

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCCEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers



Département de Biologie



Laboratoire :

Antibiotiques Antifongique : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique
(LapSab)

MEMOIRE

Présenté par

AZZAZ SOUMIA

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Sciences biologiques, **option** : Biochimie

Thème

**Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits apolaires de
Hyoscyamus niger de la région de Tlemcen**

Soutenu le 30/06/2020, devant le jury composé de :

Président :	Mr AZZI Rachid	MCA	Université de Tlemcen
Encadreur :	M^{me} BOUALI Waffa	MCB	Université de Tlemcen
Examinatrice :	M^{me} M'HAMED Imane	MCB	Université de Tlemcen

Année Universitaire : 2019/2020

Remerciement

Avant toutes choses, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.

J'exprime ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements à Mme BOUALI Waffa, maître de conférences classe B, à l'Université d'Aboubekr Belkaïd, Tlemcen qui m'a honoré en acceptant de diriger ce travail, pour ces encouragements, ses conseils, sa disponibilité et sa patience dans la correction de ce mémoire. Merci de m'avoir guidé avec gentillesse et bienveillance. Votre modestie et votre simplicité font de vous en plus de vos qualités professionnelles, une référence de bon sens de compétence.

Mes sincères remerciements et ma plus profonde gratitude à notre maître et président de jury, maître de conférences classe A à la faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, à l'Université d'Aboubekr Belkaïd, Tlemcen, Mr AZZI Rachid pour bien vouloir présider le jury, et de m'avoir accordé de leur temps. Veuillez trouver dans ce travail témoignage de ma gratitude et mon profond respect.

J'exprime toute ma reconnaissance à Mme M'HAMED Imane maître de conférences classe B à la faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, à l'Université d'Aboubekr Belkaïd, Tlemcen pour l'honneur de bien vouloir juger ce travail.

J'adresse ma plus profonde gratitude à Mme MEDJDOUB Houria, maître de conférences classe B à la faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, à l'Université d'Aboubekr Belkaïd, Tlemcen, pour son aide et ses précieux conseils. Vos qualités humaines et professionnelles sont connues de tous et susciteront toujours notre admiration.

Un remerciement particulier à Melle Benahmed Ikram, doctorante en biochimie, et à Melle Benaïssa Asma, doctorante en microbiologie à notre université, pour leur aide précieuse, leur disponibilité et leur gentillesse.

À tous ceux qui m'ont appris des lettres dans ce monde mortel...

Dédicaces

A la lumière de mon chemin : ma mère Naïma et mon père Aboubekr, pour tous vos sacrifices innombrables, votre patience et confiance, vous êtes et vous resterez ma référence. Vous avez guetté mes pas par vos prières et tendresses. Ce travail est le fruit de votre semence et le témoignage de mon amour et ma grande fierté de vous.

A ma seule sœur Hadjer, je n'oublierais jamais ton soutien les moments d'examens, je ne pourrais jamais imaginer la vie sans toi, «You are the one and the only ».

A mes chers frères Nasro et Zaki, pour leur humour, leur taquineries et leur précieux conseils, je vous aime beaucoup.

A mes grand-mères : Mima Rahma et Mima Rabha, pour votre attention, vos prières et votre amour inconditionnel.

A ma deuxième mère Latifa pour sa sympathie et son amour qu'elle m'accorde.

A mes tantes, mes oncles et leurs conjoints pour tout le soutien.

A ma deuxième moitié Nafissa, pour les moments inoubliables qu'on a passé ensemble, tu compte énormément pour moi. Je regrette de t'avoir connu tard.

A mon cher Riyad, mon fidèle ami, mon compagne durant cinq années par sa présence et son soutien continu. Heureusement vous étiez là.

A Zineb, mon ami d'enfance, de présent et de futur. Merci pour votre encouragement.

A mes chères collègues : Kawter, Hadjer, Sarah Youssfi et Sarah Benghnima, en souvenir des moments heureux passés ensemble, avec mes vœux sincères de réussite.

A toute la famille AZZAZ et KADDOUR

الملخص

هذه الدراسة تندرج في اطار البحث عن مواد طبيعية جديدة مضادة للميكروبات، المستخلصة من نبات *Hyoscyamus niger* المتواجد بشمال الجزائر .

الهدف من هذا العمل هو تقييم النشاط المضاد للميكروبات (المضاد للبكتيريا والفطريات) للمستخلصات القطبية من هذا النبات ضد السلالات البكتيرية المسببة للأمراض ، باستخدام مجموعة متنوعة من الأساليب: عن طريق الانتشار على وسط مولر هينتون آغار ، وتحديد التركيز الادنى المثبط. أظهرت النتائج أن السلالات التي تمت دراستها لها حساسية متغيرة تجاه مستخلصات هذا النبات (قطر تثبيط يتراوح من 10 إلى 14 مم). التركيز الادنى المتحصل عليه ضد بكتيريا الزائفة الزنجارية والبكتيريا الاشريكية القولونية و السالمونيلا إنترتيدس هو 25 ، 12.5 ، 1.56 ملغ/ملل. يمكننا القول ان لهذا النبات نشاط مهم ضد البكتيريا والفطريات المسببة للأمراض.

الكلمات المفتاحية : نشاط مضاد للجراثيم ، نشاط مضاد للفطريات ، مسببات الأمراض ، التركيز الادنى المتحصل عليه، *Hyoscyamus niger* .

Résumé

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouveaux agents antimicrobiens naturels, extraits à partir des plantes. Nous sommes intéressés à une jusquiame du Nord Algérien : « *Hyoscyamus niger* ». Le but de ce travail est d'évaluer l'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) des extraits apolaires de cette plante contre des souches pathogènes, en utilisant une variété de méthodes : par diffusion sur milieu Muller Hinton Agar, qui se traduit par une zone d'inhibition de croissance plus ou moins importante selon la sensibilité des bactéries étudiées, et par la détermination de la concentration minimale inhibitrice. Les résultats obtenus ont montré que les souches étudiées ont une sensibilité variable vis-à-vis des extraits de *Hyoscyamus niger* (un diamètre d'inhibition allant de 10 à 14mm). Les CMI obtenus contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, et *Salmonella enteritidis* sont de l'ordre de 25, 12.5, et 1.56 mg/mL.

Cette plante présente une activité antimicrobienne intéressante.

Mots clés : *Hyoscyamus niger*, activité antibactérienne, activité antifongique, pathogènes, CMI.

Abstract

Our work is part of the research of new natural antimicrobial agents, extracted from plants. We are interested in a henbane from northern Algeria: "*Hyoscyamus niger*".

The aim of this work is to evaluate the antimicrobial activity (antibacterial and antifungal) of the apolar extracts of this plant against pathogenic strains, using a variety of methods: by diffusion on Muller Hinton Agar medium, which results in a zone of inhibition of growth more or less significant depending on the sensitivity of the bacteria studied, and by determining the minimum inhibitory concentration. The results obtained have shown that the strains studied have a variable sensitivity towards extracts of *Hyoscyamus niger* (an inhibition diameter ranging from 10 to 14mm). The MIC obtained against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enteritidis* are in the range of 25, 12.5, and 1.56 mg / mL. This plant has an interesting antimicrobial activity.

Key words: *Hyoscyamus niger*, antibacterial activity, antifungal activity, pathogens, MIC.

Liste des abréviations

m/m : Masse par masse.

v/v : Volume par volume.

DMSO: Dimethyl sulfoxyde.

ATCC: American type culture collection.

CMI : Concentration minimale inhibitrice..

MR : Multi résistante.

IN : Intermédiaire.

SE : Sensible.

DI : Diamètre d'inhibition.

UFC : Unité Formant Colonie.

OMS : Organisation mondial de la santé.

CLSI : Institut des normes cliniques et de laboratoire.

TSA : Trypticase-caséine-soja.

TSB : Bouillon Triptone Soja.

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	La fleur de <i>Hyoscyamus niger</i>	6
02	Feuillage et fleurs de la jusquiame noire.....	7
03	Structure chimique des alcaloïdes tropaniques.....	13
04	Structure de base des composés phénoliques.....	13
05	Structure générale du noyau des flavonoïdes	14
06	Structure des withanolides isolés à partir des graines de <i>Hyoscyamus niger</i>	16
07	<i>Escherichia coli</i> sous microscope électronique à G X 1000.....	18
08	Salmonellose envahissant des cellules humaines, microscope électronique à balayage.....	20
09	La plante de <i>Hyoscyamus niger</i>	21
10	Extraction par Soxhlet de l'extrait hexanique	23
11	Macération de l'extrait hydro acétonique.....	23
12	Extraits acétoniques et hexaniques dissouts dans le DMSO.....	24
13	Purification des cultures bactériennes et fongiques.....	25
14	Rendement de l'extrait acétonique et hexanique.....	28
15	Effets inhibiteurs des extraits de <i>H.niger</i> sur les différents microorganismes.....	31
16	La concentration minimale inhibitrice de l'extrait hexanique de la partie aérienne de <i>Hyoscyamus niger</i> vis-à-vis des souches microbiennes.....	35

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Liste des constituants non alcaloïdes isolés des graines de <i>Hyoscyamus niger</i>	9
02	Nature et origine des souches testées.....	22
03	Caractéristiques des extraits de <i>Hyoscyamus niger</i>	28
04	Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits de la partie aérienne de <i>Hyoscyamus niger</i>	32
05	Concentration minimale inhibitrice (CMI) (mg/mL) de l'extrait hexanique de la partie aérienne de <i>Hyoscyamus niger</i> vis-à-vis des souches microbiennes.....	33

Table des matières

Introduction générale	1
------------------------------------	---

Partie I: Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Plantes médicinales, *Hyoscyamus niger*

1. Généralités.....	3
2. Plantes médicinales.....	3
2.1. Définition d'une plante médicinale.....	3
2.2. Intérêt de l'étude des plantes médicinales.....	4
2.3. La phytothérapie.....	4
3. Etude botanique de la plante étudiée (<i>Hyoscyamus niger L</i>).....	5
3.1. Famille Solanacées : <i>Solanaceae</i>	5
3.2. Le genre <i>Hyoscyamus</i>	5
3.3. L'espèce <i>Hyoscyamus niger</i>	5
3.3.1. Description botanique.....	5
3.3.2. Systématique de la plante.....	6
3.3.3. Noms vernaculaires.....	7
3.3.4. Répartition Géographique.....	7
3.3.5. Usage ethno -pharmacologiques.....	7
3.3.6. Composition chimique de la plante <i>Hyoscyamus niger</i>	8
3.3.7. Toxicité.....	9
3.3.8. Récolte et conservation.....	10

Chapitre 2 : Métabolites primaires et secondaires des plantes médicinales

1. Introduction.....	11
2. Les métabolites primaires.....	11
2.1. Les glucides.....	11
2.2. Les acides aminés et organiques.....	11
2.3. Les lipides.....	11
2.3.1. Les lipides simples.....	12
2.3.2. Les lipides complexes.....	12
3. Les métabolites secondaires.....	12
3.1. Les alcaloïdes tropaniques.....	12
3.2. Composés phénoliques.....	13

3.2.1. Les flavonoïdes.....	14
3.2.2. Les lignanes.....	14
3.2.3. Les tanins.....	15
3.3. Les saponines.....	15
3.4. Les withanolides.....	15
4. Les huiles fixes.....	16
Chapitre 3 : Activité antimicrobienne	
1. L'activité antimicrobienne de <i>Hyoscyamus niger</i>	17
2. Les infections microbiennes.....	17
3. Les antibiotiques.....	17
4. Choix des antibiotiques utilisés.....	17
5. Détermination de DI (diamètre d'inhibition).....	18
6. Description des souches microbiennes étudiées.....	18
Partie II : Expérimentale	
Chapitre 4 : Matériel et méthodes	
1. Objectif	21
2. Matériel végétal.....	21
3. Matériel biologique.....	21
4. Méthodes.....	22
4.1. Préparation des extraits de <i>Hyoscyamus niger</i>	22
a- Préparation de l'extrait hexanique.....	22
b- Préparation de l'extrait hydro acétonique.....	23
4.2. Calculs des rendements en extraits.....	24
4.3. Préparation des suspensions bactériennes et fongiques.....	24
4.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits étudiés.....	26
a- Technique de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode des puits).....	26
b- Méthode de microdilution en milieu liquide (CMI).....	26
Chapitre 5 : Résultats et discussion	
1. Rendement des extractions.....	28
2. Etude de l'activité antimicrobienne	29
2.1. Méthode des puits	29
2.2. Détermination des concentrations Minimales Inhibitrices (CMI).....	32
Conclusion générale	36
Références bibliographiques	37

Introduction générale

Les maladies infectieuses et parasitaires constituent un problème de santé publique à cause de leur fréquence et leur gravité. Si la découverte et l'utilisation des antibiotiques ont été à l'origine des plus grands succès de la médecine, aujourd'hui, l'émergence et la diffusion des bactéries multi-résistantes dans les populations humaines sont devenues des problèmes de santé publique très préoccupants. La progression de la multi-résistance et l'absence de réelles perspectives de découverte de nouveaux antibiotiques dans les années à venir, nous a conduits à étudier l'efficacité des plantes à vertus thérapeutiques afin d'en isoler les principes actifs (**Laghrifi et al., 2013**).

