



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE ABBES LAGHROUR –KHENCHELA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Departement : Des Sciences De la Nature Et De la Vie

Mémoire

Présenté Pour l'obtention du Diplôme de
Master académique

FILIERE : Biologie Moléculaire et Cellulaire
OPTION : Microbiologie

Thème

**Étude phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de deux plantes médicinales:
Thymus algériensis et *Globularia alypum***

Présenté par :

- Litim Widad
- Reghis Hadia

Encadré par:

Boutarfa Soumia

Soutenu le : 14/06/2015

Jury de soutenance

Président : Thabet Rachid M.A.A Université Abbes Laghrou –Khenchela.

Encadreur : Boutarfa Soumia M.A.A Université Abbes Laghrou –Khenchela.

Examinatrice: Masai Alima M.A.A Université Abbes Laghrou –Khenchela.

Promotion : juin -2015

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier en premier lieu **DIEU** Miséricordieux qui m'a donné la volonté et la patience pour achever ce mémoire

J'adresse ma profonde gratitude à mon promotrice **Melle. BOUTARFA Soumia** Qui m'a permis de mener à bon terme ce mémoire de thèse.

Ils vont directement à toutes les personnes qui ont croisé mon parcours de travail et qui m'ont offert leur aide, également **M. KARA ALI, W.** Pour leur soutien quand j'en ai eu besoin.

Je remercie aussi l'ensemble de membres du laboratoire de Biologie , pour leur soutien qu'ils m'ont apportés, notamment **Mr AOUAIDJIA ABDNOUR.** Je terminerai en disant que si l'on se retrouve seul devant le jury, c'est que derrière soi une famille, des amis nous servent de soutien et il est très agréable de leur offrir ce travail en guise de reconnaissance.

Dédicaces

A mon meilleur professeur. Aucun ne
Saurait exprimer la profondeur de ma
Reconnaissance, mon attachement, **Mon Père.**

A celle qui est sacrifié pour moi tout le temps
Et porte dans son cœur se que le monde
Reforme de respect et d'affection, cette source
Réchauffant de tendresse, et d'espoir. **Ma Mère.**

A mes frères

ABDELHAFIDH et sa femme

ET Amer

A mes chères sœurs : **SABAH** et sa fils (**Mohamed Islam**),

Nassima, et Chahrazed

Et une spéciale dédicace a mes beaux-frères

Walid et Mounir

A mes amis les plus proches de mon cœur

Hadia, Amel Baali, Amel Bouzakri, Hanane, Meriem Remadnia

A tous ceux qui ont participé à réalisation de ce travail.

Widad

Dédicaces

A celui qui m'a aidé à tous les obstacles

Et s'est sacrifié tout pour moi

Je lui rends un vibrant hommage

Mon cher père

A celle qui a veillé les auprès de moi

Source sans réserve de tendresse et d'espoir

Ma chère maman

A ceux qui ont attendu ce jour, mes sœurs : *Nafissa,*

Sabah, Radja

A mon seul frère

Hichem

A mes fideles amies :

Hanen, Imen, zaineb, Hadjer, Widad

Hadia

Table De matière

Liste des abréviations	i
Liste des figures.....	ii
Liste des tableaux	iii
Introduction Générale.....	1
Chapitre I. Revue bibliographique	
I. La phytothérapie et les produits naturels.....	2
I.1. Les produits naturels des plantes et leurs activités biologiques.....	2
I.1.1. Les flavonoïdes.....	3
I.1.2. Les tannins.....	3
I.1.3. Les terpènes.....	4
I.1.4. Les saponosides.....	4
I.1.5. Les coumarines.....	4
I.1.6. Les alcaloïdes.....	4
II. La plante médicinale <i>Thymus algériensis</i>	5
II. 1. Description de la plante et la répartition géographique.....	5
II.2. Place dans la systématique.....	6
II.3. Composition chimiques.....	6
II.4. Utilisation en médecine traditionnelle.....	6
III. La plante médicinale <i>Globularia alypum</i>	6
III.1. Description de la plante et la répartition géographique.....	7
III.2. Place dans la systématique.....	8
III.3. Composition biochimique.....	8
III.4. Utilisation en médecine traditionnelle.....	8
IV. Les agents antimicrobiens.....	10
IV.1. Les différents types d'agents antimicrobiens.....	10
IV.1.1. Les agents physiques.....	10
IV.1.1.1. La chaleur.....	10
IV.1.1.2. Les radiations.....	11
IV.1.1.3. Pression	11
IV.1.1.4. Elimination mécanique.....	11
IV.1.2. Les agents chimiques.....	11

IV.1.3. Les agents chimio thérapeutiques.....	11
IV.1.4. Les substances naturelles.....	12
IV.2. La résistance aux antibactériens.....	12
V. les flavonoïdes.....	13
V.1. Définition.....	13
V.2. Structure.....	14
V.3. Classification.....	14
V.4. Rôle physiologique des flavonoïdes pour les plantes.....	15
V.5. Propriétés biologiques.....	16
V.5.1. Activité antioxydant.....	16
V.5.2. D'autres activités biologiques.....	16
VI. L'activité antimicrobienne des flavonoïdes.....	17
VI.1. L'activité antibactérienne.....	17
VI.2. L'activité antifongique.....	17
VI.3. L'activité antivirale.....	18
VII. Les bactéries étudiées et le rôle pathologique.....	18
VII.1. <i>Escherichia coli</i>	18
VII.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
VII.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	19

Chapitre II. Matériels et Méthodes

I. Matériel.....	21
I.1. Matériel biologique (Echantillonnage).....	21
I.1.1. Matériel végétal.....	21
I.1.2. Les souches bactériennes.....	21
I.2. Réactifs chimiques et instrumentations.....	21
II. Méthodes.....	22
II.1. Préparation des extraits méthanolique.....	22
II.2. Screening phytochimique des extraits végétaux.....	23
II.2.1. Mise en évidence des tanins.....	23
II.2.2. Mise en évidence des saponosides.....	23
II.2.3. Mise en évidence des flavonoïdes.....	23
II.2.4. Mise en évidence des composés réducteurs.....	23
II.2. 5. Mise en évidence des alcaloïdes.....	23

II.3. Dosage des flavonoïdes.....	24
II.4. Etude de l'activité antibactérienne.....	24
II.4.1. Méthode des disques -Tests d'efficacité.....	25
II.4.2. Détermination de la concentration Minimale inhibitrice (CMI).....	26
II.4.3. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB).....	26
II.5. L'analyse statistique.....	26

Chapitre III. Résultats et Discussions

I. Le rendement des extraits.....	28
II. Tests de mise en évidence de certains composés Phytochimiques.....	28
III. Dosage des flavonoïdes.....	30
V. Résultat de l'activité antibactérienne.....	31
V.1. L'activité antibactérienne testée par la méthode des disques.....	31
V.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	35
V.3. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide(CMB).....	36
Conclusion et perspectives.....	39
Références bibliographiques.....	40

Annexes

Résumé

Abstract

Résumé Arabe

IPA: Institut Pasteur d'Algérie

LOST : Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques

MeOH : Méthanol

mg : milligramme

MgEQ/gE : MilligrammeEquivalent de quercétine par g d'extrait

MH : Muller-Hinton

ml : millilitre

mm : millimètre

NaOH : Hydroxyde de sodium.

nm : nanomètre

OMS : l'Organisation Mondiale de la Santé

PAM: Plantes Aromatiques Médicinales.

SAR: *Staphylococcus aureus résistante*

SAS: *Staphylococcus aureus sauvage*

SD: Standard déviation

SIDA :Symptôme d'immunodéficience acquise

Spp: Espèce

T. algeriensis :*Thymus algeriensis*

UV:Ultraviolet

V: Volume.

ZI:Zone d'inhibition

Liste des abréviations

AcOEt : Acétate d'éthyle

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADV : Adénovirus

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphates

BaCl₂ : Chlorure de Barium

°C : Degré celsius

cm : Centimètre

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité Optique

EMGA : L'extrait méthanolique de *Globularia alypum*

EMTA : L'extrait méthanolique de *Thymus algeriensis*.

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

E. coli: *Escherichia coli*

g : gramme

Gent : Gentamicine

G.alypum: *Globularia alypum*

h : heure

HCl : Acide chlorhydrique

HIV: Human Immunodeficiency Virus

H₂O: Eau

H₂SO₄: Acidesulfurique

HV: virus de l'herpès

Liste des Figures

N°	Titre	Page
01	Photo de <i>Thymus algériensis</i>	05
02	Photo de <i>Globularia alypum</i>	07
03	Représentation des mécanismes de résistance aux antibiotiques	13
04	structure de base des flavonoïdes	14
05	Structures chimiques de quelques flavonoïdes	15
06	Aspect morphologique des micro-organismes étudiés	20
07	Préparation de la poudre végétale	22
08	L'aromatogramme ou méthode des disques -Tests d'efficacité	27
09	Courbes d'étalonnage de la quercétine	34
10	Teneur en flavonoïdes totaux	35
11	Photo montrant l'effet antibactérien de l'EMTA et Gentamicine contre <i>Staphylococcus aureus</i> sauvage, <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> résistante, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (A, B, C et D)	37
12	Photo montrant l'effet antibactérien de l'EMGA et Gentamicine contre <i>Staphylococcus aureus</i> sauvage, <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> résistante, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (A, B, C et D)	38
13	Photos montrant la détermination de la CMB d'extrait méthanolique de <i>T.algeriensis</i> sur les quartes souches (SAR, <i>E. coli</i> , SAR, <i>P. aeruginosa</i> (A, B, C,D).	42

Liste des Tableaux

N°	Titre	Page
01	Les compositions chimiques isolées de type <i>Globularia alypum</i>	09
02	Le rendement d'extrait méthanolique de <i>Thymus algeriensis</i>	32
03	Analyse phytochimique préliminaire d'extrait méthanolique de <i>G. alypum</i> et <i>T. algeriensis</i>	33
04	Diamètre des zones d'inhibition	36
05	Concentration minimale inhibitrice de l'EMTA	39
06	Concentration minimale inhibitrice d'EMGA	40
07	Concentration minimale bactéricide des extraits de <i>T. algeriensis</i>	40
08	Interprétation des résultats de CMI et CMB de l'extrait méthanolique de <i>T.algeriensis</i> .	41

Introduction
Introduction

Introduction

Les échecs thérapeutiques causés par la résistance aux antibiotiques ont obligé la communauté scientifique à chercher d'autres substances douées d'activité antimicrobienne pour remédier à ce problème de santé publique. Les produits naturels parmi lesquels les essences végétales issues de plantes médicinales sont une source prometteuse et un moyen efficace pour l'éradication des germes résistants aux antibiotiques puisqu'elles possèdent un réservoir de molécules anti-infectieuses importantes ayant des propriétés contre des bactéries à Gram positif et Gram-négatif.

Les plantes aromatiques et médicinales « PAM » constituent une source de substances ayant des vertus thérapeutiques diverses, utilisées depuis l'Antiquité dans la pharmacopée traditionnelle de nombreux pays. Ces extraits volatils ont été utilisés en traitement des maladies infectieuses présentes avant la découverte des micro-organismes.

La découverte des antibiotiques en 1929 par Alexandre Fleming, qui a mis en évidence pour la première fois l'action de la pénicilline, a donné l'espoir que les antibiotiques puissent éradiquer les pathologies causées par les infections, mais l'apparition de la résistance des micro-organismes a fait douter de cette opinion et posé le problème de l'échec de l'antibiothérapie.

L'objectif de notre travail vise à démontrer la richesse de notre plante *Globularia alypum* et *Thymus algeriensis* en flavonoïdes et à déterminer l'activité antibactérienne *in vitro*. Pour cela notre étude englobe deux aspects, dont le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur la préparation de différents extraits. Deux types d'extrait ont été préparés à partir de la poudre de la partie aérienne de *Globularia alypum* et *Thymus algeriensis* ; un extrait méthanolique de *Globularia alypum* (EMGA) et un extrait méthanolique de *Thymus algériensis* (EMTA). Le second aspect porte également sur les tests de mise en évidence dans EMGA et EMTA, une étude quantitative afin d'estimer la quantité des flavonoïdes dans ces deux extraits.

Un autre volet de ce travail est consacré à une évaluation de l'activité antibactérienne *in vitro* des différents extraits sur des souches test : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* résistante (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* sauvage (ATCC 43300), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

Chapitre I

Revue bibliographique

Chapitre I : Revue bibliographique

Chapitre I. Revue bibliographique

I. La phytothérapie et les produits naturels

La phytothérapie existe depuis la préhistoire ; c'est le Traitement ou prévention des maladies par l'usage des plantes(1,2).Ce terme vient de grec:"phytos" la plante et "thérapie" la thérapie (3).

Malgré les multiples progrès de la médecine moderne, il y 'a un net regain d'intérêt vis-à-vis de la phytothérapie. Selon OMS (Organisation Mondiale de la Santé) plus de 80% de la population mondiale ont recours à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de la santé (4), la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont pas eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria.Elle connaît de nos jours un nouveauexceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques commel'asthme ou l'arthrite (5).

I.1. Les produits naturels des plantes et leurs activités biologiques

Les plantes produisent un grand nombre de composés, Ils ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie:en alimentation, en cosmétologie et en dermopharmacie .Ils se sont surtout illustrés en thérapeutique et dépassent actuellement 100 000 substances identifiées. Les produits naturels des plantes peuvent être classés en deux catégories, les métabolites primaires et les métabolites secondaires(15).

