



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique



Université ABBES LAGHROUR –Khenchela-

Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie

Département de Biologie Moléculaire Et Cellulaire

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Master académique

Filière de Sciences Biologiques

Option : Microbiologie appliquée

Thème

**La séparation des composés phénoliques des  
feuilles de la plante *Cytisus villosus* et l'étude de  
leur activité antimicrobienne**

Présenté par :

GARMI Rofaida

MELLAH Wahiba

Dérogé par :

BOUSSAA A.

Devant le Jury de soutenance

Président : Dr. LARBAA R.

(M.C.B) Univ. Abbes LAGHROUR -Khenchela-

Examinatrice : Dr. DEROUICHE F.

(M.C.B) Univ. Abbes LAGHROUR –Khenchela-

Examineur : Mr. ABAIDIA A.

(M.A.A) Univ. Abbes LAGHROUR - Khenchela-

Promoteur: Mr. BOUSSAA A.

(M.A.A) Univ. Abbes LAGHROUR - Khenchela-

Titre	Page
Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	I
Abstract	II
ملخص	III
Liste des abréviations	IV
Liste des figures	VI
Liste des tableaux	VII
Introduction	01
<b>PREMIÈRE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>Chapitre I: Généralité sur la plante <i>Cytisus villosus</i></b>	
I.1. Introduction	03
I.2. La famille des <i>Fabaceae</i>	03
I.3. Le genre <i>Cytisus</i>	05
I.4. L'espèce <i>Cytisus villosus</i> , <i>Cytisus triflorus</i> L'Hérit, Cytise à trois fleurs	06
I.4.1. Présentation	06
I.4.2. Classification de la plante <i>Cytisus villosus</i>	07
I.4.3. Les caractéristiques écologiques	08
I.4.4. Utilisation de la plante de <i>Cytisus villosus</i>	09
<b>Chapitre II: Les techniques de séparation des polyphénols</b>	
II.1. Présentation générale sur les composés phénoliques	10
II.1.1. Définition	10
II.1.2. Structure chimique et classification	10
II.1.3. Effets biologiques des polyphénols	11
II.2. Les techniques de séparation	11
II.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	12
II.2.1.1. Principe de la CCM	12
II.2.2. Chromatographie sur colonne	13
II.2.2.1. Principe de chromatographie sur colonne	13
II.2.2.2. Les type de chromatographie sur colonne	14

<b>DEUXIEME PARTE : ETUDE EXPERIMENTALE</b>	
<b>Chapitre III : Matériel et Méthodes</b>	
<b>III.1. Matériel</b>	<b>15</b>
<b>III.1.1. Matériel végétal</b>	<b>15</b>
<b>III.1.2. Souches bactériennes</b>	<b>15</b>
<b>III.1.3. Produits chimiques et réactifs</b>	<b>16</b>
<b>III.1.4. Milieux de culture</b>	<b>16</b>
<b>III.1.5. Appareillage</b>	<b>16</b>
<b>III.2. Méthodes</b>	<b>17</b>
<b>III.2.1. Préparation des extraits</b>	<b>17</b>
<b>III.2.1.1. Macération et agitation</b>	<b>17</b>
<b>III.2.1.2. Centrifugation et filtration</b>	<b>18</b>
<b>III.2.1.3. Rota-évaporation et récupération des extraits</b>	<b>18</b>
<b>III.2.1.4. Détermination du Rendement</b>	<b>19</b>
<b>III.2.2. Etude de l'activité antimicrobienne</b>	<b>19</b>
<b>III.2.2.1. Préparation d'inoculum</b>	<b>19</b>
<b>III.2.2.2. Test de l'activité antimicrobienne (méthode de diffusion à partir d'un disque)</b>	<b>20</b>
<b>III.2.2.3. Méthode des micro-dilutions en milieu liquide</b>	<b>22</b>
<b>III.2.3. Séparation des composés phénoliques</b>	<b>24</b>
<b>III.2.3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)</b>	<b>24</b>
<b>III.2.3.2. Chromatographie sur colonne</b>	<b>25</b>
<b>III.2.4. Etude de l'activité antibactérienne des fractions obtenues</b>	<b>27</b>
<b>Chapitre IV : Résultat et Discussion</b>	
<b>IV.1. Résultats du rendement d'extraction</b>	<b>28</b>
<b>IV.2. Résultats de l'étude de l'activité antimicrobienne</b>	<b>29</b>
<b>IV.2.1. L'activité antibactérienne</b>	<b>29</b>
<b>IV.2.2. L'activité antifongique</b>	<b>32</b>
<b>IV.3. Résultats de la méthode des micro-dilutions en milieu liquide</b>	<b>36</b>
<b>IV.3.1. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)</b>	<b>36</b>
<b>IV.3.2. Concentration Minimale Bactéricide et Fongicide (CMB et CMF)</b>	<b>37</b>
<b>IV.4. Résultats des techniques de séparation</b>	<b>39</b>

<b>IV.4.1. Détermination du meilleur système de séparation par CCM</b>	<b>39</b>
<b>IV.4.2. La séparation des composés phénoliques par Chromatographie sur colonne</b>	<b>43</b>
<b>Conclusion</b>	<b>45</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>46</b>
<b>Annexes</b>	
<b>Résumé</b>	

**%** : Pourcentage.

***A.flavus*** : *Aspergillus flavus*.

***A.niger*** : *Aspergillus niger*.

**ADN** : L'acide désoxyribonucléique.

**AFNOR** : L'Association française de normalisation.

**ANOVA**: Analyse de variance.

**APG II** : Angiosperm Phylogeny Group.

**ATCC** : American Type Collection Culture.

**CCM** : Chromatographie sur couche mince.

**CEC** : L'électrochromatographie capillaire.

**Chl** : Chloroforme.

**CMB** : Concentrations Minimales Bactéricide.

**CMF** : La Concentration Minimale Fongicide.

**CMI** : La Concentration Minimale Inhibitrice.

**DMSO** : Le diméthylsulfoxyde.

***E.coli*** : *Escherichia coli*.

**Et-OH** : Ethanol.

**GC** : Gas Chromatography.

**GN** : Bouillon nutritif.

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Acide sulfurique.

**HPLC** : La chromatographie liquide de haute performance.

**HSD** : Test de comparaison multiple (Différence Honnêtement Significative).

**LDL** : Low Density Lipoproteins.

**M/M** : Rapport de masse.

**Me-OH** : Méthanol.

**MH** : Bouillon Muller-Hinton.

**min** : minute.

***P.aeruginosa*** : *Pseudomonas aeruginosa*.

**PDA** : La gélose dextrosée à la pomme de terre.

**PET** : Ether de pétrole.

**Rd** : Rendement.

**Rf** : Rapport frontal.

***S. aureus*** : *Staphylococcus aureus*.

**TLC** : Thin Layer Chromatography.

**UV** : Ultraviolet.

Figure	Titre	Page
Figure 01	Famille des <i>Fabaceae</i>	04
Figure 02	Différentes espèces de genre <i>Cytisus</i>	05
Figure 03	<i>Cytisus villosus</i> avec ses différentes parties	06
Figure 04	Les caractéristiques climatiques et du sol de <i>Cytisus villosus</i>	08
Figure 05	Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe	10
Figure 06	Principe de chromatographie sur colonne	14
Figure 07	Le broyage de la plante	17
Figure 08	Etapes de la macération et d'agitation	18
Figure 09	Etapes de centrifugation et de filtration	18
Figure 10	La rota-évaporation	19
Figure 11	Méthode de diffusion à partir d'un disque solide	20
Figure 12	Préparation de l'inoculum fongique et sa standardisation	21
Figure 13	Observation microscopique des spores fongiques d' <i>Aspergillus niger</i> et <i>A.flavus</i>	22
Figure 14	La méthode de la micro-dilution en milieu liquide	23
Figure 15	Méthode de réalisation de la CMB et CMF	23
Figure 16	Méthode de préparation de la CCM	24
Figure 17	Etape de récupération des fractions obtenues	26
Figure 18	Dispositif utilisé pour la chromatographie sur colonne	26
Figure 19	Zones d'inhibition avec les souches bactériennes avec l'extrait méthanoïque et aqueux appartenant à la plante <i>Cytisus villosus</i>	29
Figure 20	Zones d'inhibition des souches fongiques avec l'extrait méthanoïque et cétonique appartenant à la plante <i>Cytisus villosus</i>	33
Figure 21	Observation de la migration des spots sous UV à (254 nm et 365nm)	42
Figure 22	Les zones d'inhibition obtenues par l'activité antibactérienne de fractions récupérées par chromatographie sur colonne de l'extrait méthanoïque de <i>Cytisus villosus</i>	44

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 01</b>	La classification de la plante <i>Cytisus villosus</i>	<b>07</b>
<b>Tableau 02</b>	Gradient d'élution utilisé lors de la chromatographie sur colonne	<b>25</b>
<b>Tableau 03</b>	Résultats du rendement d'extraction	<b>28</b>
<b>Tableau 04</b>	Résultats de test des comparaisons multiple (HSD) pour le rendement d'extraction	<b>28</b>
<b>Tableau 05</b>	Diamètre des zones d'inhibition des souches bactériennes	<b>29</b>
<b>Tableau 06</b>	Résultats de test de comparaison multiple pour l'activité antibactérienne des extraits de <i>Cytisus villosus</i>	<b>30</b>
<b>Tableau 07</b>	Résultats de test de comparaison multiple HSD pour la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait acétonique	<b>30</b>
<b>Tableau 08</b>	Résultats de test de comparaison multiple HSD pour la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait méthanoïque	<b>30</b>
<b>Tableau 09</b>	Résultats de test de comparaison multiple HSD pour la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait éthanoïque	<b>31</b>
<b>Tableau 10</b>	Diamètre des zones d'inhibition des champignons	<b>32</b>
<b>Tableau 11</b>	Résultats de test de comparaison multiple HSD pour la sensibilité des souches fongiques vis-à-vis de l'extrait méthanoïque et cétonique	<b>33</b>
<b>Tableau 12</b>	Résultats de test de comparaison multiple HSD pour la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait éthanoïque	<b>34</b>
<b>Tableau 13</b>	Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'extrait éthanoïque	<b>36</b>
<b>Tableau 14</b>	Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'extrait méthanoïque	<b>36</b>
<b>Tableau 15</b>	Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'extrait acétone	<b>36</b>
<b>Tableau 16</b>	Concentration Minimale Bactéricide et fongicide (CMB et CMF) de l'extrait éthanoïque	<b>37</b>
<b>Tableau 17</b>	Concentration Minimale Bactéricide et fongicide (CMB et CMF) de l'extrait méthanoïque	<b>38</b>
<b>Tableau 18</b>	Concentration Minimale Bactéricide et fongicide (CMB et CMF) de l'extrait acétone	<b>38</b>
<b>Tableau 19</b>	Résultats de séparation des composés phénolique de <i>Cytisus villosus</i> par CCM	<b>40</b>
<b>Tableau 20</b>	Résultats de l'activité antibactérienne des fractions récupérés par chromatographie sur colonne de l'extrait méthanolique de <i>Cytisus villosus</i>	<b>43</b>

La Phytothérapie est une médecine qui utilise des plantes, ou la seule "partie active" de ces plantes ayant des propriétés thérapeutiques. Ces plantes sont appelées "plantes médicinales" (**Guignard, 1994**).

Quelles que soient les parties et les formes sous lesquelles elles sont utilisées, les plantes sont extrêmement complexes du point de vue de leur composition chimique. On estime qu'elles sont formées de plusieurs milliers de constituants différents, dont quelques-uns seulement (ou parfois un seul) sont responsables de l'effet thérapeutique ou de l'effet toxique (**Linuma, 1993**).

Il est donc indispensable de connaître les principes actifs des plantes médicinales afin d'étudier leur efficacité, leur mode d'action et bien entendu leurs effets secondaires sur la santé humaine.

Le règne végétal avec ses 400.000 à 500.000 espèces représente une source inépuisable de molécules actives, et le potentiel des plantes comme source de nouveaux médicaments reste immense (**Mekkiou, 2005**).

La flore Algérienne avec ses 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% endémiques, reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique (**Mekkiou, 2005**).

Une des originalités majeures des végétaux, réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées, en effet, à côté des métabolites primaires classiques, ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente, mais qui représentent une source importante utilisable par l'homme dans des domaines aussi différents. Les polyphénols sont des composés largement représentés dans la quasi-totalité des plantes, faisant partie intégrante de notre nourriture quotidienne. Ils possèdent potentiellement des activités biologiques, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, anti-cancérigènes, anti-oxydantes (**Mekkiou, 2005**).

Le genre *Cytisus* appartient à la famille des *Fabaceae*, fait l'objet de nombreuses études phytochimiques. Ces travaux ont permis l'isolement de plusieurs types de produits dont les plus majoritaires sont les composés phénoliques notamment les flavonoïdes. L'espèce *Cytisus villosus*, n'a été l'objet d'aucune étude de son activité antimicrobienne, néanmoins de son utilisation depuis longtemps dans la médecine traditionnelle Algérienne contre l'ulcère gastrique, les hémorroïdes et surtout pour guérir les paies (**De Witt, 1963**).

L'extraction des composés phénoliques à partir d'une matière naturelle en utilisant les solvants est une étape importante pour caractériser les systèmes naturels riches en polyphénols, ces préparations peuvent être obtenues par macération, infusion, sous forme de teinture, poudre totale, extraits... etc. (Mutlib et Abbott, 1992).

Le présent travail est basé sur la séparation des composés phénoliques de la partie aérienne de *Cytisus villosus*, ainsi que l'étude de leurs activités antimicrobiennes, pour se faire, on a divisé notre travail en deux parties :

- La première partie de ce manuscrit, comporte deux chapitres de synthèse bibliographique :
- ✓ Dans le premier, nous avons commencé par des généralités sur la plante *Cytisus villosus*.
- ✓ Dans le deuxième, nous rappelons les techniques de séparation des composés phénoliques.
- La deuxième partie concerne la partie expérimentale qui se déroule en deux axes :
- ✓ Dans le premier axe, nous avons réalisé l'extraction et la séparation des composés phénoliques par deux techniques (Chromatographie sur couche mince et chromatographie sur colonne).
- ✓ Dans le deuxième axe nous nous sommes intéressés à évaluer l'activité antimicrobienne des fractions obtenues après séparation.
- Enfin, dans la troisième partie, nous avons rapporté et discuté les résultats obtenus.

## I. 1. Introduction

L'homme s'intéresse aux plantes depuis toujours et l'histoire des substances naturelles s'identifie en partie à celle de la pharmacie, dont une discipline, la pharmacognosie, étudie les poisons et les remèdes naturels, ou par extension la plupart, des substances biologiquement actives (**Mohammedi, 2013**).

Une plante médicinale est définie par « la pharmacopée » comme une «drogue végétale », dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Cette « drogue végétale » est butilisée en état, soit le plus souvent sous la forme desséchée, soit à l'état frais. L'expression drogue végétale ou, plus couramment, drogue, désigne donc une matière première naturelle servant à la fabrication des médicaments (**Mohammedi, 2013**).

## I.2. La famille des *Fabaceae*

### I.2.1. Présentation

La famille des Fabacées se compose de plantes dicotylédones. Cette famille est aussi appelée couramment Légumineuses (*Leguminosae*) ou Papilionacées (*Papilionaceae*), mais ce ne sont pas de vrais synonymes. Chaque nom s'applique à un caractère particulier du fruit et de la fleur de ces familles de plantes (figure 1) (**De Witt, 1963**).

