

N° Ref :.....

Centre Universitaire de Mila

Institut des Sciences et de la Technologie
Département des Science de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé En vue de l'obtention du diplôme de Master

En :

Filière : Biologie

Spécialité : Biologie Appliquée et Environnement

Option : Biochimie et microbiologie appliquées

Thème :

**Activité antibactérienne des extraits de
Santolina africana L.**

**Préparé par : BOUREGHDA Ibtissem
KECIES Hadjer**

Soutenu le 08/06/2014 devant le jury :

- | | | |
|--------------------------------|--------------------|------------------------------|
| - Président : YAHIA Abdelouhab | Professeur | Centre Universitaire de Mila |
| - Examineur : SIDANI Saïd | Maitre assistant A | Centre Universitaire de Mila |
| - Promoteur : ZOUAGHI Mohammed | Maitre assistant A | Centre Universitaire de Mila |

Année universitaire : 2013/2014

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce travail.

Nous tenons à remercier sincèrement Monsieur Zouaghi MOHAMED, qui, en tant qu'encadreur de notre mémoire de fin d'étude, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce travail, ainsi pour que l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer.

Nous remercions également le Pr. Yafia Abdelouhab pour avoir accepté de présider le jury ainsi que Monsieur Sidani Said pour sa participation à l'évaluation de notre travail.

Nos remerciements s'étendent également aussi à tous nos enseignants durant les années des études, et en particulier à M.r: Boutellaa Saber qui n'a jamais hésité de nous venir humblement en aide.

SOMMAIRE

Liste des abréviations.....	v
Liste des figures.....	iii
Liste des tableaux.....	iv
Introduction.....	1

Première partie : Synthèse bibliographique

I.1. Plantes médicinales et phytothérapie.....	2
I.1.1.Plantes médicinales	2
I.1.2.Phytothérapie.....	2
I.1.2.1. Différents types de phytothérapie	3
I.1.2.2. Avantages et limites de la phytothérapie	3
I.2. Plante médicinale sélectionnée	4
I.2.1. Aspect botanique	4
I.2.2. Classification	4
I.2.3. Biotope et répartition géographique	5
I.2.4. Phytochimie	5
I.2.5. Usage traditionnel	6
I.3. Bioactivité des substances d'origine végétale	6
I.3.1. Composés phénoliques	6
I.3.1.1. Biosynthèse des composés phénoliques.....	7
I.3.1.2. Principales classes de composés phénoliques	7
I.3.1.2.1. Acides phénoliques.....	8
I.3.1.2.2. Flavonoïdes.....	9
I.3.1.2.2.1. Biosynthèse des flavonoïdes.....	11
I.3.1.2.2.2. Bioactivité des flavonoïdes.....	12
I.3.1.2.3.Tanins	13
I.3.1.2.3.1. Catégories de Tanins.....	13
I.3.1.2.3.2. Activités biologique et pharmaceutique des tannins.....	13
I.3.2. Alcaloïdes.....	14
I.3.2.1. Classification.....	14
I.3.2.2. Rôle biologique des alcaloïdes.....	14
I.3.3. Huiles essentielles et composés terpéniques.....	15

I.3.3.1. Huiles essentielles	15
I.3. 3.2. Les composés terpéniques.....	15
I.3. 3.3. Activités biologiques.....	15

Deuxième partie : Matériel et méthodes

II.1. Matériel.	16
I.1.1. Matériel végétal.	16
I.1.2. Matériel relatif au test antibactérien.....	16
II.2. Méthodes	17
II.2.1. Préparation des extraits (aqueux, méthanolique et chloroformique).....	17
II.2.2. Détermination des rendements d'extraction.....	19
II.2.3. Screening phytochimique.....	19
II.2.4. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM).....	21
II.2.4.1. Principe.....	21
II.2.4.2. Mode opératoire.....	22
II.2.5. Screening de l'activité antibactérienne.....	23

Troisième partie: Résultats et discussion

III .1. Résultats	28
III.1.1. Rendements d'extraction.....	28
III.1.2. Etude phytochimique (qualitative) de <i>S. africana</i>	29
III.1.3. Analyse chromatographique sur couche mince (CCM) des extraits de <i>S. africana</i>	29
III.1.4. Activité antibactérienne des extraits de <i>S. africana</i>	32
III.1.4.1. Détermination des antibiogrammes des souches testées.....	32
III.1.4.2. Activité antibactérienne des extraits de <i>S. africana</i> sur les souches testées.....	34
III.2. Discussion	37
III.2.1. Préparation des extraits et rendements d'extraction.....	37
III.2.2. Screening phytochimique et analyse chromatographique (CCM) des extraits.....	38
III.2.3. Activité antibactérienne.....	39
Conclusion	41
Références	42
Annexes	

Liste d'abréviation

ATB : Antibiotique

ATCC : American type culture collection = Collection américaine des cultures type.