➤ Les métabolites primaires

Ils ont un rôle essentiel pour le métabolisme et le développement végétal, se retrouvent dans toutes les espèces(6) caractérisé par leur caractère nécessaire et vital à la survie des cellules, de l'organisme qui sont :

- les glucides, source d'énergie, paroi cellulaire
- les lipides, source d'énergie, membranes cellulaires
- les acides aminés, source primaire déconstruction des protéines(7).

➤ **Les métabolites secondaires**

Ils ne sont pas issus directement lors de la photosynthèse, mais résultent des réactions chimiques ultérieures(8).

Bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi pollinisateurs et disséminateurs. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires(9), font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures in vivo et in vitro de tissus végétaux. Ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicaux, en particulier les flavonoïdes et les proanthocyanidines(10).

I.1.1. Les flavonoïdes

Ils constituent le plus large groupe des phénols dans la plante. Sont identifiés jusqu'à maintenant sont de 4000 composés; ces pigments sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles aussi sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV (11).

En plus de leur rôle de la pigmentation des végétaux certains de ces composés présentent des activités biologiques d'intérêt. telles que des actions anti antioxydants(12), anti inflammatoires(13, 14,15), antihypertenseurs, anti influenza(15), antifongiques et antivirale(15,16).

I.1.2. Les tannins

Les tannins sont des composés phénoliques très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes et les dicotylédones(17). Leur importance est liée à la propriété qu'ils ont de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible = le cuir : le tannage. Le tannin va impliquer l'établissement de liaisons entre les fibres de collagène de la peau d'où résistance à l'eau, à la chaleur et à l'abrasion, cependant on a deux grands groupes de tannins(18).

- ❖ **Les tanins hydrolysables:** qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins

soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins(19).

- ❖ **Les tanins condensés:**Sont appelés proanthocyanidines parce que leur oxydation en milieu alcool-acide entraîne la formation des pigments anthocyanidiques tels que les cyanidines (à partir de procyanidines) et les delphinidines(20).

I.1.3. Les terpènes

Ils sont des constituants habituels des cellules végétales, impliqués ou non dans des fonctions métaboliques essentielles. L'étude de leur métabolisme connaît un regain d'intérêt par suite du développement des méthodes analytiques auxquelles est venu s'ajouter l'outil moléculaire(21).

Des études faites sur des animaux ont montré que certains classe des terpènes telle que : le béta sitostérol, comme son glucoside, possèdent des propriétés anti –inflammatoire, antipyrétique, antinéoplasique, et immuno-modulatrice(15). Aussi, les terpènes sont largement utilisés dans le secteur de la nutrition humaine (saveur, conservateur) et l'industrie du parfum (22).

I.1.4. Les saponosides

Mot latin "sapon", l'herbe à savon(23). ils sont des substances végétales de nature glycosidique, composées de carbone, d'hydrogène et d'oxygène(24).

Il semble que les saponosides jouent un rôle de défense du végétal contre les pathogènes microbiens. Les interactions mises en jeu avec les stérols de la membrane ont pour conséquence des propriétés hémolytiques et une activité spermicide de certaines molécules(9)

I.1.5. Les coumarines

Historiquement le nom de coumarine vient de « cumaru » qui est le nom dans une langue amazonienne, de l'arbre de Tonka (*Dipteryx odorata* Willd, Fabaceae) dont les fèves contiennent 1 à 3 % de coumarine. Les coumarines ont été isolées pour la première fois en 1820. Elles sont présentes en quantités plus faibles dans plusieurs plantes comme le mélilot, la sauge scellée. On la trouve aussi dans le miel(25). Ils sont cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du cœur), hypotensives ; elles sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées(26).

I.1.6. Les alcaloïdes

Le terme **alcaloïde** a été introduit au début du XIX^{ème} siècle par Meisner. Ce sont des substances organiques d'origine naturelle (le plus souvent végétale) (27). La plupart ont des propriétés basiques, contenant de l'azote (15) et sont pharmacologiquement actifs, ils sont utilisés aussi comme antalgiques majeurs (morphine), pour combattre l'excès d'acide urique (colchicine), comme substance paralysante/stimulante (curare, caféine), comme anticancéreux (vinblastine, vincristine). Ils sont aussi de forts agents antimicrobiens (28).

II. La plante médicinale *Thymus algériensis*

II. 1. Description de la plante et la répartition géographique

Thymus algériensis est une espèce endémique de l'Afrique du Nord. Au Maroc, elle est rencontrée dans le Moyen Atlas, le Haut Atlas, l'Anti Atlas occidental, le Rif et l'Oriental (Forêt de Béni Snassen). C'est une plante vivace à entre-nœuds longs de 4 à 7 mm naissant en touffe de la souche courte et ligneuse. Tige, au moins sur les rameaux jeunes, à pilosité répartie uniformément tout au long de l'entre-nœud. Les feuilles florales peu différentes des feuilles caulinaires. Peu dilatées (29,30) (Figure 01.).



Figure 01: Photo de *Thymus algériensis* (29).

II.2.Place dans la systématique (30).

Règne:*Plantae*

Sous règne: *Tracheobionta*

Division :*Magnoliophyta*

Classe:*Magnoliopsida*

Sous classe : *Astériidae*

Ordre:*Lamiales*

Famille :*Lamiaceae*

Genre:*Thymus*

Espèce: *Thymus algeriensis*

II.3.Composition chimiques

La composition chimique de *Thymus algériensis* est marquée par la présence du thymol, α -terpinène, β -cymène et de carvacrol comme constituants majoritaires (31).

II.4. Utilisation en médecine traditionnelle

Le thym est utilisé fréquemment par les populations autochtones grâce à ses diverses propriétés importantes. Citant ci-dessous les plus connues et appliquées : cette plante aromatique très odorante, utilisée dans la cuisine algérienne pour faire les différents plats ; recommandée contre tous les types de faiblesse, et indiquée pour les crampes d'estomac, les inflammations pulmonaires et les palpitations, ainsi que les affections de la bouche, contusions (lésion produite par un choc sans déchirure de la peau), et les accidents articulaires. Il est considéré aussi comme l'un des remèdes populaires les plus utiles et efficaces, dans le traitement des affections respiratoires ; rhume, grippe, et angine. Il contribue également dans le nettoyage et la cicatrisation des plaies, et aussi l'expulsion des gaz intestinaux (30).

III. La plante médicinale *Globularia alypum*

La famille des *Globulariacées* comprend deux genres dont *Globularia* et *Poskea*; et environ 30 espèces répandues en Europe et le nord africain (32,33).

Le genre *Globularia* représenté en Algérie par 3 espèces: *Globularia eriocephala*, *Globularia vesceritensis*, Ils sont présents dans le Sahara central (Hoggar, Tassili) (33), et le type de *Globularia alypum* qui est l'objectif d'étude dans cette recherche.

III.1. Description de la plante et la répartition géographique

Son nom *Globularia* fait référence à la forme globuleuse de l'inflorescence et le terme *alypum* vient du grec alypon qui signifie calmer la douleur(34).

Globularia alypum appelée communément Tasselgha, Aux tunes elle est appelé « Zerga » (33), Et au Maroc est appelée "EinLarne"(35). C'est un arbuste rameux d'environ 60 cm de hauteur. Feuilles coriaces, glauques, de forme ovale, se terminant en une petite pointe. Fleurs réunies en capitules denses à bractées ciliées. Atteignant près de 2 cm de diamètre et disposées le long et au sommet des tiges. Calice velu à 5 dents aigues. Corolle bleue, bilabée, ayant la lèvre supérieure très courte et l'inférieure, à 3 dents ; 4 étamines, à anthères d'un bleu violacé. 1 style. Fruits akéniens, La période de floraison de cette plante se situe en hiver au début du printemps (janvier à mars/avril) (34)(Figure 02).

Cette plante originaire de sud de l'Europe sur le pourtour méditerranéenne jusqu'en Grèce, Afrique du nord (Algérie, Maroc jusqu'au Sahara) (36), et Asie mineure (Egypte, Arabie) en forets, dans les terrains rocaillieux (34)



Figure 02. Photo de *Globularia alypum* L(37)

III.2. Place dans la systématique(33)

Règne : *Plantes*

Sous-règne : *Tracheobiontes*

Embranchement : *Spermatophytes*

Sous embranchement : *Angiospermes*

Division : *Magnoliophytes*

Classe : *Magnoliopsides*

Sous classe : *Asteridae*

Ordre : *Scrophulariales*

Famille : *Globulariaceae*

Genre : *Globularia*

Espèce : *Globularia alypum*

III.3. Composition biochimique

La majorité des études phytochimiques effectuées sur un nombre important d'espèces du genre *Globularia*, montrent la richesse ainsi que la diversité structurale de ces dernières en métabolites secondaires incluant en particulier les flavonoïdes, les phényléthanoïdes et des iridoïdes glycosides(38,39) (Tableau.1).

III.4. Utilisation en médecine traditionnelle

La plante est connue en pharmacopées traditionnelle pour ses propriétés curatives; antidiabétique, laxative, cholagogue, stomachique, sudorifique et purgative(40),

Au nord de l'Afrique elle est utilisée pour calmer les douleurs et pour traiter les douleurs rhumatismales(41). Des études bibliographiques confirment que les espèces du genre *Globularia* présentent des activités antimicrobiennes, cytotoxiques, cytostatiques, anti-oxydante et anti-inflammatoires (34).

Tableau1. Les compositions chimiques isolées de type *Globularia alypum*

chercheurs (année)	Parties étudiées	les produits isolés de la plante	Références
Sanchez (1933) Espagne	/	- Acide cinnamique - Acide pyrocatechuique	(42)
Bernard, P. (1974) France	Feuilles	- Globularine -acide cinnamique - Catalpol -acide caféique - Rutine -acide ferulique -Luteoline 7-glucoside -acide p-coumarique -Acide chlorogenique	(43)
Chaudhuri R.K. (1979 et 1981)Suisse	plante entière	-Globularimine -Globularine -Globularinine -Catalpol -Globularidine -liriodendrine -Globularicisine -syringine	(44), (45)
BenhassineB. (1982) Tunisie	plante entière	-4',7-dihydroxyflavone - Apigenine-7-gucoside -Quercetol -Luteoline-7-glucoside -8-C-glucosyl-4',7-dihydroxyflavone -Rutoside -Cyanidine -Peonidine -Acide vanillique, Acide syringique -Acide caféique,Acide sinapique -Acide p-coumarique, Acide ferulique -Acide b-resorcylique	(46)
Louis S. (1999) France	Feuilles	-Globularine	(47)

IV. Les agents antimicrobiens

On désigne par agent antimicrobien tout agent chimique, physique ou biologique inhibant la croissance et/ou la survie des micro-organismes(48,49).

Les agents antimicrobiens agissent par différents mécanismes et peuvent être utilisés de diverses manières, selon les objectifs recherchés et selon leur spécificité d'action, cette dernière peut globalement être répartie en différents types :

- ❖ Bactéricide ou (germicide) : pour les agents ayant une action létale sur les bactéries.
- ❖ Bactériostatique: pour les agents qui inhibent les bactéries sans les tuer(50).

IV.1. Les différents types d'agents antimicrobiens

La destruction ou l'arrêt de la prolifération des microorganismes nécessite l'utilisation d'agents antimicrobiens. On distingue quatre catégories : les agents physiques, chimique, chimiothérapeutiques et les substances naturelle (51).

IV.1.1. Les agents physiques

De nombreux agents physiques exercent un effet antagoniste vis-à-vis des microorganismes. La chaleur ou certains types de radiations ont une action létale qui permet leur emploi dans la stérilisation de différents milieux. Les agents les plus fréquemment employés sont la chaleur (humide ou sèche), les radiations, la pression et l'élimination mécanique(48,52).

IV.1.1.1. La chaleur

C'est encore un des moyens les plus couramment de destruction de microorganismes. Il faut distinguer deux grands types d'application: La chaleur humide et la chaleur sèche(50).

➤ La chaleur humide

La chaleur humide tue les virus, les bactéries et les mycètes, la stérilisation à la vapeur est réalisée dans un autoclave(50).

➤ La chaleur sèche

La mort des microorganismes résulte apparemment de l'oxydation des constituants cellulaires et la dénaturation des protéines. La stérilisation par la chaleur sèche est réalisée dans des fours éclectiques (four pasteur)(50).

IV.1.1.2. Les radiations

La stérilisation ou la réduction d'une population microbienne d'un milieu donné, peuvent être efficacement menées par l'emploi de différents types de radiation électromagnétiques : micro-onde, rayons ultraviolets, rayons gamma, rayons bêta, rayons alpha, rayons x. chaque types de radiations a une longueur d'onde spécifique qui détermine son énergie, son mécanisme d'action et son domaine d'application(49,50).

IV.1.1.3. Pression : les fortes pressions (ultrapressions) sont capables de détruire les micro-organismes. Elles sont couramment utilisées en recherche pour faire éclater les cellules bactériennes(53).

IV.1.1.4. Elimination mécanique: deux procédés mécaniques permettent d'éliminer les micro-organismes d'un milieu liquide ou ils sont en suspension : la filtration et la centrifugation (53).

IV.1.2. Les agents chimiques

Les agents chimiques antimicrobiens sont très nombreux. Leur choix dépend de l'usage auquel ils sont destinés, de leur activité, de leur toxicité, de leur stabilité, de leur pouvoir corrosif ou colorant, de leur odeur ... etc. Il existe des réactions de résistances aux substances antimicrobiennes : (métaux, les antibiotiques, etc.), qui aboutissent à l'apparition de biotype nouveau(50). Parmi ces agents: Les alcools, les colorants, les oxydants et les métaux lourds et leur sels (51).

