





MAST-Bio-208 / 01

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Abou-Bakr-Belkaïd Tlemcen

Faculté des Sciences de la nature et de vie et sciences de la terre et de l'univers

Département de Biologie

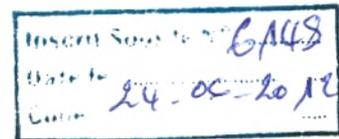
Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire Au Biomédicale et à l'Environnement

Laboratoire des produits naturels.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option : Microbiologie

Présenté par M<sup>elle</sup> : OURAHMANE NADJET



Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne de  
quelques extraits végétaux

Soutenu le 05 Juin 2012 devant le jury :

- |                                |                       |              |
|--------------------------------|-----------------------|--------------|
| - M <sup>r</sup> ABDELWAHID D. | Professeur            | Président    |
| - M <sup>me</sup> BEKHECHI C.  | Maitre de conférences | Examinatrice |
| - M <sup>me</sup> CHAUCHE F.   | Maitre-assistante A   | Promotrice   |



Année universitaire 2011-2012

## Table des matières

|  | Pages |
|--|-------|
| Résumé en Français .....   | I     |
| Résumé en Anglais .....  | II    |
| Résumé en arabe .....  | III   |
| Remerciements .....  | IV    |
| Dédicaces .....  | V     |
| Glossaire .....  | VI    |
| Liste des abréviations .....   | VII   |
| Listes des figures.....  | IX    |
| Liste des tableaux .....   | X     |
| <br>   |       |
| <i>Introduction générale</i> .....                                       | 01    |
| <i>Partie bibliographique</i> .....                                      | 04    |
| <br>   |       |
| <i>Premier chapitre : Etude de la plante</i>                             |       |
| 1. Caractères généraux des <i>Asteraceae</i> .....                       | 06    |
| 2. <i>Helichrysum stoechas</i> .....                                     | 06    |
| 3. <i>Phagnalon saxatile</i> .....                                       | 08    |
| 4. Compositions, activités biologiques et utilisations médicinales ..... | 09    |
| <br>   |       |
| <i>Deuxième chapitre : Les métabolites secondaires.</i>                  |       |
| 1. Introduction .....  | 12    |
| 2. Définition des métabolites secondaires .....                          | 12    |
| 3. Fonctions des métabolites secondaires .....                           | 12    |
| 4. Biosynthèse des métabolites secondaires .....                         | 13    |
| 5. Classification .....  | 14    |
| 5.1 Les composés phénoliques ( <i>Les polyphénols</i> ).....             | 14    |



|       |  |           |
|-------|--|-----------|
| 5.1.1 | Principaux composés phénoliques .....  | 15        |
| a)    | Les acides phénoliques .....   | 15        |
| b)    | Les tanins .....   | 15        |
| c)    | Les flavonoïdes .....  | 16        |
| d)    | Les acides phénylpropanoïques, coumarines et lignines .....  | 17        |
| 5.1.2 | Rôles et activités biologiques des polyphénols .....   | 17        |
| 5.2   | Les Alcaloïdes .....   | 18        |
| 5.2.1 | Activité biologiques des alcaloïdes .....  | 19        |
| 5.3   | Les isoprénoïdes .....   | 20        |
| 5.3.1 | Activités biologiques des terpénoïdes et saponines .....   | 20        |
| 6.    | Isolation, caractérisation et évaluation des métabolites secondaire .....                            | 21        |
|       | <i>Troisième chapitre : Détermination de l'activité antimicrobienne des métabolites secondaires.</i> |           |
| 1.    | Introduction .....   | 23        |
| 2.    | Méthodes de détermination du niveau de l'activité antibactérienne .....                              | 23        |
| 2.1   | Méthode de diffusion en disque dans un milieu gélosé .....   | 23        |
| 2.2   | Méthode de dilution .....  | 24        |
| 2.2.1 | En milieu liquide .....  | 24        |
| 2.2.2 | En milieu solide .....   | 24        |
|       | <b>Partie expérimentale</b> .....  | <b>25</b> |
|       | <i>Matériel et méthodes</i> .....  | <b>26</b> |
| 1.    | Matériel végétal .....   | 27        |
| 2.    | Préparation des extraits bruts méthanoliques.....  | 29        |
|       | Calcul des rendements .....  | 29        |
| 3.    | Tests phytochimiques .....   | 29        |
| 4.    | Dosages des polyphénols.....   | 30        |
| 5.    | Chromatographie sur couche mince .....   | 31        |
| 6.    | Étude de l'activité antimicrobienne .....  | 32        |
| a)    | Les souches étudiées .....   | 32        |
| b)    | Les milieux de culture utilisés .....  | 33        |
| c)    | Préparation de l'inoculum .....  | 33        |
| d)    | Méthode de diffusion sur milieu solide .....   | 33        |
| e)    | Détermination de la concentration Minimale Inhibitrice sur milieu liquide.....                       | 34        |

|   |    |
|---|----|
| <i>Résultats et discussion</i> .....                        | 35 |
| 1. Extraction et calcul des rendements .....                | 36 |
| 2. Tests phytochimiques.....                                | 37 |
| 3. Dosage des polyphénols .....                             | 40 |
| 4. Chromatographie sur couche mince .....                   | 42 |
| 5. Etude de l'activité antimicrobienne .....                | 45 |
| a) Méthode de diffusion des disques sur milieu solide ..... | 46 |
| b) La concentration minimale inhibitrice .....              | 49 |
| <i>Conclusion générale</i> .....                            | 51 |
| <i>Références bibliographiques</i> .....                    | 55 |
| <i>Annexes</i> .....  | 63 |

## Résumé

L'augmentation de la fréquence des infections dues aux germes multirésistants, la cytotoxicité et la néphrotoxicité des médicaments et antibiotiques ont poussé les gens à se soigner avec les plantes médicinales.

La présente étude s'est dirigée vers l'étude des extraits de deux plantes peu étudiées et qui sont *Helichrysum stoechas subsp rupestre* et *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile* de la région de Tlemcen vis-à-vis de quelques souches bactériennes et fongiques.

Des extraits bruts méthanoliques ont été préparés à partir des fleurs et des tiges feuillées. Les rendements obtenus sont respectivement 18.7% et 13.5% pour *Helichrysum stoechas ssp rupestre* et 10% et 09% pour *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile*.

Des tests phytochimiques et des dosages en polyphénols totaux ont été effectués. Ils ont permis de détecter la présence des flavonoïdes, des tanins et des stérols et triterpènes dans les deux plantes, et de déterminer la teneur en polyphénols totaux dans les extraits d'*Helichrysum stoechas ssp rupestre* et *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile*. Les teneurs sont pour ces deux espèces, respectivement, **31.34** mg GAE/g MS et **4.8** mg GAE/g MS dans les extraits des fleurs et **18.62** mg GAE/g MS et **18.82** mg GAE/g MS dans ceux des tiges feuillées.

La chromatographie sur couche mince révèle la présence de la quercétine, la catéchine et l'acide gallique dans fleurs, la catéchine dans les tiges feuillées des extraits bruts d'*Helichrysum stoechas subsp rupestre* et de l'acide gallique dans les tiges-feuillées, la quercétine dans l'extrait des fleurs de *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile*

L'étude du pouvoir antimicrobien montre que les extraits éthérés ont une activité modérée comparée à celle des extraits méthanoliques qui se sont révélés inactifs. Les souches les plus sensibles sont *Bacillus cereus* et *Candida albicans* suivies par *Staphylococcus aureus*.

**Mots clé :** *Helichrysum stoechas subsp rupestre*, *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile*, Extrait brut, Screening phytochimique, Dosages, polyphénols totaux, Chromatographie sur couche mince, Activité antimicrobienne.

## Abstract

The increased frequency of infections due to multidrug resistance, cytotoxicity and néphrotoxicité drugs and antibiotics have led people to seek treatment with medicinal plants.

This study is directed toward the study of extracts from two plants that are poorly studied : *Helichrysum stoechas subsp ruestre* and *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile* of the Tlemcen region vis-à-vis some bacterial and fungal strains.

Methanolic crude extracts were prepared from the flowers and leafy stems. The yields are respectively 18.7% and 13.5% for *Helichrysum stoechas subsp ruestre* and 10% and 09% for *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile*.

Phytochemical tests and assays in total polyphenols were performed. They have detected the presence of flavonoids, tannins and sterols and triterpenes in both plants, and determine the content of total polyphenols in the extracts of *Helichrysum stoechas subsp rupestre* and *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile*. The levels are for these two species, respectively, 31.34 mg GAE / g DM et 4.8 mg GAE / g DM in the extracts of flowers and 18.62 mg GAE / g DW and 18.82 mg GAE / g DM in those leafy stems.

The thin layer chromatography revealed the presence of quercetin, catechin and gallic acid in flowers, the catechins in the leafy stems of crude extracts of *Helichrysum stoechas subsp rupestre* and gallic acid in the stem-leaf, the quercetin in the extract of flowers had *Phagnalon saxatile subsp saxatile*.

The study shows that antimicrobial potency of the ether extracts had moderate activity compared to that of the methanol extracts were found inactive. The most sensitive strains are *Bacillus cereus*, and *Candida albicans* followed by *Staphylococcus aureus*.

**Key words:** *Helichrysum stoechas subsp rupestre*, *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile*, crude extract, Scening phytochemical assays, total polyphenols, TLC, Antimicrobial Activity.

## REMERCIEMENT

*Le* présent travail a été réalisé dans le laboratoire des Produits naturels «LAPRONA», département de Biologie, Faculté des SNV-STU, Université de Tlemcen.

*Avant* toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

*Je* tiens à exprimer mon profond attachement, ma gratitude, mes vifs remerciements et ma sincère reconnaissance à Mme Chaouche Farah, Maître- assistante au département de Biologie, Faculté des SNV-STU, Université de Tlemcen, pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique. Sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle m'a accordé, m'ont permet de réaliser ce mémoire.

*J'*exprime toute ma gratitude à Monsieur Abdelouahid D. E. Professeur au département de Biologie, Faculté des SNV-STU, Université de Tlemcen, d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.

*Je* tiens à exprimer ma très grande considération et mes vives reconnaissances à Mme Bakhechi C. Maître de conférences au département de Biologie, Faculté des SNV-STU, Université de Tlemcen, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

*A* Mme Atik- Bekkara F. Professeur à l'Université de Tlemcen et Chef d'Equipe au laboratoire des Produits naturels, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Qu'elle trouve ici mon respect et ma reconnaissance.

*Je* remercie les personnes dont la collaboration était essentielle pour la réalisation de ce travail, Merci à vous.

*Je* remercie mes amies pour leur soutien et les sympathiques moments que nous avons passé ensemble.

*Merci* à tous les étudiants de la promotion de Master microbiologie 2012 et à toutes personnes de proche ou de loin de m'avoir aidé à réaliser ce modeste travail.

*Merci bien*

## DEDICACES

♥ *A la mémoire de ma mère :*

*Que Dieu repose son âme en paix. Tous les mots ne me suffisent pour dire  
combien elle me manque*

♥ *A mon père que dieu le protège :*

*En témoignage de ma profonde affection. Qu'il sachant que ce travail est  
en partie le fruit de son soutien ; je lui suis très reconnaissante. Sa fierté à mon  
égard aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses.*

♥ *A mon fiancé et prochain mari*

*En témoignage de mon amour*

♥ *A ma belle mère, et ma très chère Imane :*  
*Pour leur aide et leur soutien moral*

♥ *A mon petit frère Ishak*

♥ *A mes sœurs surtout ma jumelle Nadia*

♥ *A mes cousines et mes tantes*

♥ *A toutes mes proches amis (es)*

♥ *A tous ceux qui m'ont consacré du temps, patience et conseils surtout dans  
les moments difficiles.*

*Nadjet*

## GLOSSAIRE

**Antibactérien** : Substance active contre les bactéries.

**Antibiotique** : Qui s'oppose à la vie. Substance qui empêche le développement des microbes.

**Anticoagulant** : Substance médicamenteuse ou naturelle s'opposant à la coagulation du sang.

**Antifongique** : Substance active contre les champignons et les levures parasites.

**Anthelminthiques** : antiparasitaire actif contre les cestodes.

**Anti-infectieux** : Substance active contre les infections microbiennes.

**Anti-inflammatoire** : Substance utilisée dans le traitement des maladies inflammatoires.

**Antitussif** : Médicament calment la toux.

**Aromatique** : Qui contient des huiles essentielles très odorantes.

**Astringent** : Qui resserre les tissus.

**Bactéricide** : Qui tue les bactéries.

**Bactériostatique** : Action des substances qui suspendent la division des bactéries.

**Cicatrisant** : Qui favorise la cicatrisation, la fermeture d'une plaie.

**Détoxifiant** : Qui élimine les substances toxiques.

**Fébrifuge** : Combat la fièvre ou en prévient les accès.

**Hépatoprotecteur** : Qui protège le foie ou modifie les fonctions hépatiques.

**Mucolytique** : Qui favorise l'élimination du mucus par fluidification.

**Fongistatique** : Qui stoppe la croissance des champignons pathogènes.

**Antioxydant** : Ralentissant ou s'opposant à l'oxydation.

**Nématocide** : Ayant la propriété de tuer les nématodes.

**Insecticide** : Produit qui détruit les insectes.

**Poison** : Substance affectant les fonctions vitales et pouvant provoquer la mort.

**Antipaludéen** : Médicament propre à éviter ou soigner l'apparition de paludisme.

**Stupéfiant** : Médicament entraînant une sédation, une analgésie (baisser le seuil de la douleur), ayant une action euphorisante (sentiment de bien-être), narcotique (sommeil).

**Cholinergique** : Agent qui stimule ou simule l'action de l'acétylcholine.

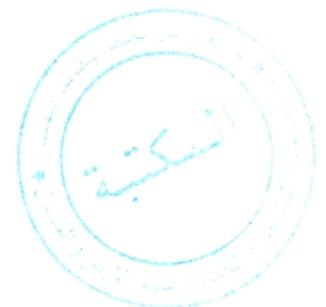
## ABREVIATIONS

- °C : Degré Celsius.
- µg : Microgramme.
- µl : microlitre.
- al. : collaborateurs.
- ATCC : American type culture collection.
- CC : Chromatographie sur colonne.
- CCM : Chromatographie sur couche mince.
- CGL : Chromatographie gaz liquide.
- cm : Centimètre.
- CMB : Concentration minimale bactéricide.
- CMI : Concentration minimale inhibitrice.
- CML : Concentration minimale létale.
- CP : Chromatographie sur papier.
- CPG : Chromatographie en phase gazeuse.
- DMSO : Diméthylsulfoxyde
- Fig : Figure.
- g : Gramme.
- H.* : *Helichrysum*.
- HPLC : Chromatographie liquide haute performance.
- MeOH : Méthanol
- GAE: équivalent acide gallique
- ml : Millilitre.
- mm : Millimètre.
- mn : minute.
- MNHN : Muséum national d'histoire naturelle
- MS : Matière sèche.
- nm : Nanomètre.
- PDA : Potato Dextrose Agar
- Rdt : Rendement.
- Rf : Rapport frontal.
- RMN : Résonance magnétique nucléaire.

SM : Spectrométrie de masse.

subsp : Sous espèce.

UV : Ultra violet.