CCM : Chromatographie sur couche mince

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

DO : Densité optique

E.Aq : Extrait aqueux

E.Ch : Extrait chloroformique

E.Mét : Extrait méthanolique

F_eCl₃ : Chlorure ferrique

HCl : Acide chlorhydrique

H₂SO₄ : Acide sulfurique

KI : Iodure de potassium

MeOH : Méthanol

mg : Milligramme

mg/ml : Milligramme par millilitre

min : Minutes

ml : Millilitre

mm : Millimètre

NaOH : Hydroxyde de sodium

NH₄OH : Hydroxyde d'ammonium

nm : Nanomètre

O.M.S : Organisation Mondiale de la Santé

R : Rendement

Rf : Rapport frontal

T/min : Tour par minute

UV : Ultra-Violet

UFC : Unité formant colonie

V : volume

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

µg : Microgramme

Numéro de la figure	Titre de la figure	Page
1	Aspect morphologique de la plante <i>Santolina africana</i>	4
2	Voies de biosynthèse des composés phénoliques	7
3	Structure de base des flavonoïdes	9
4	Voies de biosynthèse des flavonoïdes	12
5	Etape d'évaporation et de concentration de l'extrait au moyen d'un rotavapeur	18
6	Protocole d'extraction	18
7	Organisation de la plaque de CCM et vue plongeante d'une cuve de CCM	22
8	Etape d'ensemencement par écouvillonnage	24
9	Découpage des puits sur gélose Muller-Hinton	25
10	Distribution des dilutions des différents extraits dans les puits	25
11	Application des antibiotiques	26
12	Histogrammes de rendements des différents extraits de <i>S. africana</i>	27
13	Chromatogramme des extraits méthanolique (E. Mét), chloroformique (E.Ch) et aqueux (E. Aq).	29
14	Effet inhibiteur des antibiotiques sur la croissance des souches bactériennes testées	32
15	Histogrammes de sensibilité des souches bactériennes testées vis-à-vis des antibiotiques utilisés (IPM, CIP, NA, FOX)	32
16	Action inhibitrice des extraits méthanolique, chloroformique et aqueux sur les trois bactéries <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> et <i>S. epidermis</i>	33
17	Histogramme de sensibilité de <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> et <i>S. epidermis</i> vis-à-vis des extraits méthanolique et chloroformique	34

Numéro du Tableau	Titre du Tableau	Page
I	Principaux acides hydroxycinnamiques	8
II	Principaux types de coumarines	8
III	Principaux acides hydroxybenzoïques	9
IV	Structure de quelques classes de flavonoïdes	10
V	Provenance des germes bactériens étudiés	16
VI	Listes des antibiotiques et leur famille	17
VII	Rendement et caractéristiques des différents extraits bruts de <i>S. africana</i>	27
VIII	Résultats des tests phytochimiques sur la partie aérienne de <i>S. africana</i>	28
IX	Rf et couleur des bandes des différents extraits observées à l'œil nu	30
X	Rf et apparence des bandes séparées de l'E.Mét révélées sous lampes UV	30
XI	Rf et apparence des bandes séparées de l'E.Ch révélées sous lampes UV	31
XII	Rf et apparence des bandes séparées de l'E.Aq révélées sous lampes UV	31
XIII	Diamètres des zones d'inhibition induites par les extraits de <i>S. africana</i> et par les antibiotiques NA, FOX, IPM (30µg/disque) et CIP (50µg/disque)	35

Introduction

Depuis la nuit des temps, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soulager toutes sortes de maladies et douleurs. L'effet thérapeutique de telles plantes est dû à la présence de centaines, voire de milliers de composés naturels bioactifs accumulés dans ses différents organes. En effet, ces substances ont des actions spécifiques sur les divers systèmes de l'organisme (circulatoire, respiratoire, nerveux, endocrinien, immunitaire...).

Aujourd'hui les plantes sont de plus en plus utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour l'extraction des principes actifs afin de développer des médicaments plus efficaces. Par exemple, il est difficile d'imaginer le monde sans la quinine (extraite d'une plante du genre *Cinchona*), qui est employée contre la malaria, ou sans la dioxine (du genre *Digitalis*), qui traite les troubles cardiaques, ou encore sans l'éphédrine (du genre *Ephedra*), que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes. Ces trois plantes, ainsi que beaucoup d'autres, sont largement utilisés en médecine traditionnelle (**Iserin, 1997**).

Des milliers d'espèces végétales médicinales couvrent les quatre coins du monde. La flore végétale algérienne se caractérise par sa richesse et par sa diversité. Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal de l'Algérie, se trouve le genre *Santolina*. Ce dernier est distribué dans différentes régions. Certaines de ses espèces sont utilisées comme plantes d'ornementation dans les jardins mais aussi en médecine traditionnelle pour leurs vertus thérapeutiques. Parmi les espèces les plus connues se trouve *Santolina africana* qui a fait l'objet de certains travaux de recherches visant la caractérisation de ses principes actifs et la détermination de ses propriétés biologiques. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier cette espèce aromatique afin d'apporter notre contribution et enrichir les connaissances qui se rapportent à cette plante.

Le présent travail a été entrepris dans le but d'une évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de la partie aérienne de *Santolina africana*. Pour en arriver, l'étude est passée par plusieurs étapes résumées dans ce qui suit :

- *Préparation des différents extraits (aqueux, méthanolique et chloroformique).
- *Etude phytochimique des extraits obtenus.
- *Enfin, évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits préparés.

Première partie :
Synthèse
bibliographique



I. Synthèse bibliographique

I.1. Plantes médicinales et phytothérapie

Malgré les multiples progrès de la médecine moderne, un net regain d'intérêt vis-à-vis de la phytothérapie est enregistré. Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), plus de 80% de la population mondiale ont recours à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes liés à leur santé (**Farnsworth et al., 1986**).

La majorité des espèces végétales recensées sur la planète ont des vertus médicinales (**Millogo et al., 2005**). Cette propriété est étroitement liée à la composition phytochimique de ces plantes dont les principes actifs constituent aujourd'hui les composants de base de nos médicaments et produits de soins (**Hans, 2007**).