- **Les alcools :** dénaturent les protéines, les solutions contenant de 60 % à 95 % d'alcool sont les plus efficaces (54);
- **Les colorants :** les principaux sont : bleu de méthylène et vert brillant (50);
- **Les oxydants :** l'eau oxygénée, le chlore et ses dérivés;
- **Les métaux lourds et leur sels :** mercure, argent, zinc, cuivre et or(53).

IV.1.3. Les agents chimio thérapeutiques

Un agent chimio thérapeutique est un composé chimique ou de synthèse qui inhibe le développement des microorganismes. Ce composé agit à faibles doses, il exerce une action très spécifique sur le fonctionnement cellulaire tout en ayant une toxicité sélective. Il inhibe le développement de sa cible ou la tue tout en étant inoffensif pour l'hôte. Dans ce groupe, on retrouve les antibiotiques, les antifongiques(55,56) et les antiviraux(53).

IV.1.4. Les substances naturelles

Les plantes sont capables de produire une grande diversité de produits (substances naturelles) ne participant pas à leur métabolisme de base, mais représentant plutôt des produits du métabolisme secondaire. Nous pouvons citer comme exemple les alcaloïdes, les terpènes, les stéroïdes, les polyphénols, les huiles essentielles. Parmi ces composés, les polyphénols représentent l'un des groupes les plus importants du fait qu'ils aient une faible toxicité et de nombreux avantages biologiques, notamment thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétologiques et alimentaires.

Ces dernières années, nous avons assisté à un grand regain des phytothérapeutes pour les produits riches en polyphénols, et principalement en flavonoïde ; Ces derniers ont d'ailleurs montré qu'ils avaient des propriétés biologiques très importantes et très vastes. Nous pouvons dire que ce sont notamment de grands antioxydants et antimicrobiens(17).

IV.2. La résistance aux antibactériens

La résistance aux antibiotiques est un facteur majeur compliquant le traitement des infections bactériennes et la dissémination des souches multirésistantes(57)(figure 03).

Les bactéries deviennent résistantes aux antibactériens par différentsmanières:

- ❖ La diminution de la perméabilité membranaire des bactéries à gram négatif.
- ❖ L'inactivation enzymatique.
- ❖ La modification du site d'action.
- ❖ L'augmentation de l'efflux(58).

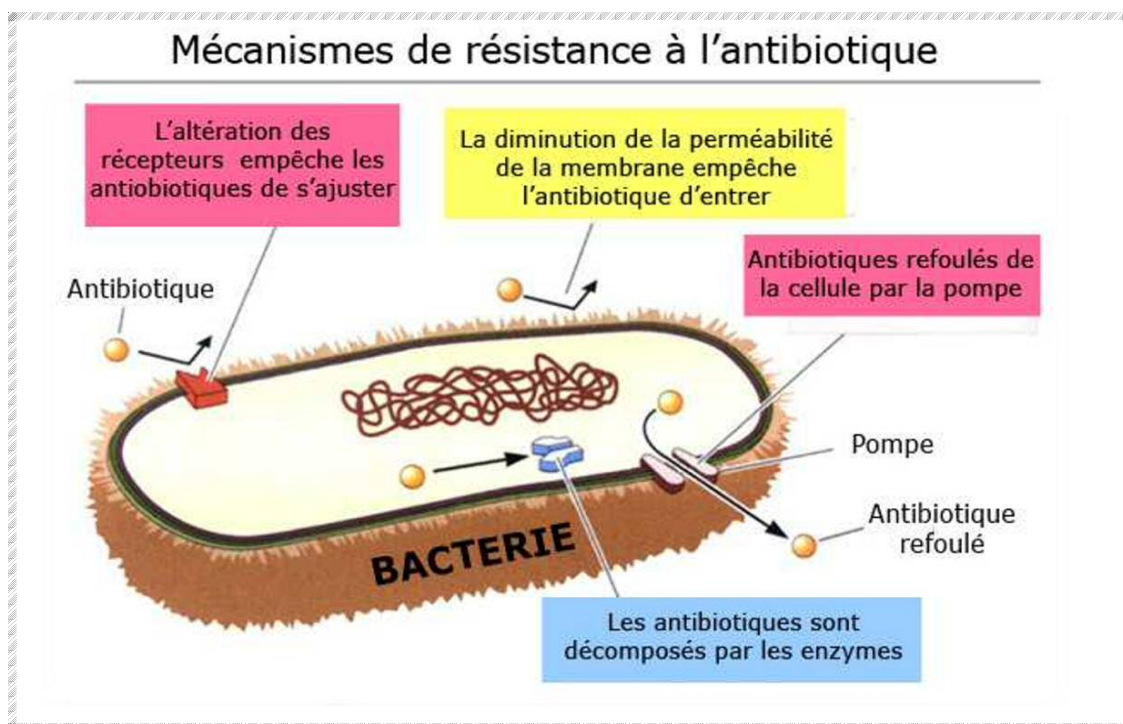


Figure 03. : Représentation des mécanismes de résistance aux antibiotiques(59).

V. les flavonoïdes

L'intérêt nutritionnel pour les flavonoïdes date de la découverte de la vitamine C, par Albert Szent-Gyorgyi, qui a constaté que les symptômes hémorragiques du scorbut, liés à la fragilité ou l'hypersensibilité des vaisseaux, étaient guéris par des extraits de Paprika et du jus de citron, riche en vitamine C et flavonoïdes : cette action a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre du mot perméabilité) (60,10). Cette notion de vitamine P n'existe plus à l'heure actuelle puisqu'elle ne correspond pas à la définition classique des vitamines. Les flavonoïdes sont considérés comme des micronutriments importants puisqu'ils peuvent jouer des rôles antioxydants ou posséder des propriétés biologiques diverses (10).

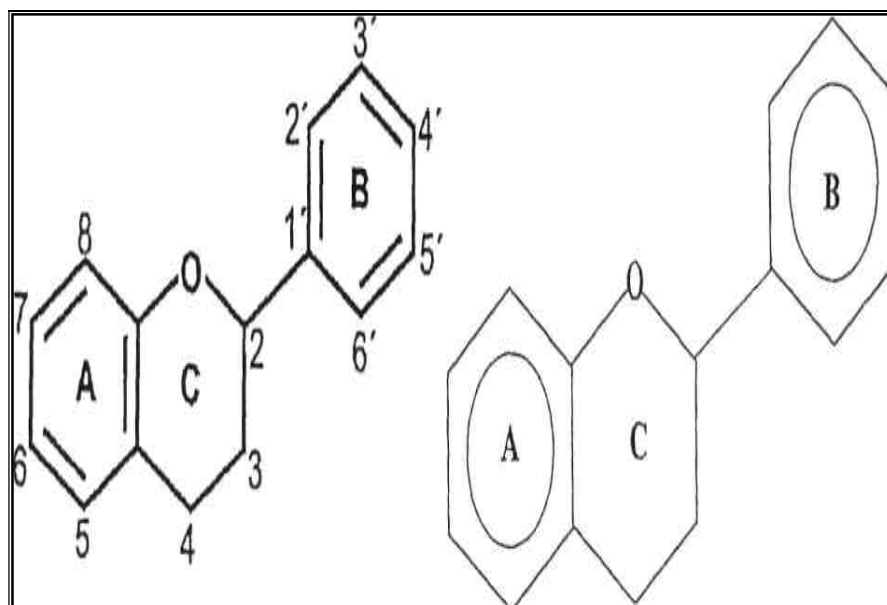
V.1. Définition

Les flavonoïdes sont amplement répandus dans le règne végétal (graines, fleurs, fruits, feuilles) (61,62). Le terme flavonoïde provenant du latin "flavus", signifiant "jaune"(52). Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux(63). Souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (64,10) qui peuvent être rencontrés dans une large variété de fruits et de légumes consommés quotidiennement par l'être humain(12).

On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits(65).présents dans tous tous les organes aériens, ils ont une teneur maximale dans les organes jeunes (feuilles et boutons floraux) (66).

V.2. Structure

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phényl chromone à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6)(60,63, 67,68) constitué de deux noyaux aromatiques, que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné(60,63), que désigne la lettre C portant des fonctions phénols libres(69), éthers ou glycosides (70)(figure 04,05).



Figures 04: structure de base des flavonoïdes(69).

V.3. Classification

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et de ce fait possèdent-le même élément structural de base. Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le Degré d'oxydation du noyau pyranique central, le noyau B relié à l'hétérocycle C dans les

Positions 2, 3 (60).

- Dans la position 2 : le flavonoïde est appelé Flavane.
- Si la position 4 de la flavane porte un groupement carbonyle la flavane est appelé Flavanone.

- Si la liaison C2-C3 dans le squelette de la flavanone est insaturée le composé est Nommé Flavone.
- Si le squelette est substitué en position 3 par un groupement hydroxyle il est désigné par le nom de Flavonol.
- Dans la position 3 : le flavonoïde est désigné par le terme Isoflavane (71). (Figure 06).

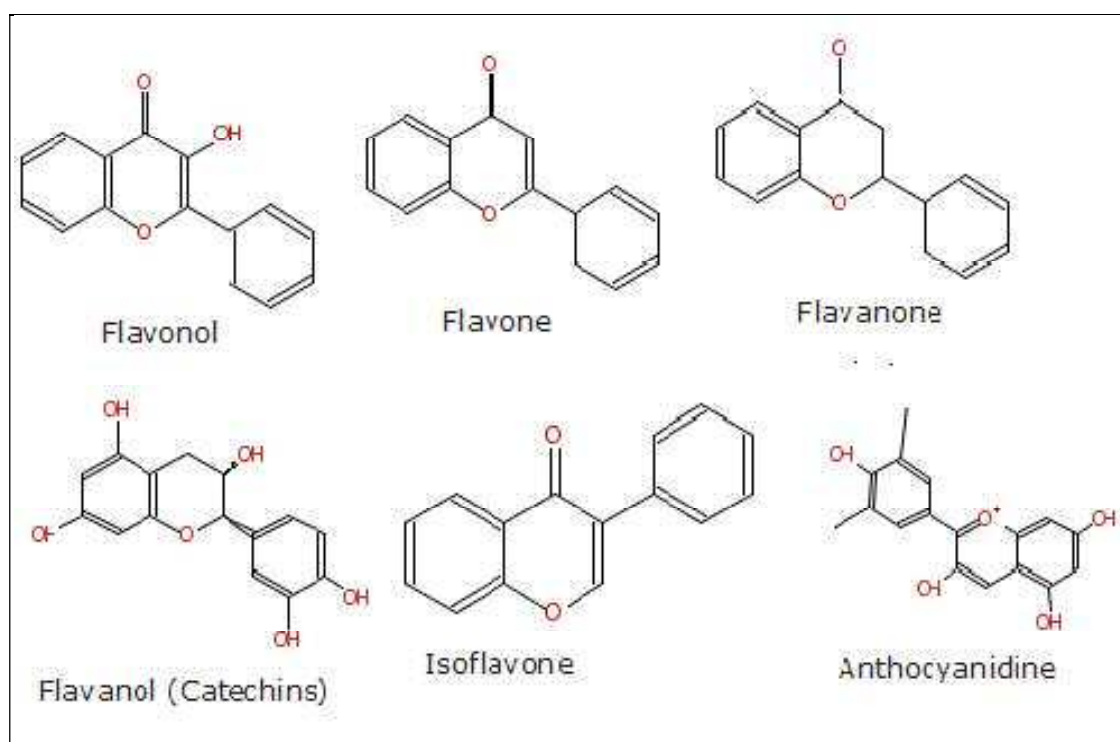


Figure 05. Structures chimiques de quelques flavonoïdes(64).

V.4. Rôle physiologique des flavonoïdes pour les plantes

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, et sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV(11).

Les pigments responsables de la coloration des fleurs représentent des signaux visuels qui attirent des animaux pollinisateurs. La plupart de ces pigments sont des anthocyanes, des aurones et des chalcones. D'autres polyphénols incolores tels que des

flavonols et des flavanones interagissent avec des anthocyanes pour altérer, par Co-pigmentation la couleur des fleurs et des fruits(72).

De plus les flavonoïdes sont impliqués dans la photosensibilisation, le transfert d'énergie, et le développement des plantes, en interagissant avec les diverses hormones, et régulateurs de croissance.

On peut également noter que les flavonoïdes ont un rôle dans le contrôle de la respiration, la photosynthèse et la détermination du sexe (73). Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines(16, 74), c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries (15,65, 75, 76).

V.5. Propriétés biologiques

La principale propriété initialement reconnue aux flavonoïdes est d'être "veino-actifs", C'est-à-dire capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance (60).

V.5.1. Activité antioxydant

Les flavonoïdes sont des composés avec une activité anti-oxydante prononcée(77). Ils expriment les propriétés anti-oxydante par : Le piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (ERO); par l'inhibition de quelques enzymes comme l'oxygénase (76,78) ou par chélation des ions métalliques comme les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^{+}) qui sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques, mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène(10) ou par la protection des systèmes de défense antioxydants de l'organisme- régénération des antioxydants liés aux membranes comme l' α – tocophérol(75,76, 77)

V.5.2. D'autres activités biologiques

De nos jours, les propriétés thérapeutiques des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités : anti-allergiques, anti-inflammatoires(13,14,15), anti-hypertenseurs, anti-influenzas(15), antivirales, antifongiques(15,16), anti-ulcéreux(14,15), anti-radicalaires, antibactériennes et anti-microbiennes(15), hépatoprotecteurs, hypocholestérolémiants, anticarcérogènes(13). Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le

réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase. Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques(15).