## LISTE DES FIGURES

|  | Pages |
|--|-------|
| Figure I-1 : <i>Helichrysum stoechas</i> .....   | 07    |
| Figure I-2 : <i>Phagnalon saxatile</i> .....   | 08    |
| Figure II-1 : Principales voies de biosynthèse impliquées dans la production des métabolites primaires et secondaires végétaux ..... | 13    |
| Figure II-2 : Acides phénoliques, squelette benzoïque (I) et squelette cinnamique(II) .....  | 15    |
| Figure II-3 : Unités de base de tanins hydrolysables :(a) acide gallique.(b) acide ellagique .                                       | 16    |
| Figure II-4 : Structure des tanins condensés .....   | 16    |
| Figure II-5 : Structure de base des flavonoïdes .....  | 17    |
| Figure II-6 : Structure de coumarine .....   | 17    |
| Figure II-7 : Structure de Tropane .....   | 19    |
| Figure II-8 : Structure de Pipéridine .....  | 19    |
| Figure II-9 : Structure de mescaline .....   | 19    |
| Figure II-10 : Structure de la molécule d'isoprène .....   | 20    |
| Figure III-1 : Méthode de macrodillution .....   | 25    |
| Figure III-2 : Méthode de microdillution .....   | 25    |

## LISTE DES PHOTOS

|  |    |
|--|----|
| Photo VI-1: Les plantes étudiées: <i>Helichrysum stoechas subsp rupestre</i> (A) et <i>Phagnalon saxatile subsp eu- saxatile</i> (B) ..... | 27 |
| Photo V-4 : Effets des différents extraits sur <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Candida albicans</i> .....                               | 49 |

## LISTE DES TABLEAU

|   | Pages |
|---|-------|
| Tableau II-1 : Activités biologiques des composés polyphénoliques .....   | 18    |
| Tableau II-2 : Méthodes d'extraction, isolation, séparation et identification des métabolites secondaires .....   | 22    |
| Tableau IV- 1: Situation géographique des stations d'étude .....  | 27    |
| Tableau IV-2 : Souches bactériennes et fongiques utilisées dans l'activité antimicrobienne  | 32    |
| Tableau V-1 : Les rendements obtenus à partir des extraits secs des deux plantes .....  | 36    |
| Tableau V-2 : Tests phytochimiques réalisés sur des extraits préparés à partir des tiges feuillés et des fleurs d' <i>Helichrysum stoechas</i> et <i>phagnalon saxatile</i> ..... | 39    |
| Tableau V-3 : Teneurs en polyphénols totaux dans les différents extraits méthanoliques (mg GAE/g).....  | 41    |
| Tableau V-4 : Résultat de la chromatographie sur couche mince de gel de silice des deux plantes. ....   | 43    |
| Tableau V-5 : Résultats de la chromatographie sur couche mince des témoins utilisés sur gel de silice avec les deux systèmes d'élution .....                                      | 43    |
| Tableau V-6 : Composés identifiés par CCM chez les deux plantes.....  | 44    |
| Tableau V-7: Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition (D). ....   | 45    |
| Tableau V-8 : Diamètre des zones d'inhibition (en mm) obtenus par dépôt de 10µl d'extrait par disque. ....  | 47    |
| Tableau V-9 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits des deux plantes .....  | 50    |

---

# *Introduction*

---

**L**e traitement des infections bactériennes est en général basé sur l'utilisation des antibiotiques. La très grande utilisation souvent inadaptée de ces molécules a provoqué la sélection de souches bactériennes multi-résistantes (Archibalt *et al.*, 1997), ce qui a entraîné des échecs thérapeutiques. Ajouté aux effets secondaires indésirables et toxiques des antibiotiques, ces drogues synthétiques ont un coût très onéreux (Marchese et Shito, 2000).

Les plantes médicinales constituent une source naturelle de molécules chimiques (Combrinck *et al.*, 2007), tels que les métabolites secondaires qui interviennent dans plusieurs domaines (Oussou *et al.*, 2010). Ils ont trouvé leur place en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et dans la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues (Amarti *et al.*, 2010).

Aujourd'hui et malgré les progrès réalisés en médecine, plusieurs populations ont recours aux plantes pour se soigner, soit par inaccessibilité aux médicaments prescrits par la médecine moderne, soit parce que ces plantes ont donné des résultats thérapeutiques très encourageants et à moindres effets secondaires remarqués lors de leur utilisation, soit parce qu'elles sont moins agressives et moins nocives pour l'organisme (Arrif et Benkhaled., 2009). Il est donc important d'orienter les recherches vers de nouvelles voies et surtout vers les végétaux qui ont toujours servi de base à de nouveaux médicaments (Oussou *et al.*, 2010).

Diverses recherches ont été consacrées sur des plantes médicinales appartenant au genre *Helichrysum*, dont certaines espèces sont peu étudiées. Dans ce contexte, notre étude a pour objectif d'évaluer l'activité antimicrobienne de quelques extraits d '*Helichrysum stoechas ssp rupestre* de la région de Tlemcen et de *Phagnalon saxatile ssp eu-saxatile* de la région de Fellaouçène vis-à-vis de quelques souches bactériennes et fongiques.

Nous avons choisi d'étudier ces deux plantes pour les raisons suivantes :

- Plantes endémiques et spontanées ;
- Selon la littérature, les espèces de ces deux genres contiennent des composés phénoliques doués d'un pouvoir antimicrobien ;
- Plantes qui ont plusieurs activités biologiques à savoir activités anti-oxydante, antibactérienne et antifongique.

Le présent travail se divise en trois parties :

- Une recherche bibliographique réalisée sur les plantes étudiées, les métabolites secondaires des végétaux et la détermination de leurs activités antimicrobiennes.
- Une partie expérimentale dont laquelle nous décrivons le matériel et les méthodes utilisés ;
- Les résultats et la discussion :

Enfin, notre contribution s'achève par une conclusion générale.

---

# *Partie bibliographique*

---





## I. Etude botanique :

### 1. Caractère généraux des *Asteraceae* :

Les *Asteraceae* (Composées) sont une famille appartenant aux Dicotylédones comprenant plus de 1500 genres et plus de 25000 espèces décrites. Ce sont presque toujours des plantes herbacées avec souvent des racines charnues : rhizomateuses, tubéreuses ou pivotantes (Crete, 1965).

C'est une des familles la plus importante des Angiospermes, présentant des caractères morphologiques divers : herbes annuelles ou vivaces, plus rarement des arbustes, arbres ou plantes grimpances et quelques fois, plantes charnues (Bonnier, 1934).

### 2. *Helichrysum stoechas* :

Les espèces de *Helichrysum* appartiennent à famille des *Asteraceae*. Ce genre se compose d'environ 500 espèces, généralement aromatiques, arbustes vivaces, ayant des feuilles denses avec des têtes de fleurs rustiques (Sobhy et El-Feky, 2007).

Ce nom provient du grec « hélios », le soleil et « chryos », l'or, qui est approprié considérant les fleurs jaunes attrayantes montrées par plusieurs espèces (Pooley, 2003).

Des plantes de ce genre sont connues: *Helichrysum arenarium*, *H. angustifolium*, *H. italicum* et *H. stoechas* (Carini et al., 2001).

*Helichrysum stoechas* est une vivace aromatique à souche ligneuse qui forme des touffes de 10 à 40 cm de hauteur. Ses tiges sont d'aspect laineux et blanchâtre. Ses feuilles sont persistantes, de 2 à 3 cm de long, étroites, de couleur verdâtre. Elles sont comme les tiges, recouvertes d'un duvet cotonneux (Fig. I-1). La floraison s'étale de juin à septembre. Les capitules sont de 4 à 6 mm de diamètre regroupés en corymbes, de couleur jaune doré. Les fleurs qui fanent et se dessèchent persistent sur la plante, tout en gardant leur belle couleur dorée, ce qui évoque l'immortalité (Jovet, 1934). Ce petit arbrisseau, facile à repérer, aime les sols secs et calcaires. Le parfum tout à fait reconnaissable de cette plante (senteur de curry), est très fort et persiste longtemps après la cueillette (Schauenberg et Paris, 1977).

Cette plante se développe sur les rochers et sables maritimes de côtes subatlantiques et du midi méditerranéen. C'est une espèce commune qui peut recouvrir de grandes surfaces au sein des dunes grises (dunes fixées), constituant ainsi une pelouse plus ou moins fermée.

Les dunes grises sont le faciès de prédilection de cette immortelle, mais nous pouvons également la rencontrer occasionnellement sur les rochers et falaises maritimes (Jovet, 1934).

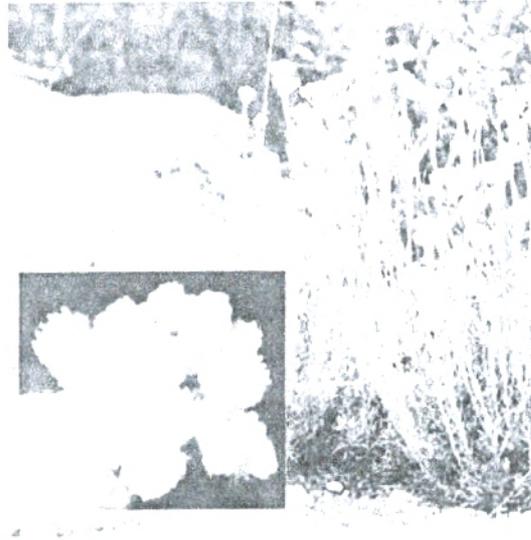


Figure I-1 : *Helichrysum stoechas*.

- **Noms en français :** Immortelle, Immortelle commune, Immortelle jaune, Immortelle Hyères, Immortelle stoechas (Servais et Seba, 2010).
- **Nom en arabe :** Chemessa (Trabut, 2006).

La présente étude s'est focalisée sur la sous espèce *Helichrysum stoechas ssp rupestre*. Peu d'informations botaniques sont actuellement publiées. C'est un arbuste vivace endémique du pourtour méditerranéen caractérisé par Capitules en corymbe peu nombreux. Feuilles tomenteuses en dessus (bien que vertes); très blanches en dessous. Bractées de l'involucre aiguës, les intérieurs linéaires à partie coriace couverte de glandes dorées (Quezel et Santa, 1963).

- **Nom en arabe :** Zeheur ed daime زهر الدايم, Chegara الشقارة, Arfiya عرفية, Atsa lalla Fatma عطسة لالة فاطمة (Trabut, 2006).
- **Synonymes :** *H. Fantanesii* ; *H. rupestre* ; *H. Gnaphalium* (Quezel et santa, 1963).

## ➤ Classification botanique (Dupont et Guiguard., 2007) :

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| <i>Embranchement :</i>      | <i>Spermatophytes</i>                      |
| <i>Sous Embranchement :</i> | <i>Angiospermes</i>                        |
| <i>Classe :</i>             | <i>Eudicots</i>                            |
| <i>Sous Classe :</i>        | <i>Euasteridées II</i>                     |
| <i>Ordre :</i>              | <i>Astérales</i>                           |
| <i>Famille:</i>             | <i>Astéracées</i>                          |
| <i>Genre:</i>               | <i>Helichrysum</i>                         |
| <i>Espèce:</i>              | <i>Helichrysum stoechas</i>                |
| <i>Sub espèce:</i>          | <i>Helichrysum stoechas subsp rupestre</i> |

**3. *Phagnalon saxatile* :**

Le genre *Phagnalon* de la famille des *Asteraceae*, est représenté par environ 30 espèces répartis dans le monde, dont six sont typiques de la région méditerranéenne (Tutin *et al.*, 1976 ; Engler, 1964). Les espèces de ce genre sont caractérisées par des feuilles inférieures linéaires-lancéolées, les supérieures étroitement linéaires et ± révolutes.

*Phagnalon saxatile* est une plante suffrutescente de 20-60 cm, avec des Tiges dressées, très rameuses, blanches-tomenteuses. Bractées de l'involucre glabres, scarieuses, souvent ondulées au sommet, linéaires-lancéolées. Cette plante se développe sur les broussailles, les rochers (Quezel et santa, 1963), les vieux murs, les rocailles de la plaine et des montagnes (Bammi et Douira, 2004).

Parmi les espèces de *Phagnalon* nous citons : *P. sordidum*, *P. Garamantum*, *P.saxatile* (Quezel et santa, 1963).



Figure I-1 : *Phagnalon saxatile*.

- **Nom Français :** Immortelle des pierres.
- **Nom en Arabe :** Foddia فضية, Arfedj عرفج, Motti مطي, Taam el arnab طعام الأرنب (Trabut, 2006).

La présente étude s'est focalisée sur la sous espèce *Phagnalon saxatile ssp eu-saxatile*. Peu d'informations botaniques sont actuellement publiées. Les bractées externes de l'involucre de cette sous espèce sont étalées et même réfléchies, aiguës ou spatulées. Elle est très commune et nous la trouvons partout (Quezel et santa, 1963).

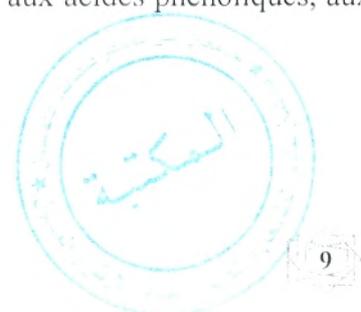
- **Synonymes :** *P. Zepidotum Pomel* (Quezel et santa, 1963).
- **Classification botanique (Dupont et Guiguard , 2007) :**

|                            |  |
|----------------------------|--|
| <b>Embranchement:</b>      | <i>Spermatophytes</i>                        |
| <b>Sous embranchement:</b> | <i>Angiosperme</i>                           |
| <b>Classe:</b>             | <i>Eudicots</i>                              |
| <b>Sous classe:</b>        | <i>Euasteridées II</i>                       |
| <b>Ordre:</b>              | <i>Asterales</i>                             |
| <b>Famille:</b>            | <i>Astéracées</i>                            |
| <b>Genre:</b>              | <i>Phagnalon</i>                             |
| <b>Espèce:</b>             | <i>Phagnalon saxatile(L) Cass</i>            |
| <b>Sub espèce:</b>         | <i>Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile.</i> |

#### 4. Compositions, activités biologiques et utilisations médicinales des espèces appartenant aux genres *Helichrysum* et *Phagnalon* :

La gamme des produits naturels qui ont été isolés dans le genre *d'Helichrysum* est tout à fait large, couvrant presque toutes les classes fondamentales connues excepté des alcaloïdes (Tomas *et al.*, 1988 ; Rios *et al.*, 1991 ; Afolayan et Meyer, 1997). Ces plantes contiennent des flavonoïdes, les terpènes et des huiles essentielles (Czinner *et al.*, 2000). Des activités biologiques des extraits à partir des espèces *d'Helichrysum* ont été largement rapportées (Aiyegoro *et al.*, 2009).

Plusieurs composés phénoliques ont été isolés à partir d' *Helichrysum stoechas*. Ces composés appartiennent aux alpha-pyrones, aux phloroglucinols, aux acides phénoliques, aux flavonoïdes et aux groupes de coumarine (Hwisa *et al.*, 2011).



Ces plantes ont été utilisées dans la médecine populaire pour au moins 2000 ans pour traiter les troubles de la vésicule biliaire, en raison de leur régulation de la bile et des effets diurétiques. Ils sont utilisés pour soulager les maux d'estomac et les pansements, pour leur pouvoir anti-infectieux, hépatoprotecteur, détoxifiant, pour stimuler la sécrétion de sucs gastriques, et dans le traitement de la toux, l'érythème et le diabète sucré (Czinner *et al.*, 2000).

Les espèces d'*Helichrysum* sont couramment utilisées en Turquie et d'autres parties du monde pour leurs différents propriétés anti-inflammatoire (Sala *et al.*, 2003), antioxydantes (Czinner *et al.*, 2000 ; Tepe *et al.*, 2005), et antimicrobiennes ( Nostro *et al.*, 2002 ; Sagdic *et al.*, 2003).