I.1.1. Plantes médicinales

Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une de leurs parties possède des propriétés médicamenteuses (**Farnsworth et al., 1986**). Elles sont utilisées pour prévenir, soigner ou soulager divers maux.

Environ 35000 espèces de plantes sont employées à travers le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Ces plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (**Elqaj et al., 2007**).

L'action phytothérapique des plantes repose sur les milliers de substances chimiques actives (métabolites secondaires) qu'elles contiennent (**Iserin et al., 2001**). La recherche de telles molécules et leur séparation est devenu, actuellement, une priorité en industrie pharmaceutique, dans le souci de développer des médicaments efficaces et sans effets secondaires négatifs.

I.1.2. Phytothérapie

Le mot «phytothérapie» se compose de deux racines grecques : *phyton* et *therapeia* qui signifient respectivement "plante" et "traitement" (**Axel, 2001**). Cette discipline est fondée donc sur l'emploi des substances actives d'origines végétales (**Frank et al., 2009**), c'est-à-dire une façon de mettre à profit les propriétés médicinales des végétaux en utilisant les plantes, en partie ou en totalité, sous formes de préparations dites « galéniques », afin de soigner ou de prévenir les maladies.

La phytothérapie s'intéresse aussi bien à la structure intrinsèque qu'à la composition chimique des plantes, elle décrit les possibilités et les limites de l'application des produits

phytothérapeutiques aux indications de la médecine humaine (**Fenni, 1991**). Pour cela, elle fait appel à de nombreuses disciplines notamment: l'anatomie, la chimie, la biologie, la physiologie, la pharmacologie et la pharmacognosie (**Hurbielle et Paris, 1981**).

I.1.2.1. Différents types de phytothérapie

Selon la nature du remède végétal utilisé et son mode de préparation, plusieurs types phytothérapeutiques se distinguent tels que :

- Aromathérapie (utilisation des essences ou huiles essentielles secrétées par de nombreuses familles de plantes pour traiter un certain nombre d'états pathologiques.
- Gemmothérapie (fondée sur l'utilisation d'extraits alcooliques de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les racines).
- Herboristerie (repose sur l'emploi de la plante entière ou d'une de ses parties, à l'état frais ou séché, préparée le plus souvent dans de l'eau) (**Zeghad, 2009**).
- Phytothérapie pharmaceutique (utilisation de préparations dosées à base de composés phytochimiques obtenus par extraction : sirops, gouttes, lyophilisats...)(**Strang, 2006**).

I.1.2.2. Avantages et limites de la phytothérapie

Malgré l'énorme progrès réalisé par la médecine moderne, la phytothérapie continue à offrir de multiples avantages. En effet, les plantes constituent une source de remèdes peu coûteuse et d'une utilisation facile. D'autant plus, elles ne présentent pratiquement pas d'effets secondaires si les posologies sont respectées et se caractérisent par une action à la fois douce et profonde (**Frank et al., 2009**).

Cependant, la phytothérapie doit être utilisée avec précaution pour les raisons suivantes (**Turgeon, 2001 ; Grunwald et Jaricke, 2006**).

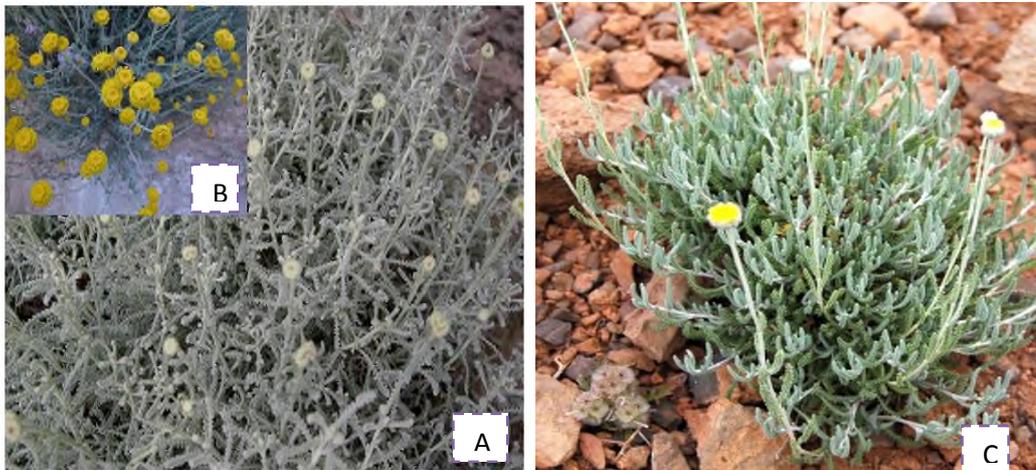
- Données relatives à l'activité pharmacologique des plantes souvent fragmentaires et incomplètes.
- Absence de données toxicologiques quant à l'administration à longue durée, la cancérogénèse et la tératogénèse.
- Arguments cliniques généralement tirés de la tradition et ne comportant pas de travaux rigoureux.
- Absence de méthode d'évaluation fiable de la sécurité et de l'efficacité des plantes médicinales. Si certaines plantes contiennent des principes actifs inoffensifs, l'emploi inconsidéré de certaines d'autres peut aboutir à des intoxications graves voir mortelles.