Depuis l'antiquité, et certainement bien avant, les plantes ont servi de pharmacothèque naturelle et pragmatique pour l'Homme. Personne ne cherchait à savoir pourquoi ou comment elles agissent, mais c'était un fait incontesté et qui paraissait magique. En effet il est étonnant qu'une feuille, une fleur ou une racine puisse guérir ou tout au moins soulager un état pathologique ou des troubles organiques (**Schauenburg et Paris, 2005**).

La famille des Solanacées, représentée par un large nombre de genres et d'espèces dans le monde, a déjà fait preuve d'être parmi ces plantes médicinales. Parmi les espèces de cette famille, notre intérêt s'est porté sur une jusquiame : *Hyoscyamus niger*. Etant donné l'absence de recherche en Algérie menée sur cette espèce, nous avons entrepris d'explorer et de comparer les potentialités biologiques en générale et antimicrobienne en particulier de cette jusquiame utilisé en Algérie, comme ailleurs, en médecine traditionnelle.

L'objectif de notre travail vise premièrement à l'évaluation de pouvoir antimicrobien des extraits de la plante *Hyoscyamus niger*, et comparer les résultats pour le but de savoir le solvant le plus efficace de point de vue rendement et activité antimicrobienne. Cette étude consiste aussi à déterminer la concentration minimale inhibitrice d'extrait de la plante vis-à-vis de quelques bactéries à Gram positif, à Gram négatif et des levures *Candida albicans*.

Pour cela, notre étude englobe deux parties ;

- La première partie est d'ordre théorique divisée en trois chapitres ; nous aborderons dans le premier des données générales sur les plantes *Hyoscyamus niger*, le deuxième chapitre est réservé aux métabolites primaires et secondaires, leurs classifications et leurs propriétés pharmacologiques, le troisième chapitre sera consacré à l'étude de l'activité antimicrobienne.

-La deuxième partie est une étude expérimentale qui repose sur deux volets, le premier concerne l'extraction et la préparation des extraits hexanique et acétonique de *H.niger*.

Le second volet sera consacré à une évaluation de l'activité antimicrobienne par une analyse qualitative: par détermination des zones d'inhibition et par analyse quantitative: par détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).

Chapitre 1 :
Plantes médicinales,
Hyoscyamus niger

1. Généralités

Une des conditions indispensables du succès des soins de santé primaires est de disposer de médicaments appropriés et de les utiliser. Les plantes sont depuis toujours une source habituelle de remèdes sous forme de préparation traditionnels ou de principes actifs purs (**Farnsworth *et al.*, 1986**).

Certaines plantes étaient vénérées pour des vertus qu'on leur avait reconnues. Personne ne cherchait à savoir pourquoi ou comment elles agissaient, mais c'était un fait incontesté et qui paraissait magique. En effet, il est étonnant qu'une feuille, une fleur ou une racine puisse guérir, ou tout au moins soulager un état maladif ou des troubles organiques.

La science moderne, en analysant et étudiant les effets thérapeutiques des plantes, n'a pas pour but de diminuer cette confiance en la nature, mais elle veut préciser, comparer et classer les diverses propriétés pour grouper les plantes à effet similaires, choisir les plus efficaces et les faire connaître (**Schauenberg et Paris, 2005**).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS, 2013**), plus de 80% des populations africaines font recours à la médecine et la pharmacopée traditionnelles pour faire face aux problèmes de santé (**Kolling, 2010 ; Mangambu, 2013**). Sur plus ou moins 300.000 espèces de plantes médicinales recensées sur la planète, plus de 200.000 vivent dans les pays tropicaux de l'Afrique et ont des vertus médicinales (**Kolling, 2010 ; Mangambu *et al.*, 2012**).

2. Plantes médicinales

2.1 Définition d'une plante médicinale

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies. Certaines plantes contenant toute une gamme de matières efficaces peuvent avoir des actions très différentes suivant leur préparation (**Schauenberg et Paris, 2005**).

La pharmacopée française a défini une plante médicinale comme une « drogue végétale au sens de la pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses ». Une « drogue végétale » est une plante ou une partie de plante, utilisée, soit le plus souvent sous la forme desséchée, soit à l'état frais (**Mohammedi, 2013**).

L'insuffisance des soins de santé, le manque de médicaments essentiel, le coût élevé des médicaments et les habitudes socioculturelles des populations expliquent le recours aux pratiques traditionnelles à base de plantes médicinales (**Sanogo, 2006**).

1.2. Intérêt de l'étude des plantes médicinales

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie. Elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus (**Iserin, 2001**). Les plantes médicinales ont énormément contribué à l'évolution de la médecine moderne (**Telefo et al., 2012**). Cette médecine traditionnelle ancestrale est le précurseur de la phytothérapie et de l'aromathérapie d'aujourd'hui (**Bastien et al., 2010**).

1.3. La phytothérapie

La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, est souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en Occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. La phytothérapie à la différence de la médecine classique, recommande d'utiliser la plante entière, appelée aussi <<totum>> plutôt que des extraits obtenus en laboratoire (**Iserin, 2001**).

L'efficacité de la phytothérapie « médecine douce consistant à prévenir, soigner ou soulager divers maux grâce aux propriétés médicinales des plantes naturelles » est prouvée et elle est toujours vue comme un remède surtout utilisé par la population rurale à travers le monde (**Pastor, 2006**), par manque d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne mais aussi parce que ces plantes ont souvent une réelle efficacité et elles sont d'un coût beaucoup inférieur aux médicaments de synthèse (**Lhuillier, 2007**).

3. Etude botanique de la plante étudiée (*Hyoscyamus niger* L)

Black henbane (*Hyoscyamus niger* L.) est une plante bisannuelle indigène d'Europe, d'Asie occidentale et septentrionale et d'Afrique du Nord. Elle a été introduit en Asie de l'Est, en Amérique du Nord et en Australie, et cultivé dans plusieurs autres pays (Li *et al.*, 2011).

3.1. Famille Solanacées : *Solanaceae*

Les Solanacées, communément appelées la famille des ombres nocturnes, se composent d'environ 96 genres avec 3000 espèces. Cette famille comprend une grande variété de plantes importantes économiques, agricoles et pharmaceutiques (Wink, 2003).

La famille des solanacées appartient au deuxième groupe végétal des tubiflores qui comporte 6 familles. Elles présentent quelques caractères communs : ce sont essentiellement des herbes, bien représentées dans les zones tempérées et froides, l'ovaire présente un caractère peu évolué, le feuillage est plutôt alterne. La famille des solanacées est regroupée autour du genre *solanum*. Linné nommait les plantes de cette famille les «blêmes», les «tristes» car les feuilles ont plutôt un aspect tombant avec des couleurs assez ternes (Goullé *et al.*, 2004).

3.2. Le genre *Hyoscyamus*

Le genre des jusquiames trouve son origine dans la littérature grecque «Huos» signifiant un porc et «Kyamos» signifiant un haricot qui signifie haricot de porc, car les porcs étaient prétendument immunisés contre ses effets toxiques. Ce sont les discordiens qui, bien avant l'ère chrétienne, ont donné à la plante son nom de *Hyoscyamus* (Panda, 2002). Ce genre comprend 15 espèces annuelles, bisannuelles ou vivaces, vivant sur les talus, les falaises, les friches et les plages de galets en Europe, en Afrique du nord et en Asie (Goullé *et al.*, 2004).

3.3. L'espèce *Hyoscyamus niger*

3.3.1. Description botanique

La jusquiame noire (*Hyoscyamus niger*) (Figure1) est un arbuste vert grisâtre composé de feuilles et de tiges avec des sommités fleuries donnant une forte odeur désagréable et un goût amer (Sajeli Begum, 2010). La plante entière est collante, velue et odorante (Mitich, 1992). Elle mesure en moyenne entre 0,75 et 1,5 m de haut

et se développe dans les friches sèches. Plante annuelle ou bisannuelle, à feuilles légèrement lobées et à fleurs jaunes pâles veinées de rouge en forme de clochettes (**Iserin, 2001**).

Les feuilles de 10 à 20 centimètres de long sont ovales, entières ou dentées et recouvertes d'un épais feutrage gris vert. Le fruit est une capsule contenant jusqu'à 200 graines ; une seule plante avec 50 capsules environ peut produire près de 1000 graines. Ces derniers ressemblent à celles du coquelicot et peuvent provoquer un empoisonnement (**Tomanová et al., 2013**). *Hyoscyamus niger* est considéré comme une plante autogame (**Panda, 2002**).



Figure 01 : La fleur de *Hyoscyamus niger*
(<https://www.cabi.org/isc/datasheet/28251>)

3.3.2. Systématique de la plante

Cette plante a été classée selon (**Al-Snafi, 2018**) comme suit:

Domine : Eucaryote

Règne : *Plantae*

Sous règne : *Viridiplantae*

Infra règne: *Streptophyta*

Superdivision: *Embryophyta*

Division: *Tracheophyta*

Embranchement : *Spermatophytae*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Solanales*

Famille : *Solanaceae*

Genre : *Hyoscyamus*

Espèce : *Hyoscyamus niger*

3.3.3. Noms vernaculaires : (Flesch, 2005 ; Al-Snafi, 2018)

- ✓ **Français** : fève à cochons, jusquiame noire, herbe aux dents.
- ✓ **Anglais** : *Henbane*, Black henbane, Common henbane, *Fetid night shade*.
- ✓ **Arabe** : Benj Aswad , Sakran

Les noms communs de *Hyoscyamus niger* sont la jusquiame commune, l'œil du diable, les porcs été, le haricot Jupiter, et le banj (Drager, 2002). La plante a une odeur nettement désagréable, d'où ses noms folkloriques étaient *Stinking Nightshade* et *Stinking Roger* (Prance et Nesbitt, 2005). Elle est connue par la Jusquiame officinale selon (Jouzier, 2005) et par l'Herbe de chevaux selon (Olivier, 1986).



Figure 02 : Feuillage et fleurs de la jusquiame noire
(<https://www.cabi.org/isc/datasheet/28251>)

3.3.4. Répartition Géographique

Il a été distribué en Afrique: Algérie, Maroc, Tunisie et en Asie: Chine, Japon, Afghanistan, Iran, Irak, Liban, Turquie (Al-Snafi, 2018), et dans toute l'Europe; du Portugal à la Grèce au sud et de la Norvège à la Finlande au nord, au Caucase, en Iran, en Amérique du Nord et en Serbie (Duke, 1985). En Inde, on le trouve du Cachemire au Garhwal Himalaya (Kirtilar *et al.*, 1984).

3.3.5. Usage ethno -pharmacologiques

Hyoscyamus niger a une très longue histoire d'utilisation comme plante médicinale, il a été largement utilisé comme sédatif et analgésique. Son effet sédatif et

antispasmodique en fait un traitement disponible pour les symptômes de la maladie de Parkinson (**Matsuda et al., 1991**).

Elle a également été utilisée dans les troubles mentaux, la manie épileptique et la démence chronique avec insomnie, paralysie, convulsions, névralgies, toux spasmodique et asthme (**Nadkarni, 2002**). A dose thérapeutique, la Jusquiame noire est employée comme parasympatholytique et sédatif nerveux. Elle entre dans la composition de la Boldolaxine®, de la Néoboldolaxine® et des Grains de Vals® (**Jouzier, 2005**).