VI. L'activité antimicrobienne des flavonoïdes

L'activité antimicrobienne et donc anti-infectieuse des flavonoïdes a été démontrée par de nombreuses études. Elle est due principalement à la capacité de ces molécules à inhiber l'expression de l'ADN et la synthèse de certaines enzymes et protéines membranaires des microorganismes(17).

VI.1. L'activité antibactérienne

Théoriquement, les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont de puissants inhibiteurs *in vitro* de l'ADN gyrase(79). Une étude a montré l'effet bactéricide de différentes flavanones sur un *Staphylococcus aureus* (80), *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Heliotropium sinuatum*, *Proteus mirabilis* ... etc.(17).

Il a été cité que les flavonoïdes extraits avec du méthanol 95 % étaient actifs sur certaines bactéries, alors que ceux extraits avec du méthanol 60 % de la même plante ne l'étaient pas, comme c'était le cas des flavonoïdes de *Linum capitatum* contre *Staphylococcus aureus* (81).

Bien que le mécanisme d'action des flavonoïdes sur les microorganismes demeure encore imprécis, certaines études ont commencé à donner un début d'explication de leur activité antibactérienne par un exemple bien explicite ; la quercétine censée agir sur l'ADN gyrase d'*Escherichia coli* selon deux mécanismes:(82).

- ❖ Elle se fixe sur l'ADN au niveau des sites d'insertion de l'enzyme bloquant ainsi son activité.
- ❖ Elle bloque le site de fixation de l'ATP se trouvant sur l'ADN gyrase.

Dans les deux cas l'action du flavonoïde se manifeste par le clivage de l'ADN bactérien, désormais incapable de subir les modifications topologiques nécessaires à son bon fonctionnement(15).

VI.2. L'activité antifongique

Aussi comme la majorité des polyphénols, les flavonoïdes ont une activité antifongique très puissante(17,16), le plus grand nombre appartient aux flavanones et aux flavanes qui sont actives contre *Candida albicans*, Alors que plusieurs flavones polyméthoxylées

sont actives contre *Aspergillus flavus*(83). Batawita et ses collaborateurs, dans leur étude sur les flavonoïdes de *conyzaaegyptica*, ont aussi démontré que ces molécules avaient une action fongicide et fongistatique sur différents agents de mycoses: *Microsporumcanis*, *Microsporumgypseum*, *Trichophyton montagrophytes*, et *Candida zeylanoides*(17).

Quelque soit la classe de flavonoïdes considérée, il apparaît que le caractère lipophile des composés augmente l'activité, permettant aux molécules de pénétrer plus facilement à travers la membrane fongique(16).

VI.3. L'activité antivirale

La stratégie de recherche d'un composé antiviral consiste à mesurer la réduction de l'infection virale des cellules en culture, une substance peut agir à différents niveaux du cycle viral :

- ❖ au niveau de l'adsorption du virus sur la cellule hôte
- ❖ au niveau de la pénétration du virus dans la cellule hôte
- ❖ au niveau la de réplication du virus et la synthèse des protéines virales
- ❖ au niveau de l'assemblage et de la sortie du virus hors de la cellule hôte(2).

Les flavonoïdes sont aussi connus par l'activité antivirale, principalement contre le rétrovirus HIV (Human Immunodeficiency Virus) responsable du symptôme d'immunodéficience acquise (SIDA)(17,74)), le virus d'influenza(17,70), le virus de l'herpès (HV), et l'adénovirus(ADV), et le virus de la grippe A (17).

Certains chercheurs ont d'abord suggéré que ces polyphénols agissaient comme inhibiteurs de la transcriptase et/ou la transcriptase reverse de l'agent viral et de l'ADN et l'ARN polymérase de la cellule hôte ; bloquant ainsi tout le processus infectieux. D'autres travaux plus récents ont ensuite démontré que les flavonoïdes inhibaient plus exactement la synthèse de l'ARNm viral. Ceci, impliquait que les flavonoïdes n'intervenaient pas dans l'absorption des agents viraux, mais plutôt à un stade plus avancé impliqué dans la réplication virale (17).

VII. Les bactéries étudiées et le rôle pathologique

VII.1. *Escherichia coli*

E.coli est une bactérie qui fait partie de la famille des *Entérobactériaceae*(84), caractérisé par des bacilles à de coloration de Gram négatif, non sporulant, aéro-anaérobie facultatif,

mésurant de 2 à 4 μm de long et d'un diamètre d'environ 0.6 μm (85), germe que l'on trouve le plus communément des les intestins de l'homme et des animaux à sang chaud. Le plus souvent les souches d'*E.coli* qui colonisent l'appareil gastro-intestinal sont des commenseux inoffensifs(97).

Les études épidémiologiques font appel à la sérotypie, la lysotypie, et aux méthodes génétiques pour distinguer les différents types d'*E.coli*. Mais il n'existe pas de marqueurs phénotypiques spécifiques permettant de séparer les souches pathogènes des souches non pathogènes. Toutefois certaines propriétés atypiques telles que, le fait d'être lactose négatifs ou de ne pas produire d'indole à 40°C, sont plus répandues parmi les souches pathogènes qui, Ces dernières responsables de maladies intestinales qui varient en gravité, des formes bénignes jusqu' à des formes graves même être mortelles (le syndrome est mortel dans 20 à 30% des cas)(86).

VII.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Ce germe appartient à la famille des *Pseudomonadaceae*(86, 87, 88). Bacille à Gram négatif, aérobie stricte, asporulé mobile par un ou plusieurs flagelles polaires(86,88). Il s'agit de bactéries d'altération ou pathogènes (parfois même redoutable est mortelle). *Ps aeruginosa* est l'espèce qui revêt d'importance dans la pollution microbienne du milieu marin. Sa présence dans l'eau est associée aux activités humaines. On le trouve dans environ 10% des matières fécales normales et fréquemment dans les eaux usées. Il possède une grande tolérance dans les gammes de température environnante bien qu'ayant une température optimale de croissance située entre 30-35°C (mésophile). On peut les isoler de la flore intestinale de l'homme et des animaux, mais leur capacité à résister à de nombreux antibiotiques et antiseptiques explique leur présence de plus en plus fréquente en milieu hospitalier(86). Ils se comportent comme des opportunistes souvent à l'origine d'infections nosocomiales(89).

VII.3. *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif qui tendent à se grouper en amas, une espèce, *Staphylococcus aureus* (staphylocoque doré), tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales(89). Sont des germes ubiquistes que l'on trouve dans l'eau, l'air, la poussière, le lait, les sols, les eaux usées, ... etc)(86).

Le principal réservoir et habitat est constitué par la nez, la gorge et la peau des animaux /humain(86). Les symptômes qui peuvent survenir dans les 2 à 4 heures qui

suivent la consommation des aliments contaminés sont : maux de tête, les nausées, les vomissements, fortes douleurs abdominales et, parfois des diarrhées(90) (fig. 7).

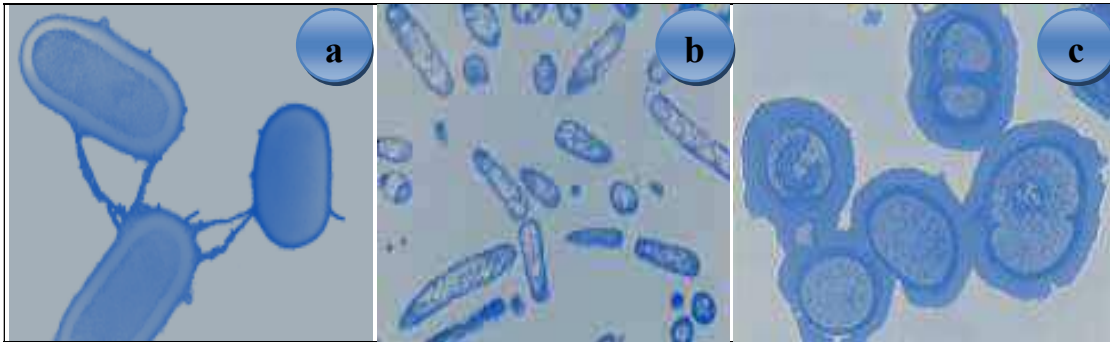


Figure 06: Aspect morphologique des micro-organismes étudiés (89).

(a) : *E. coli* ;**(b) :** *P. aeruginosa* ;**(c) :** *S. aureus*

Chapitre II

Matériel et méthodes

Chapitre II: Matériel et méthodes

Chapitre II. Matériels et Méthodes

Le travail expérimental, ayant pour objet l'étude de l'activité antibactérienne des deux plantes médicinales: *Thymus algériensis* et *Globularia alypum*. La partie expérimentale est réalisée au laboratoire de microbiologie, Université Abbés Laghrour - Khenchela-.

I. Matériel

I.1. Matériel biologique (Echantillonnage)

I.1.1. Matériel végétal

L'espèce sélectionnée «*Globularia alypum*» a été récoltée dans la région de Milia «Wilaya de Jijel» en Février 2008 et identifiée par docteur Khalef Allah Nadhira professeur au Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutique (LOST) de phytochimie, à l'université Mentouri Constantine. La partie aérienne (feuilles, fleurs et tiges) de la plante récoltée a ensuite été séchée à l'abri de l'humidité et de la lumière du soleil pendant 1 mois. Enfin, la plante sèche a été pulvérisée au broyeur pour obtenir une poudre fine pour qu'elle soit prête à l'utilisation, tandis que l'espèce *T. algeriensis* a été récoltée dans la région de Khenchela et identifiée par M Zeraib A docteur à l'université Abbés Laghrour - Khenchela.

I.1.2. Les souches bactériennes

Afin de tester le potentiel antimicrobien des extraits de *Thymus algériensis* et *Globularia alypum* in vitro, quatre souches bactériennes, deux Gram positif: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), (ATCC 43300), et deux Gram négatif: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) sont utilisées. Ces souches utilisées sont largement rencontrées dans diverses pathologies chez l'homme. Les quarts bactéries testes proviennent de la collection American types culture collection ATCC fournies par l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA).

I.2. Réactifs chimiques et instrumentations

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits: FeCl₃, acide sulfurique (H₂SO₄), HCl, acide acétique, NaOH, NH₄OH, KI, I₂, NaCl, BaCl₂, AlCl₃, diméthyl sulfoxyde (DMSO), quercétine, méthanol, n-butanol, acétate d'éthyle, chloroforme proviennent tous de Sigma-Aldrich.

Parmi l'appareillage utilisé: Rotavapeur (HAHNVAPOR), spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau (JENWAY 6305 UV/VIS), Bain Marie (MEMMERT), Etuve universelle de 5 à 220°C avec ventilation (MEMMERT), Agitateur magnétique (SCIOLOGEX), vortex (VELP), Autoclave (SANO. Clav) et Balance (OHAUS).

II. Méthodes

II.1. Préparation des extraits méthanolique

Les parties aériennes (feuilles, fleurs et tiges) de chaque plante ont été bien nettoyées et séchées à température ambiante et à l'abri de l'humidité et de la lumière du soleil. Enfin, les plantes sèches ont été pulvérisées à l'aide d'un broyeur électrique pour obtenir une poudre fine pour qu'elle soit prête à l'utilisation (Figure 08). La méthode de Markham (91) était suivie pour la préparation d'extrait méthanolique; 70 g de la poudre de *T.algériensis* est introduit dans un bécher qui contient le mélange hydroalcooliques; méthanol /H₂O (7:3) pendant une nuit (macération alcoolique). Cette technique est effectuée 2 fois, suivie chaque fois d'une filtration et soumis à une évaporation rotative à 55 °C utilisant un Rotavapeur (HAHNVAPOR) pour obtenir l'extrait brut méthanolique (91, 92).

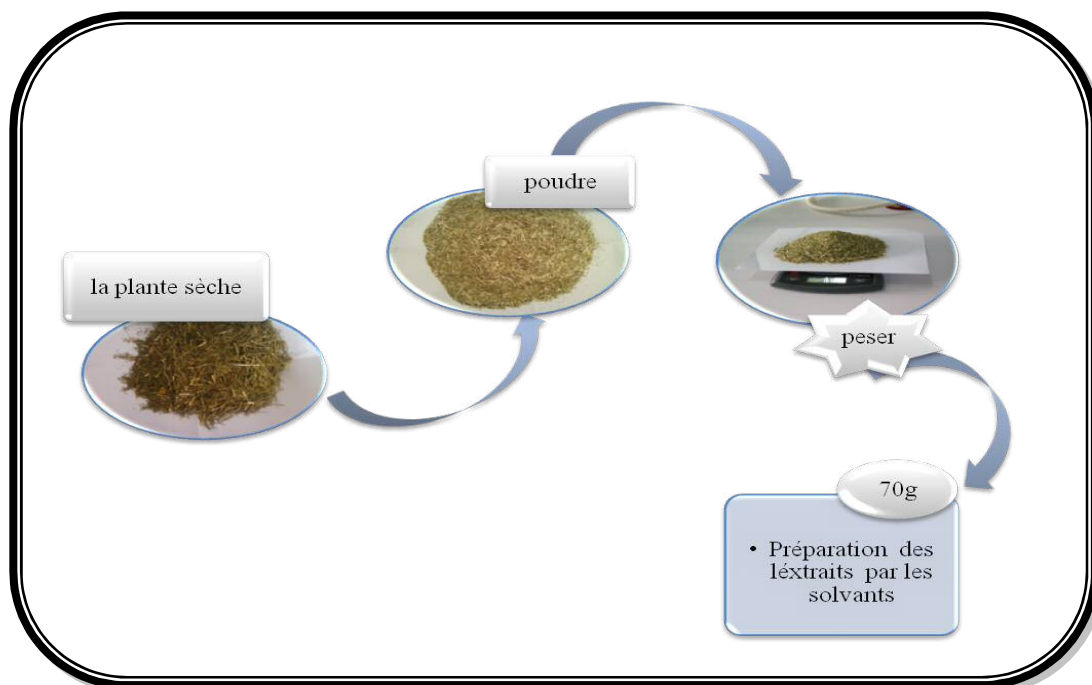


Figure 07. Préparation de la poudre végétale.