I.2. Plante médicinale sélectionnée

La plante étudiée dans ce travail appartient au genre *Santolina* qui est représenté par plus de 10 espèces largement distribuées dans la région méditerranéenne (Derbesy et al., 1989). Il s'agit de *Santolina africana* appelée communément santoline. C'est une espèce variable dont on a proposé plusieurs sous-espèces et variétés (Aït Youssef, 2006).

I.2.1. Aspect botanique

La santoline, ou *Santolina africana*, est une plante vivace, buissonnante, présentant une odeur forte et pouvant atteindre une hauteur de 25 à 50 cm. Elle pousse spontanément parmi les rochers, sur les coteaux arides et les crêtes élevées en terrain calcaire (Bellakhdar, 1997 ; Aït Youssef, 2006). Elle à un aspect duveteux et blanchâtre plus au moins abondant, ses tiges sont très ramifiée, rapides, dressées et striées. Les feuilles, d'une largeur de 2 mm, sont un peu charnues, blanchâtres, sessiles, allongées, très étroites et découpées en un grand nombre de dents courtes. Ses fleurs, de couleur jaune dorée, se présentent sous forme de capitules solitaires, longuement pédonculés, entourés d'un involucre semi-sphérique à bractées écailleuses et glabres (Beloued, 2009).



A : Aspect en sous arbrisseau à touffes denses ; B : Fleurs ; C : Feuillage.

Figure 1: Aspect morphologique de la plante *Santolina africana* (Elrhaffari, 2008).

I.2.2. Classification

Règne : Plantae

Embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Asteridae Gamopétales

Ordre : Astérales

Division : Magnoliophyta

Famille : Asteraceae

Genre : Santolina

Espèce : *africana* L. (**Barrero et al., 1999**).

I.2.3. Biotope et répartition géographique

La santoline pousse dans de nombreux pays du bassin méditerranéen (**Kisiel et al., 2003**). Elle se répartit sous les bioclimats arides et subhumides à variantes froides et très froides et dans des étages de végétation du méso-méditerranéen. Assez rustique, la santoline supporte les embruns, le vent, la sécheresse et ne craint aucune maladie, son seul ennemi est l'humidité stagnante (**Benbrinis, 2012**).

En Algérie, cette plante est assez commune sur les Hauts Plateaux, les environs d'Ain-Beida, Sétif et les Aurès (**Beloued, 2009**).

I.2.4. Phytochimie

Plusieurs espèces du genre *Santolina* ont été investiguées phytochimiquement et un nombre de composés acétyléniques (**Christensen, 1992**), d'huiles essentielles (**Sala et al., 2000**), de coumarines (**Ferrari et al., 2005**) et de flavonoïdes (**Giner Pons et Rios Canavate, 2000**) ont été identifiés.

Il paraît que les composés phytochimiques les plus répandus dans les différentes espèces de ce genre et ayant des activités pharmacologiques sont :

*Des sesquiterpènes : Types eudesmane, germacrane et farnesane (**Barrero et al., 1999**).

*Des tri-terpènes : Type dammarane (**Giner Pons et Rios Canavate, 2000**).

*Des hétérocycles acétylènes et des acétylènes de type éther spiroketalenol (**Ferrari et al., 2005**).

Selon **Elrahffari (2008)**, l'huile essentielle extraite de la santoline contient une série de substances qui sont présentes à des taux variables telles que : Spathulenol (45,82%), camphor (7,1%), α -cadinol (5,8%), methoxy-1,2-dihydrobenzene (2,83%), et cis-chrysanthenol (2,52%). En outre, l'extrait solide de cette plante est très riche en un flavonoïde : l'hydroxy-5-pentamethoxy-6,7,8,2',5'-flavone.

I.2.5. Usage traditionnel

La santoline possède des propriétés thérapeutiques bien établies en médecine traditionnelle. Ses graines et son essence sont les plus actives. C'est une plante stimulante, stomachique, antispasmodique, emménagogue et surtout vermifuge, grâce à son huile essentielle (**Elrahffari, 2008**). Elle est utilisée également contre les engorgements de la rate, du foie, les fièvres intermittentes et contre les crampes d'estomac.

La plante est utilisée soit sous forme d'infusion, principalement des sommités fleuries et des feuilles ou sous forme de poudre préparée dans du miel.

Appliquée localement, la poudre peut soulager les douleurs liées aux piqures des insectes comme elle peut accélérer la cicatrisation des plaies (**Ahuja et al., 2005**).

I.3. Bioactivité des substances d'origine végétale

Comme toutes espèces végétales, *S.africana* élabore un certain nombre de substances issues de son métabolisme secondaire qui jouent différents rôles dont celui de moyen de défense contre les agressions externes. Cependant elles ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante.

Les métabolites secondaires des végétaux sont produits en faible quantité, mais ils se caractérisent par une diversité structurale extraordinaire. Certains marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plantes et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique. Les composés phénoliques, les terpénoïdes, les stéroïdes et les alcaloïdes sont des exemples de métabolites secondaires; ils ont de nombreuses applications pharmaceutiques (**Donatien, 2009**).

I.3.1. Composés phénoliques

Ce sont des composés organiques largement distribués dans le règne végétal (**Haslam, 1993**). Ils se caractérisent par une structure de base renfermant un ou plusieurs noyaux aromatiques auxquels sont directement liés un ou plusieurs groupements hydroxyle libres ou engagés dans une liaison avec une autre fonction (éther, ester) (**Bruneton, 1999**).