H. niger était bien documenté dans le système traditionnel de la médecine chinoise pour son utilisation dans les crampes d'estomac, la toux abondante, la névralgie et la manie psychose (**Sajeli Begum, 2010**).

Les feuilles, les racines et les graines étaient principalement utilisées en phytothérapie (**Al-Snafi, 2018**). Il a également été utilisé pour le traitement des coliques abdominales, des douleurs dues à une infestation de vers, des maux de dents, des douleurs d'infection pulmonaire, des douleurs tumorales, des douleurs associées aux voies urinaires, en particulier des calculs rénaux. L'huile de graines a été utilisée à l'extérieur pour les douleurs névralgiques, dentaires et rhumatismales (**Hajipoor et al, 2015 ; Duke, 1985**).

3.3.6. Composition chimique de la plante *Hyoscyamus niger*

Les études phytochimiques de *H. niger* ont révélé la présence d'hyoscine (scopolamine), d'hyoscyamine, d'anisodine, d'anisodamine, d'esculétine, de coumarine, de kaempférol, de quercétine, de rutine, de cuscohygrine, d'acide chlorogénique, d'acide linoléique, d'acide myristique, d'acide oléique, d'acide stéarique, d'acide stéarique triméthylamine, bsitostérol, grossamide, cannabis D et G daucostérol, acide vanillique, calystégines et avec des anolides (**Gilarii et al., 2008**).

Les alcaloïdes représentés par la hyoscyamine, atropine, et hyoscine également connue sous le nom scopolamine, sont les principaux constituants des feuilles de la jusquiame noire (**Morishita, 1991**). Ces alcaloïdes psychoactifs du tropane sont présents dans toutes les parties de la plante, mais sont concentrés dans les graines et les racines (**Prance et Nesbitt, 2005**).=

L'espèce végétale anti-cholinergique produit également des métabolites secondaires non alcaloïdes comme les withanolides, les flavonoïdes, les lignanes, les

coumarines lignanes, les saponines, les glycérides, les glycosides, les phénoliques, etc. (Tableau N°1) (Begum *et al.*, 2010).

Tableau N°1: Liste des constituants non alcaloïdes isolés des graines de *Hyoscyamus niger*.

Métabolite secondaire	Nom de composant
Lignans	Hyosmin, Cannabisin D, Cannabisin G, Grossamide, Hyoscyamide, Hyoscyamal, Balanophonin.
Coumarinolignans	Cleomiscosin A, Cleomiscosin B, Hyosgerin, Venkatasin, Cleomiscosin A methyl ether.
Withanolides	Hyoscyamilactol, 16 α -acetoxyhyoscymilactol, Daturalactol.
Glycérides	1-O-octadecanoyl glycerol, 1-O-(9Z,12Z-octadecadyenoyl) glycerol, 1-O-(9Z,12Z-octadecadyenoyl)-3-O-nonadecaoyl glycerol, 1-O-(9Z,12Z-octadecadyenoyl)-2-O-(12Z-octadecadyenoyl) glycerol, 1-O-(9Z,12Z-octadecadyenoyl)-3-O-(9Z, octadecanoyl)glycerol.
Flavonoïdes	Rutine, Spiraeoside, 3',5-Dihydroxy-3,4',5', 6,7pentamethoxyflavone.
Glycoside Flavonoïde	Pongamoside C, Pongamoside D
Glycoside stéroïdien	Atroposide A, Atroposide C, Atroposide E, Petunioside L
Saponines	Hyoscyamoside A ,B,B1,B2,B3,C,C1,C2,D,D1,E,E1,F,F1,J ,J1
Phénoliques	Acide vanillique, Vnilline, Pinorésinol.

3.3.7. Toxicité

La jusquiame noire est une plante toxique en raison de sa teneur en alcaloïdes et elle peut être mortelle. Toutes les parties de cette plante sont toxiques et la

sécheresse ou l'ébullition ne pouvait pas détruire ses alcaloïdes. Il y a eu plusieurs rapports et des séries de cas d'intoxication à *H. niger*, se produisent accidentellement ou intentionnellement. En raison d'une concentration élevée de scopolamine chez *H.niger*, l'ingestion de doses élevées entraîne une hypertension, un arrêt respiratoire, une hallucination. Symptômes et signes de patients intoxiqués (cas de surdosage d'atropine), y compris mydriase, tachycardie, arythmie, agitation, convulsion et coma (**Alizadeh et al., 2014**).

3.3.8. Récolte et conservation

Les feuilles et les sommités fleuries de *H.niger* sont récoltées au stade de la floraison de la plante. L'herbe est séchée au soleil pendant 2-3 jours suivis de 6-7 jours à l'ombre avec un soutirage constant avec des bâtonnets. 52°C semblait être optimal pour sécher les feuilles. Les feuilles fraîches laissent, jusqu'à lorsqu'elles débordent une forte odeur désagréable, comme celle du tabac. L'odeur caractéristique disparaît en séchant, mais le goût amer devient alors plus prononcé. L'herbe séchée peut être stockée dans un endroit sec et frais pendant environ 2 mois avant de poursuivre le traitement (**Panda, 2002**).

Chapitre 2 :
Métabolites primaires
et secondaires des
plantes médicinales

1. Introduction

Les plantes renferment une partie importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme appelées métabolites. On distingue deux groupes de métabolites : métabolites primaires et métabolites secondaires (**Malec *et al.*, 2004**).

2. Les métabolites primaires

Ce sont des composés qui sont produits dans toutes les cellules et qui jouent un rôle central dans le métabolisme et la reproduction de ces cellules. Ces molécules comprennent les acides nucléiques, les acides aminés communs, les acides gras et les sucres (**Lei *et al.*, 1996**).

2.1. Les glucides : sont des molécules indispensables à la survie des organismes vivants car leurs formes les plus simples sont à la base des mécanismes énergétiques et de la biosynthèse des autres métabolites. Chez les végétaux on les retrouve sous différentes formes: polymères énergétiques (amidon) ou structuraux (cellulose, pectines...), sucres simples et hétérosides (**Lei *et al.*, 1996**).

2.2. Les acides aminés et organiques : Ces métabolites primaires sont présents dans différentes parties des plantes (**Lei *et al.*, 1998**). A titre d'exemple, les fruits et le jus d'argousier contiennent dix-huit acides aminés dont les plus abondants sont l'acide aspartique, la proline et la thréonine. Des acides organiques sont également présents tels que l'acide malique, l'acide quinique et l'acide citrique (**Lei *et al.*, 1996**).

2.3. Les lipides : Les lipides (du grec *lipos*, graisse) sont des molécules à caractère hydrophobe (à solubilité nulle ou faible dans l'eau) et solubles dans des solvants organiques. (**Venkatramesh *et al.*, 2003**).

2.3.1. Les lipides simples : encore appelés homolipides sont des corps ternaires (C, H, O) que l'on classe en fonction de l'alcool :

- Acylglycérols (ou glycérides) : sont des esters du glycérol.
- Cérides : sont des esters d'alcools à longue chaîne (alcool gras).
- Stérides : sont des esters de stérols (alcool polycyclique). (**Venkatramesh et al., 2003**).

2.3.2. Les lipides complexes : Les lipides complexes sont des lipides qui contiennent (en plus du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène) du phosphore, de l'azote, du soufre ou des oses. On distingue les phosphoglycérolipides (ou phospholipides), les galactoglycérolipides (ou galactolipides) et les sphingolipides (**Ackman, 1989**).

3. Les métabolites secondaires

Ces composés diffèrent en fonction des espèces, ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent, et ils sont probablement des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et pollinisateurs (**Krief, 2003**).

Ils constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour des propriétés anti oxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anticancéreuses (**Epifano et al., 2007**). Les plus grands groupes sont les alcaloïdes, les terpénoïdes, et les composés phénoliques (**Alilou, 2012**).

3.1. Les alcaloïdes tropaniques

Sont des esters de l'acide tropique qui est un acide aromatique et du tropanole ou scopanole (**Leete, 1979 In Felidj, 2005**). Ils prennent leur nom de noyau tropane (**Felidj, 2005**), qui est un hétérocycle azoté et bicyclique (**Bruneton, 1987**). Ils se localisent dans la plante dans plusieurs organes à des concentrations variables. Ils regroupent l'hyoscyamine, la scopolamine (ou hyoscine) et l'atropine (isomère racémique de l'hyoscyamine) (**figure 03**).

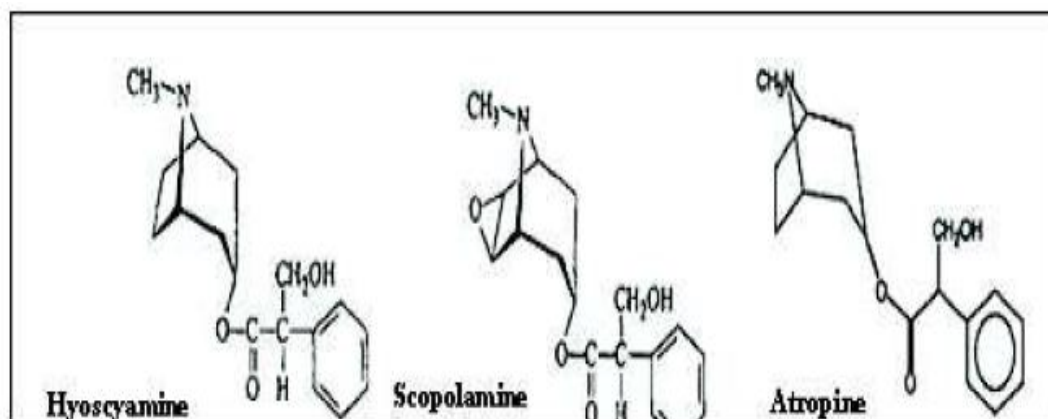


Figure 03 : Structure chimique des alcaloïdes tropaniques (Robins *et al.*, 1994).

3.2. Composés phénoliques

La désignation générale «composés phénoliques» concerne à la fois les mono, les di et les poly phénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques, qui dérivent de la biogenèse de l'acide shikimique et/ou l'acétate et qui ne contiennent pas de l'azote. Ces composés présentent une grande diversité de structures, divisées en non flavonoïdes et flavonoïdes (Macheix *et al.*, 2005).

Ils sont caractérisés par un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction du nombre des noyaux aromatiques qui les composent et des substitutions qui les relie (Manallah, 2012).

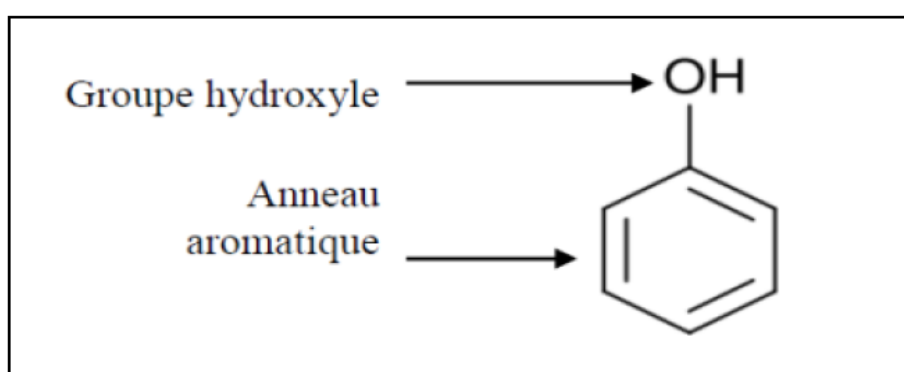


Figure 04: Structure de base des composés phénoliques (Manallah, 2012).

3.2.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés naturels dont la substitution par un noyau benzénique se fait en position 2. Les composés présentant une substitution en position 3 sont désignés par le terme isoflavonoïdes (**Bruneton, 1999 ; Erlund, 2004**). Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (**Havsteen, 2002**). Ils sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, légumes et boissons telles que le thé et le café (**Dicarlo et al., 1999**). Dans les cellules eucaryotes, les flavonoïdes assurent une multitude de fonctions ; ils sont doués d'activité antimicrobienne, anticancéreuse, antivirale, anti-leishmaniose, radioprotection (**Xie et al., 2013**).