Schématiquement le terme « légumineuses » désigne des plantes dont le fruit est une gousse.

- ✓ Appelé gousse ou légume : la gousse est un follicule déhiscent qui s'ouvre par deux fentes longitudinales en deux valves portant chacune une rangée de graines ex-albuminées ;
- ✓ Les feuilles sont composées alternes, parfois stipulées, à pétiole épaissi à sa base, dialypétales, souvent zygomorphes et papilionacées, toujours monocarpellées (**De Witt, 1963**).

Fabacées c'est une grande famille constituée de plantes ligneuses (zones tropicales) et herbacées (zones tempérées) avec quelques arbres et arbustes qui regroupent environ 12 000 espèces réparties en 400 à 500 genres. Cette famille se divise en plusieurs tribus dans lesquelles les genres sont groupés selon :

- Le port de la plante ;
- La forme des feuilles ;
- Le degré de fusion des étamines (**Bhattacharyya et Johri, 1998**).

C'est le plus grand ensemble angiospermien, cosmopolite, prédominant en individus et en espèces dans de nombreux biomes, et surtout en régions tropicales (**Spichiger et al., 2004**).



**Figure 01** : Famille des *Fabaceae* (**Bhattacharyya et Johri, 1998**).

### I.2.2. Position systématique

Selon les classifications, la composition de cette famille varie :

- ✓ Le nom Fabacées, au sens limité, est adopté en classification classique de Cronquist (1981). Ce groupe est nommé *Fabaceae* ou *Papilionaceae*. Cette famille comprend 12000 espèces réparties en plus de 400 genres. (En classification phylogénétique, ce groupe des plantes serait la sous-famille *Faboideae*) ;
- ✓ Le nom Fabacées, au sens large, est adopté en classification phylogénétique APG II. Ce groupe est nommé *Fabaceae* ou *Leguminosae*. Cette famille comprend 18000 espèces réparties dans trois sous-familles. (En classification classique, ce groupe des plantes serait l'ordre des *Fabales* avec trois familles).

Les trois sous-familles :

- Sous-famille *Caesalpinioideae* avec une fleur pseudo-papilionacée ;
- Sous-famille *Mimosoideae* avec une fleur régulière ;
- Sous-famille *Faboideae* ou *Papilionoideae* avec une fleur typique en papillon (**Bhattacharyya et Johri, 1998**).

Cependant, certaines analyses phylogénétiques basées sur la morphologie et des séquences ADN montrent que les *Caesalpinoideae* sont para-phylétiques à certains genres au sein des *Mimosoideae* et *Faboideae* (Bhattacharyya et Johri, 1998).

### I.3. Le genre *Cytisus*

Relativement petites, à 3 folioles à peu près arrondies et terminées chacune par une toute petite pointe, les feuilles inférieures et celles des rameaux sans fleurs ont un court pétiole (De Witt, 1963).

Ces feuilles sont plus ou moins coriaces, sans poils, d'un vert pâle en dessous et ne noircissent pas lorsqu'elles se dessèchent, le calice est relativement court et sans poils. L'étendard, sans poils, est plus long que la carène courbée et qui se termine en une sorte de bec dressé (De Witt, 1963).

Le fruit mûr est sans poils, assez aplati, de 25 à 35 millimètres de longueur sur 9 à 11 millimètres de largeur. C'est un arbrisseau à tiges brunes, dont les rameaux ont la surface verte, toute la plante est dépourvue de poils. Il peut se produire- des bourgeons adventifs sur les racines (De Witt, 1963).



Figure 02 : Différentes espèces de genre *Cytisus* (De Witt, 1963)

#### I.4. L'espèce *Cytisus villosus*, *Cytisus triflorus* L'Hérit, Cytise à trois fleurs

##### I.4.1. Présentation

- ✓ C'est un arbrisseau de 1 à 2 m qui épanouit ses fleurs jaunes depuis le mois de février jusqu'au mois de juin dans les bois, parmi les buissons ou sur les coteaux de la région méditerranéenne ;
- ✓ Les fleurs sont en général disposées par trois à l'aisselle des feuilles supérieures, de façon que l'ensemble de la partie fleurie d'un rameau forme une sorte de grappe feuillée ;
- ✓ Les feuilles sont pétiolées et à trois folioles dont la foliole médiane est plus grande que les autres. Vers la base de la partie fleurie, ces folioles sont plus longues que les fleurs ;
- ✓ Le calice est relativement court et poilu, l'étendard se replie sur le dos, il est alors plus court que la carène, il est sans poils, lachelé et strié de brun rougeâtre vers la base et la carène est presque en forme de bec au sommet ;
- ✓ D'autre part, le fruit à environ 3 centimètres de longueur est couvert de poils roux appliqués, il contient 6 à 8 graines jaunâtres ;
- ✓ C'est un arbrisseau dont les jeunes rameaux et les feuilles sont revêtues de longs poils roussâtres, parfois blancs sur les jeunes feuilles, ces poils tombent facilement et les jeunes rameaux sont à 5 angles bien marqués (figure 03) (Spichiger *et al.*, 2004) .



Figure 03 : *Cytisus villosus* avec ses différentes parties (De Witt, 1963)

- **Écologie** : Bois et buissons du Midi : Alpes-Maritimes, Var, Hérault, Aude, Pyrénées-Orientales, Corse ;
- **Répartition**: Région méditerranéenne de l'Europe et de l'Afrique ;
- **Floraison** : de mai à juin ;
- **Hauteur** : 1 à 3 m ;
- **Fleur** : 12 à 14 mm ;
- **Altitude** : 0 à 400 m (Bhattacharyya B., Johri BM., 1998).

#### I.4.2. Classification de la plante *Cytisus villosus*

La classification botanique de l'espèce *Cytisus villosus* est représentée dans le tableau 01.

**Tableau 01** : La classification de la plante *Cytisus villosus* (Bhattacharyya et Johri, 1998).

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Super-division	<i>Spermatophyta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Fabales</i>
Famille	<i>Fabaceae</i>
Sous-famille	<i>Faboideae</i>
Genre	<i>Cytisus</i>
Espèce	<i>Cytisus villosus</i>

## I.4.3. Les caractéristiques écologiques

*Cytisus villosus* est une espèce endémique de la région méditerranéenne, elle est commune entre 0-400m d'altitude qui besoin divers caractéristiques climatiques et des conditions favorable du sol (figure 04) (Sundararajan *et al.*, 2006).

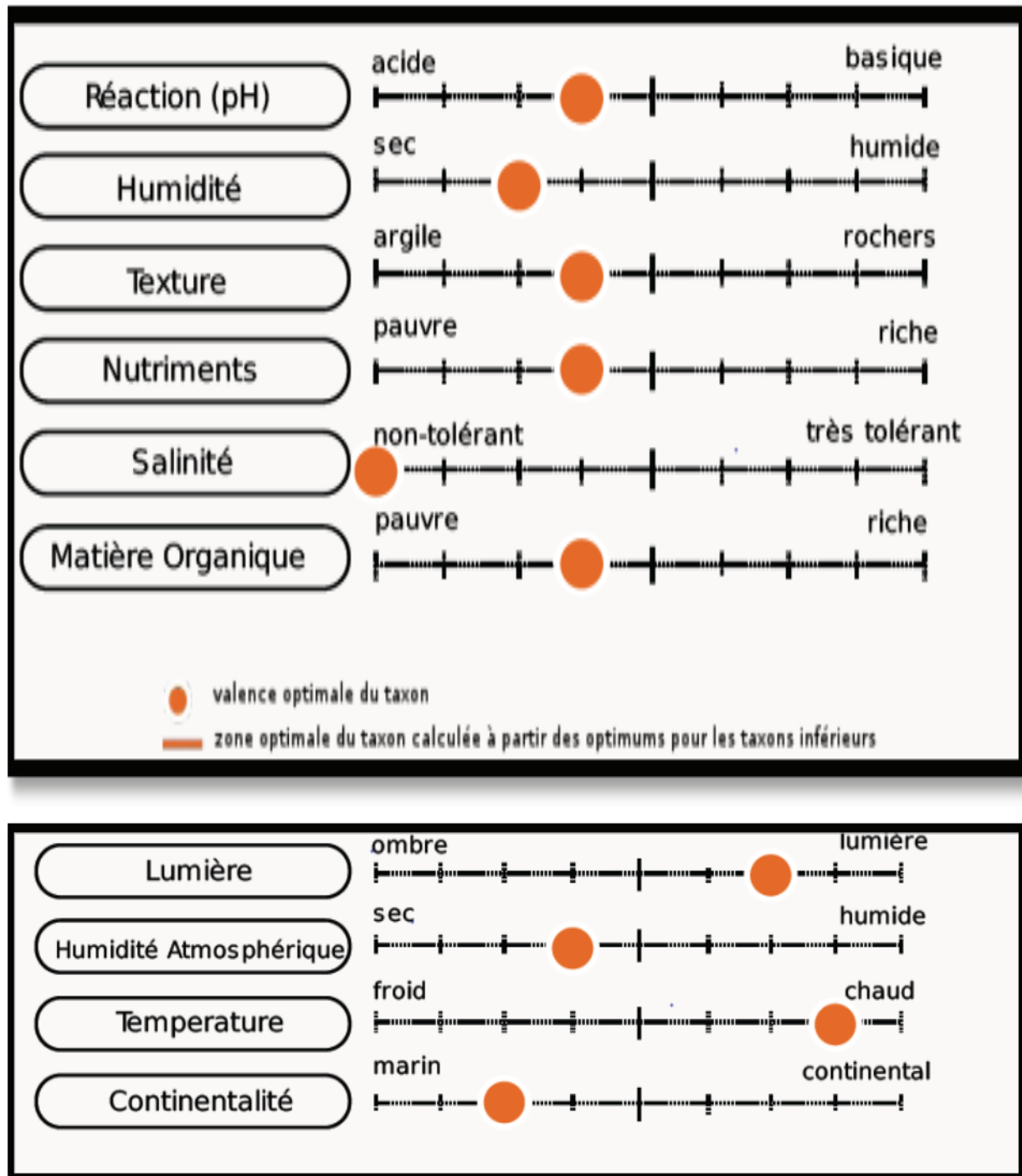


Figure 04 : Les caractéristiques climatiques et du sol de *Cytisus villosus* (Sundararajan *et al.*, 2006)

**I.4.4. Utilisation de la plante de *Cytisus villosus***

- ✓ Les plantes sont largement utilisées dans la médecine traditionnelle en raison de leurs activités bénéfiques ;
- ✓ Le genre *Cytisus* (famille des *Fabacées*) se compose d'environ 70 espèces confinées aux régions de climat doux du sud et du centre de l'Europe, l'Afrique du Nord et Asie de l'Ouest (**Sundararajan et al., 2006**) ;
- ✓ Des études montrent l'utilisation de plantes de ce genre à des fins médicinales comme hypotenseur, antidiabétiques, anti-inflammatoire, anti-bactérienne, diurétique (**Sundararajan et al., 2014**), (**Pereira et al., 2012**) et des études pharmacologiques ont confirmé certaines de ces études (**González et al., 2013**), (**Sundararajan et al., 2006**) ;
- ✓ L'analyse a montré que les espèces végétales les plus couramment utilisées dans le traitement de la peau sont généralement utilisés comme un cataplasme ;
- ✓ *Cytisus villosus*, est utilisée comme un cataplasme contre l'eczéma et les infections fongiques en raison de ses propriétés astringentes, antiseptiques, cicatrisation des plaies, blessures, la chirurgie, le gonflement ou en combinaison avec de l'huile d'olive pour guérir les brûlures. (**Hamdi Pasha et al., 2002**) ;
- ✓ *C.villosus* connu dans le Nord de l'Algérie pour ses propriétés médicinales, elle est utilisée pour traiter la douleur abdominale, des cicatrisations de plaies et comme hémostatique, antifongique, de plus, les feuilles ne sont utilisées comme « le henné » pour traiter et teindre les cheveux (le poil). Les feuilles, agissent contre le maux des intestins (**Kahouadji, 1995**).

## II. 1.Présentation générale sur les composés phénoliques

### II.1.1. Définition

Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal, on les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits (**Harborne et al., 2000 ; Havsteen, 2002**).

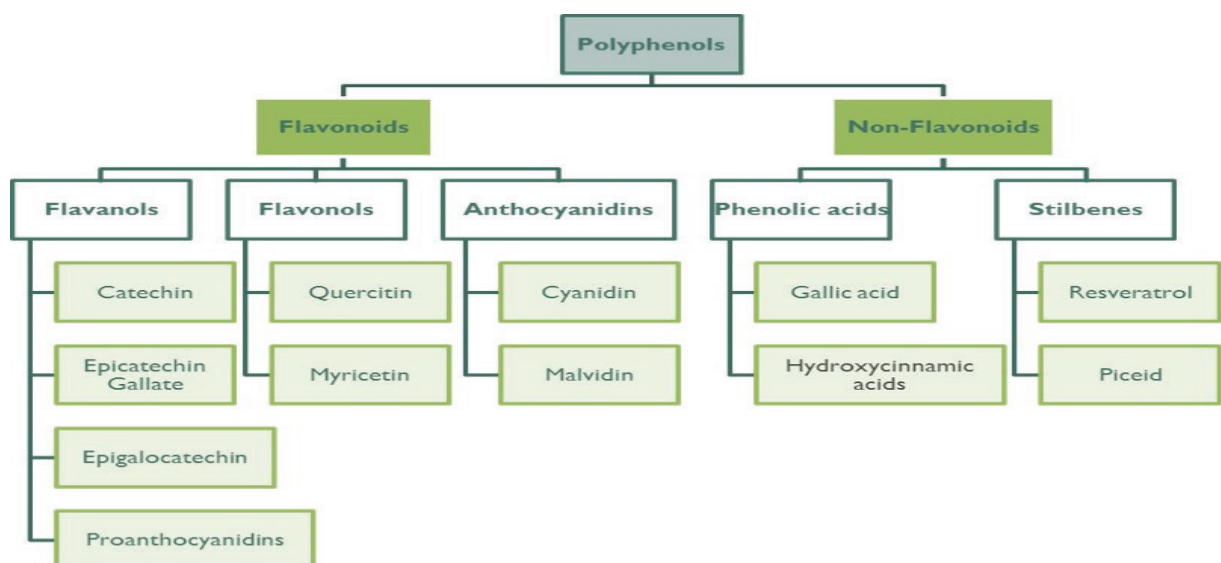
Les polyphénols sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal (**Harborne et al., 2000 ; Havsteen, 2002**).

L'expression de « composés phénoliques » est utilisée pour toutes substances chimiques possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (**Parr, 2000**).

### II.1.2. Structure chimique et classification

La structure chimique est identique à tous les polyphénols : un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés (**Boros, 2010**).

La classification a été proposée par HARBORNE (1980), on peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base, les principales classes largement répandues sont représentées dans la (figure 05) (**Macheix et al., 2006**).



**Figure 05** : Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe (**Macheix et al., 2006**)

Les polyphénols sont synthétisés par deux voies biosynthétiques :

- ✓ Celle de l'acide shikimique (shikimate);
- ✓ Celle issue de l'acétate-malonate (**Mohammedi, 2013**).