Les polyphénols naturels regroupent un vaste ensemble de substances chimiques (près de 8000 composés naturels appartiennent à cette famille). Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques, aux composés hautement polymérisés, comme les tannins (**Urquiaga et Leighton, 2000**). Ces composés se divisent en plusieurs catégories : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les saponines (triterpénoïdes) et les lignanes (**SFA, 2005**).

I.3.1.1. Biosynthèse des composés phénoliques

La biosynthèse du noyau aromatique est un des processus fondamentaux de la biochimie végétale. Ce noyau, qui constitue la structure de base des composés phénoliques, est souvent obtenu par la voie de shikimate, générateur des acides aminés aromatiques : tryptophane, tyrosine et phénylalanine. Cette dernière est ensuite métabolisée en suivant la voie des phénylpropanoïdes pour fournir, en plus des principaux acides phénoliques simples (coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique...), des précurseurs de la lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose (Hopkins, 2003 ; Hoffmann *et al.*, 2004) (Figure 2).

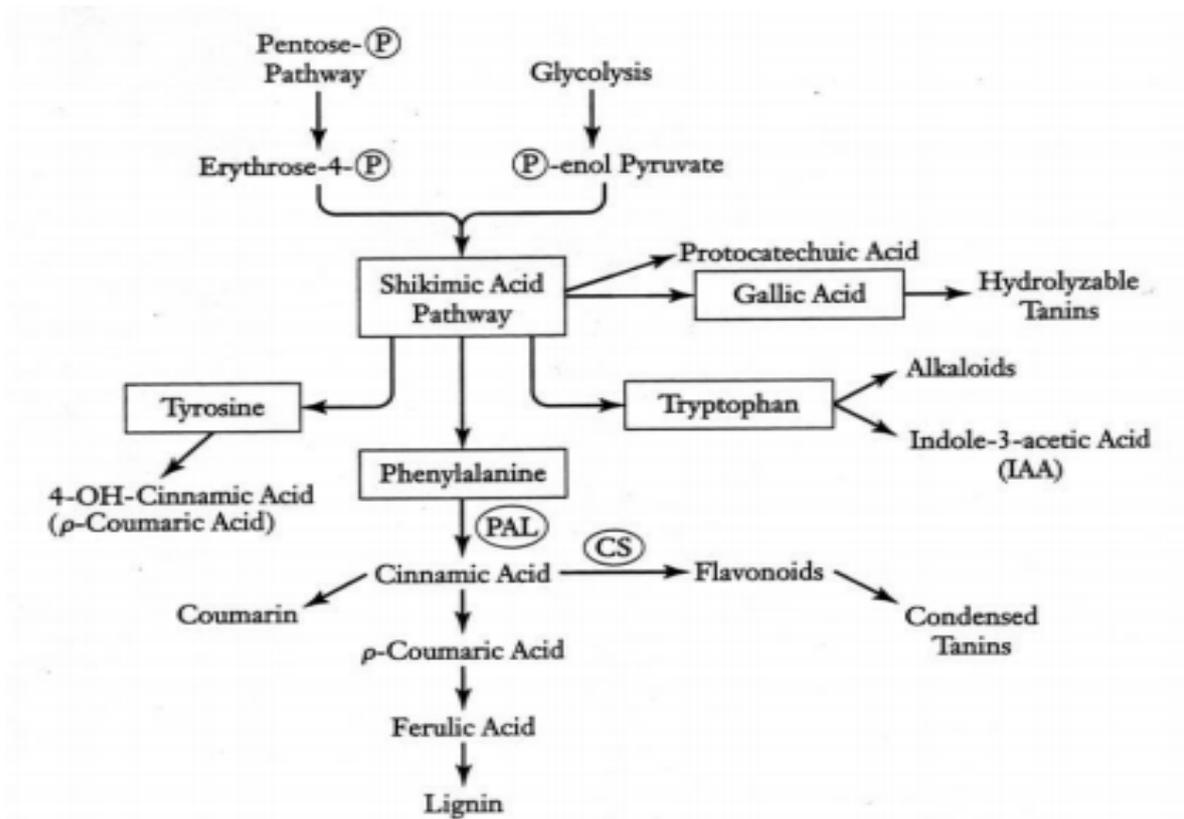


Figure 2 : Voies de biosynthèse des composés phénoliques (Hopkins, 2003).

I.3.1.2. Principales classes de composés phénoliques

Les composés phénoliques se distinguent entre eux par : La complexité du squelette structural de base (allant du plus simple au plus complexe), par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation, etc.) et par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres (glucides, lipides, protéines, etc.) (Herbert, 1989 ; Macheix *et al.*, 2005 ; Beta *et al.*, 2005). De ce fait, ces composés sont

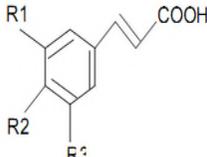
répartis en plusieurs catégories à savoir : les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique, coumarines), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, et les tanins (**King et Young, 1999 ; Tapiero et al., 2002**).

I.3.1.2.1. les acides phénoliques

Il en existe plusieurs, dont chacun d'eux provient d'un précurseur bien déterminé (**Tableaux I, II et III**) :

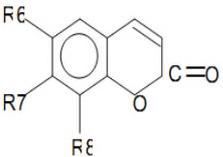
- Acides hydroxycinnamiques (C₆-C₃) : Ils sont d'une distribution large et existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Ils dérivent de l'acide cinnamique.