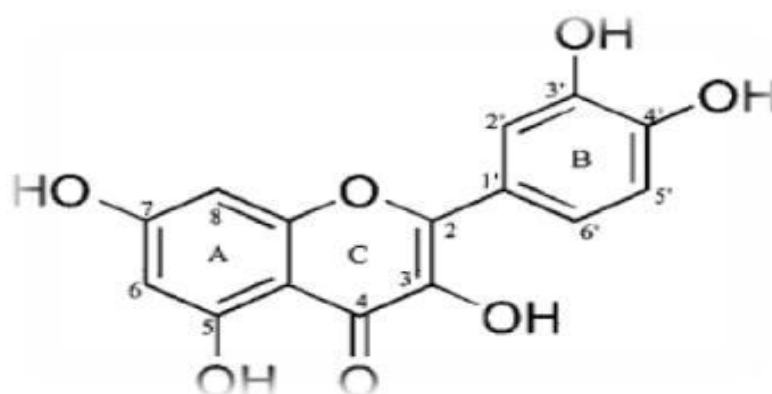


Figure 05 : Structure générale du noyau des flavonoïdes (**Lovegrove et al., 2017**).

3.2.2. Les lignanes

Les lignanes sont un groupe biologiquement actif de produits naturels formé par l'union de deux phénylpropnoïdes (C6-C3) par couplage oxydatif (**Begum et al., 2010**). Ces composées sont des métabolites secondaires qui représentent un moyen de protection contre les herbivores et les microorganismes pour les plantes qui les synthétisent (**Lonkova, 2011**).

3.2.3. Les tanins

Les tanins sont des polyphénols végétaux de poids moléculaire élevé (Aguilard *et al.*, 2008). Ils peuvent être subdivisés en tanins hydrolysables et tanins condensés. Les premiers sont des esters d'acide gallique alors que les derniers (également connu comme proanthocyanidines) sont des polymères des monomères de polyhydroxyflavan-3-ol. Une troisième subdivision, les florotanins consistant entièrement en floroglucinol, qui a été isolé à partir de plusieurs genres des algues brunes (Porter, 2012).

3.3. Les saponines

Les saponines sont des composés glycosylés non-volatils, tensio-actifs distribués principalement dans le règne végétal (Vincken *et al.*, 2007). Le nom «saponine» est dérivé du mot latin *sapo*, qui signifie «savon». En effet, les molécules de saponines dans l'eau forment une solution moussante (Bruneton, 2009). Les saponines font partie des métabolites secondaires qui servent de défense à la plante, ils existent dans les plantes sous forme biologiquement active et sont impliquées dans la phyto-protection antimicrobienne (Hostettman et Marston, 1995 ; Osbourn, 1996a, b). Les saponines présentent des activités antimicrobiennes (Vermeersch *et al.*, 2009).

3.4. Les withanolides

Les withanolides sont un groupe de lactones stéroïdiennes naturelles possédant des activités biologiques intéressantes comme les propriétés anti-tumorales, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et régénératrices du cerveau. On les trouve principalement dans les plantes solanacées. Les withanolides ont été isolés et caractérisés à partir de l'extrait éthanolique de graines (Figure 06) (Ma *et al.*, 1999).

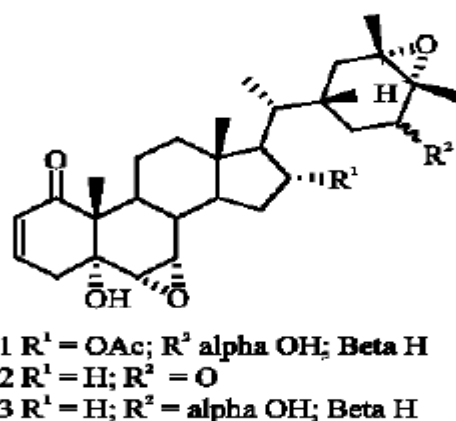


Figure 06 : Structure des withanolides isolés à partir des graines de *Hyoscyamus niger* (Begum *et al.*, 2010).

4. Les huiles fixes

L'huile végétale ou l'huile fixe est une matière grasse, onctueuse et épaisse, souvent liquide à température ambiante et qui est insoluble dans l'eau, les huiles se composent de lipides formées de triglycérides composés des molécules des acides gras estérifiées par le glycérol (une molécule d'alcool). Se sont des composants majeurs de l'énergie du corps humain, car les matières grasses fournissent des calories en grand nombre (Merbouha et Imane, 2019).

La composition chimique des huiles végétales correspond dans la plupart des cas à un mélange de 95 % de triglycérides et 5 % d'acides gras libres, de stérols, cires, et autres composants minoritaires (Merbouha et Imane, 2019).

La méthode d'extraction des huiles fixes la plus utilisée est l'extraction par solvant. Ce type d'extraction peut s'appliquer aussi bien aux graines intactes. Le solvant utilisé généralement c'est l'hexane. Le taux de récupération de l'huile par cette méthode varie de 95 à 99% (Bruneton, 2009).

Chapitre 3 :

Activité antimicrobienne

1. L'activité antimicrobienne de *Hyoscyamus niger*

Bien qu'un grand nombre d'études aient été réalisées sur *Hyoscyamus niger*, seules quelques-unes ont été étudiées pour l'activité antimicrobienne.

Les graines de *Hyoscyamus niger* utilisées en médecine traditionnelle en Turquie ont été étudiées pour leur capacité à inhiber les pathogènes fongiques cliniquement pertinents comme six espèces de *Candida*. La plante a montré une activité contre toutes les cultures fongiques testées. Les extraits possédaient une forte puissance antifongique (Dulger *et al.*, 2010). Les graines de *Hyoscyamus niger* possédaient aussi une activité anticlostridienne dose dépendante (*Clostridium perfringens*) (Afzal *et al.*, 1992), et un effet antimicrobien puissant contre les pathogènes des voies urinaires (Dulger et Dulger, 2015). *Hyoscyamus niger* présente un pouvoir antibactérien puissant contre des bactéries Gram positif et Gram négatif (Khan *et al.*, 1992).

2. Les infections microbiennes

Les infections microbiennes sont causées par différents micro-organismes et sont la cause des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues. De nombreux antibiotiques sont développés pour les traiter, cependant leur utilisation abusive est à l'origine de l'apparition de la multirésistance bactérienne.

3. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont par définition, des produits microbiens, ou leurs dérivés, capables de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance. Leur action étant spécifique et dirigée contre les micro-organismes, ceux qui inhibent la croissance bactérienne sont qualifiés de «bactériostatiques» alors que ceux qui tuent les bactéries sont dites «bactéricides», et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes (Toure, 2015).

4. Choix des antibiotiques utilisés

Selon la recommandation du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, 2012), le choix des antibiotiques testés sur les différentes souches bactériennes isolées, repose d'une part, sur l'identification du genre et son profil habituel contre des antibiotiques et d'autre part sur le spectre d'activité de chaque antibiotique.

5. Détermination de diamètre d'inhibition (DI)

Après incubation 18-24 heures à 37°C dans l'étuve. La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque puits à l'aide d'une règle en mesurant la moyenne de deux diamètres perpendiculaires passant par le milieu du puits. Le résultat de cette méthode est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition. (Aref et Heded, 2015), la souche ayant un diamètre :

- $D < 0.8\text{cm}$: Souches résistante.
- $0.99\text{cm} \leq D \leq 1.4\text{cm}$: Souches sensible.
- $1.5\text{cm} \leq D \leq 1.9\text{cm}$: Souches très sensible.
- $D > 2\text{cm}$: Souches extrêmes sensible.

La mesure des diamètres des zones d'inhibition se fait avec précision à l'extérieur de la boîte fermée (Merbouha et Imane, 2019).

6. Description des souches microbiennes étudiées

✓ *Escherichia coli*

C'est un bacille à Gram négatif, aérobie-anaérobie facultatif, immobile ou mobile avec une structure flagellaire péritriche et non-sporulée. Sa température optimale de croissance est de 37°C. Bactérie non exigeante ; elle est capable de croître sur des milieux ordinaires tels que le milieu TSA (trypticase-caséine-soja) (ISO 16654, 2001). L'espèce *E. coli* est une bactérie versatile qui comprend, à la fois, des bactéries commensales du tube digestif, des bactéries pathogènes et des bactéries adaptées à l'environnement (Tenailon *et al.*, 2010).



Figure 07: *Escherichia coli* sous microscope électronique à G X 1000(Avril *et al.*, 2000).

✓ ***Pseudomonas aeruginosa***

P. aeruginosa est une bactérie à Gram négatif, aérobie stricte, mobile grâce à la présence de 1 à 2 flagelles, dépourvue de capsule. Sa température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C. Les cultures de *P. aeruginosa* dégagent une odeur caractéristique, et produisent le plus souvent des pigments de pyocyanine et de pyoverdine (You Essoh, 2013).

✓ ***Staphylococcus aureus***

Staphylococcus aureus est une bactérie d'intérêt majeur en raison de sa capacité à causer un large éventail d'infection et de son aptitude à s'adapter à différentes conditions environnementales (Williams, 1963 ; McKinnell *et al.*, 2013). Elle présente de nombreuses résistances vis-à-vis des antibiotiques (Von Eiff *et al.*, 2001).

Les staphylocoques sont des bactéries sphériques (coques) aéro-anaérobie facultatives à Gram positif, très résistantes dans le milieu extérieur et peu exigeantes en culture. *S.aureus*, communément appelé staphylocoque doré, est un staphylocoque à coagulase positif (Couderc *et al.*, 2014).

✓ ***Bacillus cereus***

Ce sont des bactéries à Gram positif capables de produire des spores, leur permettant de résister aux traitements thermiques. Elles sont assez grandes, 2 à 7 µm de diamètre, avec une forme circulaire peu régulière et une couleur crème (De Vos *et al.*, 2009). Cette bactérie est dite ubiquitaire (Guinebretière *et al.*, 2008) ce qui explique donc que nous la retrouvons dans l'environnement et notamment dans les sols (Margulis *et al.*, 1998).

✓ ***Bacillus subtilis***

Ce sont des bacilles à Gram positif. Ils présentent des bâtonnets droits à extrémité carrée ou arrondie, formant des endospores. Le plus souvent mobiles, à flagelles péritriches. Ils sont aérobies, parfois facultatifs, et catalase positif (Prescott *et al.*, 2003).

B. subtilis n'est pas pathogène pour l'homme et ne produit pas d'endotoxines et peut être facilement cultivé. Elle se développe dans un milieu minimal sans facteurs de croissance (Larpent et Sanglier, 1992 ; Prescott *et al.*, 2003).

✓ *Salmonella enteritidis*

Les salmonelles (*Salmonella*) forment un genre de protéobactéries appartenant à la famille des entérobactéries. Elles mesurent 0,7 à 1,5 μm de diamètre, pour 2 à 5 μm de longueur avec un flagelle. Elles provoquent chez l'espèce humaine des maladies telles que la fièvre typhoïde, la fièvre paratyphoïde et la salmonellose, une des principales causes de toxi-infection alimentaire collective. (Van Delden *et al.*, 1998).

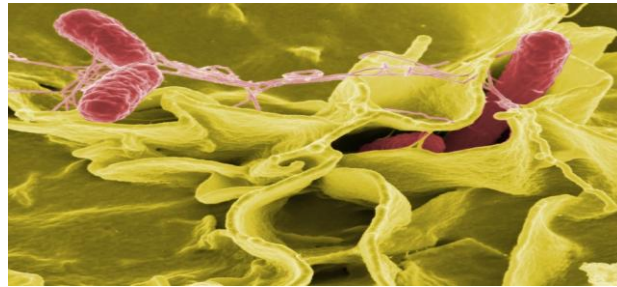


Figure 08 : Salmonellose envahissant des cellules humaines, microscope électronique à balayage (Ben Saadi et Guemmouda, 2017).

Chapitre 4 :

Matériel et méthodes

1. Objectif

L'intérêt de ce travail est la valorisation d'une plante médicinale (*Hyoscyamus niger*) poussant à l'état spontané dans la région de Tlemcen par l'étude de son activité antimicrobienne.

La plante étudiée était choisie essentiellement sur la base de leur intérêt et leur fréquence d'emploi grâce à l'enquête ethno-pharmacologique effectuée au cours de cette étude auprès des tradi-thérapeutes, des herboristes et des personnes utilisant ou vendant les plantes médicinales.