### II.1.3. Effets biologiques des polyphénols

Les composés polyphénoliques sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique, de nombreux travaux suggèrent que les polyphénols participent à la prévention des maladies cardio-vasculaires, leur consommation se traduit par une augmentation transitoire de la capacité antioxydante du plasma dans les heures qui suivent le repas, parvenus au niveau des artères, ils préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoproteins ou LDL), qui est l'un des facteurs clé du processus physiopathologique de l'athérosclérose, en inhibant l'oxydation des LDLs, ils limitent leur incrustation dans les parois des artères qui contribuent à l'épaississement des parois et à réduire le flux de sang qui parvient au niveau des tissus (**Manach et al., 2005 ; Crozier et al., 2010**).

Les polyphénols agiraient aussi en inhibant l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose qui peut conduire à l'occlusion des artères, ils sont regroupés dans la catégorie de veinotoniques et des vasculo-protecteurs, un certain nombre de molécules polyphénoliques sont également en étude clinique comme des antiagrégants plaquettaires ou hypotenseurs sans résultats probants (**Martin et Andriantsitohaina, 2002 ; Manach et al., 2005 ; Ghosh et al., 2009**).

## II.2. Les techniques de séparation

Les méthodes de séparation des composés phénoliques ont fait des progrès spectaculaires au cours des dernières années, mais il n'existe aucune méthode permettant d'extraire et de séparer de manière satisfaisante et simultanée l'ensemble des composés phénoliques (**Naczk et al., 2004 ; Macheix et al., 2005**).

La complexité des extraits phénoliques nécessite des techniques de séparation efficaces pour identifier les diverses molécules d'intérêt, alors différentes techniques d'analyse s'offrent à l'expérimentateur pour la séparation des polyphénols telles que :

- ✓ La chromatographie sur couche mince (*Thin Layer Chromatography*, TLC) ;
- ✓ La chromatographie sur colonne ;
- ✓ La chromatographie en phase gazeuse (*Gas Chromatography*, GC);

- ✓ La chromatographie liquide de haute performance en phase normale (HPLC en phase normale);
- ✓ La chromatographie liquide de haute performance en phase inversée (HPLC en phase inverse) ;
- ✓ L'électrochromatographie capillaire (*Capillary Electrochromatography*, CEC) (**Marston, 2007**).

### II.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une méthode basée sur les différentes affinités d'un ou plusieurs composés à l'égard de deux phases (stationnaire et mobile) permettant de séparer et d'identifier les différents composés d'un mélange. (**D'alvise et al., 2000**)

L'échantillon est entraîné par un courant de phase mobile au contact d'une phase stationnaire, chaque composé présent migre à une vitesse différente qui dépend de ses caractéristiques et de celles des deux phases (**D'alvise et al., 2000**).

La chromatographie sur couche mince est une méthode facile à mettre en œuvre, elle donne l'avantage de nécessiter peu de matériel et de fournir des résultats facilement interprétables et toujours très reproductibles (**Bataille, 2000**).

A l'origine, la CCM a été utilisée pour la séparation des substances colorées (d'où son nom). Aujourd'hui, elle est considérée comme une méthode puissante pour les analyses qualitatives et quantitatives. Elle permet aussi, de suivre l'évolution d'une réaction et de tester la pureté d'un solvant (**Delmeyda, 2001**).

#### II.2.1.1. Principe de la CCM

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. La séparation des constituants du dépôt se fait à l'aide de deux phases : une phase mobile qui est un solvant ou un mélange de solvants, et une phase stationnaire qui est un adsorbant maintenu sur une plaque de verre ou de plastique rigide (**Bounias, 1983**).

L'échantillon à analyser doit se trouver dans un solvant volatil et le dépôt se fait alors sur une extrémité de la phase stationnaire, et les constituants de l'échantillon sont alors élués (entraînés) par la phase mobile qui monte par capillarité vers le haut de la plaque. Les

substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant (**Delmeyda, 2001**).

### II.2.2. Chromatographie sur colonne

Chromatographie sur colonne est une méthode utilisée pour purifier les composés chimiques individuels à partir de mélanges de composés (**Diehl, 1984**).

La colonne classique de chromatographie préparatoire, est un tube en verre avec un diamètre de 50 mm et une hauteur de 50 cm à 1 m avec un robinet au fond (**Diehl, 1984**).

Deux méthodes sont généralement utilisées pour préparer une colonne; la méthode sèche, et la méthode humide, pour la méthode sèche, la colonne est d'abord remplie de poudre de phase stationnaire sèche, suivie par l'ajout de la phase mobile, qui est rincé à travers la colonne jusqu'à ce qu'il soit complètement mouillé, et à partir de ce point n'est jamais autorisé à courir à sec, et pour la méthode humide, une boue est préparée de la éluant avec la poudre de phase stationnaire et ensuite soigneusement versée dans la colonne, il faut prendre soin d'éviter les bulles d'air (**Diehl, 1984**).

Une solution de la matière organique est reproduite à la pipette en haut de la phase stationnaire, cette couche est généralement garnie d'une petite couche de sable ou de coton pour protéger la forme de la couche organique de la vitesse d'éluant nouvellement ajouté, et éluant est lentement traversé la colonne pour faire avancer la matière organique. Souvent, un réservoir éluant sphérique est placé au-dessus de la colonne (**Diehl, 1984**).

Chromatographie flash sur colonne (Flash Chromatography) est une technique de chromatographie spécialisée qui utilise du gaz comprimé (comme l'azote ou l'air) ou une pompe pour pousser le solvant dans la colonne. (**Zurbrick et James, 2008**).

Les considérations spéciales pour la chromatographie éclair comprennent l'utilisation d'une granulométrie plus fine pour la phase stationnaire (comme le gel de silice) (**Zurbrick et James, 2008**).

#### II.2.2.1. Principe de chromatographie sur colonne

Cette chromatographie est basée sur le même principe que la CCM, sauf que la silice est placée dans une colonne et non sur une plaque. On utilise une colonne en verre équipée d'un verre fritté et d'un robinet, la colonne est remplie d'une poudre, généralement de

l'alumine ou de la silice, ou une résine échangeuse d'ions, un mélange est placé en haut de la colonne (**Horowitz, 2000**).

Selon la nature de l'éluant et du contenu de la colonne, certaines molécules sont plus facilement éluées que d'autres (**Still et al., 1978**).

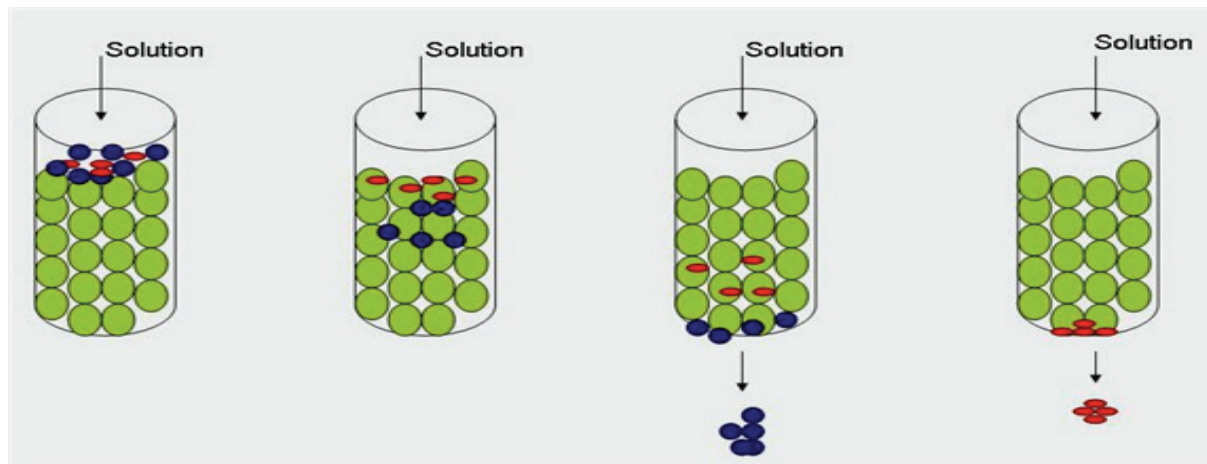


Figure 06 : Principe de chromatographie sur colonne (**Horowitz, 2000**)

#### II.2.2.2. Les type de chromatographie sur colonne

Deux types de chromatographie existent:

- **Chromatographie par gravité**

Elle utilise des particules de silice de 70 à 200  $\mu\text{m}$  et le solvant s'écoule au goutte-à-goutte. Cette technique est désuète car elle demande une plus grande quantité de silice et de solvant (**Diehl, 1984**).

- **Chromatographie éclair (flash)**

Dans certaines circonstances, on peut utiliser la technique de la "chromato-flash", où, pour gagner du temps, on monte la colonne sur une fiole à vide branchée sur une pompe (**Diehl, 1984**).

Elle utilise des particules de silice de 35 à 70  $\mu\text{m}$  et le solvant s'écoule sous pression d'air comprimé (**Still et al., 1978**).

### III.1. Matériel

#### III.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal comprend la partie aérienne florale (feuilles) de l'espèce *Cytisus villosus* récoltée de la région El-Milia, Wilaya de Jijel au mois de Mars 2017 au stade plein de floraison.

La partie aérienne est bien nettoyée, séchée à l'ombre et à température ambiante, stockée à l'abri de la lumière puis broyée à l'aide d'un broyeur pour avoir une poudre à partir de laquelle les extraits ont été réalisés.

#### III.1.2. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans l'essai antibactérien sont :

- Les bactéries à Gram<sup>-</sup> et les bactéries à Gram<sup>+</sup> qui sont conservées à 4°C dans des tubes à essais contenant le milieu solide incliné GN jusqu'à l'utilisation.

Gram <sup>+</sup>	Gram <sup>-</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 25922)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)
	<i>Acenitobacter bumanii</i> (ATCC 19606)
	<i>Salmonella sp</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i> (ATCC 25922)

Les souches fongiques disponibles sont :

- *Aspergillus niger* ;
- *Aspergillus flavus* ;
- *Penicillium sp* .

### III.1.3. Produits chimiques et réactifs

Les solvants organiques utilisés dans les différents compartiments de cette étude sont les suivants:

- ✓ **Alcools** : Méthanol, éthanol.
- ✓ **Acides** : Acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).
- ✓ **Autres produits** : Chlorure de barium, acétone, éther de pétrole, acétate d'éthyle et DMSO.

### III.1.4. Milieux de culture

Au cours de cette étude, nous avons utilisé ce qui suit :

- ✓ **Les géloses** : Gélose Mueller-Hinton, gélose nutritive, PDA, gélose Sabouraud (**Voir annexe 1**).
- ✓ **Les bouillons** : Bouillon nutritif, bouillon Muller-Hinton (**Voir annexe 1**).

### III.1.5. Appareillage

L'appareillage utilisé est le suivant :

- ✓ Broyeur (SYNX);
- ✓ Vortex (VELP);
- ✓ Bain marie (MEMMERT);
- ✓ Four Pasteur (MEMMERT);
- ✓ Etuve (MEMMERT);
- ✓ Balance (OHAUS) et balance de précision;
- ✓ Autoclave;
- ✓ Centrifugeuse électrique;
- ✓ Evaporateur d'un type rotatif (HAHNVAPOR);
- ✓ Agitateur magnétique (SCIOLOGEX);
- ✓ Chambre à UV à 264/365 nm (VILBER COURMAT).

## III.2. Méthodes

### III.2.1. Préparation des extraits

Cette technique a été décrite par (Isbilir *et al.*, 2012). Cette étape consiste à extraire le maximum de molécules poly-phénoliques contenues dans les parties aériennes de la plante en utilisant des solvants organiques, les étapes utilisées dans ce travail sont les suivantes :

- Séchage, broyage (figure 07), macération, centrifugation, filtration, rota-évaporation, récupération des extraits.



Figure 07 : Le broyage de la plante

#### III.2.1.1. Macération et agitation

La macération du matériel végétal broyé a été faite dans différents solvants (Méthanol/Ethanol/Acétone/Eau).

Généralement cette opération est répétée trois fois pour extraire le maximum de principes actifs.

Une prise d'essai de 10g de poudre a été mise à macérer dans 150 ml de chaque solvant, répétée 3 fois, sous l'agitation à température ambiante pendant une nuit (figure 08).

En effet, cette série d'extraction a permis d'obtenir 4 extraits organiques bruts: extrait de méthanol, extrait d'acétone, extrait d'éthanol et extrait aqueux qui seront récupérés dans des flacons en verre puis conservés à 4° C jusqu'à utilisation.

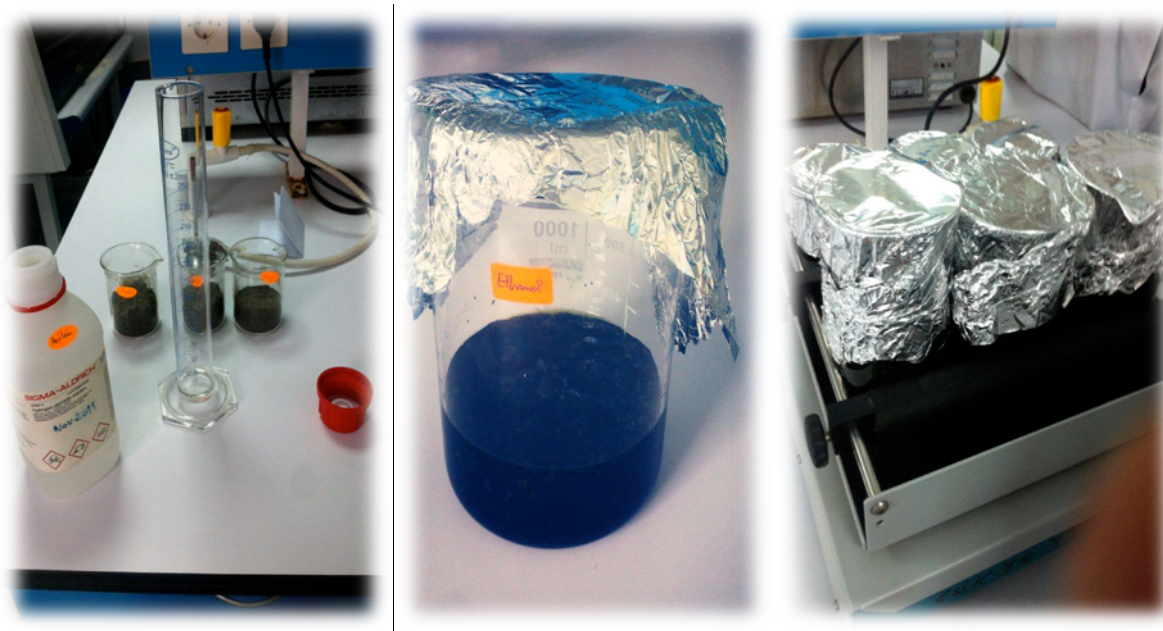


Figure 08 : Etapes de la macération et d'agitation

### III.2.1.2. Centrifugation et filtration

Les extraits ensuite ont été centrifugés pendant 15 min à 3000g, après ont été filtrés sur un papier Wattman filtre N°3 (figure 09).