Tableau I : Principaux acides hydroxycinnamiques (**Sarni-Manchado et Cheyner, 2006**)

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

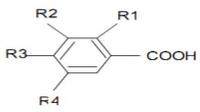
- Coumarines : Elles proviennent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de leurs chaînes latérales.

Tableau II : Principaux types de coumarines (**Macheix et al., 2005**).

Structure	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH3	OH	H	Scopolétol
	OCH3	OH	OH	Fraxétol
	H	OH	OH	Daphnétole

- Acides hydroxybenzoïques (C6-C1) : Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque (comme l'acide vanillique) et se présentent dans la plus part des cas sous forme d'esters ou de glycosides. Ils sont particulièrement représentés chez les gymnospermes et les angiospermes.

Tableau III : Principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynie, 2006).

Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

I.3.1.2.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des substances aromatiques généralement colorées très répandues chez les végétaux, ils se retrouvent dans toutes les parties de la plante y compris les feuilles, les racines, les tiges, les fleurs, le pollen, le nectar, les graines et l'écorce (Cermak *et al.*, 1998 ; Tim et Lamb, 2005). On estime que 2 % environ du carbone organique photo-synthétisé par les plantes, soit quelques 10⁹ tonnes par an, est converti en flavonoïdes (Lhuillier, 2007).

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules (Tableau IV), dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones et les anthocyanes (Bruneton, 1999).

Les flavonoïdes résultent de la substitution d'une structure de base (figure 3) par différents groupements : Hydroxy, méthoxy, méthyl, benzyl et isoprényl (Kueny-Stotz, 2008).

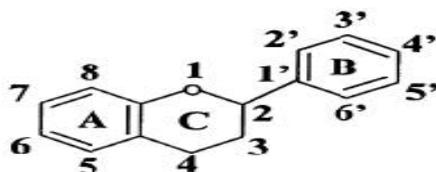


Figure 3: Structure de base des flavonoïdes (Tim et Lamb, 2005)

Tableau IV: Structure de quelques classes de flavonoïdes (résumé à partir de **Gamet-Payraastre et al., 1999**).

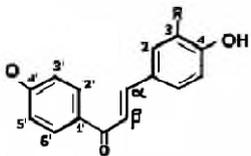
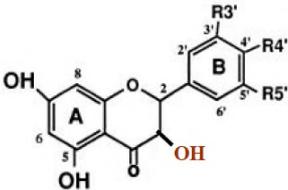
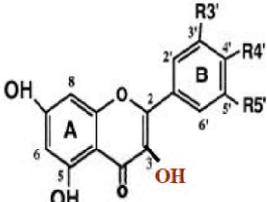
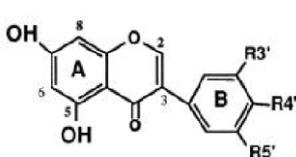
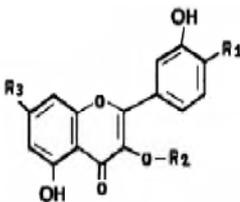
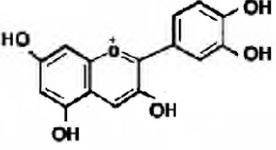
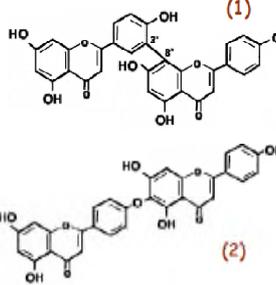
Classes	Structure chimique	Caractéristiques
Chalcones		Présentent un chaînon tricarboné cétonique α-β-insaturé (Markham, 1982).
Flavanonols		Caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3 (Lee et al., 1994). Ils diffèrent des flavones par la présence de groupement hydroxyles en C3 (Pierpoint, 1986).
Flavonols		Caractérisés par la présence de la double liaison entre C2 et C3. Ils diffèrent des Flavones par leur possession d'un groupement hydroxyl en C3 (Formica et Regelson, 1995).
Isoflavonoïdes		Caractérisés par un enchaînement en C6-C3-C6, obtenus par cyclisation des chalcones dans lesquels le noyau B est lié au C3 du noyau C (Hahlbrock, 1981).
Hétérosides flavonoïdiques (Flavonoïdes-O-glycosides)		Un ou plusieurs groupements hydroxyles sont liés à un ou plusieurs sucres par une liaison acide labile. Le sucre est habituellement un glucose, un galactose ou un rhamnose.

Tableau IV (suite) : Structure de quelques classes de flavonoïdes (résumé à partir de Gamet-Payrastre *et al.*, 1999).

<p>Anthocyanidines</p>		<p>Possèdent un hétérocycle de type benzo-pyroxonium à oxygène tétravalent. Ils sont responsables de la couleur rouge, bleu et pourpre des fruits.</p>
<p>Biflavonoïdes</p>		<p>Résultent de la condensation de deux flavonoïdes par des liaisons de type carbone-carbone(1) ou de type éther (2).</p>

I .3.1.2.2.1. Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont tous une origine biosynthétique commune. De ce fait, ils possèdent le même élément structural de base. L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation, catalysée par la chalcone synthase, d'une unité de phénylpropanoïde avec trois unités de malonyl-CoA (**Figure 4**). Cette chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la synthèse des divers flavonoïdes (**Bruneton, 1999**).