Ce travail est réalisé au niveau de laboratoire de biochimie et de microbiologie de département de biologie, faculté SNV.

2. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué des feuilles et tiges de *Hyoscyamus niger* récoltée au mois de Juin 2019 dans la région d'Aïn Fezza situé au Nord- Est de la Willaya de Tlemcen.

Les parties aériennes de la plante fraîchement collectées ont été séchées sur du papier à l'ombre, à température ambiante et dans un endroit sec à l'abri de l'humidité pendant quelques jours jusqu'au moment de préparation des extraits.

L'identification de la plante a été faite au niveau du Département de biologie, Université Aboubekr Belkaïd, Tlemcen par Dr. Babali.



a- Plante fraîche



b- Plante séchée

Figure 09: La plante de *Hyoscyamus niger*.

3. Matériel biologique

L'activité antimicrobienne des extraits étudiés a été testée sur 09 souches pathogènes (**Tableau N°05**).

Tableau N°02 : Nature et origine des souches testées.

Souches	Type de microorganisme	Origine
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Bacille Gram –	Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire au biomédical et à l'environnement (LAMAABE) Université de Tlemcen, Algérie.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27835	Bacille Gram –	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Cocci Gram+	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	Bacille Gram+	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Bacille Gram+	
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 2453	Bacille Gram –	
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Candida albicans</i> ATCC 26790 <i>Candida albicans</i> ATCC IPP444	Levures	

4 .Méthodes

4.1. Préparation des extraits de *Hyoscyamus niger*

a- Préparation de l'extrait hexanique

Les extraits huileux sont extraits dans un montage de type Soxhlet à l'aide d'un solvant organique. Selon **Fine et al. (2013)**, l'hexane est un solvant employé industriellement pour l'extraction des huiles végétales. Il a été sélectionné depuis de nombreuses années pour ses propriétés apolaires qui lui confèrent une grande affinité pour les lipides.

Selon la méthode décrite par **Bichra et al. (2012)**, 20 g du broyat végétal sont placés dans une cartouche de papier épais et poreux au dessus de 200 ml d'hexane et soumis à l'extraction au Soxhlet. Après 6 heures, la cartouche est retirée et l'hexane chargé d'extrait de la plante est récupéré pour être concentré à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait résultant (sous forme huileux) a été stocké dans des tubes Eppendorf.



Figure 10 : Extraction par Soxhlet de l'extrait hexanique.

b- Préparation de l'extrait hydro acétonique

Suivant le protocole d'extraction décrit par **Stanković (2011)**, l'extraction de la poudre dégraissée (10 g) s'est faite par macération à froid dans une solution hydro acétonique (20/80) dans un récipient couvert, le tout à l'abri de la lumière pendant 48H avec agitation de temps en temps. Les macéras sont filtrés sur papier filtre, les filtrats sont évaporés à sec à 50°C au moyen d'un évaporateur rotatif, le résidu sec est repris puis stocké au réfrigérateur (4-6°C) à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation.



Figure 11 : Macération de l'extrait hydro acétonique.

4.2. Calculs des rendements en extraits

Le rendement en extrait brut est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait brut sec et la masse du matériel végétal broyé à traiter.

$$R = (M1/M2) \times 100$$

R : rendement en extrait brut sec exprimé en %.

M1 : masse en grammes de l'extrait brut sec.

M2 : masse en grammes du matériel végétal broyé.

Préparation des solutions des extraits

Les extraits ont été dissouts dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour obtenir une solution mère de 100 mg/mL. L'extrait hexanique a été dissout dans le même solvant pour préparer les différents dilutions (1/10, 1/100, 1/1000).



Figure 12 : Extraits acétoniques et hexaniques dissouts dans le DMSO.

Stérilisation du matériel

L'eau distillée, le DMSO, les milieux de culture, les filtres à seringue, les tubes à essai utilisés pour la préparation des solutions microbiennes ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

4.3. Préparation des suspensions bactériennes et fongiques

Les tests antimicrobiens sont effectués à partir de colonies jeunes de 18 à 24 h en phase de croissance exponentielle.

- **Revivification des souches**

5ml de bouillon nutritif est ensemencé à partir des souches bactériennes et fongiques conservées. Ces derniers sont incubés à une température de 37°C pendant 24h. Cette étape contribue à l'enrichissement et la revivification des souches.

- **Repiquage**

Les différentes souches microbiennes ont été repiquées sur des boîtes de Pétri par la méthode des stries, de manière à obtenir des colonies isolées, puis incubées à une température de 37°C pendant 24 heures. Cette étape permet la purification des souches microbiennes.

- **Conservation des souches**

A partir des jeunes cultures (18-24h) sur bouillon nutritif, des tubes inclinés sont ensemencés à l'aide de pipette Pasteur, puis incubés à 37°C pendant 24h. Les tubes sont conservés dans le congélateur à une température de -4°C pour éviter le risque de les perdre.

- **Préparation, ajustement et ensemencement**

Après une incubation à 37°C pendant 24 heures des boîtes, quelques colonies sont transférées à l'aide d'une anse de platine dans un tube à essai contenant de l'eau physiologique. Les densités optiques sont ajustées à l'aide d'un colorimètre à une longueur d'onde de 580 nm pour les bactéries où la densité optique doit être comprise entre 0.08 et 0.1 l'équivalent de 10^8 UFC/mL, et de 530 nm pour les levures où la densité optique doit être comprise entre 0,12 et 0,15 l'équivalent de 10^6 UFC/mL (CLCI, 2006).

Les boîtes de pétri coulées de milieu Muller Hinton gélosé sont ensemencées par écouvillonnage.



Figure 13 : Purification des cultures bactériennes et fongiques.

4.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits étudiés

La détection des propriétés biologiques nécessaires pour la survie des plantes est parmi les bases dans la recherche de propriétés biologiques similaires pour combattre différents micro-organismes responsables de plusieurs maladies infectieuses chez l'homme et l'animal. Ces recherches ont tendance à faire face à la résistance aux antibiotiques des microorganismes pathogènes (**Miguel, 2010**).

Deux méthodes différentes ont été utilisées pour la détermination de l'activité antimicrobienne, *in vitro* :

- Méthode de diffusion sur gélose (méthode des puits).
- Méthode de microdilution en milieu liquide.

Tous les tests ont été répétés deux fois.

a- Technique de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode des puits)

La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie (antibiogramme et antifongigramme), repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide. Après séchage des boîtes ensemencées, et suivant le protocole décrit par (**Hazzit et al., 2009**), la gélose est perforée à l'aide de la partie supérieure d'une pipette Pasteur (de 6mm de diamètre). Les cavités ainsi formées sont remplies de la solution aqueuse d'extrait (50 µL de l'extrait dans chaque puits) et une cavité de DMSO sert de contrôle négatif. Différents disques d'antibiotiques et d'antifongiques standards ont également été utilisés comme contrôle positif : streptomycine (10 µg / disque) et gentamicine (10 µg / disque), amphotéricine B (20µg / disque).

Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37 °C pendant 24 heures pour les bactéries, et 48 heures pour les levures.

b - Méthode de microdilution en milieu liquide (CMI)

Le bouillon Tryptone-Soja (TSB) est largement utilisé comme milieu standard pour la microdilution en plaque. Il contient un mélange de peptones permettant la croissance de la plupart des micro-organismes non exigeants.

La microplaque à 96 puits permet de déterminer les CMI des différents extraits végétaux. Le premier puits qui servira de témoin négatif, contient uniquement le TSB d'un volume de 100 μL . Le deuxième puits qui servira de témoin positif, contient 100 μL de TSB inoculé. Le troisième puits restera vide pour éviter toute contamination. Dans les puits des colonnes 4 à 12 nous avons introduit à l'aide d'une micropipette 50 μL de bouillon TSB. Ensuite, 50 μL de l'extrait hexanique est ajouté dans le 4^{ème} puits. A partir de ce dernier, nous avons procédé à des dilutions de 50 μL de puits à puits à l'aide d'une micropipette. Le facteur $\frac{1}{2}$ est pris en considération dans les calculs de concentrations des produits à tester. Chaque puits contient 50 μL de bouillon et d'extrait en dilution. Ensuite, nous avons additionné 50 μL de l'inoculum (10^8 UFC/mL pour bactéries et 10^6 UFC/mL pour levure) dans les puits de 4 à 12. Pour les levures il s'agit de la même méthode, mais le milieu de culture utilisé est le bouillon Sabouraud (**Duret *et al.*, 1978**).

La microplaque est couverte et incubée à 37°C pendant 24 h. La lecture se fait à l'œil nu sachant que la CMI est la plus faible concentration d'extrait testée, à laquelle aucun trouble visuel n'est observé.

Tous les tests ont été effectués en bouillon et répétés deux fois.

Chapitre 5 :

Résultats et discussion

1. Rendement des extractions

Après extraction et élimination de toute trace de solvant, les rendements des extraits sont calculés par la formule précédente.

Les résultats obtenus par les deux techniques d'extraction (**Tableau N° 03**) ont montré que l'extrait obtenu avec l'acétone est récupéré sous forme des granules marrons cristallisées, et que l'extrait hexanique est récupéré sous forme de pâte collante d'une couleur verte bouteille.

Le meilleur rendement est celui de l'extrait eau/acétone (05,23% (m/m)). Cependant l'extrait hexanique représente le rendement le plus faible (02,57% (m/m)).

Tableau N° 03 : Caractéristiques des extraits de *Hyoscyamus niger*.

Caractéristiques	Aspect	Couleur	Rendement (%)	Solubilité (v/v)
Extrait eau/acétone	Cristallisé	Marron	5,23	DMSO
Extrait d'hexane	Pâte collante	Vert bouteille huileux	2,57	DMSO

Cette différence peut s'expliquer par le caractère moins polaire du l'hexane vis-à-vis du l'acétone, et puisque l'extraction par soxhlet et par solvant apolaire résulte des acides gras et des triglycérides on peut dire que la teneur de plante *H.niger* en composés apolaires est faible par rapport au autres composés polaires. Ce qui permet de conclure que *H.niger* et pauvre en huile végétale et graisses.



a



b

Figure 14 : Rendement de l'extrait acétonique (a) et hexanique (b).

2. Etude de l'activité antimicrobienne

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien des extraits isolés de *Hyoscyamus niger* par deux différentes méthodes courantes ; par la méthode de diffusion de puits sur gélose, et par la détermination de la concentration minimale inhibitrice.

2.1. Méthode des puits

La technique de diffusion sur milieu solide est une technique qualitative basée sur la mesure des diamètres d'inhibition en mm. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. En effet, les extraits obtenus ont été testés sur des souches bactériennes et fongiques de référence (**Fig15**).

Les résultats des tests qualitatifs de l'activité antimicrobienne des deux extraits de *Hyoscyamus niger* obtenus sont regroupés dans le **tableau N° 4**. Les valeurs indiquées sont les moyennes des duplicatas pour chaque test.

Les résultats obtenus montrent clairement que les souches sont plutôt sensibles aux deux extraits hexanique et acétonique avec des zones d'inhibition de 10-14mm, ce qui confirme que la plante de la jusquiame noire est douée de propriétés antimicrobiennes.

L'extrait d'hexane avait de forte activité antimicrobienne contre les agents pathogènes par rapport à celui d'acétone. *P.aeruginosa* et *S.aureus* étaient les plus sensibles à l'extrait d'hexane (13 mm). D'autre part *S.aureus* était la plus sensible à l'extrait acétonique (14 mm). La variation de l'activité antimicrobienne des extraits explique les variations de leurs compositions chimiques.

L'extrait hexanique dilué à 1/10, 1/100, et 1/1000 n'avait aucun effet sur la totalité des souches ; ce qui montre que le pouvoir antimicrobien est inversement proportionnel à la dilution.

Nous avons observé que l'extrait hexanique a une meilleure activité que l'extrait acétonique.

En général les deux extraits testés témoignent d'activité antimicrobienne. Cette activité peut être indicative de la présence de toxines métaboliques ou des composés végétaux de la plante en citant les alcaloïdes, les withanolides, les flavonoïdes et les acides gras.