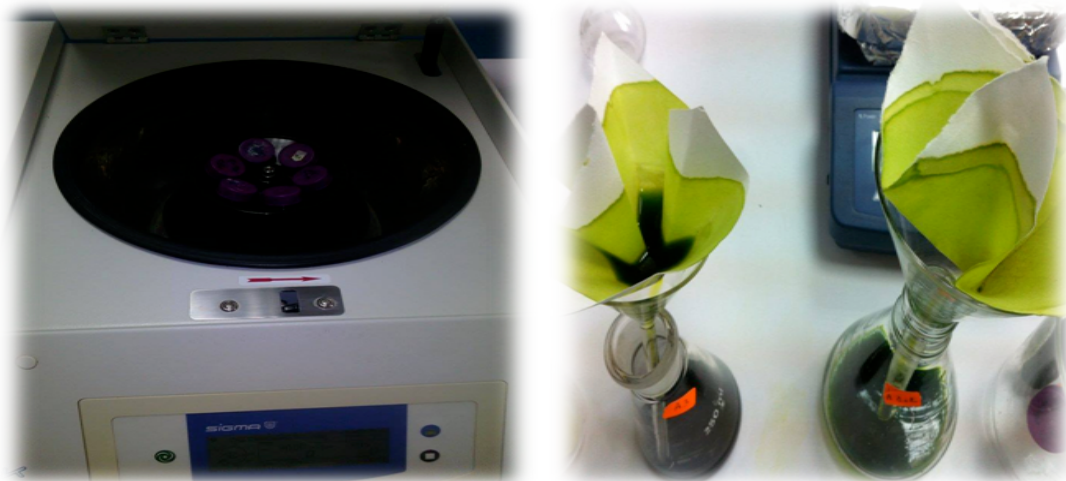
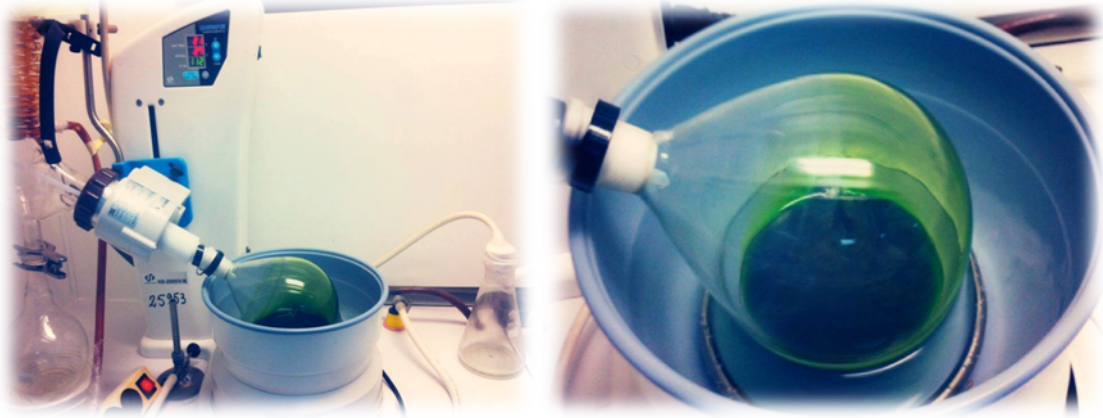


Figure 09 : Etapes de centrifugation et de filtration

### III.2.1.3. Rota-évaporation et récupération des extraits

Les extraits sont ensuite évaporés à sec sous pression et à température ambiante, le rendement est ensuite calculé pour chaque extrait (3 répétitions) et le résidu est récupéré par la suite à concentration de 100mg/ml.



**Figure 10** : La rota-évaporation

#### III.2.1.4. Détermination du Rendement

Selon la norme AFNOR (1986), le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait obtenu après l'extraction ( $M'$ ) et la masse sèche du matériel végétal utilisée ( $M$ ). Le rendement est exprimé en pourcentage, et il est donné par la formule suivante :

$$\text{Rd \%} = (M' / M) * 100$$

Les extraits ont été conservés dans le réfrigérateur à 4°C.

#### III.2.2. Etude de l'activité antimicrobienne

Deux méthodes différentes sont employées pour l'évaluation de l'effet antimicrobien des différents extraits bruts :

- ✓ La méthode de diffusion à partir d'un disque de papier qui permet la mise en évidence de l'activité antimicrobienne des différents extraits.
- ✓ La méthode de micro-dilutions qui a pour objectif de la détermination des CMI (Concentrations Minimales Inhibitrices) à partir d'une gamme de concentrations de produit dans le milieu de culture.

##### III.2.2.1. Préparation d'inoculum

###### a. Revivification des souches

Les souches bactériennes ont été revivifiées dans un bouillon nutritif à 37°C pendant 24 heures. Puis chaque souche a été repiquée en stries sur la surface des boîtes de pétries pré-coulés en gélose nutritive pour obtenir des colonies bien isolées après incubation de 24 heures à 37 °C qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

### b. Préparation de l'inoculum

L'inoculum a été préparé à partir de colonies viables fraîchement identifiées dans un tube à essai stérile contenant de 10ml d'eau physiologique. La turbidité est ajustée à l'aide d'un vortex et comparé à 0.5 Mac Farland (**Voir annexe 2**).

### III.2.2.2. Test de l'activité antimicrobienne (méthode de diffusion à partir d'un disque)

#### a) Activité antibactérienne

La méthode de diffusion à partir d'un disque solide a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des extraits vis-à-vis des germes cibles.

La gélose Mueller-Hinton est coulée dans des boîtes de Pétri et écouvillonnée par les inoculum bactériens déjà préparés, puis des disques de papier Wattman n°3 de 6mm de diamètre, stérilisés auparavant à l'étuve (120 °C pendant 15 min), ces disques sont placés à la surface des gélouses, 10µl de chaque extrait a été déposé sur les disques.

L'expérience est répétée trois (03) fois pour chaque extrait et pour chaque espèce bactérienne (figure 11).

Après l'incubation de 18-24H à 37C°, l'activité antibactérienne a été détectée par la présence des différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques.



**Figure 11** : Méthode de diffusion à partir d'un disque solide

**b) Activité antifongique**

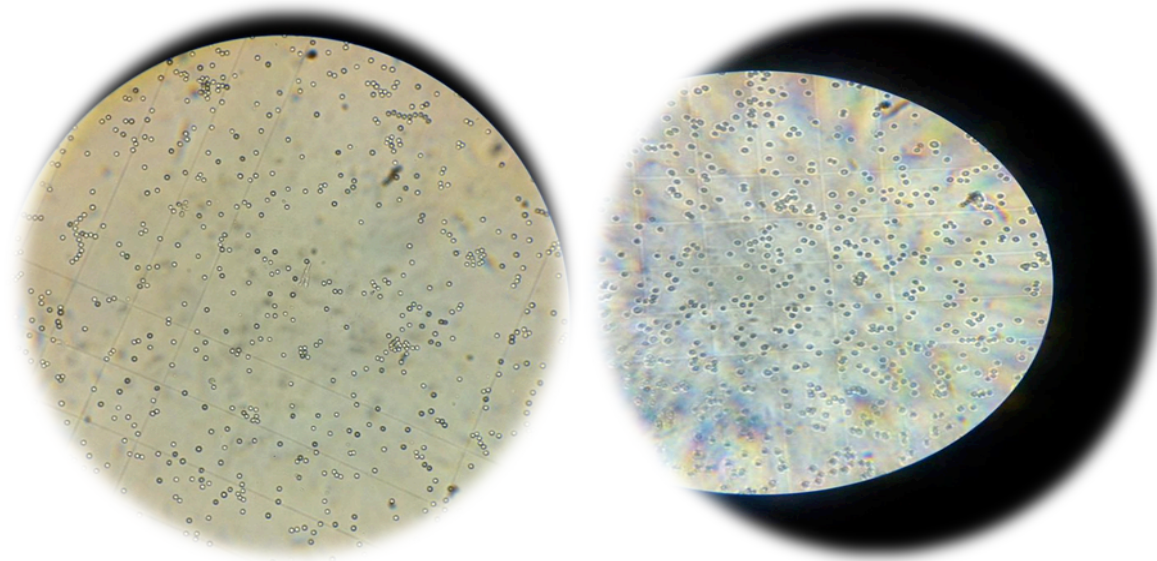
Sur une boîte ensemencée par la souche à tester, et qui a été incubée à 37°C pendant 5 jours. 10 ml de l'eau distillée contenant de Tween 20 sont mis sur la surface de la boîte. La colonie fongique est rincée soigneusement par la solution de Tween 20, en faisant des mouvements circulaire de la boîte de Pétri afin d'obtenir le nombre maximal de spores. La suspension sporale est ensuite récupérée stérilement dans un tube à essai stérile (figure 12) (**Guarro *et al.*, 1998**).

L'inoculum est standardisé à une concentration de  $1-2 \cdot 10^5$  spore /ml par un comptage en utilisant la cellule de Mallassez, les spores ont été observés sous un microscope optique à grossissement (\*40) (figure 12) (**Guarro *et al.*, 1998**).

L'ensemencement, le dépôt des disques, l'incubation et la lecture des résultats, se fait par les mêmes techniques utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne.



**Figure 12 :** Préparation de l'inoculum fongique et sa standardisation



**Figure 13 :** Observation microscopique des spores fongiques d'*Aspergillus niger* et *A. flavus*

### III.2.2.3. Méthode des micro-dilutions en milieu liquide

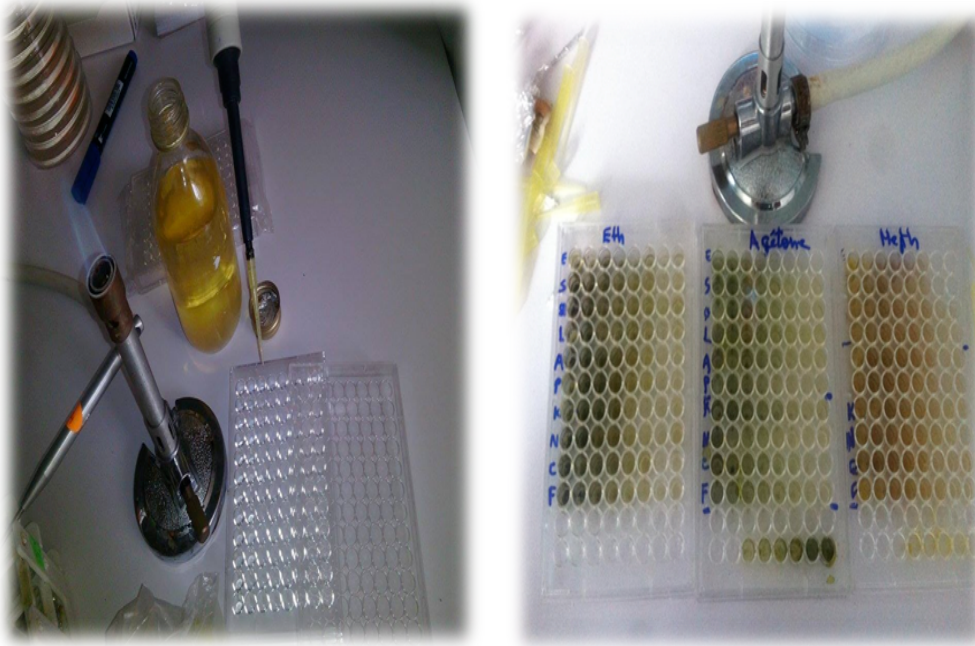
#### a) Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et les Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) ont été déterminées en utilisant la technique de micro-dilution avec le bouillon Muller Hinton.

La micro-dilution est généralement effectuée dans des plaques de 96 puits à fond arrondi. Les suspensions microbiennes ont été diluées avec du bouillon et distribuées dans ces plaques. (Kahlmeter et Turnidge, 2012).

Une solution-mère de chaque extrait (d'une concentration finale de 100 mg/ml) est obtenue, puis une série de dilutions est réalisée extemporanément à partir de cette solution, la gamme de concentrations finales ainsi obtenue correspond à  $1/2 - 1/4 - 1/8 - 1/16 - 1/32 - 1/64 - 1/128$  et  $1/256$ . 100  $\mu$ l de chaque dilution sont alors incorporés à 90  $\mu$ l de bouillon Mueller Hinton puisensemencé par 10  $\mu$ l de l'inoculum bactérien ou fongique standardisé. Tous les essais sont répétés trois fois. Les plaques ont été recouvertes et incubées à 37 °C pendant 24 heures.

La CMI a été définie comme la concentration minimale d'extrait pour laquelle on n'observe pas de croissance visible à l'œil nu.

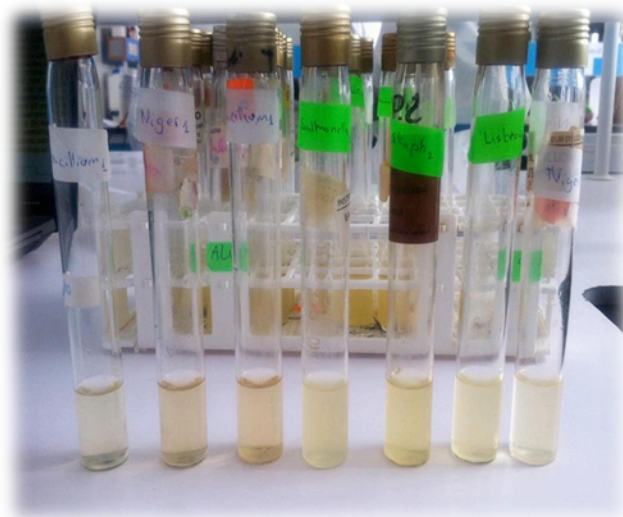


**Figure 14 :** La méthode de la micro-dilution en milieu liquide

**b) Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) et Fongicide (CMF)**

La CMB et la CMF ont été déterminées en prélevant 100  $\mu$ l de chaque suspension dans les puits sans croissance visible et en ensemençant du bouillon MH.

L'incubation s'est faite à 37 °C pendant 48 heures au bout desquelles on a procédé au comptage des colonies.



**Figure 15 :** Méthode de réalisation de la CMB et CMF

### III.2.3. Séparation des composés phénoliques

#### III.2.3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Dans cette présente étude les échantillons sont analysés en utilisant des plaques commerciales prêtes à être utiliser, de gel de silice de dimension 4x10 cm activées au four Pasteur pendant 15min à 120C° (figure 16).

La phase mobile est constituée par un mélange des solvants organiques. Pour cela, différents systèmes des solvants ont été essayés pour définir ceux qui donnent les meilleures séparations.

Les échantillons et les standards ont été déposés sur les plaques de gel de silice, ensuite les plaques sont introduites dans la chambre de migration préalablement saturée par la phase mobile correspondante.

Après développement, les plaques ont été séchées à l'aide d'un sèche à cheveux et observées à la lampe UV à (254.nm et 365nm).

Enfin les rapports frontaux sont calculés. La disposition des substances (spots) sur la chromatographie est exprimée le plus souvent en rapport frontal : " $R_f = d / D$ ".

- **D**: La distance parcouru par le front du solvant.
- **d**: Distance entre la ligne de dépôt et le centre de spot.



Figure 16: Méthode de préparation de la CCM

### II.2.3.2. Chromatographie sur colonne

La séparation des composés phénolique de *Cytisus villosus* a été réalisée selon la méthode décrite par (Harwood, 1985) par les étapes suivantes :

#### ✓ Préparation de la colonne

Une éprouvette graduée est utilisée comme colonne dans laquelle une boulette de coton bien serrée et bien tassée est introduite, qui jouera le rôle de filtre et de « bouchon » (figure 17). Une série de tubes à essais propres et secs (40) ont été préparés et numérotés de 0% Ether de pétrole à 100% Chloroforme puis de 100% Chloroforme à 100% Acétate d'éthyle (tableau 02). 5g du gel de silice est versé, puis tassé.

#### ✓ Remplissage de la colonne

La colonne est remplie avec 2/3 de solvant, puis l'adsorbant est laissé couler dans la colonne à l'aide d'un entonnoir en faisant attention à avoir une répartition homogène dans la colonne.