*Helichrysum stoechas* a des activités antibactériennes (Rios *et al.*, 1990 et Rios *et al.*, 1991), anti-inflammatoires (Recio *et al.*, 1991), antioxydantes (Carini *et al.*, 2001) antifongique, antitussive, fébrifuge, antihelminthiques (Magouille, 2011). Cette plante semble avoir des effets bénéfiques sur les maladies de la peau. Elle est un bon remède contre la bronchite et l'asthme, et est utilisée ainsi dans les traitements des rhumes (Mukul, 2010).

La sous espèce *rupestre* a des activités, anticoagulante, mucolityque, cicatrisante et astringente cutanée, anti-oxydante, antibactérienne et antifongique . Elle stimule la régénération des cellules du foie (Jahandiez et Marie, 1934).

Parmi les espèces de *Phagnalon*, *P. rupestre* signale la présence de n-paraffines et des corps gras, des terpénoïdes, des flavonoïdes et des glycosides. Elle est utilisée pour traiter l'asthme, des maux de tête et comme anesthésique pour les maux de dents (Göngora *et al.*, 2001, Göngora *et al.*, 2002).

Des étude ont montré la présence de 3,3 - diméthylallyl-P-benzoquinone, des flavonoïdes (Dolci et Tira, 1982), des composés phénoliques, l'acide caféique, l'acide méthylchlorogénique (Filomena *et al.*, 2010), l'huile essentielle dont les sesquiterpènes, des acides gras et des cires, dans la partie aérienne de *Phagnalon saxatile* (Senatore *et al.*, 2005).

Les plantes du genre *Phagnalon* ont été utilisées en médecine populaire, ainsi qu'une variété d'extraits a été examinée. En Espagne, *Phagnalon saxatile* a des propriétés curatives, analgésiques et elle est utilisée pour diminuer le taux de cholestérol dans le sang (Santayana *et al.*, 2005), alors que l'huile essentielle de cette espèce ne montre aucune activité antimicrobienne (Senatore *et al.*, 2005).



## II. LES METABOLITES SECONDAIRES :

### 1. Introduction :

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 (glucides, protéines, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits <secondaires> dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (Macheix *et al.*, 2005).

### 2. Définition des métabolites secondaires :

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

La notion de « métabolites secondaire » résultait initialement de trois groupes d'observations : d'abord une difficulté à attribuer à ces métabolites une fonction précise dans la physiologie même de la plante, ensuite une répartition très inégale selon les végétaux, quelquefois entre des espèces très voisines ou même entre différentes sous-espèces ou variétés à l'intérieur d'une même espèce, enfin une certaine « inertie biochimique » car ces substances sont rarement remobilisées dans la plante après qu'elles y ont été accumulées (Macheix *et al.*, 2005).

### 3. Fonctions des métabolites secondaires :

Bien que le rôle physiologique des métabolites secondaires soit mal compris, la plupart d'entre eux sont plus ou moins toxiques et semblent intervenir essentiellement dans des réactions de défense contre les infections microbiennes ou l'attaque d'herbivores (William et Évrard, 2003).

Certains métabolites participent à l'attraction et la signalisation entre la plante et les animaux lors de la pollinisation et de la dissémination. Les huiles essentielles attractives renferment des terpènes et des dérivés aromatiques tandis que les pétales sont colorés par des flavonoïdes (anthocyanes) et dérivées azotés (bétalaïnes).



De nombreuses substances ont un effet répulsif, comme certains terpènes des huiles essentielles de la Sauge, les glucosinolates de la Moutarde, les coumarines des herbacées, etc.

D'autres, comme la lignine et les tanins, rigidifient les organes, diminuant l'attrait pour les herbivores. Par ailleurs, les alcaloïdes de la Belladone, ou des saponines des Caryophyllacées sont toxiques.

Les tissus de surface comme les écorces fabriquent des terpènes antiseptiques et libèrent des tanins qui rendent difficile la pénétration des bactéries et des champignons. Les dérivés azotés comme les bêtaïnes sont des antiviraux et antifongiques, tandis que les mucilages et le latex ont un effet cicatrisant (Richard *et al.*, 2010).

#### 4. Biosynthèse des métabolites secondaires :

Les principales voies de biosynthèse de ces composés et leur interaction avec les métabolites primaires sont souvent complexes et peuvent être schématisées comme suit :

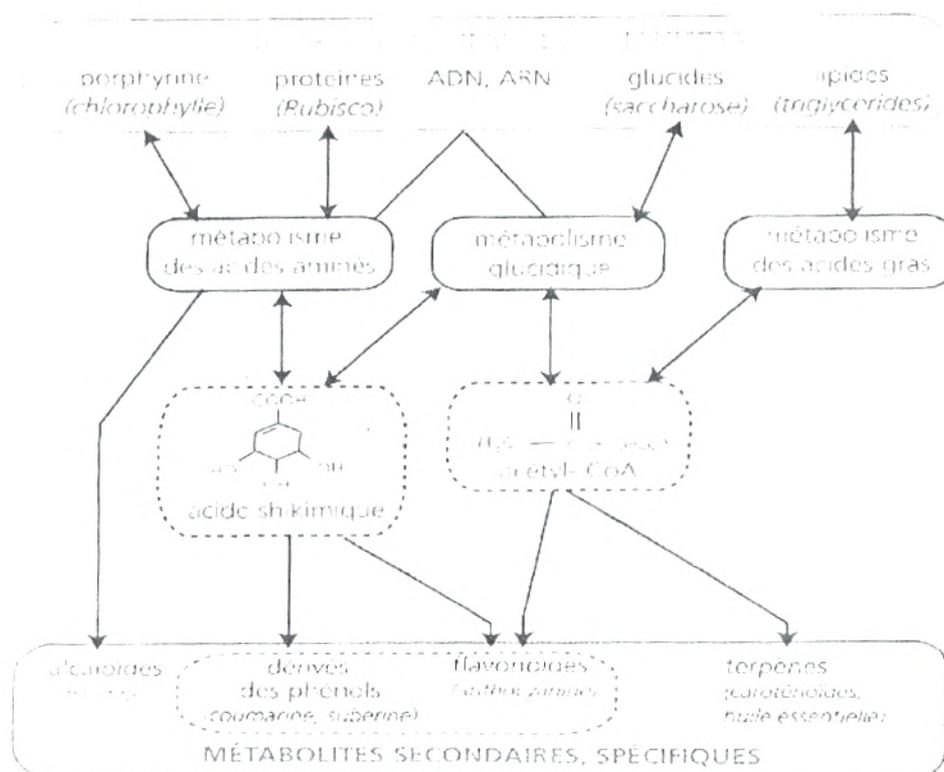


Figure II-1 : principales voies de biosynthèse impliquées dans la production des métabolites primaires et secondaires végétaux (Meyer *et al.*, 2008).

Les voies de l'acide mévalonique et de l'acide shikimique sont les deux voies métaboliques importantes qui produisent à la fois des métabolites primaires et secondaires (William et Évrard, 2003). Tous les composés phénoliques sont formés via la voie du shikimate, appelée également la voie de phénylpropanoïde, aboutit à l'acide shikimique. Cette voie conduit à la formation de plusieurs composés phénoliques tels que : les coumarines, la lignine, les flavonoïdes, isoflavonoïdes qui trouvent leur origine dans des acides phénoliques simples (Meyer *et al.*, 2008).

La voie de l'acide mévalonique produit deux composés à 5 atomes de carbone, l'isopentenyldiphosphate et le diméthyllyldiphosphate qui sont la base de la famille des terpénoïdes (William et Évrard, 2003).

## 5. Classification :

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés (Macheix *et al.*, 2005). Nous estimons que chaque végétal produit au moins une centaine de ces métabolites, classés dans trois catégories principales selon leurs structures : les alcaloïdes, les stéroïdes et terpénoïdes, et les polyphénols, ou composés phénoliques (Meyer *et al.*, 2008).

### 5.1. Les composés phénoliques (*Les polyphénols*) :

#### Généralités :

Les composés phénoliques correspondent à une grande variété de substances. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside...) (Bruneton, 1999).

Ces polyphénols peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines...) (Macheix *et al.*, 2005).

Ces composés dérivent de la voie de l'acide shikimique qui donne de l'acide gallique et de l'acide cinnamique. Ces dernières sont à l'origine des phénols simples et condensés, des tanins hydrolysables et condensés, et des flavonoïdes (Richard *et al.*, 2010).

### 5.1.1 Principaux composés phénoliques :

#### 1) Les acides phénoliques :

Les acides phénoliques sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales. Ils sont formés d'un squelette à sept atomes de carbone (Psotová *et al.*, 2003). Nous distinguons (Fig. II-2) :

- Les dérivés de l'acide benzoïque (constitués d'un squelette à sept carbones)
- Les dérivés d'esters hydroxycinnamiques (constitués d'une structure de type (C6-C3).

(Barbouni, 2006), qui constituent une classe très répandue, parmi laquelle on distingue l'acide caféique, qui est présent en quantité notable dans le café (Tapiero *et al.*, 2002).

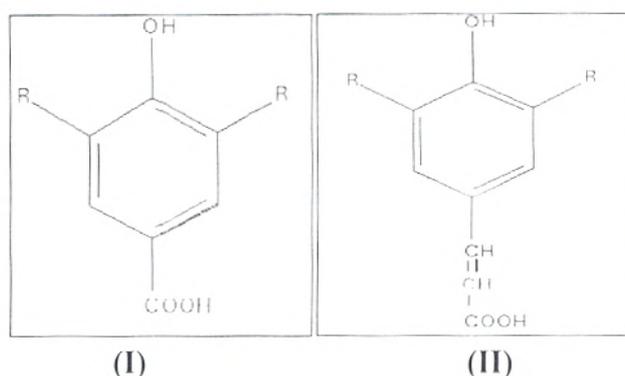


Figure II-2 : Acides phénoliques, squelette benzoïque (I) et squelette cinnamique(II).

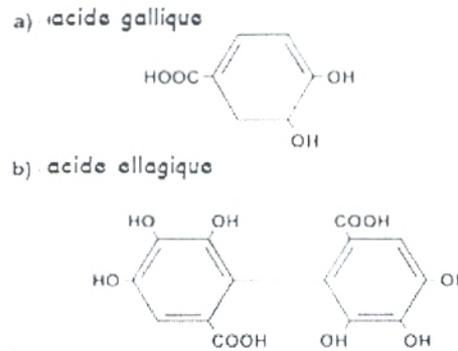
#### 2) Les tanins (C<sub>15</sub>)<sub>n</sub> :

Les tanins, utilisés depuis l'antiquité par l'homme pour le traitement des peaux d'animaux, ont une importance économiques et écologiques considérables et sont responsables de l'astringence de nombreux fruits et des légumes et des produits qui en sont dérivés (vin et thé...) (Macheix *et al.*, 2005).

Nous distinguons deux grands groupes de tanins différents à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition : les hydrolysables et les tanins condensés :

##### ➤ Les tanins hydrolysables :

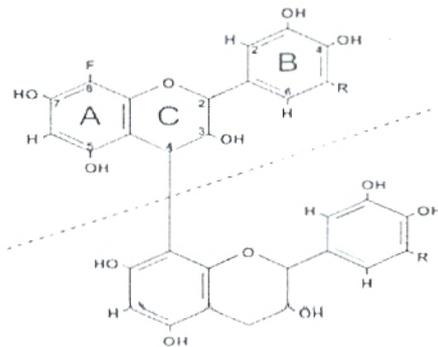
Les tanins hydrolysables sont composés de deux types d'unités de base, à savoir un glucide (la plupart du temps le D-glucose) et des acides phénoliques. Il s'agit des gallotanins pour lesquels le glucide est estérifié par l'acide gallique et des ellagitanins où le glucide est estérifié par l'acide ellagique (Fig. II-3) (Kogel-Knabner, 2002).



**Figure II-3** : Unités de base de tanins hydrolysables : (a) acide gallique (b) acide ellagique (Kogel-Knaber, 2002).

➤ **Les tanins condensés (proanthocianidols) :**

Les tanins condensés sont des polymères de polyhydroxy-flavan-3-ol, liés la plupart du temps par des liaisons entre C-4 et C-8 et sporadiquement entre C-4 et C-6 (Fig. II-4).



**Figure II-4** : Structure des tanins condensés (Kogel-Knaber, 2002).

**3) Les flavonoïdes (C6-C3-C6) :**

Les flavonoïdes, présents dans la plupart des plantes, sont des pigments polyphénoliques qui contribuent, entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaune ou en blanc (Iserin, 2001). Selon Middleton E. *et al* (2000) et Gibault T. (2001), nous les divisons en 6 classes :

- Flavone et flavonols qui représentent la majorité des flavonoïdes ;
- les flavanols, les anthracyanines, les flavanines et les chalcones.

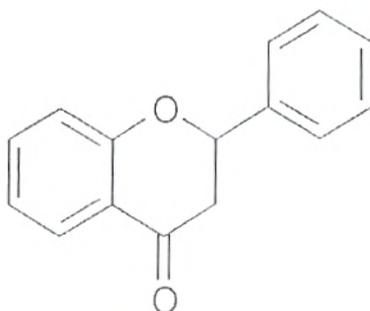


Figure II-5 : Structure de base des flavonoïdes.

#### 4) Les acides phénylpropanoïques (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>), coumarines et lignines (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>)<sub>n</sub> :

Formés à partir de l'acide cinnamique ou p-coumarique, ils sont à l'origine des voies de synthèse de nombreuses substances telles que les lignines, les flavonoïdes, les stilbènes (Ismailoglu, 2002).

Les phénylpropanoïdes dérivent de la phénylalanine, et peuvent contenir un ou plusieurs résidus (Bruneton, 1999).

Les lignines des parois cellulaires secondaires leur confèrent une haute résistance à la traction et la pression grâce à leur élasticité. Formant une barrière mécanique, de goût désagréable, et réduisant la digestibilité des sucres de la paroi, les lignines participent à la résistance des plantes aux microorganismes et herbivores. La lignification est une réponse courante à l'infection ou la blessure. (Ismailoglu, 2002).

Les coumarines, des molécules largement répandues dans tout le règne végétal, sont des 2H-1-benzopyran-2-ones, considérées comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-7-cinnamiques (Dewick, 1993).

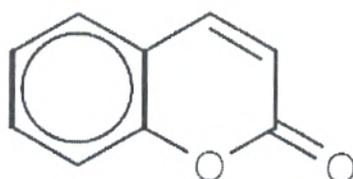
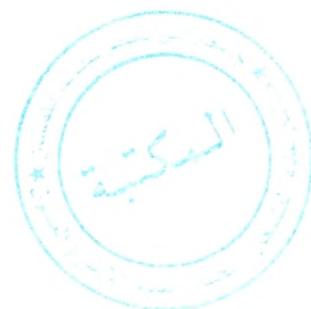


Figure II-6 : Structure de coumarine.



##### 5.1.2 Rôles et activités biologiques des polyphénols :

Les composés phénoliques peuvent intervenir :

- dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la

Croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...);

- dans l'interaction des plantes avec leur environnement biologique et physique (relation avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV) ;
- dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles...);
- dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies en raison de leur interaction possibles avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (Macheix *et al.*, 2005).