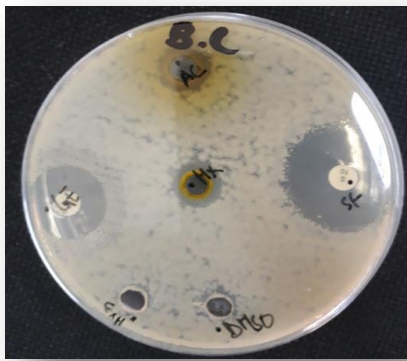
À notre connaissance et selon la bibliographie disponible, il n'existe pas de travaux antérieurs sur l'activité antimicrobienne des extraits hexanique et acétonique de la plante *Hyoscyamus niger*, pour cela, les résultats de cette étude ont été comparés à ceux obtenus pour d'autres solvants.

Dulger et al. (2015) explique que les extraits au méthanol des graines de la jusquiame noire ont été étudiés pour leur effet antimicrobien contre les agents pathogènes des voies urinaires (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* et *Candida albicans*). Les extraits ont montré une forte activité antimicrobienne contre *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* et *Candida albicans* avec des zones d'inhibition de 26,0, 19,0 et 16,0 mm, et une activité modérée contre les autres micro-organismes testés.

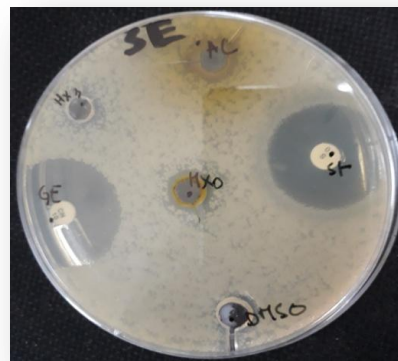
Dans un autre travail, **Khan et al. (2015)** déclare que l'activité antimicrobienne des composés non alcaloïdes des extraits des graines de *Hyoscyamus niger* ont été testés contre les bactéries à Gram positif et Gram négatif et des levures. L'effet s'est avéré d'être puissant contre *E.coli*, *B.subtilis*, *S.aureus* et *Aspergillus niger*.

Selon **Dulger et al. (2010)**, les extraits méthanoliques des graines de *Hyoscyamus niger* ont été étudiés pour leur activité antifongique contre six espèces de *Candida* (*C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 13808, *C. guilliermondii* ATCC 6260, *C. krusei* ATCC 20298, *C. glabrata* ATCC 2001 et *C. parapsilosis* ATCC 22019) et deux espèces de *Cryptococcus* (*C. neoformans* ATCC 90112 et *C. laurentii* ATCC 34142) L'extrait possédait une forte puissance antifongique.

Ces informations ont confirmé que le méthanol est le solvant le plus efficace pour l'extraction des substances antimicrobiennes chez *H. niger*.



Bacillus cereus



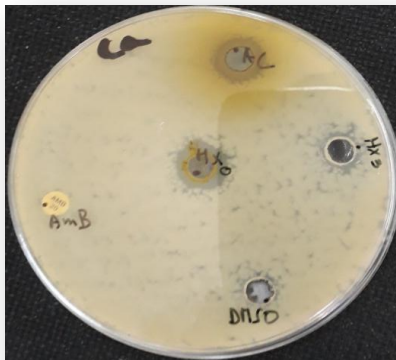
Salmonella enteritidis



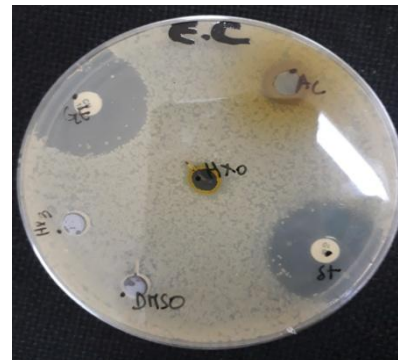
Staphylococcus aureus



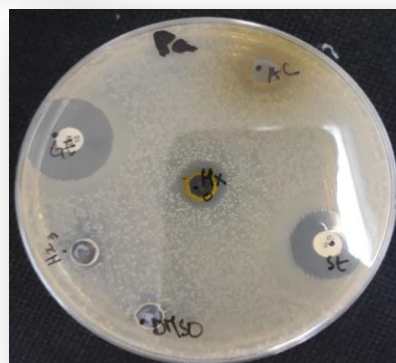
Bacillus subtilis



Candida albicans



Escherichia coli



Pseudomonas aeruginosa

Figure 15 : Effets inhibiteurs des extraits de *H.niger* sur les différents microorganismes (Original).

Tableau N°04 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits de la partie aérienne de *Hyoscyamus niger*.

Extractions Souches	Brut hexanique	Hexanique 1/10	Hexanique 1/100	Hexanique 1/1000	Brut hydro acétonique
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11	/	/	/	10
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27835	13	/	/	/	10
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13	/	/	/	14
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	12	/	/	/	11
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	12	/	/	/	11
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 2453	11	/	/	/	11
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	12	/	/	/	11

2.2. Détermination des concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

D'après les résultats obtenus pour la technique de diffusion sur gélose, nous sommes intéressés à déterminer la concentration minimale inhibitrice de l'extrait le plus actif sur les souches précédentes : l'extrait hexanique.

La CMI est un critère d'importance majeure. Elle est jugée comme étant la concentration la plus basse rapportée de l'extrait pour donner une inhibition complète des bactéries testées après 24 heures d'incubation (aucun trouble n'est observé). La CMI a été déterminée pour les différentes souches microbiennes (**Figure 16**), les résultats des tests sont exprimés dans le **tableau N° 05**.

Tableau N° 05 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) (mg/mL) de l'extrait hexanique de la partie aérienne de *Hyoscyamus niger* vis-à-vis des souches microbiennes.

Souches	CMI
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	50
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 2453	1.56
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	12.5
<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	12.5
<i>Candida albicans</i> ATCC IPP444	12.5

Lors de la méthode de microplaque nous avons fait la lecture grâce aux troubles de croissance en observant les puits qui nous a permis de déterminer la CMI (voir **figure 15**).

Ces résultats montrent que l'extrait hexanique de *H. niger* a un effet sur toutes les souches bactériennes étudiées suivantes : *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. enteritidis*, avec des valeurs de CMI: 12,5 mg /ml, 25 mg /ml, 50mg /ml, 1,56 mg /ml respectivement. La bactérie la plus sensible à l'extrait hexanique de la jusquiame noire est la bactérie à Gram négatif *Salmonella enteritidis*. En effet, sa valeur de CMI obtenue (1,56mg/mL), est nettement plus basse que celles produites par les souches *P. aeruginosa* (25mg/mL), *E. coli* (12,5mg/mL) et *S. aureus* (50mg/mL).

La démonstration de l'activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif peut être le signe de la présence d'un principe actif à large spectre et ça sera un grand avantage dans la lutte contre de nombreux agents pathogènes très fréquents ces derniers temps (**Doughari, 2006**).

En raison du manque d'études sur l'activité antimicrobienne des extraits apolaires de la plante *Hyoscyamus niger*, les résultats de cette étude ont été comparés à ceux obtenus pour d'autres plantes de même genre.

Alghazeer et al. (2012) ont montré que l'extrait méthanolique de *Hyoscyamus albus* a une valeur plus faible de CMI (0,156 mg / ml) sur les souches Gram positif (*Staphylococcus aureus*), cette valeur est inférieure à celle trouvée dans notre étude avec l'extrait hexanique. Ce même auteur a trouvé que l'extrait alcaloïdique de *H. albus* a montré une activité remarquable sur *E. coli* et *Salmonella typhi* avec des valeurs de CMI (0, 313 et 0,313 mg/ml) respectivement. Il est fort probable que la toxicité de cette plante est principalement liée à la forte teneur en alcaloïdes

Dans un autre travail de Doctorat, **Afaf Benhouda (2016)** a démontré l'effet de l'extrait méthanolique de la plante *Hyoscyamus albus* sur des bactéries Gram positif (*S.aureus* ATCC 25923) et des bactéries Gram négatif (*E.coli* ATCC 25922, *P.aeruginosa* ATCC27853). Les valeurs de CMI étaient de l'ordre 8,30 mg/mL, 6,93 mg/mL, 7,63mg/mL.

Pour la levure de *Candida* et malgré la résistance progressive des trois souches (*C.albicans* ATCC 10231 multi résistante), elles présentent la même valeur de CMI de 12,5 mg /ml.

Nos résultats montrent que l'extrait hexanique possède un pouvoir antifongique moyen par rapport aux études de **Dulger (2010)**, qui montrent que l'extrait méthanolique avait un fort effet contre *Candida albicans* avec une CMI de 0.06 mg/ml. Selon les résultats actuels, l'extrait de méthanol a un spectre d'activité antimicrobienne plus fort et plus large. Certaines études concernant l'efficacité des méthodes d'extraction soulignent que l'extraction au méthanol produit une activité antimicrobienne plus élevée que les autres solvants (**Febles et al., 1995**).

L'hexane est un solvant employé industriellement pour l'extraction des huiles végétales. Il a été sélectionné depuis de nombreuses années pour ses propriétés apolaires qui lui confèrent une grande affinité pour les lipides (**Fine et al., 2013**), donc l'extrait hexanique de *H.niger* devrait être très riche en acides gras, d'où ses propriétés antibactériennes sont attribuées à la présence des lipides, des

stérols et des acides gras . Ces derniers ont probablement la capacité à se complexer avec les protéines extracellulaires de la paroi cellulaire bactérienne.

Bien que le mécanisme exact par lequel l'extrait apolaire d'hexane effectue ses effets inhibiteurs sur les microorganismes demeure inconnu, la libération des constituants intracellulaires peut-être un des facteurs clés dans l'inactivation de la cellule.

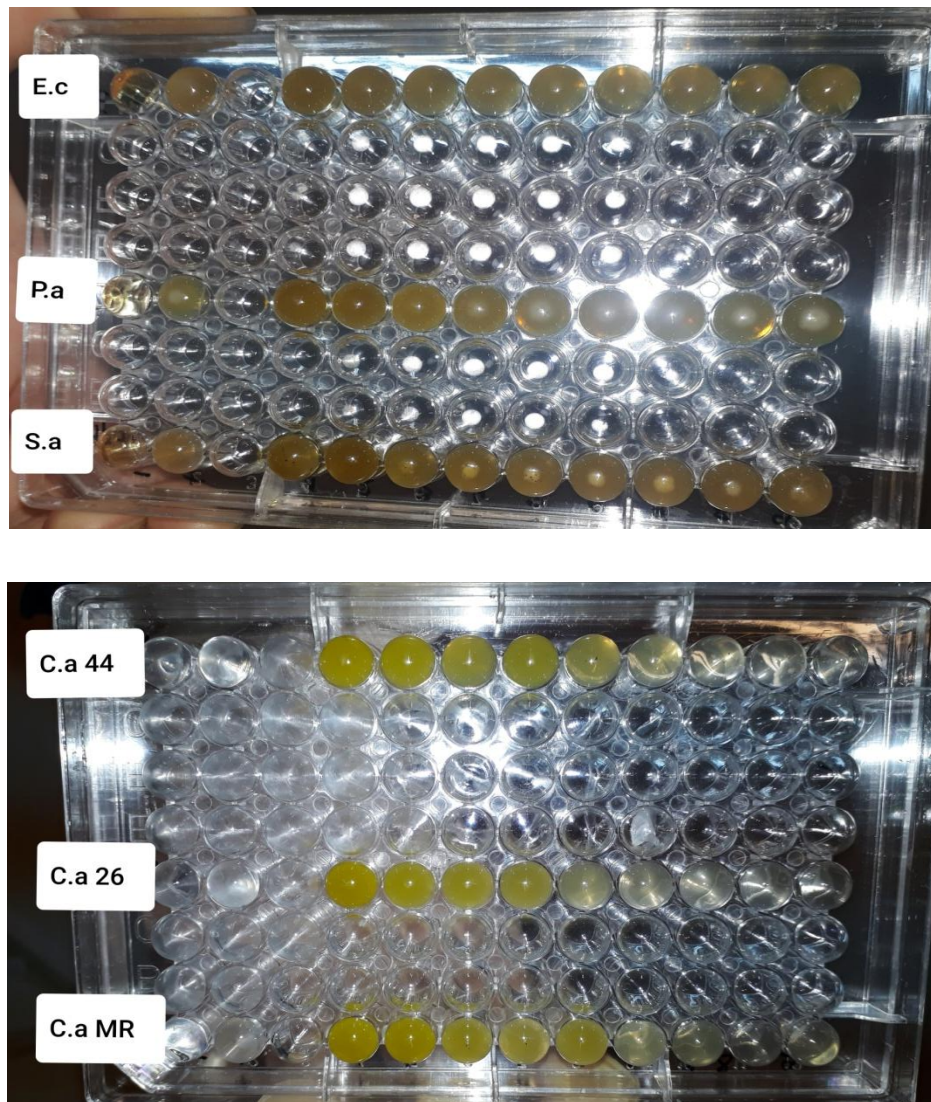


Figure 16 : La concentration minimale inhibitrice de l'extrait hexanique de la partie aérienne de *Hyoscyamus niger* vis-à-vis des souches microbiennes.