#### ✓ Dépôt des produits et élution

L'élution est fait selon un gradient de solvant polaire, en faisant varier les proportions de solvant composant l'éluant. Dans ce cas, la colonne doit être préparée avec le solvant le moins polaire (Pedersen et Rosenbohm, 2001).

**Tableau 02 :** Gradient d'élution utilisé lors de la chromatographie sur colonne

<b>Ether de pétrole %</b>	<b>100</b>	<b>95</b>	<b>90</b>	<b>85</b>	<b>..</b>	<b>..</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
<b>Chloroforme %</b>	0	5	10	15	..	..	90	95	100

#### ✓ Récupération des fractions obtenues

Les fractions obtenues ont été récupérées après séchage dans des boites de pétri en verre. Le rendement est ensuite calculé pour chaque fraction et le résidu est récupéré par la suite en utilisant le DMSO à concentration de 100mg/ml.



**Figure 17** : Etapes de récupérations des fractions obtenues



**Figure 18** : Dispositif utilisé pour la chromatographie sur colonne

**II.2.4. Etude de l'activité antibactérienne des fractions obtenues**

Après récupération des fractions obtenues, chaque fraction a été testée pour son activité antibactérienne vis à vis les souches bactériennes suivantes :

<b>Gram <sup>+</sup></b>	<b>Gram <sup>-</sup></b>
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 25922)	<i>Salmonella</i> sp

L'activité antibactérienne se fait par les mêmes techniques utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne des extraits, sauf que la disposition des fractions sur les disques se fait par le DMSO récupéré.

#### IV. Résultats et discussion

Le présent travail porte sur "La séparation des composés phénoliques et l'étude de l'activité antimicrobienne de la partie aérienne de la plante médicinale *Cytisus villosus*".

##### IV.1. Résultats du rendement d'extraction

La macération de 10/20 g de matière végétale dans 150/300ml de solvant (éthanol, méthanol, acétone et eau distillée) nous a permis de calculer le rendement d'extraction. Les résultats sont résumés dans le tableau 03.

**Tableau 03** : Résultats du rendement d'extraction

Extrait	Rendement (%)
Méthanol	25.75±2.06
Ethanol	24.1±1
Acétone	10.57±2.45
Aqueux	12.81±2.50

L'analyse statistique des résultats de tableau 03 par le test ANOVA a montré une différence très hautement significative avec  $p < 0,0001$ . Ainsi les résultats de test de comparaison multiple (HSD) ont montré que les extraits méthanolique et éthanoïque ont le meilleur rendement ( $p < 0,002$ ).

**Tableau 04** : Résultats de test des comparaisons multiple (HSD) pour le rendement d'extraction

Modalités	Moyenne	Regroupements
Methanol	25.813	A
Ethanol	24.100	A
Aqueux	12.813	B
Acétone	10.570	B

Les études précédentes montrent que le méthanol et éthanol sont les solvants les plus utilisés pour une haute récupération de composés phénoliques et l'obtention d'une meilleure activité antibactérienne (Barros *et al.*, 2010 ; Sahreen *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2010; Bouzid *et al.*, 2011).

Nos résultats montrent que le méthanol et le meilleur solvant pour l'extraction des polyphénols de *Cytisus villosus*. En effet, il a été recommandé et fréquemment employé pour l'extraction des composés phénoliques (Falleh *et al.*, 2008).

## IV.2. Résultats de l'étude de l'activité antimicrobienne

### IV.2.1. L'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits de *Cytisus villosus* est testée vis-à-vis de sept souches bactériennes par la méthode de diffusion des disques. Les résultats sont montrés dans le tableau 05.

**Tableau 05** : Diamètre des zones d'inhibition des souches bactériennes

Souches testées	Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
	Méthanol	Ethanol	Acétone	Aqueux
<i>Escherichia coli</i>	12±2	12.33±1.15	12±0	00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12.33±0.57	9.58±1.52	12.33±1.15	00
<i>Salmonella sp</i>	11.33±0.57	11.33±5.41	14±2.65	00
<i>Klebsiella oxycota</i>	12.33±0.57	12.33±0.57	12.33±0.57	00
<i>Listeria monocytogenese</i>	8±2	10.66±1.52	10.33±4.04	00
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10±1	11±1	10.66±2.08	00
<i>Staphylococcus aureus</i>	8.33±1.15	9±1	11±3.60	00

Les résultats révèlent que les l'extraits de *Cytisus villosus* (suaf l'extrait aqueux) exercent un effet antibactérien vis-à-vis de toutes les souches testées. l'activité antibactérienne la plus élevée à été observée avec la souche *Salmonella sp* (14 mm) avec l'extrait acétone et la souche *E.coli* (12 mm) (figure 18) avec l'extrait méthanoïque, éthanoïque et d'acétone. Il est à noter que parmi les extraits testés, l'extrait aqueux n'a montré aucune activité antibactérienne vis-à-vis de toutes les souches testées (Tableau 05).



**Figure 19** : Zones d'inhibition avec les souches bactériennes avec l'extrait méthanoïque et aqueux appartenant à la plante *Cytisus villosus* (Voir annexe 4)

L'analyse statistique des résultats de tableau par le test ANOVA a montré une différence très hautement significative avec  $p < 0,0001$ . Ainsi les résultats de test de comparaison multiple (HSD) ont montré que les extraits méthanoïques et éthanoïques ont la meilleure activité antibactérienne ( $p < 0,0001$ ) (Tableau 06).

**Tableau 06** : Résultats de test de comparaison multiple pour l'activité antibactérienne des extraits de *Cytisus villosus*

Modalités	Moyenne	Regroupements
Methanol	11.476	A
Ethanol	10.476	A
Acetone	5.857	B

De plus l'analyse statistique des résultats n'a montré aucune différence significative en ce qui concerne la sensibilité des souches testées vis-à-vis des extraits testés, (tableau 07).

**Tableau 07** : Résultats de test de comparaison multiple HSD pour la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait acétonique

Modalités	Moyenne	Regroupements		
<i>E.coli</i>	10.333	A		
<i>S.aureus</i>	8.667	A	B	
<i>P.aerugenosa</i>	7.667	A	B	
<i>Klebsiella</i>	7.000	A	B	
<i>Salmonella.sp</i>	4.667	A	B	C
<i>Acenitobacter</i>	2.667		B	C
<i>Listeria</i>	0.000			C

Il ressort du tableau 07 que la souche *E.coli* est la souche la plus sensible vis-à-vis de l'extrait cétonique, et la souche *Listeria oxytoca* semble la moins sensible par le même extrait.

**Tableau 08** : Résultats de test de comparaison multiple HSD pour la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait méthanoïque

Modalités	Moyenne	Regroupements
<i>P.aerugenosa</i>	12.333	A
<i>Klebsiella</i>	12.333	A
<i>E.coli</i>	12.000	A
<i>Listeria</i>	11.667	A
<i>S.aureus</i>	11.333	A
<i>Salmonella.sp</i>	11.333	A
<i>Acenitobacter</i>	9.667	A

En analysant le tableau des résultats du test HSD pour la sensibilité des souches testées vis-à-vis de l'extrait méthanolique, il ressort que ce dernier exerce un effet égal vis-à-vis de toutes les souches testées.

**Tableau 09** : Résultats de test de comparaison multiple HSD pour la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait éthanoïque

Modalités	Moyenne	Regroupements		
<i>E.coli</i>	12.333	A		
<i>Klebsiella</i>	12.333	A		
<i>Acenitobacter</i>	11.000	A	B	
<i>Listeria</i>	10.667	A	B	C
<i>P.aerugenosa</i>	10.333	A	B	C
<i>S.aureus</i>	9.000		B	C
<i>Salmonella.sp</i>	7.667			C

Pour l'extrait éthanoïque (tableau 09), il est à remarquer que *Klebsiella pneumoniae* et *E.coli* ont été trouvées les souches les plus sensibles à cet extrait, par contre la souche la moins sensible était *Salmonella sp.*

Plusieurs travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram (+) par rapport aux Gram (-) (Falleh *et al.*, 2008 ; Hayouni *et al.*, 2007 ; Turkmen *et al.*, 2007 ; Shan *et al.*, 2007 ; Koné *et al.*, 2004), Ceci peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram (-) et Gram (+). Les bactéries Gram (-), indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle la membrane externe, qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules. Néanmoins, la présence des porines dans cette couche permettra la diffusion libre des molécules avec une masse moléculaire en-dessous de 600 Da.

Cependant, l'inhibition de la croissance des bactéries Gram (-) a été rapportée, particulièrement en combinaison avec les facteurs qui peuvent déranger l'intégrité de la cellule et/ou la perméabilité de la membrane, telle que les basses valeurs du pH et concentrations accrues en NaCl (Georgantelis *et al.*, 2007).

Nos résultats sont en accords avec ce qui est trouvé par (Guesmi et Boudabous, 2006) qui n'ont révélé aucune activité antimicrobienne sélective vis-à-vis les bactéries Gram (+) ou Gram (-).

La zone d'inhibition augmente considérablement avec la concentration des extraits, ce qui a été constaté aussi par **Dordevic et ses collaborateurs, (2007)**. Les auteurs ont révélé des zones d'inhibition de l'ordre de  $(20.5 \pm 1.8 \text{ mm})$ ,  $(12.8 \pm 0.5 \text{ mm})$ ,  $(16.3 \pm 0.5 \text{ mm})$  respectivement pour les souches *Staphylococcus aureus* ATCC, *Escherichia coli* ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC pour une dilution au 2% d'extrait de *Carlina acanthifolia*, ces zones sont augmentées de l'ordre de :  $(21.8 \pm 0.9 \text{ mm})$ ,  $(13.5 \pm 0.5 \text{ mm})$ ,  $(19.3 \pm 0.5 \text{ mm})$  pour une dilution au 4%.

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne influe aussi les résultats (**Natarajan et al., 2005**) et (**Fazeli et al., 2007**) ont constaté que la méthode de diffusion à partir des puits sur gélose est plus adaptée pour étudier l'activité des extraits aqueux et organiques de l'*Euphorbia fusiformis* et Hydro-éthanoïques de *Rhus coriaria* et *Zataria multiflora*, que la méthode de diffusion en milieu gélosé .

Plusieurs classes de polyphénols telles que les acides phénoliques, flavonoïdes et les tannins servent de mécanisme de défense des plantes contre les micro-organismes, les insectes, et les herbivores pathogènes (**Falleh et al., 2008**). Les Polyphénols, tels que les tannins et les flavonoïdes comme l'epigallocatechine, la catéchine, la myricétine, la quercétine, (**Shan et al., 2007**) et lutéoline (**Askun et al., 2009**) sont des substances antibactériennes importantes.

Il a été rapporté que les composés responsables de l'action antibactérienne semblent vraisemblablement être les diterpénoïdes phénoliques, qui sont les composés principaux de la fraction apolaire des extraits des plantes (**Fernandez-Lopez et al., 2005**). Ce qui explique l'activité de nos extraits.

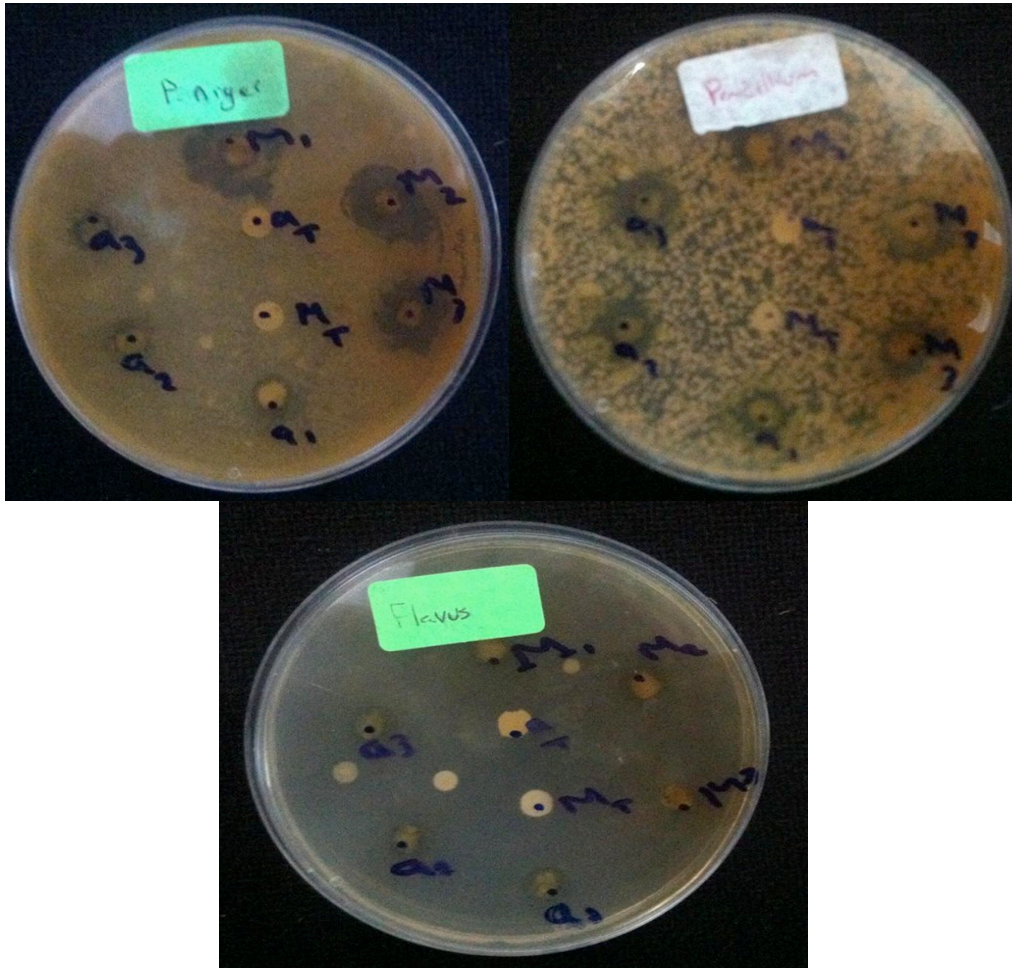
#### IV.2.2. L'activité antifongique

L'activité antifongique testée par la méthode de diffusion sur gélose. Le tableau 10 résume les résultats trouvés.

**Tableau 10** : Diamètre des zones d'inhibition des champignons

Champignons testés	Diamètres des zones d'inhibition (mm)		
	Témoin	Méthanol	Acétone
<i>Aspergillus niger</i>	0	18±4.24	9.33±2.31
<i>Aspergillus flavus</i>	0	7±1	6.66±0.57
<i>Penicillium</i>	0	14±1.73	12±2

Pour l'étude de l'activité antifongique, les deux extraits ont montré une activité remarquable vis-à-vis des trois souches testées. Il est remarquable que l'activité la plus élevée a été enregistrée avec la souche de *A.niger* avec une zone d'inhibition de 18 mm (figure 19).



**Figure 20** : Zones d'inhibition des souches fongiques avec l'extrait méthanoïque et cétonique appartenant à la plante *Cytisus villosus*

L'analyse statistique des résultats de tableau par le test ANOVA a montré une différence très hautement significative avec  $p < 0,0001$ . Ainsi les résultats de test de comparaison multiple (HSD) ont montré que les extraits méthanolique et d'acétone ont la meilleure activité antifongique ( $p < 0,0001$ ) Tableau 10. En outre il à noter que la souche *A.niger* était la souche la plus sensible à l'égard des extraits testés (tableau 11).