Les activités de certains composés phénoliques sont résumées dans le tableau suivant :

| POLYPHENOLS                                | ACTIVITES  |
|--|--|
| Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques) | Antibactériennes ; Antifongiques<br>Antioxydantes  |
| Coumarines                                 | Protectrices vasculaires et Antioedémateuses   |
| Flavonoïdes                                | Antitumorales ; Anticarcinogènes ; Anti-inflammatoires ; Hypotenseurs et diurétiques<br>Antioxydantes            |
| Anthocyanes                                | Protectrices capillaro-veineux   |
| Proanthocyanidines                         | Effets stabilisants sur le collagène ;<br>Antioxydantes ; Antitumorales ;<br>Antifongiques ; Anti-inflammatoires |
| Tannins galliques et catéchiques           | Antioxydantes  |

Tableau II-1 : Activités biologiques des composés polyphénoliques (Bahorun, 1997).

## 5.2. Les Alcaloïdes :

Ce sont les principaux métabolites secondaires azotés. Nous en connaissons environ 12 000 synthétisés à partir des acides aminés, constitués d'un hétérocycles (Meyer *et al.*, 2008). La plupart ont des propriétés basiques. Il existe plusieurs types d'alcaloïdes, certains ont de structures très simples, d'autres de structures beaucoup plus complexes (Mekkiou et Benayache, 2005). Nous distinguons 3 classes (Brossi et Suffness, 1990) :

- **Les alcaloïdes vrais** : Ils existent à l'état de sel et sont biosynthétiquement formés à partir des acides aminés comme l'Hysecyamine.

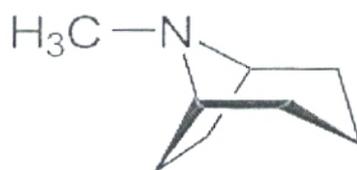


Figure II-7 : Structure de Tropane.

➤ **Les pseudo alcaloïdes** : Des traces d'alcaloïdes typiquement végétales ont été mises en évidence dans les tissus animaux, en particulier au niveau de système nerveux.

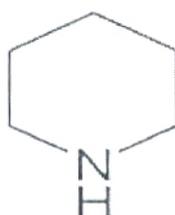


Figure II-8 : Structure de Pipéridine.

➤ **Les proto alcaloïdes** : Ce sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocycliques. Ils sont une réaction basique et sont élaborés *in vivo* d'acides aminés.

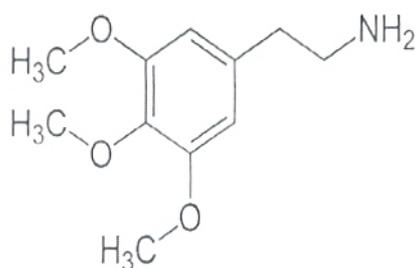


Figure II-9 : Structure de mescaline.

### 5.2.1 Activité biologiques des alcaloïdes :

Ils sont utilisés comme antalgiques majeurs (morphine), antipaludéen (quinine), substance paralyzante (curare, caféine), poisons (strychnine, nicotine), stupéfiants (cocaïne, mescaline), cholinergique (pilocarpine), anticancéreux (vinblastine, vincristine) et pour combattre l'excès d'acide urique (colchicine) (Mekkiou et Benayache, 2005).

### 5.3. Les isoprénoïdes :

Les terpènes sont des dérivés d'unités isopréniques IPP (iso-pentényl-pyrophosphate) (Richard *et al.*, 2010). Leur classification est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de base isoprène (Fig. II-7): **hémiterpènes** (C5), **monoterpènes** (C10), **sesquiterpènes** (C15), **diterpènes** (C20), **sesterpènes** (C25), **triterpènes** (C30), **tétraterpènes** (C40) et **polyterpènes** (Malecky *et al.*, 2007). Dans la composition de la plupart des huiles essentielles les monoterpénoïdes et les sesquiterpénoïdes forment la majeure partie (Calsamiglia *et al.*, 2007 ; Benchaar *et al.*, 2008).

Les diterpènes servent notamment de précurseurs de métabolites primaires (gibbérélines, phytol, plastoquinone, etc.). Les triterpènes composent le squelette des phyto-stéroïls et des stéroïdes végétaux (Richard *et al.*, 2010).

Les saponines sont des glycosides à poids moléculaire élevé, regroupant un ensemble complexe et chimiquement très diversifié de molécules triterpéniques ou stéroïdes. Elles se composent d'une fraction aglycone hydrophobe (un noyau stéroïdique ou triterpénique) liée à une chaîne mono ou polysaccharidique hydrophile (Wallace, 2004).

Enfin, les tétraterpènes donnent des caroténoïdes, alors que les polyterpènes sont de constituants des latex (Richard *et al.*, 2010).

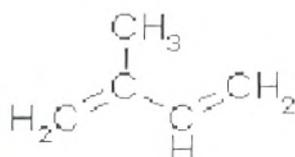


Figure II-10 : Structure de la molécule d'isoprène (Calsamiglia *et al.*, 2007).

#### 5.3.1 Activités biologiques des terpénoïdes et saponines :

Les terpénoïdes, ont des effets contre les bactéries, les mycètes, et les protozoaires. (Cowan, 1999).

Les huiles essentielles sont employées pour leur saveur et odeur dans l'industrie des produits naturels et en industrie des parfums (Smallfiled, 2001). Ils ont des propriétés antiseptiques pour les poumons (*Eucalyptus*), dépuratives ou cicatrisantes (*Lavande*) (Caillard, 2003), activités analgésiques (*thym*) (Schwämmle *et al.*, 2001), et activités antioxydantes liées étroitement à tout contenu phénol (Stephanovits *et al.*, 2003).

Les saponines stéroïdiques sont à la base de la synthèse de la pilule contraceptive.. Certaines saponines triterpénoidiques ont une activité hormonale, elles sont souvent expectorantes et facilitent l'absorption des aliments (**Iserin, 2001**).

#### **6. Isolation, caractérisation et évaluation des métabolites secondaire :**

Il existe différentes méthodes d'extraction des métabolites secondaires par des solvants adéquats (l'éther, chloroforme, l'acétate d'éthyle...).

Une fois l'extrait est obtenu, l'analyse permet d'identifier et de quantifier les produits qui le composent. La séparation et l'identification sont fondées essentiellement sur les différentes techniques chromatographiques (CCM, CP, CC), et spectrométries ( la résonance magnétique nucléaire (RMN)) (**Harborne, 1998**).

| Méthodes                |  | Utilisées pour  |  |
|-------------------------|--|---|--|
| Extraction et isolation | Le choix de la méthode dépend de la texture de la plante et sa teneur en eau ainsi que de type de la substance à isoler. |   |  |
|                         | Peut être effectuée par l'utilisation des solvants de polarité différente  | Ether, diéthylique, éther de pétrole, chloroforme, hexane   |  |
|                         |  | Alcool, acétate d'éthyl   |  |
| Séparation              | Chromatographie  | Le choix de la technique dépend des propriétés de solubilité et de volatilité de composés à séparer |  |
|                         |  | C Sur papier  | Composés hydrosolubles (carbohydrates, acides aminés, acides organiques, et les composés phénoliques). |
|                         |  | CCM   | Composés liposolubles (lipides, stéroïdes, caroténoïdes, quinones simples, chlorophylles).             |
|                         |  | C gaz liquide CGI.  | Composés volatiles (mono et sesquiterpènes).   |
|                         | HPLC   | Composés moins volatiles.   |  |
|                         | Electrophorèse   | Composés chargés (acides aminés, quelques alcaloïdes, acides organiques et protéines).              |  |
| Identification          | Spectrométrie UV, Infra-rouge, spectrométrie de masse (SM), résonance magnétique nucléaire (RMN).                        |   |  |

Tableau II-2 : Méthodes d'extraction, isolation, séparation et identification des métabolites secondaires (Harborne, 1998).





### III. DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES METABOLITES SECONDAIRES :

#### 1. Introduction :

Depuis l'antiquité, les plantes aromatiques furent utilisées le plus souvent par les parfumeries. Cependant, durant ces dernières décennies, elles sont devenues sources d'antioxydants naturels et d'agents antimicrobiens (Bandonienc *et al.*, 2000). Ces plantes possèdent plusieurs activités biologiques, parmi lesquelles nous pouvons citer les activités suivantes : Fongistatique, Insecticide, Nématicide, Herbicide, Bactériostatique, Antioxydante (El kalamouni, 2010).

À l'heure actuelle, une grande partie de la population mondiale dépend encore de la médecine traditionnelle et donc de l'utilisation des plantes à vertus médicinales notamment pour leurs activités antimicrobiennes (Kasperek et Al-Janabi, 2008).

Dans le but de trouver de nouvelles activités antimicrobiennes, plusieurs travaux ont été publiés sur les extraits des plantes (Ayse *et al.*, 2004).

#### 2. Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne :

L'activité antimicrobienne d'une substance peut être mise en évidence, *in vitro*, par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide (El kalamouni, 2010).

L'efficacité d'un agent antimicrobien contre un microorganisme peut être fournie par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale létale (CML) (ou bactéricide (CMB)), qui sont respectivement, la concentration la plus faible capable d'empêcher le développement d'un microorganisme particulier, et la concentration la plus faible capable de tuer le microorganisme (Prescott *et al.*, 2010).

##### 2.1 Méthode de diffusion en disque dans un milieu gélosé :

Des disques de papier wattman, imprégnés des agents antimicrobiens à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablementensemencé avec une culture pure des souches à étudier (Euzéby, 2009). Quand la concentration de l'antimicrobien devient si diluée qu'il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition est démarquée. Les méthodes de diffusion ne permettent pas de chiffrer directement les valeurs des CMI (Guérin-Faublée et Carret, 1999).

## 2.2 Méthode de dilution :

Ces méthodes peuvent être appliquées en gélose ou en bouillon, à partir des quelles nous pouvons déterminer les CMI (Prescott *et al.*, 2010). Il existe une relation simple entre les diamètres des zones d'inhibition et les CMI mesurées par les techniques de dilution. Cette relation, appelée droite de concordance ou droite de régression (Guérin-Faubleé et Carret, 1999), la zone d'inhibition correspond inversement à la CMI de l'essai (El kalamouni *et al.*, 2010).

### 2.2.1 En milieu liquide :

L'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes (méthode de macrodilution) (Fig. III-1) ou de cupules (méthode de microdilution) (Fig. III-2) contenant l'agent antimicrobien. Après incubation, la CMI est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration d'agent antimicrobien où aucune croissance n'est visible (Euzéby, 2009).

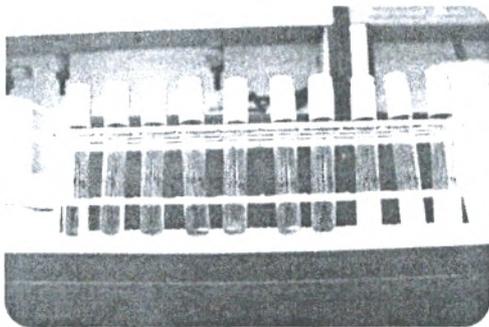


Figure III-1 : méthode de macrodilution Figure III-2 : méthode de microdilution

### 2.2.2 En milieu solide :

L'agent antimicrobien est incorporé dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Pétri. La surface de la gélose estensemencée avec un inoculum microbien à étudier. Après incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'agent antimicrobien (Euzéby, 2009).

---

# *Partie expérimentale*

---

---

# *Matériel et méthodes*

---

#### IV. MATERIEL ET METHODES :

##### 1. Matériel végétal :

*Helichrysum stoechas subsp rupestre* a été récoltée de la région Honaïne à environ 44 km au Nord Ouest de Tlemcen tandis que *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile* provient de la région de Fellaoucène à environ 31 km au nord-ouest de Tlemcen, et ce pendant le mois de Mars 2012 (Photo VI-1, Figure IV- 1). Les paramètres géographiques de ces régions sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau IV- 1: Situation géographique des stations d'étude.

| Station     | Latitudes Nord | Longitude Ouest | Altitudes (mètres) |
|-------------|----------------|-----------------|--------------------|
| Honaïne     | 35° 10'        | 1° 38'          | 900 m              |
| Fellaoucène | 35° 58'        | 1° 42'          | 1113m              |

Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, les fleurs et les tiges feuillées des deux espèces ont été séparées et broyées grossièrement dans un moulin électrique.

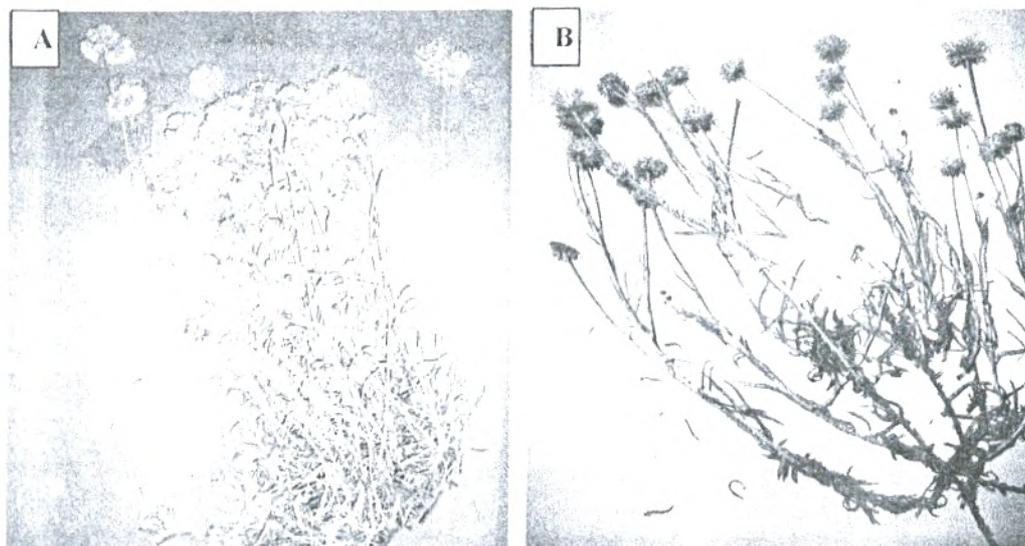


Photo VI-1 : Les plantes étudiées: *Helichrysum stoechas subsp rupestre* (A) et *Phagnalon saxatile subsp eu- saxatile* (B).