Conclusion générale

Le présent travail a visé l'étude antibactérienne et antifongique des extraits hexaniques et acétoniques obtenus par macération et au Soxhlet de la partie aérienne de la plante *Hyoscyamus niger* cultivée dans la région de Tlemcen en Algérie.

Nous avons ciblé notre étude sur des souches pathogènes reconnus pour ces impacts cliniques, sanitaires et économiques : une levure : *C.albicans*, trois bactéries à Gram positif: *S.aureus*, *B.cereus*, *B.subtilis* et trois bactéries à Gram négatif : *E.coli*, *P.aeroginosa*, *S.enteritidis*.

Les rendements des extractions par macération de l'extrait acétonique s'avèrent importants que ceux de l'extrait hexanique obtenu par Soxhlet.

Les résultats de l'activité antimicrobienne par méthode des puits et de CMI ont révélé l'efficacité des deux extraits contre toutes les souches testées, avec des zones d'inhibition de 10mm à 14mm vis-à-vis des souches pathogènes. La meilleure concentration minimale inhibitrice enregistrée dans cette étude était de l'extrait considéré comme le plus actif : hexanique est de l'ordre 1.56 mg/mL.

Ces résultats constituent une première étape dans la recherche de substances naturelles biologiquement actives. Il serait toute fois intéressant d'approfondir les investigations phytochimiques et biologiques de cette plante afin d'isoler les principes actifs ce qui permettra d'élargir l'arsenal thérapeutique des médicaments à base des plantes.

Cependant d'autres études approfondies sont nécessaires et se résument dans :

- L'identification exacte des composés actifs de la plante *Hyoscyamus niger*.
- Etude des activités biologiques des produits purifiés pour arriver aux principes actifs.
- Tester d'autres activités : l'activité antiparkinsonienne, l'activité antidépressive, l'activité anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques.
- Réaliser l'extraction avec d'autres solvants de polarité différente.
- Evaluer l'activité antimicrobienne par des essais *in-vivo sur des* animaux comme les rats.

Références bibliographiques

1. Ackman, R. G. (1989). Fatty acids. Marine biogenic lipids, fats and oils, 1, 103-137.
2. Afzal, H., Anjum, A. A., Ashfaque, M., Akhtar, M. S., & Gill, S. A. (1992). EVALUATION of anticlostridial efficacy of indigenous medicinal plant drugs: RASOOT, AJWAIN KHURASANI, NEEM and BAKAIN. *Pak. J. Agri. Sci*, 29(4).
3. Aguilar, C. N., Aguilera-Carbo, A., Robledo, A., Ventura, J., Belmares, R., Martinez, D., ... & Contreras, J. (2008). Production of antioxidant nutraceuticals by solid-state cultures of pomegranate (*Punica granatum*) peel and creosote bush (*Larrea tridentata*) leaves. *Food Technology and Biotechnology*, 46(2), 218.
4. Alghazeer, R., El-Saltani, H., Saleh, N., Al-Najjar, A., & Hebail, F. (2012). Antioxidant and antimicrobial properties of five medicinal Libyan plants extracts. *Natural science*, 4(5), 324-335.
5. Alilou, H. (2012). Etude phytochimique et antifongique de deux plantes du Sud du Maroc: *Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* (Schousb.) Greuter et *Asteriscus imbricatus* (Cav.) DC.
6. Alizadeh, A., Moshiri, M., Alizadeh, J., & Balali-Mood, M. (2014). Black henbane and its toxicity—a descriptive review. *Avicenna journal of phytomedicine*, 4(5), 297.
7. Al-Snafi, A. E. (2018). Therapeutic importance of *Hyoscyamus* species grown in Iraq (*Hyoscyamus albus*, *Hyoscyamus niger* and *Hyoscyamus reticulatus*)-A review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 8(6), 18-32.
8. AREF, M., & HEDED, M. (2015). Contribution à l'étude phytochimique, les activités biologiques (Antioxydante et Antibactérienne) d'une plante médicinale *Cleome arabica* L (Région d'Oued Souf).
9. Avril, J. L., Dabernat, H., Denis, F., & Monteil, H. (2000). Bactériologie clinique. *Ellipses Edition Marketing SA*.

10. BASTIEN, L., GIRARD, F., & DESGRANDCHAMPS, F. (2010). Diététique et cancer de la prostate. État actuel des connaissances et futurs développements. *La Phytothérapie européenne*, (56), 12-18.
11. BENHOUDA, A. (2016). Etude des activités pharmacologiques des extraits d'*Umbilicus rupestris* (Salisb Dandy) et *Hyoscyamus albus* L (Doctoral dissertation, Université de Batna 2).
12. BEN SAADI, H., & GUEMMOUDA, (2017). S. *Etude de l'activité antioxydante Et antibactérienne d'extrait de Suaeda fruticosa* (Doctoral dissertation).
13. Bichra, M., & Benkhalti, F. (2012). Antioxidant and anti-browning activities of *Mentha suaveolens* extracts. *African Journal of Biotechnology*, 11(35), 8722-8729.
14. Bruneton, J., & Barton, D. H. R. (1987). *Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie. Technique et documentation*. Lavoisier, Paris, pp 585.
15. Bruneton J (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 3e édition, *Tec & Doc. Lavoisier, Paris*.
16. Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4e éd.). *Tec & Doc/Lavoisier, Paris*, 841-842.
17. Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales*. 4e éd, revue et augmentée, *Paris, Tec & Doc, Éditions médicales internationales*, 1288p.
Dibong SD, Mpondo Mpondo E, Ngoye A, Kwin NF, Betti JL. 2011a. Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales vendues sur les marchés de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences*, 37, 2496-2507.
18. CLSI (2006). Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for dilution antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. Seventh Edition. CLSI document M7-A7 (ISBN 1-56238-587-9)*. 26 (2): 31 pages.

- 19.** Couderc, C., Jolivet, S., Thiebaut, A. C. M., Ligier, C., Remy, L., & Alvarez, A. S. (2014). on behalf of the antibiotic use and *Staphylococcus aureus* resistance to antibiotics (ASAR) study Group. Fluoroquinolone use is a risk factor for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* acquisition in long-term care facilities: a nested case-control study. *Clin Infect Dis*, 39, 206-15.
- 20.** De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., Whitman, W.B., 2009. Bergey's manual of systematic bacteriology - second edition. Bergey's manual trust 3.
- 21.** Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, et al. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 65 (4): 337-53.
- 22.** Doughari, J. H. (2006). Antimicrobial activity of *Tamarindus indica* Linn. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(2), 597-603.
- 23.** Dräger, B. (2002). Analysis of tropane and related alkaloids. *Journal of Chromatography A*, 978(1-2), 1-35.
- 24.** Duke, J. A., 1985. CRC handbook of medicinal herbs. CRC Press, Boca Raton, pp :297-300.
- 25.** Dulger, B., Hacıoglu, N., Goncu, B. S., & Guçin, F. (2010). Antifungal activity of seeds of *Hyoscyamus niger* L. (Henbane) against some clinically relevant fungal pathogens. *Asian Journal of Chemistry*, 22(8), 6321.
- 26.** Dulger, G., & Dulger, B. (2015). Antimicrobial activity of the seeds of *Hyoscyamus niger* L. (Henbane) on microorganisms isolated from urinary tract infections. *J Med Plants Studies*, 3(5), 92-95.
- 27.** DURET, M., PHILIPPON, A., PAUL, G., & NEVOT, P. (1978). Susceptibility of hemophilus Sp to ampicilin, doxycyline and minocycline and

minocycline determined by microdilution technique. *Medicine et maladies infectieuses*, 8(7), 316-322.

28. Epifano, F., Genovese, S., Menghini, L., & Curini, M. (2007). Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*, 68(7), 939-953.

29. Erlund I (2004) .Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutr Res* 24: 851-74.

30. Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D., & Guo, Z. (1986). Place des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin of the World Health Organization*, 64(2), 159.

31. Febles, C. I., Arias, A., Gil-Rodriguez, M. C., Hardisson, A., & Sierra Lopez, A. (1995). In vitro study of antimicrobial activity in algae (Chlorophyta, Phaeophyta and Rhodophyta) collected from the coast of Tenerife. *Anuario del Instituto de Estudios Canarios*, 34(2), 181-192.

32. Felidj, M. (2005). Effet du stress hydrique sur la production des alcaloïdes tropaniques chez *Datura stramonium* cultivé en plein champ. *Thèse de Magister* .Faculté des sciences agronomiques et vétérinaires, université Saad Dahleb. Blida .pp 102.

33. Fine, F., Vian, M. A., Tixier, A. S. F., Carre, P., Pages, X., & Chemat, F. (2013). Les agro-solvants pour l'extraction des huiles végétales issues de graines oléagineuses. *OCL*, 20(5), A502.

34. Flesch, F. (2005). Intoxications d'origine végétale. *EMC-médecine*, 2(5), 532-546.

35. Gilarii, A.S.; Verma, S.; Sahai, M.; Schneider, K.; and Sussmuth, (2008). Hyoscyamal, a new tetrahydrofurano lignin from *Hyoscyamus niger* Linn. *Nat.Prod. Res.* 23(7): 595-600.

- 36.** Goullé, J. P., Pépin, G., Dumestre-Toulet, V., & Lacroix, C. (2004). Botanique, chimie et toxicologie des solanacées hallucinogènes: belladone, datura, jusquiame, mandragore. In *Annales de toxicologie analytique* (Vol. 16, No. 1, pp. 22-35). EDP Sciences.
- 37.** Guinebretière, M. H., Thompson, F. L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., ... & De Vos, P. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environmental Microbiology*, *10*(4), 851-865.
- 38.** Hajipoor, K., Sani, A. M., & Mohammad, A. (2015). In vitro antioxidant activity and phenolic profile of *Hyoscyamus niger*. *IJBPAS*, *4*(7), 4882-4890.
- 39.** Havsteen BH (2002) .The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therap* *96*: 67-202
- 40.** Hazzit, M., Baaliouamer, A., Veríssimo, A. R., Faleiro, M. L., & Miguel, M. G. (2009). Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils. *Food chemistry*, *116*(3), 714-721.
- 41.** Hostettmann, K., & Marston, A. (1995). *Chemistry and pharmacology of natural products* (Vol. 548, pp. 326-327). Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- 42.** Iserin, P., (2001). Encyclopédie des plantes médicinales. Ed : Larousse Bourdasse .Paris .p. 10-335.
- 43.** ISO (International Organization for Standardization). (2001). ISO 16654/2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157.
- 44.** Jouzier, E. (2005). Solanacées médicinales et philatélie. *BULLETIN-SOCIETE DE PHARMACIE DE BORDEAUX*, *144*(3/4), 311.

-
- 45.** Khan, F. Z., Alam, M., Saleem, R., & Rashid, I. (1992). Biological studies of indigenous medicinal plants--I: physicochemical and antimicrobial screening of non-alkaloidal constituents of some solanaceous seeds. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 5(1), 55-61.
- 46.** Kirtikar KR, Basu BD. (1984). Indian medicinal plants. M/S Periodical Experts, New Delhi. p. 1794.
- 47.** Kolling, M., Winkley, K., & von Deden, M. (2010). " For someone who's rich, it's not a problem". Insights from Tanzania on diabetes health-seeking and medical pluralism among Dar Es Salaam's urban poor. *Globalization and Health*, 6(1), 8.
- 48.** Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées (Doctoral dissertation, Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS).
- 49.** Laghrifi, K., El Idrissi, M., Makoudi, Y., & Alnamer, R. (2013). In vitro antibacterial activity of the methanolic and ethanolic extract of *Inula viscosa* used in Moroccan traditional medicine. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, 2(5), 3963-3976.
- 50.** Larpent-Gourgand, M., & Sanglier, J. J. (1992). Biotechnologies: principes et méthodes. Paris, 564-569.
- 51.** Leete, E. (1979). Biosynthesis and metabolism of the tropane alkaloids. *Planta medica*, 2(36), 4-52.
- 52.** Lei, Z. H., Yahara, S., Nohara, T., Shan, T. B., & Xiong, J. Z. (1996). Cardenolides from *Erysimum cheiranthoides*. *Phytochemistry*, 41(4), 1187-1189.