**Tableau 11** : Résultats de test de comparaison multiple HSD pour la sensibilité des souches fongiques vis-à-vis de l'extrait méthanoïque et cétonique

Modalités	Moyenne	Regroupements
Méthanol	13.000	A
Acétone	9.333	A

**Tableau 12** : Résultats de test de comparaison multiple HSD pour la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait éthanoïque

Modalités	Moyenne	Regroupements
<i>A.niger</i>	13.667	A
<i>Penicillium</i>	13.000	A
<i>A.flavus</i>	6.833	B

Cette étude est la première qui évalue l'activité antifongique de *Cytisus villosus*. La présence d'une activité antifongique remarquable vis-à-vis de différents moisissures test, ouvre la porte d'une exploitation dans le domaine pharmaceutique (production des antifongiques naturels moins toxique que les antifongiques polyéniques), ou dans le domaine de la lutte biologique vis-à-vis des agents phytopathogène comme *Fusarium oxysporum*.

La charge du disque influe l'activité antimicrobienne, **Rasooli et ses collaborateurs, (2008)** ont remarqué que l'inhibition de la croissance d'*Aspergillus parasiticus* est forte lorsque le disque est plus chargé en par l'extrait de *Rosmarinus officinalis* et *Trachyspermum Copticum*.

Nous avons employé une quantité élevée de 20µl d'extrait par disque, par rapport à **(Gachkar et al., 2007)** qui ont employé des fractions minimales de 5µl d'extrait, tandis que **(Abutbul et al., 2004)**, **(Dimitrijevic et al., 2007)** ont employé des fractions plus riches : 20 µl et 15 µl par disque.

L'activité antimicrobienne ne dépend pas seulement de la présence des composés phénoliques, mais également de la présence de divers métabolites secondaires **(Kil et al., 2009)**, de l'emplacement et le nombre des groupes d'hydroxyles **(Falleh et al., 2008)**.

Il est important, de préciser qu'un résultat observé lors de l'évaluation d'un extrait brut ou d'une fraction enrichie est la composante de deux paramètres : l'activité intrinsèque des produits actifs et leur quantité relative dans l'extrait. Par exemple, une activité avérée d'un extrait peut aussi bien être le reflet d'une faible quantité de constituants très actifs que d'une grande quantité de constituants peu actifs **(Ferrari, 2002)**, ou à certains constituants tels que les hydrocarbures et les alcools qui démontrent un synergisme **(Chaibi et al., 1997)**.

Pour de nombreuses plantes, en fonction de la date de la récolte il aura des variations très importantes dans la composition chimique et de l'activité. L'exemple du latex obtenu par incision du tronc d'*Alafia multiflora* utilisé pour le traitement des plaies en Afrique tropicale.

Selon la période de récolte le taux d'acide vanillique varie de 5 % à 16 % et l'activité parallèlement d'un facteur 3 (**Balansard, 2007**).

Néanmoins, il est toujours possible que l'ajout de DMSO à un extrait végétal diminue son activité intrinsèque de telle manière que dans ce cas le résultat n'a qu'une valeur relative (**Balansard, 2007**).

On peut expliquer ces résultats par la différence de composition entre les deux extraits, l'alcool permettant une meilleure extraction de composés moins polaires comme des dérivés terpéniques (**Takasaki *et al.*, 1998**).

(**Chabot *et al.*, 1992**) rapporte que les composés les moins polaires comme les flavonoïdes manquant le groupement hydroxyle sur leur cycle B sont plus actifs vis-à-vis des microorganismes que ceux portant le groupe OH.

D'autre part, (**Mori *et al.*, 1987**) ont trouvé que les flavonoïdes trihydroxylés 3',4',5' sur le cycle B et substitués 3-OH sont nécessaires pour l'activité antimicrobienne.

Cela nous pouvons conclure que l'activité antimicrobienne des extraits dépend non seulement des composés phénoliques mais, aussi de la présence de différents métabolites secondaires. Une recherche supplémentaire sur la composition chimique de chaque extrait est plus que nécessaire pour comprendre l'évaluation de composés présentant l'activité antimicrobienne.

## IV.3. Résultats de la méthode des micro-dilutions en milieu liquide

## IV.3.1. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

Tableau 13 : Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'extrait éthanoïque

Concentration (mg/ml)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
<b>Souches</b>								
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella sp</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella oxycota</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenese</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Penicillium</i>	-	-	+	+	+	+	+	+

Tableau 14 : Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'extrait méthanoïque

Concentration (mg/ml)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
<b>Souches</b>								
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>P.aerugenosa</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella sp</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella oxycota</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenese</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium</i>	-	+	+	+	+	+	+	+

**Tableau 15** : Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'extrait acétone

Concentration (mg/ml)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
<b>Souches</b>								
<i>Escherichia coli</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella sp</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella oxycota</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenese</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium</i>	-	+	+	+	+	+	+	+

(+): Trouble (Croissance); (-): Absence de croissance (Inhibition).

#### IV.3.2. Détermination des CMB et CMF

Dans cette étude, les concentrations minimales inhibitrices ont été déterminées en utilisant la technique de microdilution sur microplaque à 96 puits (tableaux ci-dessus 12, 13, 14). Après la lecture des CMI, des ensemencements du bouillon Muller-Hinton sont effectués à partir des tubes sans croissance visible pour déterminer la CMB. Les résultats sont montrés dans les tableaux ci-dessous (tableaux 15, 16, 17).

**Tableau 16** : Concentration Minimale Bactéricide et fongicide (CMB et CMF) de l'extrait éthanoïque

Souches	CMI	CMB	CMB/CMI	Interprétation
<i>Escherichia coli</i>	25	50	2	Bactéricide
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50	50	1	Bactéricide
<i>Salmonella sp</i>	50	50	1	Bactéricide
<i>Klebsiella oxycota</i>	25	50	2	Bactéricide
<i>Listeria monocytogenese</i>	50	50	1	Bactéricide
<i>Acinetobacter baumannii</i>	25	50	2	Bactéricide
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	50	2	Bactéricide
<i>Aspergillus niger</i>	25	25	1	Fongicide
<i>Aspergillus flavus</i>	25	25	1	Fongicide
<i>Penicillium</i>	25	50	2	Fongicide

Il ressort du tableau que l'extrait éthanolique exerce un effet bactéricide et fongicide vis-à-vis de toutes les souches testées. Il est à noter que les CMI sont compris entre 25 et 50 mg/ml.

**Tableau 17** : Concentration Minimale Bactéricide et fongicide (CMB et CMF) de l'extrait méthanoïque

Souches	CMI	CMB	CMB/CMI	Interprétation
<i>Escherichia coli</i>	25	50	2	Bactéricide
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50	50	1	Bactéricide
<i>Salmonella sp</i>	25	50	2	Bactéricide
<i>Klebsiella oxycota</i>	25	50	2	Bactéricide
<i>Listeria monocytogenese</i>	50	50	1	Bactéricide
<i>Acinetobacter baumannii</i>	25	>25	>2	Bactériostatique
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	25	1	Bactéricide
<i>Aspergillus niger</i>	50	50	1	Fongicide
<i>Aspergillus flavus</i>	25	25	1	Fongicide
<i>Penicillium</i>	50	50	1	Fongicide

En analysant les résultats du tableau, on conclure que l'extrait méthanolique exerce un effet bactéricide/fongicide vis-à-vis de toutes les souches testées à l'exception de *Acinetobacter baumannii* dont l'effet semble d'être bactériostatique.

**Tableau 18** : Concentration Minimale Bactéricide et fongicide (CMB et CMF) de l'extrait acétone

Souches	CMI	CMB	CMB/CMI	Interprétation
<i>Escherichia coli</i>	25	>25	>2	Bactériostatique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50	50	1	Bactéricide
<i>Salmonella sp</i>	25	50	2	Bactéricide
<i>Klebsiella oxycota</i>	50	50	1	Bactéricide
<i>Listeria monocytogenese</i>	50	50	1	Bactéricide
<i>Acinetobacter baumannii</i>	25	50	2	Bactéricide
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	50	1	Bactéricide
<i>Aspergillus niger</i>	25	50	2	Fongistatique
<i>Aspergillus flavus</i>	25	25	1	Fongicide
<i>Penicillium</i>	50	50	1	Fongicide

Selon les rapports des CMB/CMI résumés dans le tableau, il est révélé que l'extrait acétonique exerce un effet bactéricide et fongicide à l'égard de la plus part des souches testées.

L'analyse statistique des résultats des CMI a montré une différence significative sensibilité des Gram négatifs par rapport aux souches Gram positive ( $p < 0.05$ ).

Les résultats obtenu par (**Okoro *et al.*, 2010**) ont montré une meilleur activité à l'égard des Gram positives contrairement aux souches Gram négatives testées.

Les résultats obtenus par (**Alzoreky et Nakahara, 2003; El-Kamali et Mahjoub, 2009**) concordent avec ceux observés dans notre étude. La résistance des bactéries Gram négatif à l'encontre des substances naturellement antibactérienne est liée à leur surface hydrophile et leur membrane externe riche en lipopolysaccharides (LPS) que servent de barrière de protection (**Russel et Donnel, 1999**).

Dans une synthèse bibliographique de (**Tajkarimi *et al.*, 2010**), il a été rapporté que les *Pseudomonas*, et plus particulièrement *Pseudomonas aeruginosa*, sont le groupe bactérien le moins sensible à l'effet des composés bioactif.

En fin selon les résultats des CMI et CMB, on suggère que les extraits de la plante *Cytisus villosus* exercent un effet bactéricide et fongicide vis-à-vis des souches testées.

#### **IV.4. Résultats de la séparation des composés phénolique de *Cytisus villosus***

##### **IV.4.1. Détermination du meilleur système de séparation par CCM**

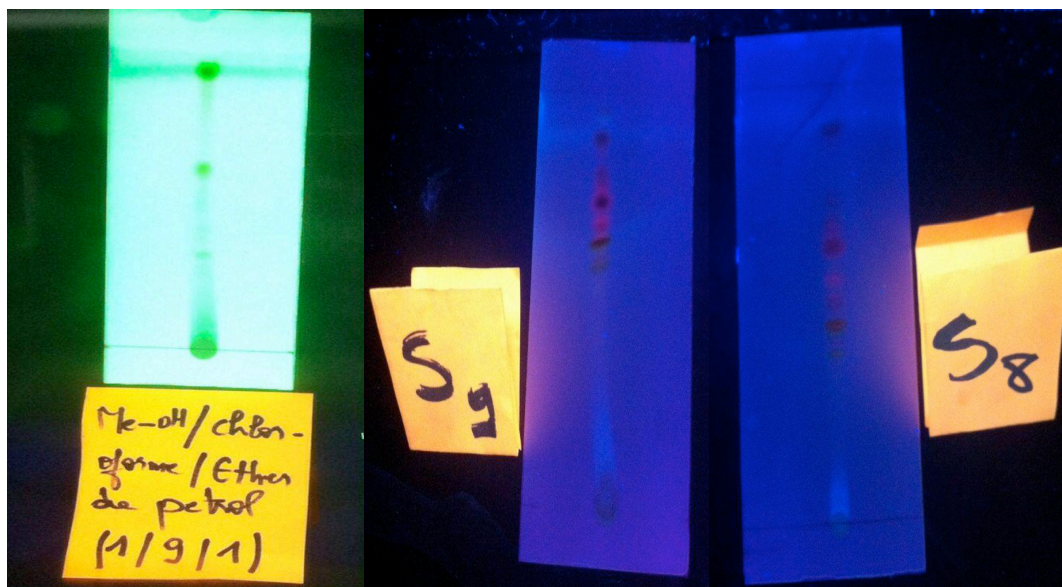
25 systèmes solvants ont été testés pour leur aptitude à séparer les composés phénoliques de *Cytisus villosus* (tableau 18), le meilleur système sera utilisé pour la séparation sur colonne. Après migration et révélation, tous les spots sont dénombrés et les  $R_f$ s sont calculés, une étude statistique est menée pour le choix du meilleur système (figure 20).

Tableau 19 : Résultats de séparation des composés phénolique de *Cytisus villosus* par CCM

S	Solvants (v)	Proportions	spots	(D f-i)	Rapport frontal (Rf)
1	Me-OH / Chl	1/9	5	4	Rf <sub>1</sub> =0.462 / Rf <sub>2</sub> =0.562 / Rf <sub>3</sub> =0.712 / Rf <sub>4</sub> =0.837 / Rf <sub>5</sub> =0.962
2	Me-OH / Chl / PET	1/9/1	7	5.4	Rf <sub>1</sub> =0.25 / Rf <sub>2</sub> =0.312 / Rf <sub>3</sub> =0.362 / Rf <sub>4</sub> =0.475 / Rf <sub>5</sub> =0.6 / Rf <sub>6</sub> =0.85 / Rf <sub>7</sub> =0.912
3	Me-OH / Chl / PET	1/9/3	11	5.3	Rf <sub>1</sub> =0.287 / Rf <sub>2</sub> =0.312 / Rf <sub>3</sub> =0.362 / Rf <sub>4</sub> =0.4 / Rf <sub>5</sub> =0.437 / Rf <sub>6</sub> =0.2 / Rf <sub>7</sub> =0.7 / Rf <sub>8</sub> =0.837 / Rf <sub>9</sub> =0.875 / Rf <sub>10</sub> =0.912 / Rf <sub>11</sub> =0.975
4	Me-OH / Chl / PET	1/2/3	7	2.5	Rf <sub>1</sub> =0.637 / Rf <sub>2</sub> =0.712 / Rf <sub>3</sub> =0.737 / Rf <sub>4</sub> =0.825 / Rf <sub>5</sub> =0.9 / Rf <sub>6</sub> =0.925 / Rf <sub>7</sub> =0.95
5	Me-OH / Chl / PET	1/5/3	6	4.3	Rf <sub>1</sub> =0.425 / Rf <sub>2</sub> =0.45 / Rf <sub>3</sub> =0.626 / Rf <sub>4</sub> =0.775 / Rf <sub>5</sub> =0.925 / Rf <sub>6</sub> =0.962
6	Me-OH / Chl / PET	1/3/3	9	3.2	Rf <sub>1</sub> =0.537 / Rf <sub>2</sub> =0.637 / Rf <sub>3</sub> =0.675 / Rf <sub>4</sub> =0.8 / Rf <sub>5</sub> =0.837 / Rf <sub>6</sub> =0.847 / Rf <sub>7</sub> =0.875 / Rf <sub>8</sub> =0.9 / Rf <sub>9</sub> =0.937
7	Me-OH / Chl / PET	1/3/10	14	3.8	Rf <sub>1</sub> =0.15 / Rf <sub>2</sub> =0.18 / Rf <sub>3</sub> =0.2 / Rf <sub>4</sub> =0.212 / Rf <sub>5</sub> =0.237 / Rf <sub>6</sub> =0.25 / Rf <sub>7</sub> =0.275 / Rf <sub>8</sub> =0.312 / Rf <sub>9</sub> =0.337 / Rf <sub>10</sub> =0.427 / Rf <sub>11</sub> =0.437 / Rf <sub>12</sub> =0.55 / Rf <sub>13</sub> =0.6 / Rf <sub>14</sub> =0.65
8	Me-OH / Chl / PET	1/5/5	11	5	Rf <sub>1</sub> =0.375 / Rf <sub>2</sub> =0.4 / Rf <sub>3</sub> =0.412 / Rf <sub>4</sub> =0.437 / Rf <sub>5</sub> =0.475 / Rf <sub>6</sub> =0.537 / Rf <sub>7</sub> =0.625 / Rf <sub>8</sub> =0.662 / Rf <sub>9</sub> =0.725 / Rf <sub>10</sub> =0.9 / Rf <sub>11</sub> =0.975
9	Me-OH / Chl / PET	2/3/5	14	3	Rf <sub>1</sub> =0.4 / Rf <sub>2</sub> =0.587 / Rf <sub>3</sub> =0.612 / Rf <sub>4</sub> =0.635 / Rf <sub>5</sub> =0.647 / Rf <sub>6</sub> =0.657 / Rf <sub>7</sub> =0.687 / Rf <sub>8</sub> =0.725 / Rf <sub>9</sub> =0.762 / Rf <sub>10</sub> =0.787 / Rf <sub>11</sub> =0.797 / Rf <sub>12</sub> =0.862 / Rf <sub>13</sub> =0.9 / Rf <sub>14</sub> =0.937
10	Me-OH / Chl / PET	2/3/1	11	3	Rf <sub>1</sub> =0.614 / Rf <sub>2</sub> =0.626 / Rf <sub>3</sub> =0.635 / Rf <sub>4</sub> =0.654 / Rf <sub>5</sub> =0.676 / Rf <sub>6</sub> =0.698 / Rf <sub>7</sub> =0.759 / Rf <sub>8</sub> =0.807 / Rf <sub>9</sub> =0.843 / Rf <sub>10</sub> =0.903 / Rf <sub>11</sub> =0.963
11	Et-OH / Chl / PET	2/3/5	7	7.5	Rf <sub>1</sub> =0.062 / Rf <sub>2</sub> =0.087 / Rf <sub>3</sub> =0.687 / Rf <sub>4</sub> =0.787 / Rf <sub>5</sub> =0.925 / Rf <sub>6</sub> =0.962 / Rf <sub>7</sub> =0.987
12	Me-OH / Chl / PET	3/1/1	2	1	Rf <sub>1</sub> =0.05 / Rf <sub>2</sub> =0.162
13	Me-OH / Chl / PET	3/5/5	4	1.2	Rf <sub>1</sub> =0.825 / Rf <sub>2</sub> =0.887 / Rf <sub>3</sub> =0.925 / Rf <sub>4</sub> =0.975
14	Me-OH / Chl / PET	1/13/1	7	5.7	Rf <sub>1</sub> =0.225 / Rf <sub>2</sub> =0.325 / Rf <sub>3</sub> =0.425 / Rf <sub>4</sub> =0.5 / Rf <sub>5</sub> =0.637 / Rf <sub>6</sub> =0.85 / Rf <sub>7</sub> =0.95