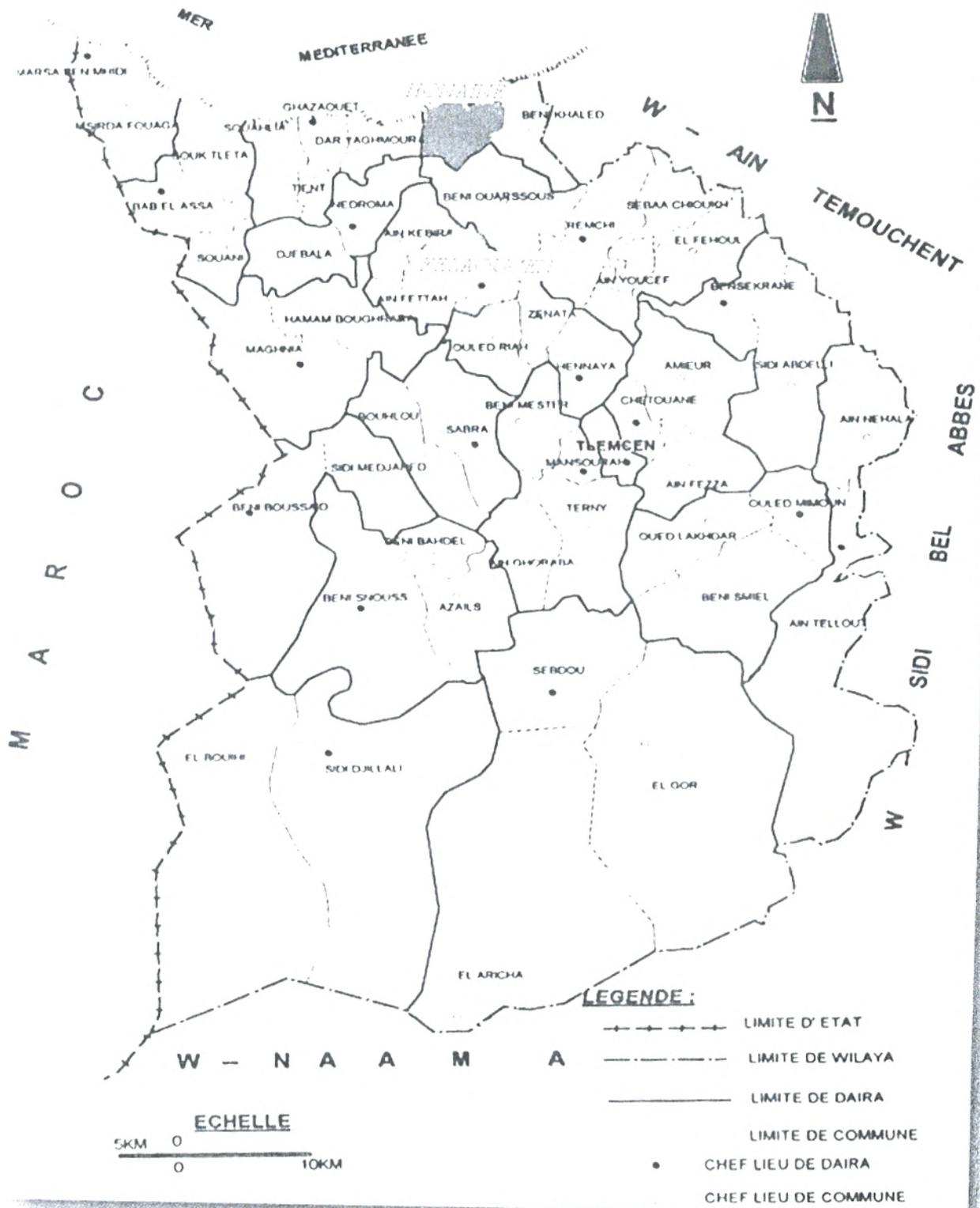


Figure IV- 1 : Localisation géographique des stations d'étude.

## 2. Préparation des extraits bruts méthanoliques :

Les extraits bruts ont été préparés à partir des fleurs et des tiges feuillées des deux plantes étudiées.

Les extraits des fleurs sont obtenus par une macération de 18h à température ambiante. Une quantité de 5g de fleurs est mise en contact avec le méthanol à 80%. Cette macération a été précédée par des vibrations en Ultrasonique pendant 20 min.

La même quantité en tiges feuillées subit d'abord un dégraissage par l'hexane pour éliminer le maximum de composés apolaires (matière grasse, cires, chlorophylle, caroténoïdes.....) (Bonnaillie *et al.*, 2012). Après filtration, le marc est ensuite soumis à une macération dans les mêmes conditions citées dans la préparation des extraits des fleurs.

Les filtrats ont été évaporés à sec et à une température de 60°C, à l'aide d'un rotavapor type HAHNVAPOR.

Pour les tests phytochimiques, les dosages et la CCM, les extraits secs ont été repris dans quelques millilitres de méthanol, tandis que les extraits secs destinés aux tests microbiologiques ont été récupérés par quelques millilitres de DMSO. Les extraits ont été conservés à 4°C.

- **Calcul des rendements :**

Les rendements en extrait sec ont été déterminés par la formule suivant :

$$Rdt (\%) = \frac{m}{M} \times 100$$

**m** : poids de l'extrait après évaporation ;

**M** : Poids de la matière végétale de départ.

## 3. Tests phytochimiques :

Les tests phytochimiques sont réalisés le plus souvent en tubes à essai dans le but de détecter quelques familles de composés co-existantes. Ils consistent en une réaction de précipitation de turbidité ou une coloration par des réactifs spécifiques (Dohou *et al.*, 2003 ; Karumi *et al.*, 2004 ; Edeoga *et al.*, 2005).

***Flavonoïdes :***

Traiter 2 ml de l'extrait alcoolique avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré et quelques mg de tournures de magnésium. Une coloration rose ou rouge apparaît en présence des flavonoïdes après trois minutes.

***Tanins :***

A 1 ml de la solution alcoolique, ajouter 2 ml d'eau distillée et 2 à 3 gouttes de FeCl<sub>3</sub>. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire, verte ou bleu-verte et un précipité, qui confirme la présence des tanins catéchiques, galliques ou éllagiques.

***Alcaloïdes :***

Traiter 2ml de l'extrait méthanolique par 0,5 ml de HCL à 2%. La solution est divisée en trois parties égales. Tester les échantillons avec les réactifs de **Mayer**, ils donnent avec ce réactif un trouble plus un précipité blanc et avec le réactif de **Wagner**, ils donnent un précipité brun. Le troisième tube est considéré comme témoin.

***Saponosides :***

Ajouter à 2 ml de la solution alcoolique un peu d'eau et ensuite agiter d'une manière forte. Une écume persistante confirme la présence des saponosides. Abandonner le mélange pendant 20 min et classifier la teneur en saponosides :

- Pas de mousse = Test négatif ;
- Mousse moins de 1 cm = Test faiblement positif ;
- Mousse de 1- 2 cm = Test positif ;
- Mousse plus de 2cm = test très positif.

Pour confirmer le résultat, ce même test est refait sur des extraits aqueux des plantes étudiée.

***Stéroïls et Triterpènes « réaction de Liebermann burchardt » :***

Mélanger 2 ml de solution à tester avec 0,5 ml d'anhydride acétique, 0,5 ml de chloroforme et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter et laisser la solution reposée 30 min à 21 °C. Cette réaction donne avec les hétérosides stéroïdiques et triterpéniques respectivement des colorations verte-bleu et verte-violette.

**4. Dosages des polyphénols :**

Dans le but d'étudier le pouvoir antimicrobien de ces deux plantes, la recherche s'est focalisée sur les composés polyphénoliques contenus dans les extraits bruts préparée à partir des tiges feuillés et des fleurs.

Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par **Vermeris *et al*, 2006** en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

Un volume de 0,1 ml de l'extrait brut méthanolique est mélangé avec 2 ml d'une solution de carbonate de sodium à 2% fraîchement préparée, le tout est agité par un vortex. Après 5 min, 100 µl du réactif de Folin-Ciocalteu (1N) sont ajoutés au mélange, le tout est laissé pendant 30 min à la température ambiante et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm.

La coloration produite, dont l'absorption maximale est comprise entre 725 et 750 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits végétaux (**Boizot et Chappentier, 2006**).

Une courbe d'étalonnage est réalisée par un étalon « l'acide gallique » à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons. La quantification des polyphénols se fait en utilisant l'équation de la régression linéaire ( $y=ax+b$ ). Les résultats sont été exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg EAG/g).

## 5. Chromatographie sur couche mince :

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorptions; la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progressent le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. (**Smaoui *et al.*, 2009**)

Une plaque CCM en gel de silice (20×20 cm) a été utilisée dans deux systèmes de migration :

- **Système 1** : Butanol/ Acide acétique (4:1) (**Onyilagha *et al.*, 2003**).
- **Système 2** : Acétate d'éthyle/ Acide formique/ Eau distillée (65:15:20) (**Males et Medic-Saric., 2001**).

Nous déposons 5µl de chaque extrait et témoin. Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Les substances migreront à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

Après développement, les plaques ont été séchées, puis visualisées séparément par une lampe UV à 366 nm.

Les rapports frontaux des spots issus de la séparation ont été calculés et comparés à ceux des témoins permettant ainsi l'identification des constituants de différents extraits.

$$R_f = \frac{d}{D}$$

**d** : Distance parcourue par le constituant ;

**D** : Distance parcourue par le front de l'éluant.

## 6. Étude de l'activité antimicrobienne :

### a) Les souches étudiées :

Les extraits bruts méthanoliques des deux plantes ont été testés contre les souches bactériennes et fongiques mentionnées dans le tableau ci-dessous :

Tableau IV-2 : Souches bactériennes et fongiques utilisées dans l'activité antimicrobienne

| Souches utilisées  |                              |                         | Référence                     |            |
|--------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------------|------------|
| <b>Bactéries</b>   | <b>A</b><br>positif          | <b>Gram</b>             | <i>Staphylococcus aureus</i>  | ATCC 25923 |
|                    |                              |                         | <i>Bacillus cereus</i>        | ATCC 10876 |
|                    | <b>A</b><br>négatif          | <b>Gram</b>             | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853 |
|                    |                              |                         | <i>Enterococcus cloacae</i>   | ATCC 13047 |
|                    |                              | <i>Escherichia coli</i> | ATCC 25922                    |            |
| <b>Champignons</b> | <i>Aspergillus flavus</i>    |                         | MNHN 994294                   |            |
|                    | <i>Aspergillus fumigatus</i> |                         | MNHN 566                      |            |
|                    | <i>Fusarium oxysporum</i>    |                         | MNHN 963917                   |            |
| <b>Levure</b>      | <i>Candida albicans</i>      |                         | ATCC 26790                    |            |

**b) Les milieux de culture utilisés :**

Pour les bactéries : Gélose nutritive, Bouillon nutritif et Muller-Hinton.

Pour *Candida albicans* : Bouillon nutritif, Sabouraud.

Pour les champignons filamenteux : PDA.

**c) Préparation de l'inoculum :**

Chaque culture microbienne doit être ensemencée par épuisement sur une gélose nutritive pour les bactéries et sur sabouraud pour les levures, pour obtenir des colonies isolées. Après une incubation à 37°C (35°C pour *Candida*) pendant 24h, choisir 4 à 5 colonies bien isolées du même type morphologique et transférer la croissance dans un tube contenant du bouillon nutritif (ou eau physiologique 0,9 %). Incuber le bouillon à 37°C jusqu'à ce qu'il devienne trouble et ensuite ajuster la turbidité à la bonne densité au standard McFarland 0,5 à l'aide d'un spectrophotomètre. Une densité optique entre 0,08 à 0,1 lue à 625nm correspond à une suspension contenant environ  $1 \text{ à } 2 \times 10^8$  UFC / mL pour les bactéries (EUCAST, 2003) et une densité optique lue à 530 nm correspond à  $1 \text{ à } 5 \times 10^6$  UFC / ml pour *Candida albicans* (Rodriguez-Tudela *et al.*, 2002).

En ce qui concerne les champignons filamenteux, l'inoculum a été préparé par un ensemencement sur la gélose PDA pendant 4 jours à 25°C afin d'avoir une sporulation adéquate. La suspension sporale a été préparée dans l'eau physiologique et la concentration a été ajustée à  $10^6$  spores / ml ce qui correspond à une transmittance de 0.68 à 0.82% lue à 530 nm (Pfaller *et al.*, 1998).

**d) Méthode de diffusion des disques sur milieu solide :**

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension microbienne précédemment préparée.
- Essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube ;
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées ;

- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose ;
- Appliquer les disques imbibés par l'extrait (10µl/ disque) sur la gélose Muller-Hinton en pressant chaque disque à l'aide de pinces bactériologiques stériles pour s'assurer de son application. Une fois appliqué le disque ne doit pas être déplacé (CLSI, 2010).

**e) Détermination de la concentration Minimale Inhibitrice sur milieu liquide :**

Une plaque de 96 puits (8 puits \* 12 puits) permet la détermination de la CMI des extraits végétaux vis-à-vis des souches qui ont présentées les diamètres d'inhibition les plus importants.

- Dans les cupules des colonnes 1 à 12, introduire, à l'aide d'une micropipette à embout stérile, 100 µl de bouillon Mueller- Hinton.
- Introduire 100 µl de l'extrait végétal dans le premier puits ;
- Reporter de puits en puits, de 1 à 12, à l'aide d'une micropipette de 100 µl. Nous obtenons des dilutions sériées (facteur de dilution ½). Chaque puits contient 100 µl de bouillon et du produit testé en dilution ;
- Redistribuer 100 µl de l'inoculum (10<sup>6</sup>UFC/ml) dans les 96 puits.

La microplaque est couverte est incubée à 37°C pendant 24h. Le DMSO doit être à raison de 2% au maximum. La lecture est effectuée à l'œil nu. La CMI est la plus faible concentration de la substance testée, à la quelle aucun trouble visuel. (CaSfm, 2008).

---

# *Résultats et Discussion*

---

## V. RESULTAT ET DISCUSSION ;

### 1. Extraction et calcul des rendements :

La préparation des extraits bruts à partir des fleurs et des tiges feuillés des deux plantes *Helichrysum stoechas subsp rupestre* et *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile* a été réalisée par le méthanol (80%). Les rendements en extraits sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Ces méthodes d'extraction menées à température ambiante permettent d'extraire le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

Tableau V-1 : Les rendements en extraits secs des deux plantes .

| Plantes                         | Parties des plantes | Rendement % |
|---------------------------------|---------------------|-------------|
| <i>H. stoechas ssp rupestre</i> | Tiges feuillés      | 13.5        |
|                                 | Fleurs              | 18.7        |
| <i>P. saxatile eu-saxatile</i>  | Tiges feuillés      | 09          |
|                                 | Fleurs              | 10          |

Les extraits méthanoliques des fleurs et des tiges feuillés d'*Helichrysum stoechas subsp rupestre* représentent des rendements plus élevés (18.7% et 13.5% respectivement) par rapport à ceux de *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile* (10% et 09% respectivement).

Le rendement calculé par Carini et ces collaborateurs (2001) à partir d'un extrait éthanolique d'*Helichrysum stoechas* est de 11%. C'est un rendement inférieur par rapport à ceux que nous avons trouvé.

Les extraits méthanoliques de 16 plantes originaires de la Turquie et appartenant au genre *Helichrysum*, étudiés par Albayrak et ces collaborateurs (2010), ont donné des rendements qui varient entre le 13% et 32%, dont celui d'*Helichrysum stoechas subsp barellieri* est de 16.87%. Dans la même année, l'extrait méthanolique d'*Helichrysum stoechas* de la Portugal testé par Barros et ces collaborateurs a donné un rendement de 17.13 %.

Les rendements obtenus à partir des deux parties de *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile* sont comparables avec le rendement obtenu à partir de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Phagnalon saxatile* (L.) Cass originaire de l'Italie (**10.53%**) lors d'une étude faite par Conforti et ces collaborateurs (**2010**). L'étude faite par Erdogan Orhan *et al.*, **2012** sur l'extrait méthanolique de *Phagnalon graecum* Boiss de la Turquie a donné un rendement est de **8,37%**.

Ces résultats sont proches nos rendements obtenus pour chaque partie séparée (fleurs et tiges feuillées). Les différences sont probablement dues à :

- Espèce et origine de la plante ;
- Rapport poids de la plante /Volume du solvant ;
- La méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée.

## 2. Tests phytochimiques :

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur les extraits méthanolique préparés à partir des tiges feuillées et des fleurs des deux plantes étudiées séchées et broyées précédemment.

Les résultats expérimentaux mentionnés dans le **tableau V-2** montrent que les **flavonoïdes**, les **tanins**, les **stérols et triterpènes** sont présents dans les fleurs et les tiges feuillées des deux plantes avec des intensités variables.

Les fleurs d'*Helichrysum stoechas subsp rupestre* contiennent plus de flavonoïdes par rapport aux tiges feuillées, ce qui n'est pas le cas pour *Phagnalon saxatile eu-saxatile*.