-
- 53.** Lei, Z. H., Jin, Z. X., Ma, Y. L., Tai, B. S., Kong, Q., Yahara, S., & Nohara, T. (1998). Cardiac glycosides from *Erysimum cheiranthoides*. *Phytochemistry*, *49*(6), 1801-1803.
- 54.** Lhuillier, A. (2007). Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: *Agauria salicifolia* Hook. f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambourissa trichophylla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embelia concinna* Baker (*Myrsinaceae*) (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Toulouse).
- 55.** Li, J., Shi, J., Yu, X. W., & Sun Jk, Q. M. (2011). Chemical and pharmacological researches on *Hyoscyamus niger*. *Chinese Herb Med*, *3*, 117-126.
- 56.** Ionkova, I. (2011). Anticancer lignans-from discovery to biotechnology. *Mini reviews in medicinal chemistry*, *11*(10), 843-856.
- 57.** Lovegrove, J. A., Stainer, A., & Hobbs, D. A. (2017). Role of flavonoids and nitrates in cardiovascular health. *Proceedings of the Nutrition Society*, *76*(2), 83-95.
- 58.** Ma, C. Y., Williams, I. D., & Che, C. T. (1999). Withanolides from *Hyoscyamus niger* seeds. *Journal of natural products*, *62*(10), 1445-1447.
- 59.** Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques, 121-216.
- 60.** Manallah, A. (2012). Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L: Pour obtenir le diplôme de *magister*, Option: Biochimie Appliquée. Université Ferhat Abbas-sétif, 87p.
- 61.** Malec, L. S., & Pamilio, A. B. (2003). Herbivory effects on the chemical constituents of *Bromus pictus*. *Mol. Med. Chem*, *1*, 30-38.
- 62.** Mangambu, M. D. D., Mushagalusa, K. F., & Kadima, N. J. (2014). Contribution à l'étude photochimique de quelques plantes médicinales antidiabétiques

de la ville de Bukavu et ses environs (Sud-Kivu, RD Congo). *Journal of Applied Biosciences*, 75(1), 6211-6220.

- 63.** Matsuda J, Okabe S, Hashimoto T and Yamaday. (1991). Cultured roots of *Hyoscyamus niger*. *J Biology Chemistry*; 25(15):460-464.
- 64.** Margulis, L., Jorgensen, J. Z., Dolan, S., Kolchinsky, R., Rainey, F. A., & Lo, S. C. (1998). The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: intestinal symbionts of animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(3), 1236-1241.
- 65.** McKinnell, J. A., Huang, S. S., Eells, S. J., Cui, E., & Miller, L. G. (2013). Quantifying the impact of extranasal testing of body sites for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization at the time of hospital or intensive care unit admission. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 34(2), 161-170.
- 66.** Merbouha, K., & Imane, R. (2019). Etude phytochimique et activités biologiques des huiles fixe et essentielle de la plante *Peganum harmala* (Doctoral dissertation).
- 67.** Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252-9287.
- 68.** Mitich, L. W. (1992). Black henbane. *Weed Technology*, 6(2), 489-491.
- 69.** MOHAMMEDI, Z. (2013). Etude phytochimique et activités biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie (Doctoral dissertation).
- 70.** Morishita, D.W. (1991). Dalmatian toadflax, yellow toadflax, black henbane: importance, distribution, and control. *Iranian J. Pharmaceutical Research*, 2:14.
- 71.** Nadkarni KM. (2002). *Indian materia medica*. Mumbai: Bombay popular prakashan; 1: 670-72.

- 72.** Olivier, E. (1886). Flore populaire de l'Allier: noms vulgaires et patois des plantes indigènes et cultivées usités dans ce Département. Auclair.
- 73.** Osbourn, A. (1996a). Saponins and plant defence—a soap story. *Trends in plant science*, 1(1), 4-9.
- 74.** Osbourn, A. E. (1996b). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The plant cell*, 8(10), 1821.
- 75.** Panda, H. (2002). Medicinal plants cultivation & their uses. Asia Pacific Business Press Inc.(pp.85,87,90)
- 76.** Pastor, G. (2006). Précis de phytothérapie (Le meilleur de la nature au service de votre santé). *Édition Alpen*, 100p.
- 77.** Porter, L. J. (2012). 11 Tannins. *Methods in plant biochemistry*, 1, 389.
- 78.** Prance GT, Nesbitt M, 2005. The Cultural History of Plants. Taylor and Francis Routledge: New York, 194.
- 79.** Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A., Bacq-Calberg, C. M., & Dusart, J. (2003). Microbiologie. 2ème édition française. *Éditions De Boeck Université, Bruxelles, Belgique*, 525-526.
- 80.** Robins, R. J., Bachmann, P., Peerless, A. C., & Rabot, S. (1994). Esterification reactions in the biosynthesis of tropane alkaloids in transformed root cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38, 241-247.
- 81.** SajeliBegum, A. (2010). *Hyoscyamus niger* Linn. Seeds: A Review. *Research journal of seed science*, 3(4), 210-217.
- 82.** Sanogo, R., Diallo, D., Diarra, S., Ekoumou, C., & Bougoudogo, D. (2006). Activité antibactérienne et antalgique de deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au Mali. *Mali Médical*, 21(1), 18-24.

- 83.** Schauenberg, P., & Paris, F. (2005). Guide des plantes médicinales: analyse, description et utilisation de 400 plantes. Delachaux et Niestlé.
- 84.** Stankovic, M. S. (2011). Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujevac J Sci*, 33(2011), 63-72.
- 85.** Telefo, P. B., Lemfack, M. C., Bayala, B., Lienou, L. L., Goka, C. S., Yemele, M. D., ... & Moundipa, F. P. (2012). Enquête ethnopharmacologique des plantes utilisées dans le traitement de l'infertilité féminine dans les localités de Fossong-Wentcheng et Foto, Cameroun. *Phytotherapie*, 10(1), 25-34.
- 86.** Tenailon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 207-217.
- 87.** Tomanova, E., Demartini, E., Nicôvá, V. 2013. Atlas illustré de plantes sauvages. *ED Terres*.
- 88.** Toure, D. (2015). Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire (Doctoral dissertation).
- 89.** Van Delden, C., & Iglewski, B. H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging infectious diseases*, 4(4), 551.
- 90.** Venkatramesh, M., Karunanandaa, B., Sun, B., Gunter, C. A., Boddupalli, S., & Kishore, G. M. (2003). Expression of a *Streptomyces* 3-hydroxysteroid oxidase gene in oilseeds for converting phytosterols to phytostanols. *Phytochemistry*, 62(1), 39-46.
- 91.** Vermeersch, M., Foubert, K., Luz, R. I. D., Puyvelde, L. V., Pieters, L., Cos, P., & Maes, L. (2009). Selective antileishmania activity of 13, 28-epoxy-oleanane and

related triterpene saponins from the plant families Myrsinaceae, Primulaceae, Aceraceae and Icacinaceae. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(10), 1404-1410.

- 92.** Vincken, J. P., Heng, L., de Groot, A., & Gruppen, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68(3), 275-297.
- 93.** Von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H., & Peters, G. (2001). Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *New England Journal of Medicine*, 344(1), 11-16.
- 94.** Williams, R. E. O. (1963). Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriological reviews*, 27(1), 56.
- 95.** Wink, M. (2003). Evaluation of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64 (1).3-19.
- 96.** Xie, J., Lin, Y. S., Shi, X. J., Zhu, X. Y., Su, W. K., & Wang, P. (2013). Mechanochemical-assisted extraction of flavonoids from bamboo (*Phyllostachys edulis*) leaves. *Industrial Crops and Products*, 43, 276-282.
- 97.** You Esoh, C. (2013). Étude épidémiologique de souches de *Pseudomonas aeruginosa* responsables d'infections et de leurs bactériophages pour une approche thérapeutique (Doctoral dissertation, Paris 11), pp56.
- 98.** <https://www.cabi.org/isc/datasheet/28251>.

المخلص

العنوان: تقييم النشاط المضاد للميكروبات للمستخلصات القطبية من نبات *Hyoscyamus niger* المتواجد بشمال الجزائر.

هذه الدراسة تندرج في اطار البحث عن مواد طبيعية جديدة مضادة للميكروبات، المستخلصة من نبات *Hyoscyamus niger* المتواجد بشمال الجزائر .

الهدف من هذا العمل هو تقييم النشاط المضاد للميكروبات (المضاد للبكتيريا والفطريات) للمستخلصات القطبية من هذا النبات ضد السلالات البكتيرية المسببة للأمراض ، باستخدام مجموعة متنوعة من الأساليب: عن طريق الانتشار على وسط مولر هينتون آغار ، وتحديد التركيز الادنى المثبط. أظهرت النتائج أن السلالات التي تمت دراستها لها حساسية متغيرة تجاه مستخلصات هذا النبات (قطر تثبيط يتراوح من 10 إلى 14 مم). التركيز الادنى المتحصل عليه ضد بكتيريا الزائفة الزنجارية والبكتيريا الاشريكية القولونية و السالمونيلا إنترينديس هو 25 ، 12.5 ، 1.56 ملغ/ ملل. يمكننا القول ان لهذا النبات نشاط مهم ضد البكتيريا والفطريات المسببة للأمراض.

الكلمات المفتاحية: نشاط مضاد للجراثيم ، نشاط مضاد للفطريات ، مسببات الأمراض ، التركيز الادنى المتحصل عليه، *Hyoscyamus niger* .

Résumé

Titre : Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits apolaires de *Hyoscyamus niger* de la région de Tlemcen.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouveaux agents antimicrobiens naturels, extraits à partir des plantes. Nous sommes intéressés à une jusquiame du Nord Algérien : « *Hyoscyamus niger* ».

Le but de ce travail est d'évaluer l'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) des extraits apolaires de cette plante contre des souches pathogènes, en utilisant une variété de méthodes : par diffusion sur milieu Muller Hinton Agar, qui se traduit par une zone d'inhibition de croissance plus ou moins importante selon la sensibilité des bactéries étudiées, et par la détermination de la concentration minimale inhibitrice. Les résultats obtenus ont montré que les souches étudiées ont une sensibilité variable vis-à-vis des extraits de *Hyoscyamus niger* (un diamètre d'inhibition allant de 10 à 14mm). Les CMI obtenus contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, et *Salmonella enteritidis* sont de l'ordre de 25, 12.5, et 1.56 mg/mL.

Cette plante présente une activité antimicrobienne intéressante.

Mots clés : *Hyoscyamus niger*, activité antibactérienne, activité antifongique, pathogènes, CMI.

Abstract

Title: Evaluation of the antimicrobial activity of apolar extracts of *Hyoscyamus niger* from the Tlemcen region.

Our work is part of the research of new natural antimicrobial agents, extracted from plants. We are interested in a henbane from northern Algeria: "*Hyoscyamus niger*".

The aim of this work is to evaluate the antimicrobial activity (antibacterial and antifungal) of the apolar extracts of this plant against pathogenic strains, using a variety of methods: by diffusion on Muller Hinton Agar medium, which results in a zone of inhibition of growth more or less significant depending on the sensitivity of the bacteria studied, and by determining the minimum inhibitory concentration. The results obtained have shown that the strains studied have a variable sensitivity towards extracts of *Hyoscyamus niger* (an inhibition diameter ranging from 10 to 14mm). The MIC obtained against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enteritidis* are in the range of 25, 12.5, and 1.56 mg / mL.

This plant has an interesting antimicrobial activity.

Key words: *Hyoscyamus niger*, antibacterial activity, antifungal activity, pathogens, MIC.