15	Me-OH / Chl / PET	3/5/10	6	2.5	Rf <sub>1</sub> =0.625 / Rf <sub>2</sub> =0.7 / Rf <sub>3</sub> =0.737 / Rf <sub>4</sub> =0.8 / Rf <sub>5</sub> =0.85 / Rf <sub>6</sub> =0.937
16	Me-OH / Chl / PET	2/10/10	6	4.2	Rf <sub>1</sub> =0.375 / Rf <sub>2</sub> =0.475 / Rf <sub>3</sub> =0.6 / Rf <sub>4</sub> =0.675 / Rf <sub>5</sub> =0.75 / Rf <sub>6</sub> =0.9
17	Et-O-Ac / Chl / PET	1/2/3	9	6.6	Rf <sub>1</sub> =0.075 / Rf <sub>2</sub> =0.1 / Rf <sub>3</sub> =0.237 / Rf <sub>4</sub> =0.287 / Rf <sub>5</sub> =0.312 / Rf <sub>6</sub> =0.462 / Rf <sub>7</sub> =0.812 / Rf <sub>8</sub> =0.85 / Rf <sub>9</sub> =0.887
18	Et-O-Ac / Chl / PET	1/2/2	18	6.7	Rf <sub>1</sub> =0.162 / Rf <sub>2</sub> =0.187 / Rf <sub>3</sub> =0.2 / Rf <sub>4</sub> =0.225 / Rf <sub>5</sub> =0.237 / Rf <sub>6</sub> =0.262 / Rf <sub>7</sub> =0.287 / Rf <sub>8</sub> =0.325 / Rf <sub>9</sub> =0.35 / Rf <sub>10</sub> =0.425 / Rf <sub>11</sub> =0.45 / Rf <sub>12</sub> =0.475 / Rf <sub>13</sub> =0.662 / Rf <sub>14</sub> =0.7 / Rf <sub>15</sub> =0.75 / Rf <sub>16</sub> =0.862 / Rf <sub>17</sub> =0.962 / Rf <sub>18</sub> =0.987
19	Et-O-Ac / Chl / PET	1/3/2	14	7.5	Rf <sub>1</sub> =0.087 / Rf <sub>2</sub> =0.112 / Rf <sub>3</sub> =0.125 / Rf <sub>4</sub> =0.15 / Rf <sub>5</sub> =0.162 / Rf <sub>6</sub> =0.187 / Rf <sub>7</sub> =0.212 / Rf <sub>8</sub> =0.25 / Rf <sub>9</sub> =0.337 / Rf <sub>10</sub> =0.437 / Rf <sub>11</sub> =0.65 / Rf <sub>12</sub> =0.725 / Rf <sub>13</sub> =0.962 / Rf <sub>14</sub> =0.975
20	Chl / PET	3/2	8	1	Rf <sub>1</sub> =0.1 / Rf <sub>2</sub> =0.112 / Rf <sub>3</sub> =0.137 / Rf <sub>4</sub> =0.162 / Rf <sub>5</sub> =0.175 / Rf <sub>6</sub> =0.2 / Rf <sub>7</sub> =0.212 / Rf <sub>8</sub> =0.237
21	Et-O-Ac / Chl / PET	3/2/1	22	7	Rf <sub>1</sub> =0.087 / Rf <sub>2</sub> =0.1 / Rf <sub>3</sub> =0.125 / Rf <sub>4</sub> =0.137 / Rf <sub>5</sub> =0.175 / Rf <sub>6</sub> =0.212 / Rf <sub>7</sub> =0.237 / Rf <sub>8</sub> =0.262 / Rf <sub>9</sub> =0.275 / Rf <sub>10</sub> =0.3 / Rf <sub>11</sub> =0.325 / Rf <sub>12</sub> =0.362 / Rf <sub>13</sub> =0.4 / Rf <sub>14</sub> =0.425 / Rf <sub>15</sub> =0.45 / Rf <sub>16</sub> =0.478 / Rf <sub>17</sub> =0.537 / Rf <sub>18</sub> =0.587 / Rf <sub>19</sub> =0.712 / Rf <sub>20</sub> =0.85 / Rf <sub>21</sub> =0.9 / Rf <sub>22</sub> =0.962
22	Et-O-Ac / Chl / PET	3/3/1	14	7.4	Rf <sub>1</sub> =0.037 / Rf <sub>2</sub> =0.062 / Rf <sub>3</sub> =0.875 / Rf <sub>4</sub> =0.137 / Rf <sub>5</sub> =0.175 / Rf <sub>6</sub> =0.2 / Rf <sub>7</sub> =0.25 / Rf <sub>8</sub> =0.462 / Rf <sub>9</sub> =0.525 / Rf <sub>10</sub> =0.687 / Rf <sub>11</sub> =0.762 / Rf <sub>12</sub> =0.85 / Rf <sub>13</sub> =0.925 / Rf <sub>14</sub> =0.962
23	Et-O-Ac / Chl / PET	2/3/2	12	7.2	Rf <sub>1</sub> =0.037 / Rf <sub>2</sub> =0.05 / Rf <sub>3</sub> =0.075 / Rf <sub>4</sub> =0.1 / Rf <sub>5</sub> =0.125 / Rf <sub>6</sub> =0.15 / Rf <sub>7</sub> =0.3 / Rf <sub>8</sub> =0.437 / Rf <sub>9</sub> =0.525 / Rf <sub>10</sub> =0.8 / Rf <sub>11</sub> =0.862 / Rf <sub>12</sub> =0.925
24	Et-O-Ac / Chl / PET	2/5/2	13	7.7	Rf <sub>1</sub> =0.025 / Rf <sub>2</sub> =0.037 / Rf <sub>3</sub> =0.05 / Rf <sub>4</sub> =0.075 / Rf <sub>5</sub> =0.112 / Rf <sub>6</sub> =0.125 / Rf <sub>7</sub> =0.137 / Rf <sub>8</sub> =0.15 / Rf <sub>9</sub> =0.175 / Rf <sub>10</sub> =0.237 / Rf <sub>11</sub> =0.85 / Rf <sub>12</sub> =0.912 / Rf <sub>13</sub> =0.987
25	Et-O-Ac / Chl	2/3	5	7.3	Rf <sub>1</sub> =0.05 / Rf <sub>2</sub> =0.15 / Rf <sub>3</sub> =0.175 / Rf <sub>4</sub> =0.712 / Rf <sub>5</sub> =0.962

Me-OH (Méthanol) / Chl (Chloroforme) / PET (Ether de petrol) / Et-O-Ac (Acétate d'éthyl)



**Figure 21** : Observation de la migration des spots sous UV à (254 nm et 365nm) (Voir annexe 5)

#### IV.4.2. La séparation des composés phénoliques par Chromatographie sur colonne

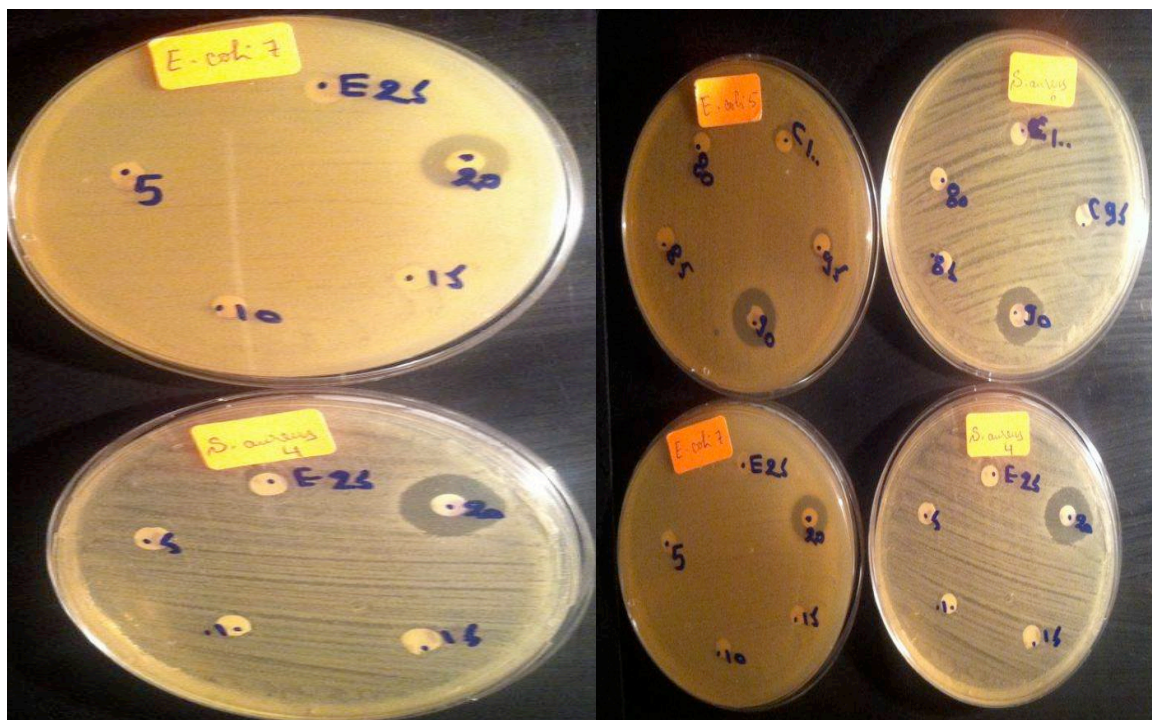
Cette étape est réalisée en utilisant un gradient de polarité ascendant par le système (Ether de pétrole/chloroforme/acétate d'éthyle). 41 fractions ont été récupérées, et testées pour leur activité antibactérienne, les résultats sont consignés dans le (tableau 19).

Selon le tableau, on dénombre 12 fractions actives, regroupées sur 6 groupes comme suit :

- ✓ Les fractions 17, élue à l'Ether de pétrole/Chloroforme (2/8), douée d'une activité contre les Gram positive et négative;
- ✓ Les fractions actives (21, 22, 23) ayant une activité vis-à-vis des souches Gram positifs et Gram négatifs;
- ✓ La fraction 26, élue à l'Ether de pétrole/Chloroforme (2.5/7.5), ayant un spectre large à l'égard des bactéries à Gram positifs et Négatifs;
- ✓ Les fractions (29, 30, 31, 32), actives avec les quatre bactéries testées sauf *S.aureus*;
- ✓ La fraction 36, élue au Chloroforme/Acétate d'éthyle (2.5/7.5), ayant une activité remarquable vis-à-vis de *L.monocytogenes*, ce spectre étroit rend cette fraction très intéressante de point de vue thérapeutique;
- ✓ Les fractions 38 et 39, élues au chloroforme/acétate d'éthyle (1/9) et (0.5/9.5), ayant une activité à l'égard de *Salmonella sp* et *L.monocytogenese*.

**Tableau 20** : Résultats de l'activité antibactérienne des fractions récupérés par chromatographie sur colonne de l'extrait méthanolique de *Cytisus villosus*.

Fraction	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Salmonella sp.</i>
E100%	-	-	-	-
E95%	-	-	-	-
E90%	-	-	-	-
E85%	-	-	-	-
E80%	-	-	-	-
E75%	-	-	-	-
E70%	09	10	-	-
E65%	-	-	-	-
E60%	-	-	-	-
E55%	10	10	-	09
E50%	-	-	-	-
E45%	-	-	-	-
E40%	-	-	-	-
E35%	-	-	-	-
E30%	-	-	-	-
E25%	-	10	-	-
E20%	16	19	10	11
E15%	-	-	-	-
E10%-	-	-	-	-
E05%	-	-	-	-
CH100%	9	10	12	11
CH95%	9	10	7	10
CH90%	18	18	11	12
CH85%	-	-	08	07
CH80%	-	-	11	07
CH75%	07	10	11	09
CH70%	-	-	11	13
CH65%	-	-	09	-
CH60%	08	09	10	07
CH55%	10	10	09	11
CH50%	09	-	11	10
CH45%	07	-	12	13
CH40%	-	-	09	11
CH35%	-	-	08	11
CH30%	-	-	09	08
CH25%	08	-	12	07
CH20%	07	-	9	9
CH15%	-	-	08	09
CH10%	-	-	13	10
CH05%	-	-	10	10
CH00% (AE100%)	7	-	-	-



**Figure 22** : Les zones d'inhibition obtenues par l'activité antibactérienne de fractions récupérées par chromatographie sur colonne de l'extrait méthanoïque de *Cytisus villosus* (Voir annexe 6)

La séparation des composés phénolique de *Cytisus villosus* par flash chromatographie sur colonne, nous a permis de limiter l'activité antibactérienne dans six fractions parmi 41 fractions éluées, la plupart de ces fractions douées d'un spectre large d'activité.

Selon (Pedersen et Rosenbohm, 2001), il est possible d'avoir des produits purs à 95% par HPLC en utilisant le flash chromatographie. La résolution est influencée directement par la qualité du gel, la longueur de la colonne, et le gradient utilisé.