II.2. Screening phytochimique des extraits végétaux

Les tests phytochimiques sont réalisés sur les deux extraits brut méthanolique de *G. alypum* (EMGA) et *Thymus algériensis* (EMTA).

II.2.1. Mise en évidence des tanins

A 2 ml de la solution à tester, ajouter 2 à 3 gouttes de la solution de FeCl_3 à 2%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire et un précipité (laisser reposer quelques minutes) (93).

II.2.2. Mise en évidence des saponosides

- **Test 1** : 5 ml de la solution à tester sont bien mélangés avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 min. La formation d'une mousse persistante après 15 min confirme la présence des saponosides (93) ;
- **Test 2** : 5 ml de l'extrait sont mélangés avec 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. Une couleur rouge-marronne de la couche d'interface indique la présence des triterpènes hétérosidiques (94).

II.2.3. Mise en évidence des flavonoïdes

5 ml d'extrait sont traités avec quelques gouttes d' AlCl_3 (1%). La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur jaune (94).

II.2.4. Mise en évidence des composés réducteurs

Ce test est basé sur la réaction de Keller-Kiliani. A 1 ml de l'extrait ajouter 5 ml d'acide acétique contenant des traces de FeCl_3 et 5 ml d'acide sulfurique contenant des traces de FeCl_3 . La présence des composés réducteurs est confirmé par la formation de deux phases, une colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique) (9).

II.2.5. Mise en évidence des alcaloïdes

Ce test est fait pour révéler la présence ou l'absence des alcaloïdes sels. A l'extrait sec, ajouter 5 ml d' HCl (2N) au résidu et chauffer dans un bain marie. Filtrer le mélange et réaliser les tests avec le réactif de Wagner (2g de KI et 1,27g d' I_2 solubilisé dans 100 ml d'eau distillée). La présence de turbidité ou de précipitation indique la présence des alcaloïdes sels (95).

II.3. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes d'extraits, acétate d'éthyle, butanolique et éther de pétrole ont été quantifiés par la méthode du trichlorure d'aluminium (96); 1 ml de chaque extrait (préparés dans le méthanol pour avoir des concentrations convenables) a été ajouté à 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2 %, dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance a été lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans les extraits a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage $y = ax + b$ établie avec la quercétine à différentes concentrations (0-40 µg / ml, chacune a été préparée dans le méthanol) pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que les extraits servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes a été exprimé en milligrammes équivalents de quercétine par grammes du poids d'extrait (mg EQ / g E).

II.4. Etude de l'activité antibactérienne

Dans le présent test, nous avons utilisé la technique de diffusion en milieux gélosés sur boîtes de pétri en adaptant la méthode de disques décrite par Bauer (97). Pour les résultats montrant un effet positif contre les souches bactériennes testées, la concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée sur milieu liquide puis l'effet bactéricide est déterminé sur milieu gélosé.

II.4.1. Méthode des disques -Tests d'efficacité-

L'étude du pouvoir antibactérien par cette technique est identique à celui de l'antibiogramme, la seule différence c'est le remplacement des antibiotiques par des extraits : EMGA, EMTA (Figure 09).

➤ Préparation de l'inoculum

À partir d'une culture pure sur milieu gélosé des bactéries à tester (ayant au maximum 24h), racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Décharger l'anse dans 5ml d'eau physiologique stérile à 0.9%. Bien homogénéiser la suspension bactérienne. Son opacité doit être équivalente à 0.5 Mack Ferland (voire Annexe) (DO=0.08-0.10 lue à 625nm). L'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum.

➤ **L'ensemencement**

Le milieu de culture utilisé est Muller-Hinton (**voire Annexe**), qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens. Couler 20ml de la gélose Muller-Hinton dans chaque boîte de pétri, et laisser solidifier. Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, l'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum. Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées. Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de pétri 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose

NB. Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de pétri il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

➤ **Préparation des disques d'aromatogramme**

- Stériliser du papier Wattman n°3 coupé en disques de 6mm de diamètre à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes ;
- Imprégner les disques avec 30µl de différents extraits repris dans Le méthanol pour EMGA et à raison de 200 mg/ml (6mg par disque). Finalement on prépare des disques imprégnés de méthanol stérile. Ces dernières catégories de disques serviront de contrôle négatif. Des disques de Gentamicine ont été également utilisés comme antibiotique de référence (contrôle positif) pour déterminer la sensibilité de chaque souche bactérienne testée;
- Les disques imprégnés des différents extraits sont ensuite délicatement déposés à la surface de la gélose. Il en est de même pour les disques de contrôle.

➤ **Incubation et lecture**

- Les diamètres des zones d'inhibition(ZI) sont mesurés autour des disques après une pré-incubation de 30minutes à la température ambiante suivie d'une incubation à l'étuve à 37°C pendant 24 ou 48 heures selon le germe;
- Les expériences sont réalisées en deux répétitions. La souche ayant un diamètre $D < 8\text{mm}$, $9 \leq D \leq 14\text{mm}$, $15 \leq D \leq 19\text{mm}$, $D > 20\text{mm}$ est considérée respectivement comme souche résistante (-), sensible (+), très sensible (++) , extrêmement sensibles (+++).

II.4.2. Détermination de la concentration Minimale inhibitrice (CMI)

Pour chaque extrait et fraction organique, on prépare par la méthode de double dilution, une gamme de concentrations stérile, allant de 80 à 0.625 mg/ml avec l'eau distillée pour EMGA et EMTA dans le mélange stérile composé d'eau distillée et de diméthylsulfoxyde (DMSO) (v/v) pour les deux extraits. On prépare également pour chaque souche bactérienne, un inoculum dont la turbidité est ajustée à 0,5 Mc Farland. Ensuite, on ajoute dans des tubes à essai, 1 ml de chaque concentration et 1 ml d'inoculum bactérien et 2 ml de bouillon nutritif (**voire Annexe**). La gamme de concentration de chaque extrait subit alors une dilution de moitié et s'étale comme suit: 80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 et 0,625 mg/ml. On prépare également un tube témoin de croissance contenant 2 ml de bouillon nutritif, 1ml d'eau distillée stérile et 1 ml d'inoculum; puis un tube témoin de stérilité contenant 1 ml d'eau distillée stérile et 2ml de bouillon nutritif stérile. Pour l'étude d'EMGA et d'EMTA, l'eau distillée est remplacée par le mélange Eau distillée-DMSO. La gamme de concentration ensemencée, ainsi que les deux témoins sont incubés à 37 °C pendant 24 heures. Après l'incubation, on examine la croissance bactérienne, dans chaque tube, qui se traduit par une turbidité. La CMI d'un extrait vis-à-vis d'une souche donnée sera la plus petite des concentrations ne montrant aucune croissance visible de germe (**98**).

II.4.3. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

Après la lecture de la CMI, on effectue des repiquages en strie sur une gélose Muller-Hinton correspondant aux tubes sans croissance visible. Ces repiquages sont ensuite incubés à 37°C pendant 24h. La CMB sera la plus petite concentration dont le repiquage montre une croissance de germe inférieure ou égale à 0.01% de survivants (**98**).

II.5. L'analyse statistique

Toutes les expériences ont été faites en double, Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm (déviation standard (n=2)).

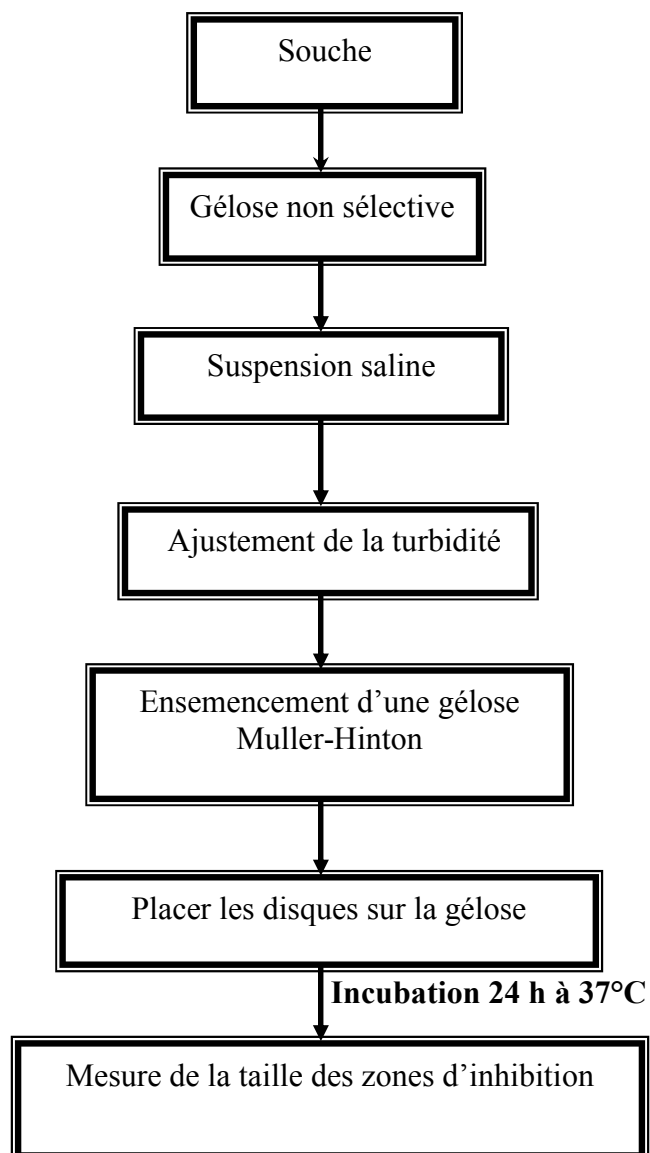


Figure 08. L'aromatogramme ou méthode des disques -Tests d'efficacité

Chapitre III

Résultats et discussion

Chapitre III : Résultats et discussion

Chapitre III. Résultats et Discussions

Le présent travail porte sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de la partie aérienne de la plante médicinale «*G. alypum* » et «*T. algeriensis* ».

I. Le rendement des extraits

L'extrait méthanolique a été préparé à partir de la poudre de la partie aérienne de *T. algeriensis* EMTA.

Tableau 02. Le rendement d'extrait méthanolique de *Thymus algeriensis*

La plante	Le poids du matériel végétal en (g)	Le rendement en (%)
<i>Thymus algeriensis</i>	75g	17.3g

L'opération de l'extraction du matériel végétale de *T. algeriensis* à l'aide du méthanol a permis d'obtenir un résidu sec d'extrait brute de 13 g.

Le calcul de rendement en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante a montré que l'échantillon de *T. algeriensis* a fourni un taux d'environ 17.33%. (Tableau 02). Cet résultat est la résultat obtenu par (99).

Car la macération est une méthode discontinue, le solvant devrait être remplacé jusqu'à ce que la matière végétale soit épuisée (100), il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie de manière générale. En effet, le rendement n'est pas relatif; il dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (100).

II. Tests de mise en évidence de certains composés Phytochimiques

Les tests phytochimiques réalisés sur EMTA et EMGA révèlent la présence de plusieurs familles de composés dont les résultats sont présentés dans le tableau 03.