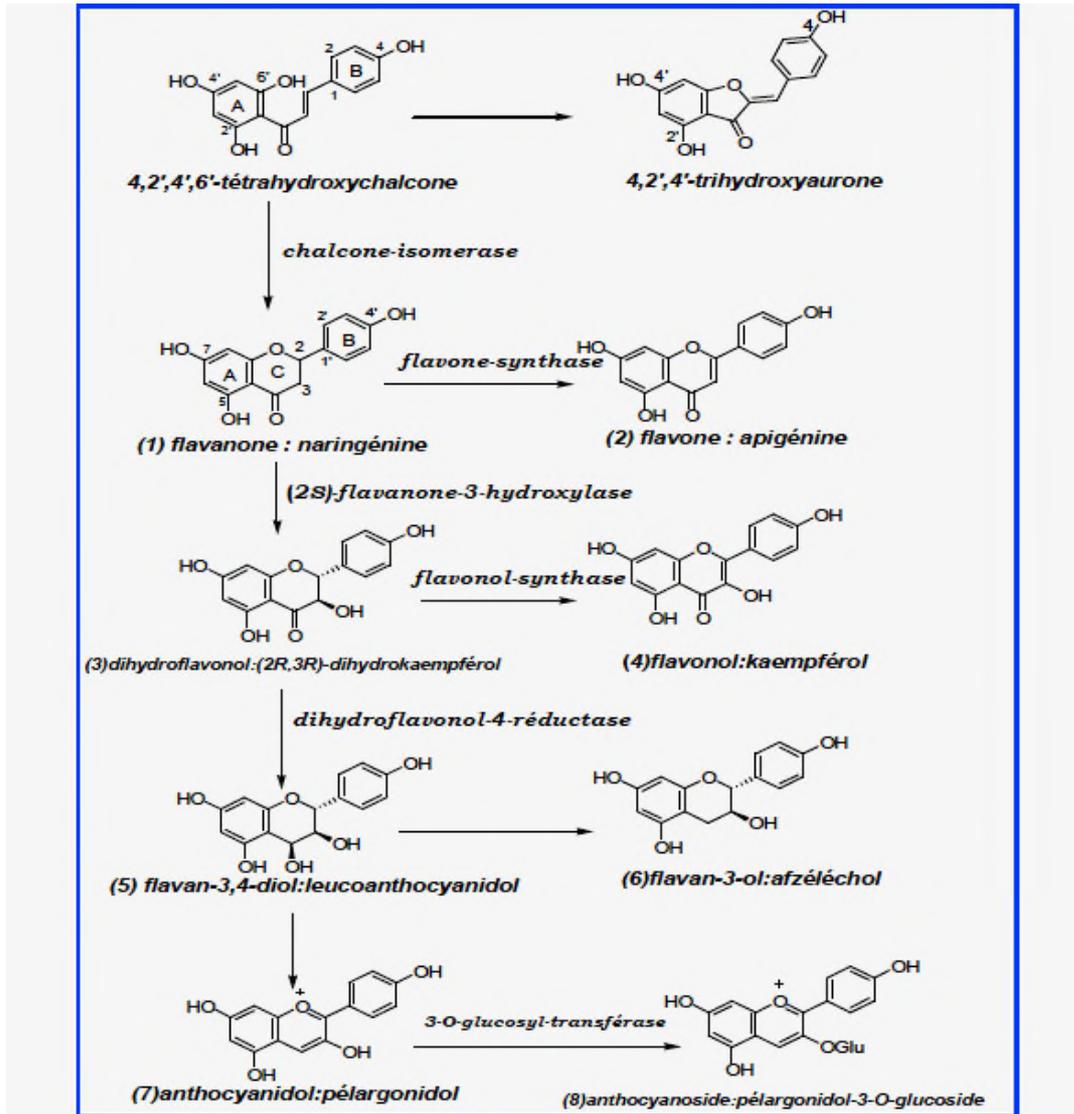


Figure 4 : Voies de biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999)

I .3.1.2.2.2. Bioactivité des flavonoïdes

Grace à leur structure polyphénolique et les groupements fonctionnels qui la substituent, les flavonoïdes et les polyphénols, d'une manière générale, pourraient exercer différents rôles :

- Intervenir dans les chaînes d'oxydo-réduction et modifier certaines réactions concernant la croissance, la respiration, la morphogenèse et la lignification (Merghem, 2009).
- Exercer des effets antimicrobiens puisqu'ils sont de puissants inhibiteurs *in vitro* de l'ADN gyrase (Ohemeng, 1993).

- Exercer des activités anti-inflammatoire, antivirale, détoxifiant, antioxydant, anti-tumoral, anti-thrombotique... (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

I .3.1.2.3. Tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée. Ils sont particulièrement abondants dans certaines familles de plantes comme les conifères, les fagacées et les rosacées (**Ghesterm et al., 2001**). Le goût amer et astringent des parties aériennes de ces végétaux revient en fait à ces structures chimiques qui constituent un moyen de protection contre les animaux herbivores.

Les tanins se caractérisent aussi par leur capacité de se combiner aux protéines, ce qui leur donne cette faculté de tanner la peau.

I .3.1.2.3.1. Catégories de Tanins

Selon Merghem (2009), Les tanins se répartissent en deux classes, les tanins hydrolysables et les tanins condensés :

- **Tanins hydrolysables** : Ce sont des hétéro-polymères dont l'hydrolyse chimique ou enzymatique libère, en plus du sucre (généralement du glucose), de l'acide gallique (cas des gallo-tannins) ou de l'acide ellagique (cas des ellagitannins).
- **Tanins condensés (tannins vrais ou tannoïdes)** : Ils résultent de la condensation de molécules élémentaires de type flavan-3-ol (catéchines) ou flavan-3-4-diols (leuco-anthocyanidines). Les liaisons formées sont de type C-C, résistantes à l'hydrolyse. Les tannins condensés sont également des pro-anthocyanidines ; en effet leur oxydation en milieu alcool-acide à chaud entraîne la formation de pigments anthocyaniques tels que les cyanidines et les delphinidines .