La présence des tanins galliques dans les tiges feuillées de *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile* et dans les fleurs d'*Helichrysum stoechas subsp rupestre* est confirmée par une couleur bleu-foncée en présence de FeCl<sub>3</sub>. La couleur vert-foncé indique la présence des tanins catéchique dans les fleurs des *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile* et les tiges feuillées d'*Helichrysum stoechas subsp rupestre*.

Les hétérosides stéroïdiques sont présents dans les fleurs d'*Helichrysum stoechas subsp rupestre* et dans les les tiges-feuillées chez *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile*. Les tiges feuillées d' *Helichrysum stoechas subsp rupestre* contiennent les hétérosides terpéniques.

Ces tests révèlent aussi la présence des alcaloïdes dans les deux parties d'*Helichrysum stoechas subsp rupestre*, l'absence de ces composés dans les deux parties de *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile* et des saponosides dans les deux plantes.

Nos résultats de l'étude phytochimique d'*Helichrysum stoechas subsp rupestre* sont en accord avec ceux trouvés dans la bibliographie, et qui mentionnent la richesse d'*Helichrysum stoechas* en polyphénols, en stérols et en fractions triterpéniques (**Carini et al., 2001 ; Lavault et al., 2004**), en acides phénoliques, flavonoïdes et coumarines (**Hwisal et al., 2011**).

L'étude phytochimique de *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile* a donné des résultats comparables avec ceux publiés sur l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Phagnalon saxatile*, qui confirment la présence des composées phénoliques (**Conforti et al., 2010**), des flavonoïdes (**Dolci et Tira, 1982**) et des sesquitérènes (**Senatore et al., 2005**)



Tableau V-2 : Tests phytochimiques réalisés sur des extraits préparés à partir des tiges feuillées et des fleurs des deux plantes étudiées.

| Test                          |                               | <i>H. Stoechas subsp rupestre</i>                 |  | <i>P. Saxatile subsp eu-saxatile</i>          |   |
|-------------------------------|-------------------------------|---|--|---|---|
|                               |                               | Tiges feuillées                                   | Fleurs   | Tiges feuillées                               | Fleurs                                  |
| <i>Flavonoïdes</i>            |                               | Rose<br>++  | Rouge orange<br>+++                            | +++   | ±                                       |
| <i>Tanins</i>                 |                               | Vert<br>« tanins catéchiques »<br>+++             | Bleu- noire<br>« tanins galliques »<br>++      | Bleu- noire<br>« Tanins<br>galliques »<br>+++ | Vert<br>« Tanins<br>cathéchiqes »<br>++ |
| <i>Alcaloïdes</i>             | <i>Mayer</i>                  | Trouble et précipité<br>+++                       | Trouble et précipité<br>+++                    | -   | -                                       |
|                               | <i>Wagner</i>                 | Trouble et précipité<br>+++                       | Trouble et précipité<br>++                     | -   | -                                       |
| <i>Stérols et triterpènes</i> |                               | Verte violette<br>++<br>Hétérosides<br>tèrpénique | Verte bleu<br>+<br>Hétérosides<br>stéroïdiques | Hétérosides<br>stéroïdique<br>+++             | -                                       |
| <i>Saponosides</i>            | <i>Extrait<br/>alcoolique</i> | -   | -  | -   | -                                       |
|                               | <i>Extrait*<br/>aqueux</i>    | -   | -  | -   | -                                       |

\*Pour les saponosides, un extrait aqueux est préparé pour confirmer l'absence des ces substances dans les deux plantes puisque ces composés ont plus d'affinité avec l'eau qu'avec le méthanol (Dohou et al., 2003).

### 3. Dosage des polyphénols :

L'étude quantitative des extraits bruts, préparés à partir des fleurs et des tiges feuillées des deux plantes étudiées, au moyen des dosages spectrophotométriques avaient pour objectif la détermination de la teneur en polyphénols totaux. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques leur sont attribués.

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode au réactif de Folin Ciocalteu (Vermeris *et al.*, 2006). Pour cette objectif, une droite d'étalonnage avec une solution d'acide gallique a été tracée (Fig. V-3).

Les teneurs obtenues (Tableau V-3), sont exprimées en mg, équivalent d'acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg GAE/g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique.

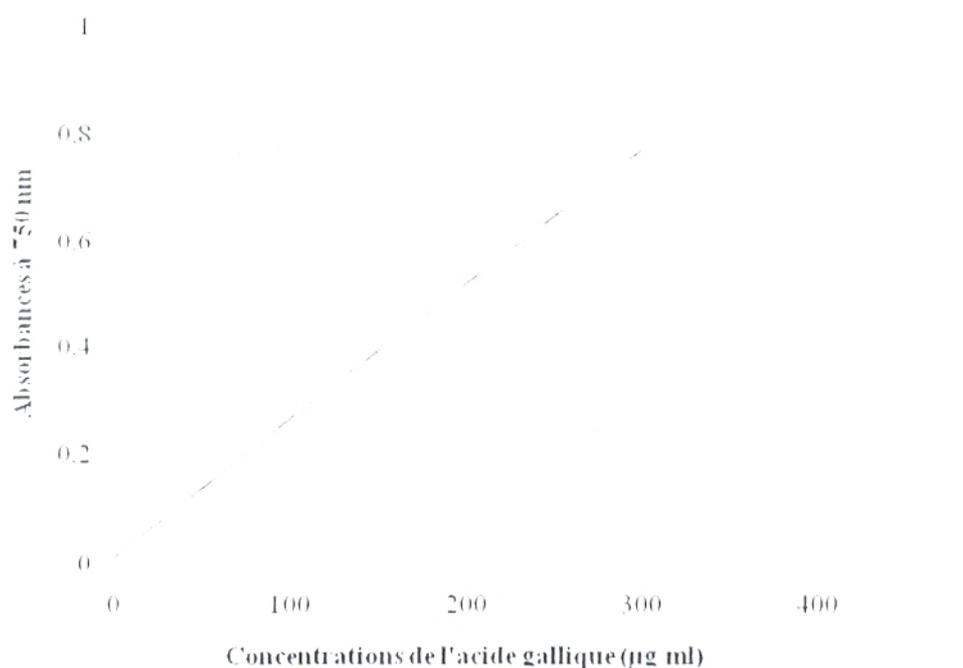


Figure V-3 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Tableau V-3 : Teneurs en polyphénols totaux dans les extraits méthanoliques (mg GAE/g MS).

| Plantes                           | Parties des plantes | Teneurs en polyphénols |
|-----------------------------------|---------------------|------------------------|
| <i>H. stoechas ssp rupestre</i>   | Tiges feuillés      | 18.62                  |
|                                   | Fleurs              | 31.34                  |
| <i>P. saxatilessp eu-saxatile</i> | Tiges feuillés      | 18.82                  |
|                                   | Fleurs              | 4.8                    |

Selon le tableau ci dessus, l'extrait méthanolique des fleurs d'*Helichrysum stoechas subsp rupestre* représente la teneur la plus élevé en polyphénols avec **31.34** mg GAE/g MS (**167.6** mg GAE/g d'extrait). Pour les tiges feuillées, elle est de **18.62** mg GAE/g MS (**179.88** mg GAE/g d'extrait). Ces résultats confirment la richesse d'*Helichrysum stoechas subsp rupestre* en substances polyphénoliques.

La teneur en polyphénols totaux d'*Helichrysum stoechas* lors d'une étude faite par Barros et ces collaborateurs (2010) est de **184.4** mg GAE/g d'extrait, une valeur légèrement supérieur par rapport à nos résultats.

Albayrak et ces collaborateurs (2010) ont déterminé, par des méthodes spectrophotométriques, le contenu en polyphénols totaux à partir des extraits méthanoliques de plusieurs espèces appartenant au genre *Helichrysum*, à savoir *Helichrysum stoechas subsp barellieri* qui a est valeur en polyphénols totaux de **94.16** mg GAE/g d'extrait. Une valeur largement inférieur aux nôtres.

En ce qui concerne *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile*, l'extrait méthanolique des fleurs représente la fraction la plus pauvre en polyphénols avec **4.8** mg GAE/g MS (**48** mg GAE/g d'extrait). Les tiges feuillées ont un rendement plus important, il est de **18,82** mg GAE/g MS (**209,134** mg GAE/g d'extrait).

L'étude faite par Erdogan Orhan et ces collaborateurs (2012) sur la partie aérienne de *Phagnalon graecum Boiss*, montre que cette espèce a une teneur en polyphénols (**150.74** mg GAE/g d'extrait) inférieure à celle des tiges feuillées de la plante étudiée.

Ces teneurs en polyphénols sont en corrélation avec les tests phytochimiques et les rendements en extrait sec précédemment réalisés.

Il est important de souligner que l'utilisation de plante d'origine géographique et climatique distinctes ainsi que des méthodes d'extraction et de dosage différentes réduisent la fiabilité d'une comparaison entre les études réalisées .

#### **4. Chromatographie sur couche mince :**

Pour la séparation des extraits bruts des fleurs et des tiges feuillées des deux plantes, une chromatographie sur couche mince à été réalisée sur des plaques en gel de silice en utilisant deux systèmes d'élution différents. La révélation a été faite dans l'UV à 366 nm et les résultats sont mentionnés dans le **Tableau V-4**

Par le biais de ces systèmes, nous avons pu mettre en évidence dans :

- *Helichrysum stoechas subsp rupestre* : deux composés pour la partie fleurs et deux composés pour la partie tiges feuillées dans la phase butanol/ acide acétique et six composés pour la partie fleurs et trois composés pour la partie tiges feuillées dans la phase acétate d'éthyle/ acide formique/ eau distillée ;
  
- *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile* : un composé pour la partie fleurs et trois composés pour la partie tiges feuillées dans la phase butanol/ acide acétique et un composés pour la partie fleurs et deux composés pour la partie tiges feuillées dans la phase acétate d'éthyle/ acide formique/ eau distillée.

Selon ces résultats nous pouvons déduire que le système 02 exerce une bonne séparation pour les extraits d' *Helichrysum stoechas subsp rupestre*. En revanche, le système 01 possède un bon pouvoir séparateur pour ceux de *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile*.

Tableau V-4 : Résultat de la chromatographie sur couche mince de gel de silice.

| Partie étudiée                              | Système 01<br>Butanol/ Acide acétique (4:1) |                     | Système 02<br>Acétate d'éthyle/ Acide formique/ Eau distillée<br>(65:15:20) |                    |
|---|---|---------------------|---|--------------------|
|   | R <sub>f</sub>                              | Couleurs des spots  | R <sub>f</sub>  | Couleurs des spots |
| <i>Helichrysum stoechas subsp rupestre</i>  |   |                     |   |                    |
| Fleurs                                      | 0<br>0.92                                   | Jaune<br>Bleu clair | 0.74  | Bleu clair         |
|   |   |                     | 0.80  | Marron             |
|   |   |                     | 0.82  | Vert clair         |
|   |   |                     | 0.84  | Violet             |
|   |   |                     | 0.87  | Jaune foncé        |
|   |   |                     | 0.91  | Bleu clair         |
| Tiges feuillées                             | 0<br>0.93                                   | Verte<br>Mauve      | 0.82  | Marron             |
|   |   |                     | 0.88  | Bleu               |
|   |   |                     | 0.92  | Rose               |
| <i>Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile</i> |   |                     |   |                    |
| Fleurs                                      | 0.9   | Orange              | 0.89  | Jaune foncé        |
| Tiges feuillées                             | 0.87  | Violet              | 0.94  | violet             |
|   | 0.91  | jaune               | 0.94  | Bleu claire        |
|   | 0.96  | Rose claire         | -   | -                  |

Afin d'essayer d'identifier ces composés, une CCM a été réalisée pour cinq témoins de nature phénolique, sur les deux systèmes d'élution. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau V-5 : Résultats de la chromatographie sur couche mince sur gel de silice des témoins utilisés.

| Témoins                      | Butanol/ Acide acétique |                    | Acétate d'éthyle/ Acide formique/ Eau distillée |                    |
|------------------------------|-------------------------|--------------------|---|--------------------|
|                              | R <sub>f</sub>          | Couleurs des spots | R <sub>f</sub>                                  | Couleurs des spots |
| Acide gallique- Acide phénol | 0.91                    | jaune              | 0.85  | Violet             |
| Pyrocatechol – Phénol simple | 0.93                    | Jaune              | 0.91  | Violet             |
| Catéchine – Flavanol         | 0.88                    | Vert jaunâtre      | 0.85  | Marron             |
| Quercétine – Flavonol        | 0.92                    | Orange             | 0.89  | Jaune foncé        |
| Rutine – Flavonol            | 0.87                    | Jaune              | 0.82  | Violet foncé       |

Par la comparaison des facteurs de rétention et des couleurs des spots de nos extraits avec ceux des témoins du deuxième système, nous avons pu mettre en évidence dans les extraits bruts d' *Helichrysum stoechas subsp rupestre* la présence de la quercétine, la catéchine et l'acide gallique dans fleurs et de la catéchine dans les tiges feuillées. Ces résultats sont en accord avec les tests phytochimiques réalisés sur ces extraits qui ont montré la présence des tanins galliques dans les fleurs et les tanins catéchiques dans les tiges feuillées de la plante. Parmi les flavonoïdes, la quercétine est détecté auparavant au niveau des capitules d' *Helichrysum stoechas* (Carini et al., 2001).

Pour *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile*, le premier système nous a permis de mettre en évidence la présence de l'acide gallique dans les tiges-feuillées, de la quercétine dans l'extrait des fleurs. Ces résultats sont démontrés dans le tableau suivant :

**TableauV-6 : Composés identifiés par CCM.**

| <i>Helichrysum stoechas subsp rupestre</i> |                      |                          |
|--|----------------------|--------------------------|
| <i>Parties étudiées</i>                    | Système 2            |                          |
|  | <b>R<sub>f</sub></b> | <b>Composé identifié</b> |
| <i>Fleurs</i>                              | 0.78                 | Quercétine               |
|  | 0.80                 | Catéchine                |
|  | 0.87                 | Acide gallique           |
| <i>Tiges feuillées</i>                     | 0.82                 | Catéchine                |
| <i>Phagnalon saxatile ssp eu-saxatile</i>  |                      |                          |
| <i>Parties étudiées</i>                    | Système 1            |                          |
|  | <b>R<sub>f</sub></b> | <b>Composé identifié</b> |
| <i>Tiges feuillées</i>                     | 0,91                 | Acide gallique           |
| <i>Fleurs</i>                              | 0,92                 | Quercétine               |

Les autres taches présentes dans les deux extraits des deux plantes étudiées, dans les deux systèmes utilisés, correspondent à d'autres composés non utilisés comme témoins. En effet plus le nombre de témoins est grand plus la comparaison des composés trouvés au niveau de la CCM est facile à réaliser.

## 5. Étude de l'activité antimicrobienne :

Notre étude consiste à la recherche de l'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques d' *Helichrysum stoechas subsp rupestre* et de *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile* vis-à-vis de cinq souches bactériennes, une levure et trois moisissures. Ces souches sont choisies en fonction de leurs fréquences élevées à contaminer les denrées alimentaires et pour leurs pathogénicités.

L'étude de cette activité antimicrobienne a été réalisée par deux techniques :

- La technique de diffusion des disques sur milieu solide, qui est une technique qualitative basée sur la mesure des diamètres d'inhibitions, en mm, qui apparaissent autour du disque de papier imprégné d'extrait brut étudié.

Cette mesure est transcrite dans différents symboles proportionnels à l'activité (**Tab. V-7**) (**Ponce et al., 2003 ; Duraffourd et al., 1990 ; Biyiti et al., 2004**).