Tableau 03. Analyse phytochimique préliminaire d'extrait méthanolique de *G. alypum* et *T. algeriensis*

composés	EMTA	EMGA
Tanins	<p style="text-align: center;">+</p> <p style="text-align: center;">Apparition d'une coloration bleue noire et un précipité après 3min</p>	<p style="text-align: center;">+</p> <p style="text-align: center;">Apparition d'une coloration bleue noire et un précipité après 3min</p>
Saponosides	±	-
Flavonoïdes	<p style="text-align: center;">+</p> <p style="text-align: center;">Apparition d'une couleur jaune</p>	<p style="text-align: center;">+</p> <p style="text-align: center;">Apparition d'une Couleur jeune</p>
Composés réducteurs	-	-
Alcaloïdes sels	-	<p style="text-align: center;">+</p> <p style="text-align: center;">Résultat positif avec le réactifde Wagner (présence de turbidité)</p>

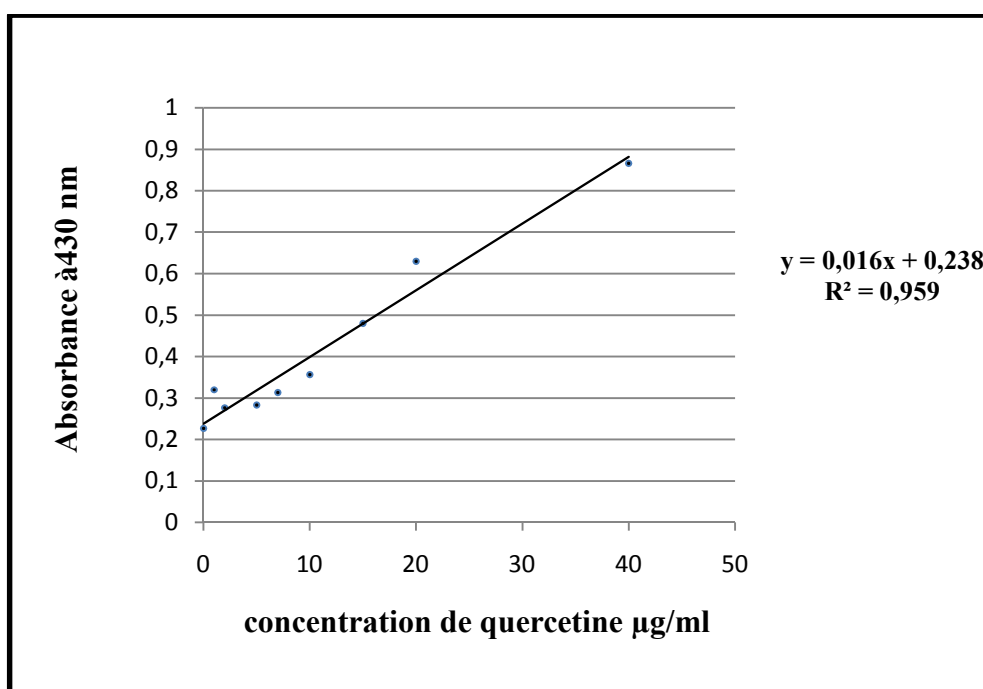
Les résultats sont interprétés comme suite:(+) Réaction positive, (±) Trace, (-) Réactions négatives.

L'étude phytochimique d'EMGA et d'EMTA a montré que; *G. alypum* contient des flavonoïdes, des tanins et des alcaloïdes sels. Alors que l'extrait de *T. algeriensis* contient des flavonoïdes, des saponosides et des tanins, car les résultats de *T.*

algeriensissent compatibles avec les résultats retrouvés par une étude sur la même plante réalisé par (Sadaoui A.S,Kasmi N.2014)(99).

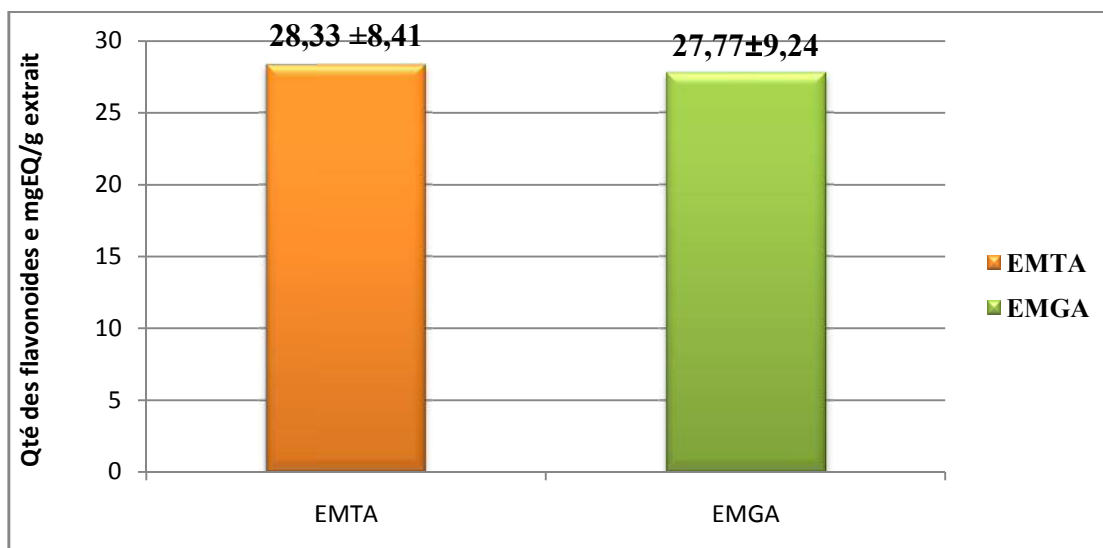
III. Dosage des flavonoïdes

L'étude quantitative des fractions issues d'extrait brut méthanolique au moyen des dosages spectrophotométriques, selon la méthode de trichlorure d'aluminiumavaient pour objectif la détermination de la teneur totale des flavonoïdes. Unecourbe d'étalonnage a été tracée pour cet objectif, établie avec la quercétine à différentes concentration. Des mesures de densité pour chaque fraction réalisées à 430 nm. Les quantités des flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en équivalent milligramme de quercétine par gramme d'extrait (Figure11) et déterminés par l'équation de type: $y=a x + b$ (Figure10).



Chaque point de la courbe représente la moyenne (n = 3)

Figure 09. Courbe d'étalonnage de la quercétine



Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3).

Figure 10. Teneur en flavonoïdes totaux

Suivant la figure ci-dessus, les teneurs en flavonoïdes, exprimés en mg équivalent quercétine par g extrait sont: (28,33. 27,77), respectivement avec l'extrait méthanolique de *Thymus algeriensis* et *Globularia alypum*. La teneur en flavonoïdes de l'extrait méthanolique de *Thymus algeriensis* est supérieure à celle de l'extrait méthanolique de *Globularia alypum*.

V. Résultat de l'activité antibactérienne

V.1. L'activité antibactérienne testée par la méthode des disques

La méthode des disques ou méthode de diffusion solide a pour but d'étudier l'activité antimicrobienne des substances naturelles. Elle a permis d'obtenir les résultats mentionnés dans le tableau 04 et les figures (12, 13).

Tableau 04. Diamètre des zones d'inhibition

Les souches bactériennes	Diamètres de zone d'inhibition (mm)		
	EMGA	EMTA	Antibiotique (Gentamicine)
<i>Escherichia coli</i> ATCC : 25922	37± 3,53	63±0	36±6,36
<i>Staphylococcus aureus</i> sauvage ATCC : 43300	33±6,36	14±0	34±2,12
<i>Staphylococcus aureus</i> résistante AT CC : 25923	20±4,24	35±0	35±4,24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC :27853	1.5±0,70	50±0	36±4,94

-Diamètre $D < 8\text{mm}$, $9 \leq D \leq 14\text{mm}$, $15 \leq D \leq 19\text{mm}$, $D > 20\text{mm}$ est considérée respectivement comme souche résistante (-), sensible (+), très sensible (++) , extrêmement sensibles (+++).

Les résultats obtenus avec l'EMGA et EMTA montrent une activité antibactérienne sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* sauvage, *Staphylococcus aureus* résistante

Tandis que *Pseudomonas aeruginosa* n'était pas sensible (1,5mm) à l'EMGA mais a présenté une sensibilité extrême (50mm) à l'EMTA. *Staphylococcus aureus* sauvage était sensible (14mm) à l'EMTA mais a présenté une sensibilité extrême

(33mm) à l'EMGA. *Staphylococcus aureus* résistante, *Escherichia coli* étaient extrêmement sensibles à l'EMGA et EMTA.

Les substances végétales de l'extrait méthanolique, ont montré un pouvoir antibactérien dont le diamètre d'inhibition le plus élevé est de (63mm) observé pour *Escherichia coli*, et (50mm) pour *Pseudomonas aeruginosa*. Par contre pour *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* résistante et *Staphylococcus aureus* sauvage, ils sont de (37mm), (35mm), et (33mm), respectivement, et enfin seulement (1,5mm) pour *Pseudomonas aeruginosa*.

Les quartes souches testées elles sont sensibles à l'antibiotique (Gentamicines)

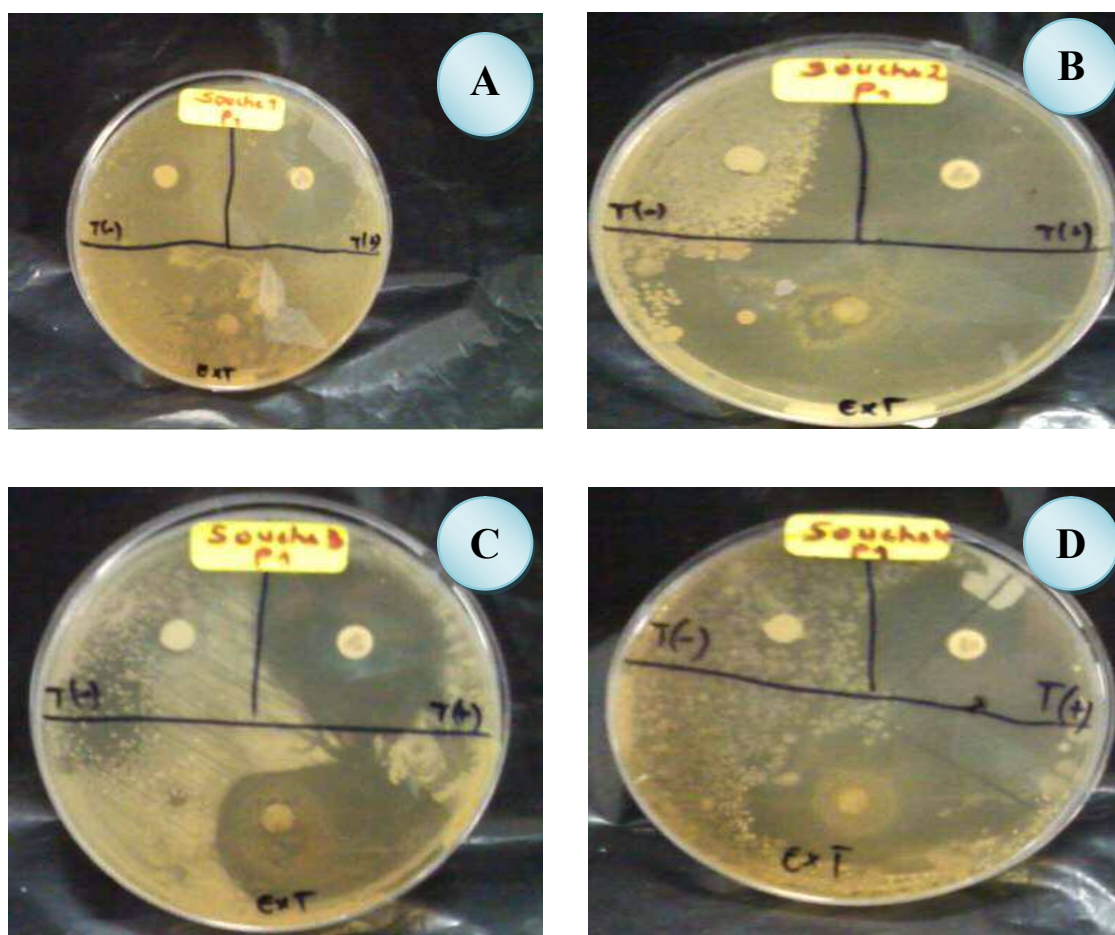


Figure 11. Photo montrant l'effet antibactérien de l'EMTA, et Gentamicine contre *Staphylococcus aureus* sauvage, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* résistante, *Pseudomonas aeruginosa* (A, B, C et D).

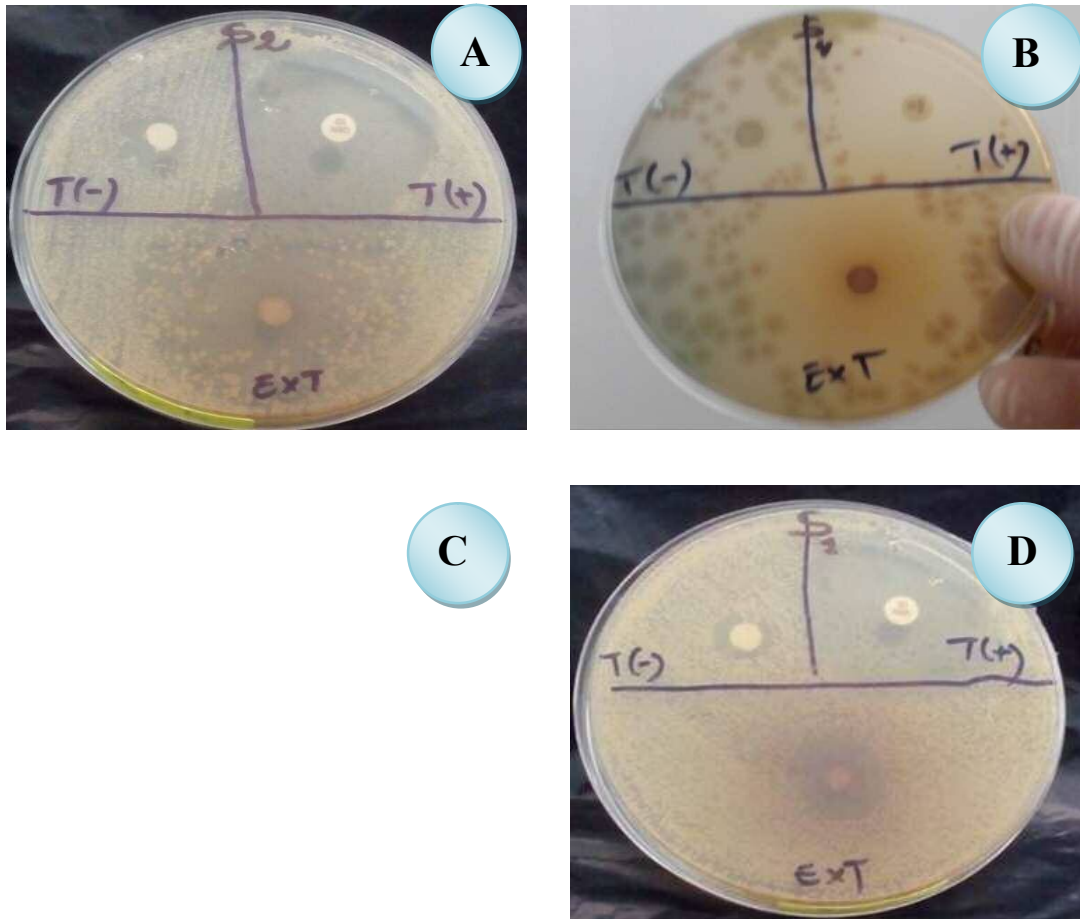


Figure 12. Photo montrant l'effet antibactérien de l'EMGA, et Gentamicine contre *Staphylococcus aureus* sauvage, *E.coli*, *Staphylococcus aureus* résistante, *Pseudomonas aeruginosa* (A, B, C et D).