Dans notre cas, il est possible d'augmenter la résolution en utilisant un gradient avec des pas de 1%. (Harwood, 1985) a suggéré que l'utilisation du gel de silice pour la CCM sans liant (le gypse) peut augmenter l'efficacité de la séparation grâce à la petite taille des particules de ce gel. En plus de cette propriété, il est moins cher que ceux utilisé pour la chromatographie sur colonne, ce qui abaisse significativement le cout de cette technique.

Selon (Harwood et al., 1999), une meilleur séparation est obtenu si le mélange à séparer ne contient aucun composé polymère. Donc il est préférable d'éliminer préalablement toutes substances polymère avant l'application de cette technique.



L'accroissement des infections microbiennes, couplées à l'insuffisance en médicaments efficaces, nous a conduits à nous intéresser à l'inépuisable source de produits naturels à vertu thérapeutique : les plantes médicinales.

A côté des médicaments synthétiques prescrits dans le traitement des infections microbiennes, de nombreux produits naturels ont été testés dans le but de trouver un agent antimicrobien efficace, sans effet néfaste pour l'organisme et moins coûteux.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude nous a permis de montrer que les extraits obtenus des feuilles de *Cytisus villosus* testés ont une activité antimicrobienne très importante.

Le test de l'activité antibactérienne appliqué sur sept souches bactériennes et trois souches fongiques dont cinq sont à Gram négatif et les deux autres sont à Gram positif, en utilisant quatre extraits différents : le méthanol, l'éthanol, l'acétone et l'eau, les résultats ont montré aussi une activité antibactérienne très importante sur les souches *P.aeruginosa*, *E.coli* et *Klebsiella*. Pour l'extrait acétone a donné un effet très hautement significatif avec la souche *E.coli*.

L'étude de la séparation par chromatographie sur couche mince après l'utilisation de 25 systèmes a montré que le système Acétate d'éthyle, Chloroforme, Ether de pétrole était le meilleur système pour la séparation des composés phénoliques de *Cytisus villosus*, ce dernier a été utilisé pour la séparation sur colonne, sur les 41 fractions récupérées, six fractions ont montré une activité antibactérienne vis-à-vis de *Salmonella*, *E.coli*, *Listeria oxytoca*, *S.aureus*.

L'étude des concentrations minimales inhibitrices a montré une activité inhibitrice avec les sept souches entre 0.5 et 0.25mg/ml, ainsi que un effet bactéricide et fongicide avec toutes les souches testées.

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

- ✓ Déterminer des nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.
- ✓ Faire des études sur la composition des extraits par la technique de l'HPLC-MS.
- ✓ Faire des études profondes sur la purification des polyphénols de *Cytisus villosus*.

## A.

- **Abdelly C., (2008):** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .*C. R. Biologies.* P 331, 372-379.
- **Abutbul S., Golan-Goldhirsh A., Barazani O., Zilberg D., (2004):** Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis sp.*). *Aquaculture.* P 238, 97-105.
- **Askun T., Tumen G., Satil F., Ates M., (2009):** *In vitro* activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria. *Food Chem.* P 116: 289-294.

## B.

- **Balansard G., (2007) :** Analyse critique des protocoles pharmacologiques utilisés pour la recherche d'extraits et de substances pures d'origine végétale à propriétés Antibactérienne ou antiparasitaire. *Revue ethnopharmacologie.* P 42
- **Bataille X., (2000):** LIVRE interactif de chimie .
- **Bhattacharyya B., Johri BM., (1998):** Flowering plants, taxonomy and phylogeny. Ed Springer-Verlag, Berlin. P 253-256.
- **Boros B., Jakabova S., Dornyei A., Horvath G., Pluhare Z., Kilar F., Felinger A., (2010):** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A.* P 1217, 7972–7980.
- **Bounias., (1983):** l'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince P 972

## C.

- **Celiktas O.Y., Hames Kocabas E.E., Bedir E., Vardar Sukan F., Ozek T., Baser K.H.C (2007a):** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* **100:** 553-559.

- **Chabot S., Bel-Rhlid R., Chênevert R., Piché Y (1992):** *Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, Gigaspora margarita Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO<sub>2</sub>- enriched conditions. New Phytol., 122, 461-467.*
- **Chaibi A., Ababouch L.H., Belasri K., Boucetta S., Busta F.F., (1997):** *Inhibition of germination and vegetative growth of Bacillus cereusT and Clostridium botulinum 62A spores by essential oils. Food Microbiology. 14:161-174.*
- **Crozier A., Del Rio D., Clifford M.N., (2010):** *Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. Molecular Aspects of Medicine, 31 : 446–467.*

## D.

- **D'alvise N.;Lesueur-Lambert C.; Fertin B.; Dhulster P.; Guillochon D., (2000):** *Removal of polyphenols and recovery of proteins from alfalfa white protein concentrate by ultrafiltration and adsorbent resin separations. Separ. Sci. Technol., 35 (15): 2453-2472.*
- **De Witt H., (1963):** Les plantes du monde. Ed Hachette, Paris : 308-323.
- **Delmeyda W., (2001):** Méthodes analytiques en chimie instrumentale (site).chromatographie sur couche mince.
- **Diehl J., (1984):** *chlorophyll separation and spectral identificaion – J. chem Ed., 61, P 454-456.*
- **Dimitrijevic S.I., Mihajlovski K.R., Antonovic, D.G., Milanovic-Stevanovic M.R., Mijin D.Z.,(2007):** *A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from Thymus vulgaris L., Rosmarinus officinalis L. and Origanum vulgare L. Food Chem. 104: 774-782.*
- **Djeridane A., Yous M., Nadjemi, B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N., (2006):** *Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chem. 97: 654-660.*
- **Dordevic S., Petrovic S., Dobric S., Milenkovic M., Vucicevic D., Zizic S., Kukic J., (2007):** *Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of Carlina acanthifolia root essential oil .J Ethnopharmacol. 109: 458 -463.*

**F.**

- **Fazeli M. R., Amin G., Ahmadian-Attari M. M., Ashtiani H., Jamalifar H., Samadi N., (2007):** *Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (Zataria multiflora) against some food-borne bacteria. Food Control 18: 646-649.*
- **Fernandez-Lopez J., Zhi N., Aleson-Carbonell L., Perez-Alvarez J.A., Kuri V., (2005):** *Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. Meat Science. 69: 371-380.*
- **Ferrari J., (2002):** Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles: *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. Thèse de doctorat. Lausanne.

**G.**

- **Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A., Rasooli I. (2007):** *Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils. Food Chem. 102: 898-904.*
- **Georgantelis D., Ambrosiadis I., Katikou P., Blekas G., Georgakis S A., (2007):** *Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. Meat Science. 76: 172-181.*
- **Ghosh D., Scheepens A., (2009):** *Vascular action of polyphenols. Molecular Nutrition & Food Research, 53 : 322 – 331.*
- **Gomez-Caravaca A.M., Gomez-Romero M., Arraez-Roman D., Segura Carretero A., Fernandez-Gutierrez A., (2006):** *Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. J Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 41: 1220-1234.*
- **González N ., Ribeiro D., Fernandes E., Nogueira DR., Conde E., Moure A., Vinardell MP., Mitjans M., Dominguez H., Photoche J., Photobiol B., (2013):** *Biology , 125: 83-89.*
- **Guesmi A., Boudabous A., (2006):** *Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles associées dans les produits de thalassothérapie. Revue des Régions Arides. Numéro spécial : 224-230.*

**H.**

- **Hamdi Pasha Y., Bekhiri A., Benazzouz M., Benhamza L., Bensegni L., (2002):** *Evaluation of the 1-healing activity after experimental burns some Algerian plants.* Rev. Med. Pharm. Afr:1- 8-16. Hanlidou, E., Kokkini, S., Bosalalidis, AM, Bessi re, JM., 1991. Glandular trichomes and essential oil constituents of *Calamintha m.* Plants Systematics and Evolution 177 (1991):17-26
- **Harborne JB, Williams CA., (1992):** *Advances in flavonoid research since .*
- **Harborne JB, Williams CA., (2000):** *Phytochemistry* 55:481–504.
- **Harwood LM.,(1985):** *Dry-column Flash Chromatography. Aldrichimia Acta.* 18: 25.
- **Harwood LM., Moody CJ., et Percy JM., (1999):** *Experimental organic chemistry* 2<sup>nd</sup> edition. Edition : Blackwell Science. Oxford. pp: 33-35.
- **Havsteen BH., (2002):** *The biochemistry and medical significance of flavonoids.* *Pharmacol Ther* 96:67–202.
- **Hayouni, E.A, Abedrabba, M ., Bouix, M., Hamdi, M., (2007):** *The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian Quercus coccifera L. and Juniperus phoenicea L. fruit extracts.* *Food Chem.* (in press).
- **Horowitz G., (2000):** *Undergraduate Separations Utilizing Flash Chromatography - J. Chem. Educ., 77, p 263.*

**k.**

- **Isbilir S.S., Orak H.H., Yagar H., Ekinci N., (2012) :** Determination of antioxidant activities of strawberry tree (*arbutus unedo l.*) flowers and fruits at different ripening stages., *Acta Sci. Pol.Hortorum Cultus*, **11**(3): 223-237.

**K.**

- **Kahlmeter G. et Turnidge J., (2012):** Techniques ph notypique. Chapitre 6. *Antibiogramme.* 3e edition. Edition ESKA. Pp: 60-62
- **Kil H.Y., Seong E.S., Ghimire B.K., Chung I.M., Kwon S.S., Goh E.J., Heo K., Kim M.J., Lim J.D., Lee D., Yu C.Y., (2009):** *Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract.* *Food Chem.* **115**:1234-1239.

- **Koné, W.M., Kamanzi Atindehou, K., Terreaux, C., Hostettmann, K., Traoré, D., Dosso, M., (2004):** *Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. J Ethnopharmacol. 93:* 43-49.

## M.

- **MACHEIX J.J., FLEURIET A., SARNI-MANCHADO P., (2006):** Les Polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec et Doc, Paris. France. Pp:1-28.
- **Manach C., Mazur A., Scalbert A. (2005):** *Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. Current Opinion in Lipidology, 16 :* 1–8.
- **Martin S., Andriantsitohaina R., (2002):** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie, 51 :* 304–315.
- **Medjbar M., Bouyoucef A., Benayad T., Zerrouki K., (2008):** Caractérisation des Salmonelles dans les tueries avicole de la wilaya de Blida, Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie. pp : 158-161.
- **Mohammedi Z., (2006):** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen., Thèse magistère, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, **155p.**
- **Mohammedi., (2013):** 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 Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. Algérie. 20-22 ,169 p.
- **Mori A., Nishino C., Enoki N.,Tawata S ., (1987):** *Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against Proteus vulgaris and Staphylococcus aureus. Phytochemistry, 26,* 2231-2234.
- **MP., Mitjans M., Dominguez H., Photoche J., Photobiol B., (2013):** *Biology, 125:* 83-89.

## N.

- **Natarajan D., John Britto S., Srinivasan K., Nagamurugan N., Mohanasundari C., Perumal G., (2005):** *Anti-bacterial activity of Euphorbia fusiformis-A rare medicinal herb. JEthnopharmacol. 102:* 123-126.

## P.

- **Parr AJ, Bolwell GP., (2000):** *Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenol content and profile.* J Sci Food Agric. 80:985–1012.
- **Pederson DS., et Rosenbohm C., (2001):** *Dry column vacuum chromatography.* Synthesis. 16: 2431-2434.
- **Pereira OR., Silva AMS., Domingues MRM., Cardoso SM., (2012):** *Food Chem,* 131: 652-659.
- **Perez M.B., Calderon N.L., Croci C.A., (2007):** *Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (Rosmarinus officinalis L.).Food Chem.* 104: 585-592.
- **Podsdek, A., (2007):** *Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. LWT.* 40:1-11.

## R.

- **Rasooli I., Fakoor M.H., Yadegarinia D., Gachkar L., Allameh A., Rezaei M.B., (2008):** *Antimycotoxigenic characteristics of Rosmarinus officinalis and Trachyspermum copticum L. essential oils. International J of Food Microbiology.*122:135-139.

## S.

- **Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D., Corke, H., (2007):** *The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. International J Food Microbiology.* 117: 112-119.
- **Spichiger R-E., Savolainen V-V., FigeatM., Jeanmonod D., (2004):** Botanique systématique des plantes à fleurs, Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. Ed Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, : 202-203
- **Sundararajan R., Haja NA., Kumar V., Mukherjee K., Saha BP., Bandyopadhyay A., Mukherjee PK.,(2006):** *BMC Complementary and Alternative Med,* 6(8):1-7.

- **Sundararajan R., Koduru R., (2014):** *Indo American J. Pharmacol. Res*, **4(4)**: 2151-2169.
- **Sylvain S., (2010):** Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthe de Corse et de Kumquats. Chimie. Université de Corse, Français.

### T.

- **Takasaki M., Yamauchi I.I., Haruna M., Konoshima T.; (1998):** *New glycosides from Ajuga decumbens. Journal of Natural Products*, **61**, 1105–1109.
- **Tawaha K., Alali F.Q., Gharaibeh M., Mohammad M., El-Elimat T., (2007):** *Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. Food Chem.* (in press).
- **Turkmen, N., Velioglu, Y. S, Sari, F., Polat, G., (2007):** *Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. Molecules*. **12**:484-496.

### V.

- **Vuorela S., (2005):** *Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics. Helsinki.*

### Z.

- **Zubrick, James W., (2008):** *The Organic Chem Lab Survival Manual*. 7th ed. New York: Wiley. (Print).



GARMI Rofaida  
MELLAH Wahiba

Date de soutenance : 02 / 06 / 2017

Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de master en Microbiologie

## Séparation des composés phénoliques des feuilles de la plante *Cytisus villosus* et l'étude de leur activité antimicrobienne

### Résumé

L'objectif de notre travail est de séparer les composés phénoliques de la partie aérienne de *Cytisus villosus* et d'évaluer leur activité antimicrobienne.

Le test de l'activité antibactérienne est appliqué sur sept souches bactériennes et trois souches fongiques dont cinq sont à Gram négatif et les deux autres sont à Gram positif, en utilisant quatre extraits différents : le méthanol, l'éthanol, l'acétone et l'eau distillée. L'étude de la Concentration Minimale Inhibitrice est réalisée par la méthode de microdillution sur des microplaques à 96 puits.

La séparation est réalisée par la chromatographie sur couche mince en utilisant 25 systèmes solvants. Le meilleur système a été utilisé pour la séparation par chromatographie sur colonne.

Les résultats de l'activité antimicrobienne ont montré une activité antibactérienne très importante avec les extraits méthanoïques et éthanoïques sur les souches *P.aerugenosa*, *E.coli* et *Klebsiella*, et pour l'extrait acétone a donné un effet très hautement significatif avec la souche *E.coli*. L'étude des Concentrations Minimales Inhibitrices a montré une activité inhibitrice avec les sept souches entre 50 et 25 mg/ml, ainsi qu'un effet bactéricide et fongicide avec toutes les souches testées.

L'étude de la séparation par chromatographie sur couche mince après l'utilisation de 25 systèmes a montré que le système Acétate d'éthyle, Chloroforme, Ether de pétrole était le meilleur système pour la séparation des composés phénoliques de *Cytisus villosus*, ce dernier a été utilisé pour la séparation sur colonne, sur les 41 fractions récupérées, six fraction ont montré une activité antibactérienne vis-à-vis de *Salmonella*, *E.coli*, *Listeria oxytoca*, *S.aureus*.

**Mots clés :** *Cytisus villosus*, Chromatographie sur couche mince, Chromatographie sur colonne, Composés phénoliques, Activité antimicrobienne, Concentration Minimale Inhibitrice, ANOVA.