**Tableau V-7:** Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition (D).

| Inhibition      | Transcription | Sensibilité    |
|-----------------|---------------|----------------|
| D < 8mm         | -             | Résistante     |
| 9mm ≥ D ≤ 14    | +             | Sensible       |
| 15mm ≥ D ≤ 19mm | ++            | Assez sensible |
| D ≥ 20mm        | +++           | Très sensible  |

- La technique des dilutions sur milieu liquide, qui est une méthode quantitative basée sur la recherche de la plus basse concentration qui inhibe la croissance bactérienne, la concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

Dans un premier temps, nos tests ont été réalisés vis-à-vis de toutes les souches par la première méthode. Les extraits qui semblent être actifs, résultat révélé par l'apparition de zones d'inhibitions importantes, ont fait l'objet d'une étude de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

**a) Méthode de diffusion des disques sur milieu solide :**

Une concentration en extrait méthanolique de 50 µg/µl n'a pas donné des zones d'inhibition importantes, ce qui nous a menés à préparer un extrait métaholique à 100 µg/µl dans les mêmes conditions cités précédemment. Même à cette concentration, les diamètres d'inhibition étaient faibles.

L'utilisation de solvants à polarités différentes permet de séparer les composés des différentes parties de la plante selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. A cet effet, un extrait de 5g de la partie aérienne des deux plantes dans 100 ml d'éther de pétrole est préparé par macération à température ambiante, afin de tester l'activité antimicrobienne des composés apolaires. Les rendements obtenus sont 0.89% pour la partie aérienne d'*Helichrysum stoechas subsp rupestre* e 0.93% pour celle de *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile*. La concentration de l'extrait éthéré est de 5 µg/µl dans le DMSO.

Les résultats du test de sensibilité microbienne aux extraits sont regroupés dans le **Tableau V-8**. Les valeurs indiquées sont les diamètres des zones d'inhibition selon la charge du disque.

Tableau V-8 : Diamètre des zones d'inhibition (en mm) obtenus par dépôt de 10µl d'extrait par disque.

| Plante  | Extrait | Partie de la plante | Les concentrations µg/µl | Les quantités µg/ disque | <i>S. aureus</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. coli</i> | <i>B. cereus</i> | <i>E. cloacae</i> | <i>C. albicans</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | <i>A. fumigatus</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> |    |
|---|---------|---------------------|--------------------------|--------------------------|------------------|----------------------|----------------|------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|----|
| <i>Helichrysum stoechas</i><br><i>subsp rupestre</i>  | MeOH    | F                   | 50                       | 500                      | 06               | 06                   | 06             | 06               | 06                | 06                 | 06                        | 06                  | 06                        |    |
|   |         |                     | 100                      | 1000                     | 10               | 09                   | 07             | 10               | 06                | 08                 | 06                        | 06                  | 06                        |    |
|   |         | TF                  | 50                       | 500                      | 06               | 06                   | 06             | 06               | 06                | 06                 | 09                        | 06                  | 06                        | 06 |
|   |         |                     | 100                      | 1000                     | 08               | 10                   | 07             | 10               | 06                | 09                 | 06                        | 06                  | 06                        | 06 |
|   | EP      | PA                  | 05                       | 50                       | 20               | 08                   | 10             | 15               | 06                | 11                 | 06                        | 06                  | 06                        |    |
|   |         |                     |                          |                          | ++               | -                    | +              | ++               | -                 | +                  | -                         | -                   | -                         |    |
| <i>Phagnalon saxatile</i><br><i>subsp eu-saxatile</i> | MeOH    | F                   | 50                       | 500                      | 11               | 08                   | 06             | 06               | 09                | 11                 | 06                        | 06                  | 06                        |    |
|   |         |                     | 100                      | 1000                     | 11               | 08                   | 06             | 07               | 09                | 11                 | 06                        | 06                  | 06                        |    |
|   |         | TF                  | 50                       | 500                      | 10               | 06                   | 06             | 06               | 07                | 07                 | 06                        | 06                  | 06                        |    |
|   |         |                     | 100                      | 1000                     | 10               | 07                   | 06             | 08               | 07                | 07                 | 06                        | 06                  | 06                        |    |
|   | EP      | PA                  | 05                       | 50                       | 13               | 09                   | 10             | 13               | 07                | 13                 | 06                        | 06                  | 06                        |    |
|   |         |                     |                          |                          | +                | +                    | +              | +                | -                 | +                  | -                         | -                   | -                         |    |
| Gentamycine   |         |                     |                          | 10                       | 15               | 12                   | 16             | 11               | 18                |                    |                           |                     |                           |    |
| Amphotéricine B                                       |         |                     |                          | 20                       |                  |                      |                |                  |                   | 22                 | 17                        | 28                  | 08                        |    |

EP : Ether de pétrole ; F : Fleurs ; TF : Tiges feuillées ; PA : Partie aérienne ; + et - : transcription.

D'après les résultats exprimés dans le tableau ci-dessus, les extraits méthanoliques des deux plante ont une très faible activité sur toutes les souches étudiées même à une concentration de 100 mg/ml (1000 µg/ disque) à l'exception des quelques souches qui ont une certaine sensibilité à ces extraits avec des diamètres compris entre 9 et 11 mm :

- *S. aureus* à l'extrait des fleurs, *C. albicans* à l'extrait des tiges feuillées, *Bacillus cereus* et *P. aeruginosa* aux extraits des deux parties d'*Helichrysum stoechas subsp rupestre* ;
- *Enterococcus cloacae* et *C. albicans* à l'extrait des fleurs et *S. aureus* aux extraits des deux partie de *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile*.

Plusieurs études ont été consacrées à la détermination du pouvoir antimicrobien de certains extraits d' *Helichrysum stoechas*. L'étude réalisée par **Sobhy et El-Feky (2007)** montre que les extraits éthanoliques ont une faible activité antibactérienne contre *S. aureus* et *P. aeruginosa* ce qui est en concordance avec nos résultats. Aucune activité n'est observée contre *C. albicans* pour les mêmes extraits de cette espèce.

Les extraits éthanoliques de *P. rupestre* étudiés par **Shtayeh et al (1998)** exercent une activité contre *S. aureus* (16.4 mm) et sont inactifs contre *C. albicans* et *P. aeruginosa*.

Les extraits étherés des deux plantes montrent une activité antimicrobienne remarquable par rapport aux extraits méthanoliques testés à deux concentrations différentes :

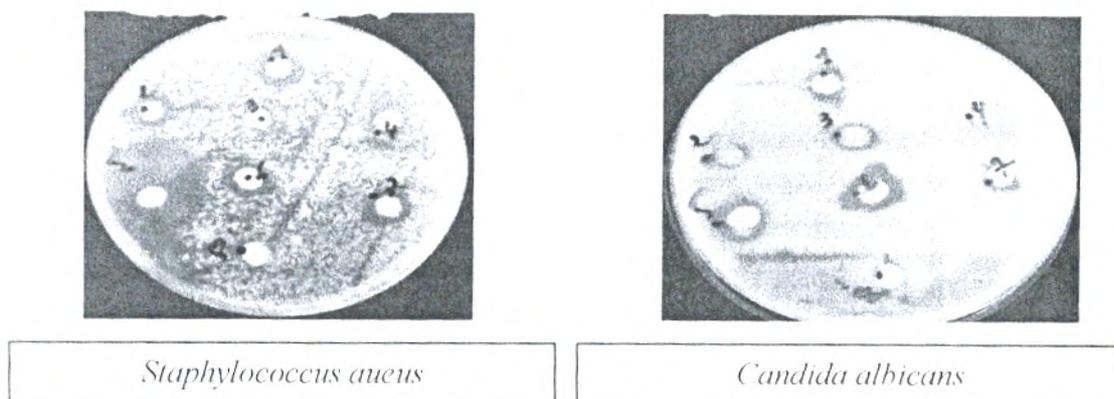
- *S. aureus* et *B. cereus* sont les souches les plus sensibles aux extraits étherés des deux plantes avec des diamètres allant de 13 à 20mm. Cette activité est plus importante que celle de l'antibiotique et de l'antifongique de synthèse utilisés.
- *C. albicans* est une souche sensible à l'extrait étheré d' *P. saxatile subsp eu-saxatile* avec un diamètre de 13mm (**Figure V-4**).
- *P. aeruginosa* et *E. coli* sont sensibles à l'extrait étheré d' *P. saxatile subsp eu-saxatile* avec des diamètres de 9mm et 11mm, respectivement.
- *E. coli* et *C. albicans* sont sensibles à l'extrait étheré d' *Helichrysum stoechas subsp rupestre* avec des diamètres de 10 mm et 11mm, respectivement.

L'activité de nos extraits étherés peut être due à la synergie entre les composés apolaires solubles dans ce solvant parmi ces composés les huiles essentielles. Cela peut être probablement en relation avec sa richesse en huile essentielle qui provoque la perforation de la membrane bactérienne et le flux rapide des composants cytosoliques (**Thuille et al., 2003 ; Shunying et al., 2005**). Pour cette raison nous avons comparé nos résultats avec ceux de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d' *Helichrysum stoechas subsp rupestre* (**Tsoukatoum et al., 1999**) contre *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* et *Enterococcus cloaceae*. Cette huile essentielle n'avait aucune activité sur les souches étudiées.

L'huile essentielle d' *Helichrysum rupestre* étudiée par Roussis et ces collaborateurs (1998) demeure inactive vis-à-vis d'*Enterococcus cloacae*, mais possède une activité contre *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*.

Selon l'étude portée par Senatore et al., (2005), l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *P. saxatile* (L.) Cass n'avait aucun effet contre quelques bactéries à Gram positif et négatif.

Enfin, les résultats obtenus montrent que les extraits méthanoliques et étherés des deux plantes n'ont aucune activité contre les moisissures testés.



1 : Extrait méthanolique de pagnalon saxatile subsp eu-saxatile (Fleurs) ; 2 : Extrait méthanolique de pagnalon saxatile subsp eu-saxatile (Tiges feuillés) 3 : Extrait méthanolique d'*Helichrysum stoechas* subsp rupestre (Tiges feuillés) ; 4 : Extrait méthanolique d'*Helichrysum stoechas* subsp rupestre (Fleurs) ; 5 : Extrait étheré : d'*Helichrysum stoechas* subsp rupestre (partie aérienne) ; 6 : Extrait étheré : de pagnalon saxatile subsp eu-saxatile (partie aérienne).

Figure V-4 : Effets des différents extraits sur *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*.

#### b) La concentration minimale inhibitrice :

Le choix des extraits étherés des deux plantes réside dans son activité qui est nettement plus supérieur que celle des extraits méthanolique.

L'étude de la CMI de ces extraits, vis-à-vis des souches *S.aureus*, *B.cereus* et *C. albicans*, (les diamètres sont les plus importants), a été réalisée par la méthode des dilutions sur milieu liquide dans une microplaque stérile. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau V-9 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits éthérés

| Souches           | CMI (µg /ml)                     |                                     |             |                 |
|-------------------|----------------------------------|-------------------------------------|-------------|-----------------|
|                   | <i>H.stoechas subsp rupestre</i> | <i>P.saxatile subsp eu-saxatile</i> | Gentamicyne | Amphotéricine B |
| <i>S.aureus</i>   | 1250                             | 625                                 | 1.25 à 2.5  | -               |
| <i>B.cereus</i>   | 1250                             | 1250                                | 2.5 à 5     | -               |
| <i>C.albicans</i> | -                                | 312.5                               | -           | 1.25 à 2.5      |

De ces résultats, nous pouvons déduire que la souche *B.cereus* s'est montrée la souche la plus résistante aux deux extraits testés avec une CMI de **1250 µg /ml**. *Candida albicans* s'est avérée la souche la plus sensible suivi par *S. aureus*, à l'extrait de *P. saxatile subsp eu-saxatile*.

Ces résultats révèlent des valeurs de la CMI nettement supérieures à celles de l'antibiotique et de l'antifongique de synthèse.

La CMI de l'extrait d'*H. stoechas subsp rupestre* vis-à-vis de *S. aureus* est inférieure à celle obtenue par **Chinou et al., (1997)** pour *Helichrysum stoechas subsp barrelieri* (CMI= **2500 µg /ml**).

A la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que l'activité des extraits des deux plantes n'est pas surprenante comparée avec celle des antibiotiques et qu'il n'y a aucune corrélation entre les diamètres d'inhibition et les valeurs des CMI obtenus.



---

# *Conclusion*

---

**D**e nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que l'antibiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires.

Les extraits naturels issus des plantes contiennent une variété de composés phénoliques et des huiles essentielles auxquelles nous attribuons un pouvoir inhibiteur des microorganismes.

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés aux effets antimicrobiens des extraits bruts de deux plantes originaires de Tlemcen. Il s'agit d'*Helichrysum stoechas subsp rupestre* de Honaine et de *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile* de Fellaoucène.

Les rendements en extraits bruts méthanoliques des fleurs et des tiges feuillées sont respectivement, 18.7% et 13.5% pour *Helichrysum stoechas ssp rupestre* et de 10% et 09% pour *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile*.

Les tests phytochimiques ont été réalisés par des réactions de caractérisation afin de mettre en évidence la présence des flavonoïdes, des tanins et des stérols et triterpènes dans les deux plantes.

Des dosages effectués ont permis de déterminer la teneur en polyphénols totaux dans les extraits méthanoliques des deux plantes. Les fleurs d'*Helichrysum stoechas subsp rupestre* ont une teneur plus élevée (**31.34** mg GAE/g MS) par rapport aux tiges feuillées (**18.62** mg GAE/g MS). Par contre, les tiges feuillées de *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile* ont une teneur largement plus élevée que celle des fleurs. Elles sont respectivement **18.82** mg GAE/g MS et **4.8** mg GAE/g MS.

La chromatographie sur couche mince sur gel de silice en utilisant deux systèmes de développement différents, a révélé la présence de la quercétine, la catéchine et l'acide gallique dans fleurs, la catéchine dans les tiges feuillées des extraits bruts d' *Helichrysum stoechas subsp rupestre* et de l'acide gallique dans les tiges-feuillées, la quercétine dans l'extrait des fleurs de *Phagnalon saxatile subsp eu-saxatile*

L'étude de l'activité antimicrobienne des extraits bruts des deux plantes révèle une activité antibactérienne plus importante de l'extrait étheré comparée à celle de l'extrait méthanolique, par la méthode de diffusion en milieu gélosé. *Staphylococcus aureus*, *B. cereus*

## Conclusion générale

---

et *C. albicans* sont les souches les plus sensibles à cet extrait avec des diamètres d'inhibition compris entre 13 et 20mm. Sur milieu liquide, ils ont une faible activité par rapport à l'antibiotique et à l'antifongique de synthèse et ils n'avaient aucun pouvoir inhibiteur contre les champignons.

Nos résultats préliminaires montrent que les extraits bruts étherés testés témoignent d'activités antimicrobiennes médiocres. D'autres études approfondies sont nécessaires et se résument dans les points suivants :

- Une étude *in vivo* est souhaitable, pour étudier la toxicité des extraits testés, partant du fait qu'une substance pouvant être très active *in vitro*, mais peut engendrer une toxicité une fois pénétrée dans le corps ;
- Isolement et caractérisation des composés actifs dans les différents extraits par des méthodes plus spécifiques (HPLC, RMN) ;
- Evaluation d'autres effets biologiques *in vitro* comme *in vivo* des extraits bruts et de leurs composés actifs en utilisant différentes techniques et différents solvants.