V.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Le test de diffusion en milieu solide n'est qu'un criblage des activités antimicrobiennes des extraits végétaux, c'est aussi un test préliminaire pour un autre essai microbiologique complémentaire, qui est la dilution en milieu liquide pour déterminer la CMI. Cette dernière est déterminée uniquement pour les souches qui ont montrées une activité pour les différents extraits. Les résultats pour une gamme de concentration des extraits allant de (80 à 0.625) mg/ml sont présentés dans le tableau (05,06).

Tableau 05. Concentration minimale inhibitrice de l'EMTA

Les souches	Concentration d'EMTA en mg/ml							
	0.625	1.25	2.5	5	10	20	40	80
<i>Staphylococcus aureus</i> sauvage	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> résistante	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	-	-	-	-

+ : trouble (croissance) ; - absence de croissance (inhibition).

A partir du tableau 05, on a pu conclure les valeurs des CMI de l'extrait méthanolique de *Thymus algeriensis* correspondantes à chaque espèce et qui étaient **10 mg/ml** pour toutes les souches testées.

Tableau 06. Concentration minimale inhibitrice d'EMGA

Les souches	Concentration d'EMGA en mg/ml							
	0.625	1.25	2.5	5	10	20	40	80
<i>Staphylococcus aureus</i> sauvage	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> résistante	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+

A partir du tableau 06, on a pu conclure les valeurs des CMI de l'extrait méthanolique de *Globularia alypum* correspondantes à chaque espèce et qui étaient > à **80mg/ml** pour toutes les souches testées.

V.3. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide

Après la lecture des CMI, des repiquages en strie sont effectués sur une gélose Muller-Hinton correspondant aux tubes sans croissance visible pour déterminer la CMB. Les résultats sont montrés par le tableau 07 et la figure (14).

Tableau07. Concentration minimale bactéricide des extraits de *T. algeriensis*

Les souches	Concentration Minimale Bactéricide mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC : 43300 sauvage	20
<i>Escherichia coli</i> ATCC : 25922	40
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC : 25923 résistantes	>80
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC : 27853	10

Tableau 8.Interprétation des résultats de CMI et CMB de l'extrait méthanolique de *T.algeriensis*.

Les souches	CMI	CMB	CMB/CMI	Interprétation
<i>Staphylococcus aureus</i> sauvage	10	20	2	Bactériostatique
<i>Escherichia coli</i>	10	40	4	Bactériostatique
<i>Staphylococcus aureus résistantes</i>	10	>80	>8	Bactériostatique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	10	1	Bactéricide

CMB/CMI=1(Bactéricide) ; CMB/CMI> 1 (Bactériostatique).

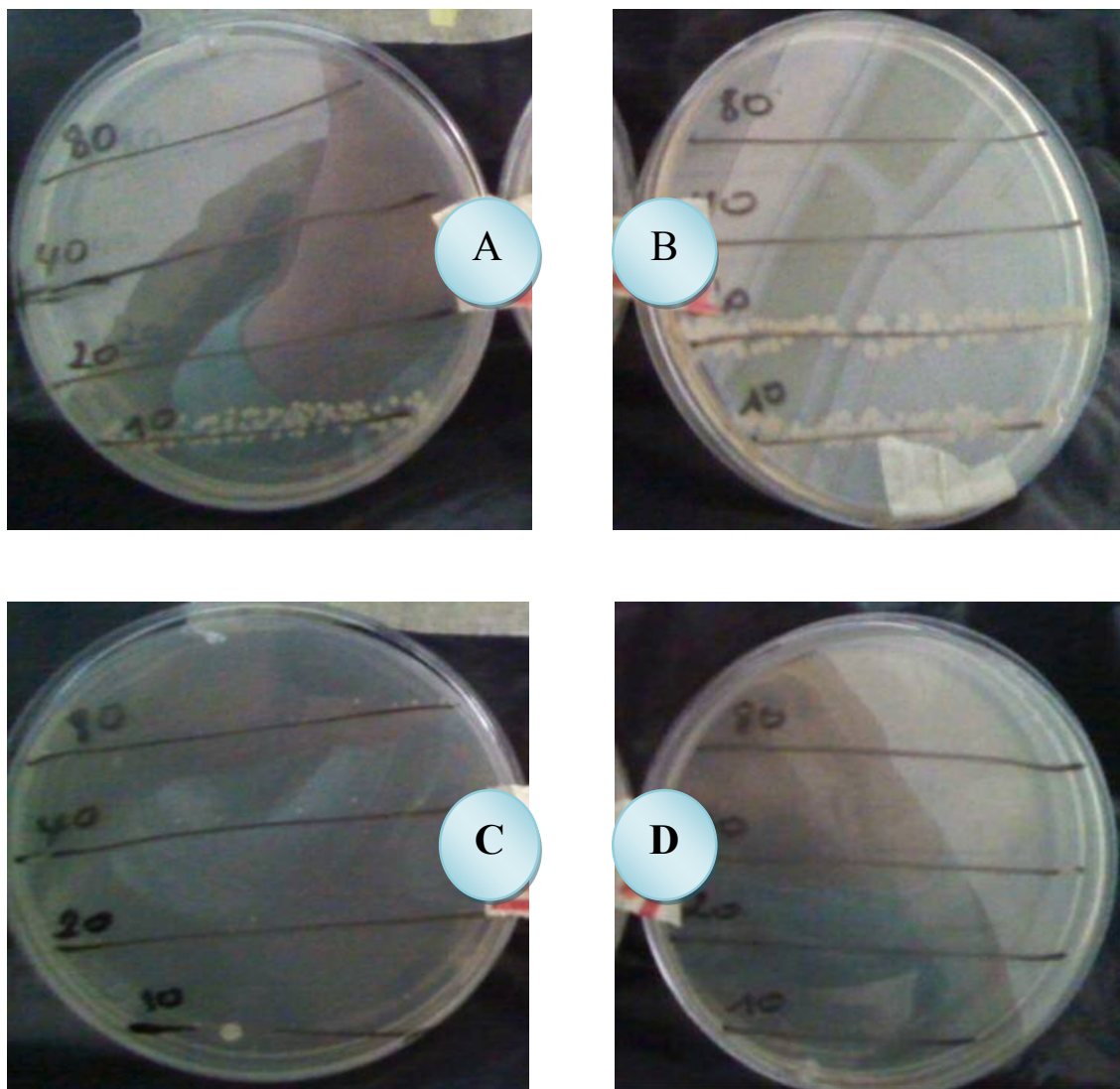


Figure 13. Photos montrant la détermination de la CMB d'extrait méthanolique de *Thymus algeriensis* sur *Staphylococcus aureus* sauvage, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* résistante, et *Pseudomonas aeruginosa* (A, B, C et D).

Conclusion

et

perspectives

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales restent toujours une source fiable des principes actifs connus Pour leurs propriétés thérapeutiques. Notre étude des propriétés antibactérienne a concerné deux plantes (*Thymus algeriensis*, *Globularia alypum*) très fréquemment employées pour leur effet antidiabétiques, antirhumatismal.

L'activité antibactérienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes, selon la méthode de diffusion de disque, les résultats indiquent que les deux extraits possèdent une activité antibactérienne sur toutes les souches testées sauf la souche *Pseudomonas aeruginosa* qui manifeste une résistance à l'extrait méthanolique de *Globularia alypum*.

Enfin, compte tenu de l'importance phytothérapeutique des extraits des plantes médicinales, nous espérons qu'elles prendront une place en thérapie hospitalière afin de pallier aux problèmes de résistances bactériennes causées par la pression de sélection des antibiotiques dans le milieu hospitalier, et comme perspectives on propose de :

- En ce qui concerne l'activité antimicrobienne il serait intéressant de définir le mécanisme d'action des substances végétales de la plante sur les microorganismes.
- de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents Déterminer problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.
- Orienter les recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires de l'activité antibactérienne des composés polyphénolique en général et des flavonoïdes en particulier.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

1. **Sean H., Timothy R., 2005.** Un guide pratique des plantes médicinales pour les personnes vivant avec le VIH, Ed. Révisée par Réseau canadien d'info-traitements sida, 1.
2. **Zeghad N.,2009.** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne, Mémoire de Magister en Biotechnologie végétale, Université Mentouri Constantine, 2-21.
3. **Grosmond G.,2001.** La phytothérapie. Elevage et agriculture biologique, Ed. Bulletin des GTV et HS, 143-145.
4. **Farnsworth NR., Akerele O., Bingel A.S., Soejarto D.D., Guo Z., (1986).** Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé*. Vol. 64(2) : 159-164
5. **Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., De Laage de Meux A., Moulard F., Zha E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deesalle –Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J. et Botrel A.** 2001. Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Ed Larousse. p10-12.
6. **Belfadel A., 2013.** Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne de la partie aérienne de la plante médicinale "Rutamontana", Mémoire de Master en Microbiologie, Université AbbésLaghrouk Khenchela, 3.
7. **Dehak K., 2013.** Méthodes d'extraction et de séparation des substances naturelles, Thèse de doctorat de chimie, Université KasdiMerbah Ouargla.
8. **Mohammedi Z., 2012.** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie, Thèse de doctorat en biologie, Université Aboubekr Belkaid- Tlemcen ,22.
9. **Sabrina K., 2003.** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, Thèse de doctorat pour obtenir le grade de Docteur du Muséum national D'Histoire Naturelle, 17.
10. **Belloum Z., 2007.** Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes, cas de l'espèce *Inulacrithmoides L*, Mémoire de Magister en chimie organique, Université de Mentouri- Constantine ,27-48.

11. **Hadi M., 2004.** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro oxydant ou capteurs de radicaux libres : Etudes et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat en sciences, Université Louis Pasteur domaine pharmacochimie, p155.
12. **Fiorucci S., 2006.** Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire, Thèse de doctorat en chimie, l'Université de Nice-Sophia Antipolis, 1-14)
13. **Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie, Photochimie Des Plantes Médicinales, 3ème Ed. Technique et Documentation Lavoisier, Paris, 366)
14. **Valérie B., 2008.** Les propriétés antiangiogéniques des flavonoïdes, Mémoire présenté comme exigence partielle de la maîtrise en chimie. Université du Québec à Montréal, 37-44.
15. **Seghiri R.,** Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires du Genre *Centaurea* : *C. africana*, *C. nicaensis*, Thèse de Doctorat d'Etat En Chimie Organique. Université Mentouri – Constantine, 8-81.
16. **Morel S., 2011.** Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea Benth.* (Fabaceae), Thèse de doctorat en Chimie des Biomolécules. Université d'Angers, 39-76.
17. **Akroum S., 2011.** Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels, Thèse de Doctorat en sciences en physio- toxicologie. Université Mentouri de Constantine, 6-23.
18. **Biaye M., 2002.** Action pharmacologiques des tanins, Thèse de doctorat en pharmacie. Université Cheikh AntaDiop De Dakar, 3.
19. **Belyagobi Née Benhamou N., 2012.** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du sud Ouest Algérien, Thèse de doctorat en biologie. Université Aboubekr Belkaid- Tlemcen, 11.
20. **Rira M., 2006.** Effet des polyphénols et des tanins sur l'activité métabolique du microbiote ruminal d'ovin, Thèse de magister en bio chimie et microbiologie appliquée. Université Mentouri Constantine, 14.
21. **Lamarti A., Badoc A., Deffieux G., Carde J-P., 1994.** Biogénèse des monoterpènes, 133:79-99.

- 22. Malecky M., 2006.** Métabolisme desterpénoïdes chez les caprins, Thèse de doctorat en Physiologie de la Nutrition Animale (biotechnologie). Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, 9.
- 23. Bougandoura N., 2011.** Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Saturejacalaminthasspnepta* (nabta) et *Ajugaiva L.* (chendgoura) de l'ouest d'Algérie, mémoire de magister en biologie. Université AboubekrBelkaid-Tlemcen, 14-25.
- 24. François-Georges ROBINET., 1937.** Saponosides stéroïdes et triterpénique de synthèse, THÈSE présentée à l'Ecole Polytechnique Fédérale, Zurich, Thèse de doctorat, 9.)
- 25. Hamimed S., 2009.** Caractérisation chimique des principes à effet antidermatophyte des racines d'*Anacycluspyrethrum L*, Mémoire de Magister en chimie organique. Université de Mentouri Constantine, 32.
- 26. Belguidoum M., 2012.** Une approche phytochimique pour différencier deux espèces de genre *Zygophyllum*, Mémoire de Master de chimie. Université KasdiMerbah Ouargla, 17.
- 27. Mekkiou R., 2005.** Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires d'espèces du Genre *Genista*(Fabaceae) : *G. saharae*, *G. ferox*, Thèse de Doctorat en Chimie Organique. Université Mentouri Constantine, 11.
- 28. Moroh JL.A., Bahi C., Dje K., Loukou Y.G., Guede-Guina F., 2008.** Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morindamorindoides*(Baker) Milne-Redheat (Rubiaceae) sur la croissance in-vitro des souches d'*Escherichia coli*. *Bulletin de la société Royale des Sciences de liège*, Vol. (77) : 44-61.
- 29. EL Ajjouri M., 2013.** Etude de la composition chimique et de l'efficacité des huiles essentielles de quelques espèces du genre *Thymus* dans la préservation du bois contre les champignons lignivores, Thèse de doctorat, Université Mohamed V _Agrad, 53.
- 30. Madi A., 2010.** Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Thèse de magister (école doctorale) en biotechnologie végétale. Université de Mentouri Constantine, 7.