# *Référence Bibliographique*



1. **Afolayan A.J., Meyer J.J.M., 1997.** The antimicrobial activity of 3, 5, 7-trihydroflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. *J. Ethnopharmacol.* 27: 177-181.BERG.
2. **Aiyegoro O.A., Afolayan A.J, Okoh A.I., 2009.** Studies on the *In vitro* time-kill assessment of crude aqueous and acetone extracts of *Helichrysum pedunculatum* leaves. *Afr. J. Biotech.* 7(20): 3721-3725.
3. **Albayrak S., Aksoy A., Sagdic O. et Hamzaoglu E., 2010.** Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. *Food Chemistry* ;119: 114- 22.
4. **Ali-Shtayeh M.S., Yaghmour M-R. R., Faidi Y.R., Salem K., Al-Nuri M.A., (1998).** Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethnopharmacology* 60 : 265–271.
5. **Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M., Chaouch A., 2010.** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*14: 141-148
6. **Archibalt L., Phillips L., Monnet D., Mac Govan J. E., Tenover J.F, Gaynes. R., 1997.** Antmicrobial resistance in isolates from in patients and outpatients in the United States. Increasing importance of the intensive care unit. *Clinic. Infect. Dis.* 24: 211-215.
7. **Arrif S., 2009.** Etude des métabolites secondaires de deux scrophulariacées du genre *Verbascum*: *V. ballii* et *V. dentifolium*. Thèse de doctorat en sciences. Université El Hadj Lakhdar-Batna. Faculté Des Sciences. Département De Chimie.
8. **Ayeş K .U., Zuhail G., Karsten S., Demirezer L.O ., Zeeck A., 2004.** Phytochemical and antimicrobial investigation of *Echium vulgare* growing in Turkey. *Biochemical Systematics and ecology.* 32 : 833-836.
9. **Bahorun T., 1997.** Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d’approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius.*
10. **Bammi J., Douira A., 2004.** Contribution à la connaissance de la flore vasculaire de la forêt de l’achach, plateau central (maroc). *Acta Botanica Malacitana* 9: 23-41.

11. Bandoniene D., Pukalskas A., Venskutonis P.R., Gruzdiene D., 2000. Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil. *Food Research International*. 33: 785-791.
12. Barboni T., Balbi N., Privat M., Gasamatta G., 2006. Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie. Thèse de doctorat en chimie, Université de Corse.
13. Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A.V., Fraser G.R., Colombatto D., McAllister T.A. *et al.*, 2008. Plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*. 145 : 209–228.
14. Biyiti L.F, Meko'o DJ.L, Tamze v, Amvam Zollo P.H., 2004. Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. *Traditional pharmacology and medicine in Africa*, 13: 11-20.
15. Bonnier, 1934. Flore complète de France, Suisse et Belgique. Edition 10, P 118.
16. Brossi A., Suffness M., 1990. The alkaloids- Antitumor bisindoles alkaloids from *Caiharanthus roseus* L. *Academic press, San Diego*, Vol 37.
17. Bruneton J., 2009. Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4<sup>e</sup> éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, 1288 p.
18. Caillard J., 2003. Les plantes, des usines chimiques en miniature. Dossier de ressources documentaires. CRDR Midi-Pyrénées. P6.
19. Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L., Ferret A., 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. 90 : 2580–2595.
20. Carini M., Aldini G., Furlanetto S., Stefani R. et Maffei Facino R., 2001. LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *HelichrysumStoechas*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 24: 517- 26.
21. CaSfm, (2008). Comité de l'antibiogramme, société Française de Microbiologie.
22. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).(2010). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard*. Eighth Edition. Pennsylvania, USA.
23. Combrinck S., Du Plooy G.W., Mccrindle R.I., Botha B.M., 2007. Morphology and Histochemistry of the Glandular Trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). *Annals of botany*. 6: 1111–1119.

24. Conforti F., Rigano D., Formisano C., Bruno M., Loizo.M. R., Menichini F., Senatore F., 2010. Metabolite profile and *in vitro* activities of *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. relevant to treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* February, Vol. 25, No. 1, Pages 97-104: 97-104.
25. Cowan. N. M., 1999. Plant products as anti microbial agents. *Clinical microbiology Reviews*.4 :564-582.
26. Crete P., 1965 .Précis de botanique. Masson, Paris, Edition 2, P 429.
27. Czinner E., Hagymasi K., Blazovics A.K., Kery A., Szoke E., Lemberkovics E., 2000. *In vitro* Antioxidant properties of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. *J. Ethnopharmacol.* 73: 437-443.
28. Dewick P.M., 1993. Isoflavonoids. *The Flavonoids Advances in research since 1986.* Edited by J. B. Harborne, Chapman & Hall. London pp.117-238.
29. Dolci S., Tira., 1982. Flavonoids of Gnaphalieae : Phagnalon species. *Atti dell' Accademia delle Scienze di Torino, Classe Sci. Fis. Mater. Nat.*, 116(3-6), 315-381.
30. Dupont F. et Guoguard J.L. (2007). *Botanique : systématique moléculaire.* 14<sup>ème</sup> Ed. Masson Paris. p 248.
31. Duraffourd C., D'Hervicourt L., Lapraz J.C., 1990. *Cahiers de phytothérapie clinique. Examen de laboratoire galénique Eléments Thérapeutiques Synergiques.* 2eme Edition Masson. Paris. p87.
32. El kalamouni C., Marzouk B., Menut C., 2010. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits des plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse.
33. Engler A., 1964. *Syllabus der Pflanzefamilien.* Part II, p. 489. Gebrüder Bornträger, Berlin.
34. Erdogan Orhan I., Sezer Senol F., Demirci B., Ozturk N., Can Baser K. H., Sener B., 2012. Phytochemical Characterization of *Phagnalon graecum* Boiss. by HPLC and GC-MS with its Enzyme Inhibitory and Antioxidant Activity Profiling by Spectrophotometric Methods.
35. Euzéby J.P., 2009. *Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. Évaluation in vitro de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.*
36. Filomena C., Daniela R., Carmen F., Maurizio B., Monica R. L., Francesco M., Senatore F., 2010. Metabolite profile and *in vitro* activities of *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. relevant to treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* February, Vol. 25, No. 1, Pages 97-104: 97-104.

37. Gibault T., 2001. Equation-Nutrition n° 14 (APRIFEL) Endocrinologue-Nutritionniste.
38. Góngora L. Mäñez S., Giner R.M., Recio M. D. C., Gray A.I., Rios J.L., 2002. Phenolic glycosides from Phagnalon rupestre. *Phytochemistry*, 59, 857-860.
39. Góngora L., Giner R.M., Mäñez S., Recio M. D. C., Rios J.L., 2001. New prenylhydroquinone glycosides from Phagnalon rupestre. *J. Nat. Prod.*, 64, 1111-1113.
40. Graglia E., Julkunen-Tiitto R., Shaver G. R., 2001. Environmental control and intersite variations of phenolics in *Betula nana* in tundra ecosystems. *New Phytologist* . 151 : 227-236.
41. Guérin-Faublée V., Carret., 1999. L'antibiogramme : principes, méthodologie, intérêt et limites. *Journées nationales GTV-INRA*, 5-12.
42. Harborne J.B., Baxter H., 1999. The handbook of natural flavonoids, Vols 1 and 2. Chichester, UK: John Wiley and Sons. human health. *Current Medicinal Chemistry*. 8 : 1-182.
43. Hwisa N., Auzi A., Parvez N., Molvi K., Sherif F., 2011. Antinociceptive effect of *Helichrysum stoechas* in experimental animals. *IJPI's Journal of Pharmacology and Toxicology* .Vol 1:2.
44. Iserin P., 2011. Encyclopédies des plantes médicinales. Larousse / VUEF. ISBN: 2-03-560252-1. Pp 14, 15.
45. Ismailoglu U.B., Saracoglu I., Harput U.S., Sahin-Erdeli I., 2002. *Ethnopharmacol.* 79. 193.
46. Jahandiez E., Mairie R., 1934. Catalogue des Plantes du Maroc. Minerva, Lechevalier, Tome 3. Alger. Pp.751.
47. Jovet P., 1934. Les amis du jardin botanique littoral Paul Jovet. Saint-Jean-de-Luz.
48. Kasperek Max et al-Janabi Suhel, 2008. Plantes médicinales. La diversité biologique au service de la santé. Division Environnement et changement climatique. Programme « Mise en œuvre de la Convention sur la Biodiversité ». Publié par : Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH.
49. Kogel-Knabner I., 2002. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*. 34 : 139-162.
50. Laitinen M.L., Julkunen-Tiitto R., Rousi M., 2000. Variation in phenolic compounds within a birch (*Betula pendula*) population. *Journal of Chemical Ecology*. 7 : 1609-1622.

67. **Quezel P., Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du centre national de la recherche scientifiques. Tome II.
68. **Recio M., Giner R., Terencio M., Sans M. J. and Rios J., 1991.** Anti-inflammatory activity of *Helichrysum stoechas*. *Planta Med*, 57, 56.
69. **Richard D., Giraud N., Pradere F., Soubaya T., 2010.** Biologie : Les métabolites secondaires des végétaux. Duonod, Paris. Pp : 192, 193.
70. **Rios J., Recio M., Villar A., 1990.** Antibacterial activity of *Helichrysum stoechas*, *Planta Med*, 56, 646.
71. **Rios J., Recio M., Villar A., 1991.** Isolation and identification of the antibacterial compounds from *Helichrysum stoechas*. *J of Ethnopharmacol.* 33 :51 – 55.
72. **Roussis V., Tsoukatou M., Chinou I. B., Oriz A., (1998).** *Planta Med.*
73. **Sagdic O., Karahan A.G., Ozcan M., et al., 2003.** Effect of some spice extracts on bacterial inhibition. *Food Sci Technol Int* .9: 353-356.
74. **Sala A, Recio M.C., Schinella G.R et al., 2003.** Assessment of the antiinflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *Eur J Pharmacol* 461: 53-61.
75. **Santanaya M.P., Blanco E., Morales R., 2005.** Plants known as *t'e* in Spain: An ethno-pharmaco-botanical review. *Journal of Ethnopharmacology* (98) 1-19. Elsevier.
76. **Schauenberg P, Paris F., 1977.** Guide des plantes médicinales. Delachaux et Niestlé SA, Neuchatel (Switzerland)- Paris .Pp : 386.
77. **Schwämmle B., Winkelhausen E., Kuzmanova S., Steiner W., 2001.** Isolation of carvacrol Assilitating Microorganisms. *Biotechnol.* 4 : 341- 345.
78. **Senatore F., Formisano C., Armando G., Daniela R., Gabriella B., Maurizio B., 2005.** Chemical composition of the Essential Oil of Phagnalon Saxatile (L). Cass. (Asteraceae) Growing Wild in Southern Italy. *Journal of essential oil- Bearing Plants.* *Jeobp* 8(3) pp 258\_263. ISSN 0972- 06OX.
79. **Senatore F., Formisano C., Armando G., Daniela R., Gabriella B., Maurizio B., 2005.** Chemical composition of the Essential Oil of Phagnalon Saxatile (L). Cass. (Asteraceae) Growing Wild in Southern Italy. *Journal of essential oil- Bearing Plants.* *Jeobp* 8(3) pp 258\_263. ISSN 0972- 06OX.
80. **Servais P., Seba P., 2010.** Tela Botanica. Base de Données Nomenclaturale de la Flore de France par Benoît Bock. BDNFF v4.02
81. **Shunying Z., Yang Y., Huaidong Y., et al., 2005.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *J. Ethnopharmacol.* 96 : 151-158.

82. Smallfied B. 2001. Introduction to growth herbs for essential oils, Medicinal and culinary purposes. Crop and Food Reaserch Number 45. p4.
83. Smaoui S., Elleuch L., Bejar W., Karray-Rebai I., Ayadi I., Jaouadi B., Mathieu F., Chouyekh H., Bejar S., Mellouli L., 2010. Inhibition of fungi and Gram-Negative Bacteria by Bacteriocin Bac TN635 Produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635Appl Biochem Biotechnol DOI 10. 1007/s/ 2010-009- 8821-7.
84. Sobhy E.A., El-Feky S.S., 2007. Chemical constituents and antimicrobial activity of *Helichrysum stoechas*. *Asian of Plant Sciences*. 6 :692-695.
85. Sobhy E.A., El-Feky S.S., 2007. Chemical constituents and antimicrobial activity of *Helichrysum stoechas*. *Asian of Plant Sciences*. 6 :692-695.
86. Stevanovits-Banyai E., Tulok M.H., Hegedüs A., Renner C., Varga I.S., 2003. Antioxydant effect to various rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones. *Acta Biologica Zsdiengensis*. 47 :111-113.
87. Tepe B., Sokmen M., Akpulat H.A., 2005. In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey. *Food Chem*. 90: 685-689.
88. Thuille N., Fille M., Nagl M., 2003. Bactericidal activity of herbal extracts. *Int. J. Hug. Environ. Health*. 206 : 217-221.
89. Tomas-Barberan FA, Msonthi JD, Hostettmann K., 1988. Antifungal Epicuticular Methylated Flavonoids from *Helichrysum nitens*. *Phytochemistry* 27: 753-755.
90. Trabut L., 2006. Noms indigènes des plantes d'Afrique du Nord. Edition Ibis Press Paris. p 127.
91. Tsoukatou M., Roussis V., Chinou I. B., Oriz A., (1998).J. Essentiel oil Res.
92. Tutin T. G., Heywood V. H., Burgess N. A., More D. M., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A., 1976. Flora Europaea. Vol. 4, p. 133. Cambridge University Press, Cambridge.
93. Wallace R.J., 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of Nutrition Society*. 63 : 621–629.
94. William G. Hopkins, Charles-Marie E., 2003. Physiologie végétale. De Boeck & Larcier. Bruxelles. Pp : 283, 284.

---

# *Annexes*

---



# ANNEXES

## Annexe 01 : Préparation de quelques milieux de cultures

### Milieux gélosés

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| <b>Gélose nutritive :</b> ..... |        |
| Peptone .....                   | 15     |
| Extrait de viande .....         | 10g    |
| Extrait de levure .....         | 02g    |
| Chlorure de sodium .....        | 05g    |
| Agar .....                      | 20g    |
| Eau distillée .....             | 1000ml |

pH =6,8-7,4

|                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| <b>Gélose Mueller-Hinton</b> ..... |        |
| Infusion de viande de bœuf .....   | 300g   |
| Hydrolysate de caseine .....       | 17.5g  |
| Amidon .....                       | 01.5g  |
| Agar .....                         | 17g    |
| Eau distillée .....                | 1000ml |

pH =7,4

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| <b>Gélose Sabouraud</b> ..... |         |
| Glucose .....                 | 40 g    |
| Peptone .....                 | 10 g    |
| Agar.....                     | 15 g    |
| Eau distillée .....           | 1000 ml |

pH = 7

|   |         |
|---|---------|
| <b>Gélose déxtrosée à la pomme de terre PDA</b> ..... |         |
| Pomme de terre .....                                  | 300g    |
| Agar.....   | 20g     |
| Eau distillée .....                                   | 1000 ml |
| .....   |         |

### Milieux liquides

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| <b>Bouillon nutritif</b> ..... |        |
| Peptone .....                  | 10,0 g |
| Extrait de levure .....        | 5,0 g  |
| Chlorure de sodium .....       | 5,0 g  |
| Eau distillée .....            | 1000ml |

pH = 7,2 ± 0,2.

|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| <b>Bouillon Mueller-Hinton</b> ..... |        |
| Infusion de viande de bœuf .....     | 300g   |
| Hydrolysate de caseine .....         | 17.5g  |
| Amidon .....                         | 01.5g  |
| Eau distillée .....                  | 1000ml |

pH =7,4