31. **Zayyad N., Farah A., Bahho D.** 2014. Analyse chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des trois espèces de *Thymus*: *Thymus zygis*, *T. algériensis* et *T. bleicherianus*, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Vol.83, 118-132.
32. **Gaussen H**, Leroy HF. Précis de botanique (Végétaux supérieures), 2ème édition, 1982 : 412.
33. **Quezel P, Santa S.** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques et méridionales, tome II. CNRS, Paris, 1963 : 860.
34. **Boutiti A.** Etude Phytochimique de l'espèce *Globularia alypum*. Thèse de Magister de l'université de Mentouri de Constantine, Algérie. 2006 ; 30-54.
35. **Khlifi S, El Hachimi Y, Khalil A, Es-Safi N, El Abbouyi A.** In vitro antioxydant effect of *Globularia alypum* hydromethanolic extract. *Indian J Pharmacol.* 2005; 37(4): 227-231.
36. **Elbetiha A, Oran SA, Alkofahi A, Darmani H, Raies AM.** Fetotoxic potentials of *Globularia arabica* and *Globularia alypum* (Globulariaceae) in rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 2000 ; 72 : 215-219.
37. **Kara Ali W., 2009.** Etude de l'effet des extraits de certaines plantes étudiées des lignées de cellules tumorales et possibilité de leur utilisation dans la prévention de la toxicité cardiaque résultant d'anti-cancer doxorubicin, mémoire de magister en biologie moléculaire et cellulaire, Université de Mentouri Constantine, 69.
38. **Es-Safi N, Kollmann A, Khlifi S, Ducrot PH.** Antioxydant effect of compound isolated from *Globularia alypum* L. structure-activity relationship. *LWT.* 2007; 40:
39. **Es-Safi N, Khlifi S, Kollmann A, Kerhoas L, El Abbouyi A, Ducrot PH.** Iridoid glucosides from the aerial parts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae). *Chem Pharm. Bull (Tokyo).* 2006; 54(1):85-8.
40. **Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., benjelloun, W., 1997.** Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco, *J Ethnopharmacol* 58, 45-54.
41. **Boulos, L., 1983.** Medicinal Plants of North Africa, p.92
42. **Sanchez JV,** Anales soc. Espan. Fis quim. 1933 ; 31 : 361-3.
43. **Bernard P, Lallemand MM, Blansard G.** plantes médicinales et phytothérapie. 1974 ; 8(3) : 174-179.
44. **Chaudhuri RK, Sticher O., Winker T.** *Tetrahedron Lett.* 1979. 34: 3149-3152.
45. **Chaudhuri RK., Sticher O., Helv. Chim. Acta.** 1979; 62: 644-646.

46. **Ben Hassine B, Bui AM, Mighri Z, Cavé A.** Journal de la société chimique de Tunisie. 1982 ; 7: 3-10.
47. **Louis S, Danghouth – Kesraoui F, Baghdikian B, Elias R, Boukef K, Blausard.** *Pharmazie*. 1999; 54(4):309-310.
48. **HAMIDI A., 2013.** Etude phytochimique et activité biologique de la plante, Mémoire de Magister en chimie organique, Université KasdiMerbah Ouargla, 42.
49. **Bousseboua H., (2001-2006).** Elément de microbiologie générale 32,60-167
50. **Kechkar M., 2008.** Extraction de la *Silymarine* et étude de son activité antimicrobienne, mémoire de magister en microbiologie appliquée, Université Mentouri Constantine, 30-34.
51. **Sablonnière B., 2002.** Biologie microbiologie. Ellipses, Paris, 270-273.
52. **Lahlahf., 2008.** Extraction des flavonoïdes par le butanol et le chloroforme a partir de *SILYBUM marianum* et étude leur activité antimicrobienne, Mémoire de Magister en Microbiologie Appliquée, université Mentouri Constantine, 13.
53. **Meyer A., Deiana J., Bernard A., 2004.** Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2^{ème} Ed. Biosciences et techniques, doin, 217-247.
54. **Upton A., 2006.** Les produits antimicrobiens à domicile. Le problème de l'antibiorésistance. *Énoncé de la SCP*, 11(3) : 177-181.
55. **Guillaume, 2000:** Www. Second euro-bioweb.com/microbiologie/ microbiologie cours Html.
56. **Allion A., 2004.** Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides, thèse de doctorat en sciences alimentaires. Ecole nationale supérieure des industries agricoles et alimentaires, 22-28.
57. **Yala D, Merad A. S, Mohammedi D, OuarKorich M.N. 2001.** Resistance Bactérienne aux Antibiotiques. *Médecine Du Maghreb*. 91: 13-14.
58. **Label B., Soussy C.J. 2010.** Resistance bactérienne aux ATB, Ed : Springer.
59. **Virginie H. V. 2010.** Les céphalosporines de 3eme et 4eme génération. Service de maladies infectieuses et tropicales (CHU) Grenoble.
60. **Athamena S, .2009.** Etude quantitative des flavonoïdes des graines de *Guminumcyminum* et les feuilles de *Rosmarinusofficinalis* et l'évaluation de l'activité biologique, mémoire de magister en biologie, université el-hadjlakhdar-batna, 19.

- 61. Attou A., 2011.** Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Rutachalepensis*(Fidjel) de la région d'Ain T'émouchent, Mémoire de Magister en biologie, Université de Abou BekerBelkaid Tlemcen, 11.
- 62. Djemaizoghache S., 2009.** Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphus lotus* L, Mémoire de Magister en Biologie, Université El-hadjlakhdar-Batna, 7.
- 63. Benguerba A., 2008.** Etude phytochimique et de la phase butanolique de l'espèce *Inulacrithmoides* L, Mémoire de Magister en chimie organique, Université Mentouri Constantine, 5.
- 64. ParulLakhanpal, MD and DeepakKumar Rai, MD Reader, Département of Pharmacology, SSR MédicalCollege, Mauritius SMHO, Département of Pediatrics, Ministry of Health&Quality of Life, Mauritius., 2007.** Quercetin: A Versatile Flavonoid, Internet Journal of Médical Update, 22.
- 65. Marfak A., 2003.** Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides, thèse de doctorat en pharmacie. Université de Limoges, 23.
- 66. Marouf A., Reynaud J., 2007.** La botanique de A à Z, Dound, Paris, 2007 :114.
- 67. Renaud S., Lorgeril M., 1992.** Le French Paradox, Lancet, 339 (8808): 1523-6.
- 68. Grotewold E., 2006.** The Science of Flavonoids, Springer, United States of America, 1
- 69. Dacosta, E., 2003.** Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed). Paris, 317p.
- 70. Milane H., 2004.** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Strasbourg, 22.
- 71. Bouakaz I., 2006.** Etude phytochimique de la plante *GenistaMicrocephala*. Mémoire de magister. Batna.
- 72. Mohammedi Z., 2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen, Mémoire de magister. Université d'Abou BakrBelkaid Tlemcen, 17.
- 73. Ayed R., 2008.** Recherche et détermination structureles des metabolites secondaires de l'espèce: *ZYGOPHYLLUM CORNUTUM (ZYGOPHYLLACEAE)*, mémoire de magister en chimie organique, Université de MentouriConstantine, 69.

- 74.Harborne B., Williams C., 2000.** Advances in Flavonoid research since 1992. *Photochemistry*, vol. (55): 481-504.
- 75.Chebil. L., 2006.** Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle, Thèse de doctorat. Institut national de polytechnique de Lorraine, 9-22.
- 76.Chebil L., Humeau C., Falcimaigne A., Engasser J.M., Ghoul M., 2006.** Enzymatic acylation of Flavonoid (Review). *ProcessBiochemistry*, 41 : 2237-2251.
- 77.Manallah A., 2012.**Activitéantioxydanteetanticoagulante des polyphénols de la pulpe de d'oliveoleaueuropola L, mémoire de magister en chimie appliqué, UniversitéFerhat Abbas- sétif,28.
- 78.Adjadj M., 2009.** Propriétés anti oxydantes et activité inhibitrice de la xanthine oxydase des extraits de la plante médicinale *Ajugaiva* (L.) Schreber, Mémoire de magister en biologie cellulaire et moléculaire. Université Mentouri Constantine, 28.
- 79.Ohemeng.K.A, Schwender.C.F, Fu.K.P, Barrett.J.F., 1993.** DNA gyraseinhibitory and antibacterialactivity of someflavones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3(2):225-30.
- 80.Sato.M, Tsuchiya.H, Takase.I, Kureshiro.H, Tanigaki.S, Iinuma.M., 1995.**Antibacterialactivity of flavanoneisolatedfrom *Sophora exigua*againstmethicillin-resistant*Staphylococcus aureus* and itscombinationwithantibiotics. *Phytother. Res.* 9(7): 509-12.
- 81.Slavica B, Ilic SSK, B. Zoran BT., 2004.**Flavonoidsfromflower of *Linumcapitatum*kit. *Phys.Chem. Technol.* 3: 67-71.
- 82.Dadi PK, Ahmad M, Ahmad Z., 2009.**Inhibition of ATPase activity of *Escherichia coli* ATPsynthase by polyphenols. *Int. J. Biol. Macromol.* 45 (1): 72-9.
- 83.Laouini S., 2014.** Etude phytochimique et activité biologique d'extraits de des feuilles de Phoenixdactylifera L dans la région du sud d'Algérie (la région d'Oued Souf), Thèse de doctorat en sciences en: Chimie industrielle, Université Mohamed khider Biskra, 62.
- 84.Cohen N., Karib H., 2006.** Risque hygiénique lié à la présence des *Escherichia coli* dans les viandes et les produits carnés: Un réel problème de santé publique. *Les technologies de laboratoire*, n°1 : 4-9.
- 85.**Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments, *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), septembre 2011. *ANSES*, 1-4.

- 86.Hellal Z., 2011.** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *citrus* .Application sur la sardine (*Sardinapilchardus*), Mémoire de Magister en Biologie, Université Mouloud Mammeri de Tizi- Ouzo, 32.
- 87.Benabid., 2009.** Rôle de l'élastase du neutrophile dans les infections pulmonaires à *Pseudomonas aeruginosa*, Thèse de doctorat en immunologie, L'université de Reims Champagne-Ardenne, 14-17.
- 88.** Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, **2011.** Recherche et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* : méthode par filtration sur membrane. MA. 700 – PSE 1.0, Rév. 3, Ministère e du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 17.
- 89.YAKHLEF G., 2010.** Eude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris*L. et *Laurusnobilis*L, Mémoire de magister en biochimie appliquée .Université El Hadj Lakhdar Batna, 33.
- 90.Hermier J., Lenoir J., Weber F., 1992.** Les groupes microbiens d'intérêt laitier. Edition CEPIL, Paris. 1-6.
- 91. Markham K. R., 1982.**Techniques of Flavonoids identification. *Academic press, London*. Chap. 1 and 2: 1-113.
- 92.Bronner W. E, Beecher G. R., 1995.** Extraction and measurement of prominent Flavonoids in orange and grape fruits juice concentrates. *J. Chromatogr.* 705: 247-256.
- 93.Karumi Y., Onyeyili PA., Ogugbuaja VO., 2004.**Identification of active principles of *M. balsamina*(Balsam Apple) leaf extract.*J Med Sci.* 4(3):179-182.
- 94. Edeaga H.O, Okwu D. E, Mbaebie BO., 2005.**Photochemical constituents of some Nigerian medicinal plants.*African journal of biotechnology.*4 (7):685-688.
- 95.Benmahdi A., 2001.** Identification des Principes actifs des extraits des plantes médicinales. *Phytochimie* 6: 11-27.
- 96. Boharun T., Gressier B., Trotin F., Bruner C., Dine T., Vasseur J., Gazin JC., Pinkas M., Luyckx M., Gazin M., 1996.**Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *ArzneimForsh / Drug Res.* 1-6.

- 97. Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris T. C and Truck M., 1966.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method, *American Journal of Clinical Pathology*.45, 493 - 496.
- 98. Bolou G.E.K., Attiou B., N'guessan A.C., Coulibaly A., N'guessan J.D ET Djaman A.J., 2011.** Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. Sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*, *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol. 80 : 772 – 790.
- 99. Saadaoui A.S, Kasmi N.2014.** Etude phytochimique et evaluation de l'activité anti-oxydante des deux plantes médicinales: *Ruta montana* et *Thymus algériensis*
- 100. Yrjonen T., 2004.** Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural products. Conference room 513 at Vikki info center. Faculty of pharmacy of the university Helsinki, 64.