I .3.1.2.3.2. Activités biologiques et pharmaceutiques des tannins

Différents travaux de recherche suggèrent que les tanins sont doués de propriétés diverses :

- Anti-diarrhéique, cicatrisante, vasoconstricteur (**Paolini et al., 2003**).
- Antimicrobienne, antivirale (**Hong et al., 2000**).
- Anti-inflammatoire et antimutagène (**Kaur et al., 2000**).
- Antioxydante (**Merghem, 2009**).

I .3.2. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques naturels, le plus souvent d'origine végétale. Ils ont une structure hétérocyclique renfermant un azote (N) comme hétéroatome ce qui les rapproche des amines. A l'état naturel, les alcaloïdes sont généralement salifiés par des acides organiques (tartrates, malates) ou combinés à des tanins, peu solubles dans l'eau, soluble dans le chloroforme, l'éther, l'alcool, le toluène, et l'éther de pétrole (Merghem, 2009).

I .3.2.1. Classification

Selon Merghem (2009), les alcaloïdes sont classés comme suite :

- **Pseudo-alcaloïdes** : Leur squelette carboné résulte de la condensation de 4 unités acétiques (4 malonyl-CoA), l'hétéroatome n'est incorporé qu'à la fin de la phase de synthèse.
- **Proto-alcaloïdes** : Ils sont élaborés à partir d'acides aminés, leur azote n'est pas inclus dans le système hétérocyclique (exemple : mescaline, hordéine, éphédrine, colchicine).
- **Alcaloïdes vrais** : Ces composés sont répartis selon la nature de leur cycle. Ils sont bio-synthétiquement formés à partir d'acides aminés. Leur atome d'azote est inclus dans un hétérocycle.

I .3.2.2. Rôle biologique des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont doués de nombreuses propriétés biologiques et médicamenteuses :

- Pourraient être des produits d'excrétion du métabolisme azoté chez les plantes, et jouer un rôle de protection de ces végétaux vis-à-vis des prédateurs et des herbivores (Merghem, 2009).
- Trouvent plusieurs applications pharmaceutiques chez l'homme (McCalley, 2002 ; Silvestrini et al., 2002 ; Stöckigt et al., 2002) en tant que : Antalgiques (morphine), spasmolytiques (tubocurarine et papavérine), vasodilatateurs (vincamine et ajmalicine), antitussifs (codéine), anti-arythmiques (quinidine et ajmaline), antipaludiques (quinine).

I .3.3. Huiles essentielles et composés terpéniques

I .3.3.1. Huiles essentielles

Les huiles essentielles désignent les composants liquides, odorants et hautement volatiles. Elles sont obtenues à partir de toutes les parties de la plante par les méthodes de distillation et contiennent plusieurs familles biochimiques incluant les alcools, les phénols, les esters, les oxydes, les sesquiterpènes, les terpénols, les cétones, les aldéhydes,...etc. Ces huiles ne renferment aucun acide gras, ni d'autres corps gras et se caractérisent par leur solubilité dans les solvants organiques polaires, à l'inverse des huiles fixes (**Bastien, 2008**).

Les huiles essentielles se rencontrent dans un nombre limité d'Angiospermes. Parmi les familles riches en ces substances les Myrtacées (*Eucalyptus*), les Rutacées (*Pyrus malus*, *Citrus*), les Lauracées (*Nerium*), les Labiées (*Thymus*, *Mentha*, *Lavandula rosmarinus*, *Origanum*) et les Astéracées (Camomille, *Inula*, *Santolina africana*) (**Merghem, 2009**).

I .3.3.2. Composés terpéniques

Ce sont des produits naturels, résultant de l'assemblage d'un nombre entier d'unités isopréniques conduisant à la formation de composés terpéniques de plus en plus complexes tels que : les hormones (gibbérellines, acide abscissique), les pigments caroténoïdes (carotène, xanthophylle), les stérols et leurs dérivés (ergostérol, sitostérol, saponosides...) (**Hopkins, 2003**).

I .3.3.3. Activités biologiques

La considération donnée aux huiles essentielles revient en fait à leurs propriétés aromatiques et pharmacologiques. Certaines d'entre elles possèdent des effets antiseptiques (antibactériens et antifongiques) assez puissants. Elles agissent par lésions membranaires, par inhibition de la croissance cellulaire, de la sporulation et de la toxigenèse (**Gabriel et al., 2013**).

Les composés terpéniques expriment aussi des effets contre les bactéries, les mycètes, les virus et les protozoaires en provoquant une rupture de leur membrane grâce aux composés lipophiles (**Cowan, 1999**).

Deuxième partie :
Matériel et Méthodes



II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel végétal

L'espèce végétale concernée par notre étude est une plante aromatique utilisée par fois comme plante d'ornementation dans les jardins. Il s'agit de *Santolina africana*. Elle a été récoltée au stade de floraison au mois de juin 2013, dans la localité de Mila. L'identification botanique de l'espèce a été faite par le Pr. Laouar H. (laboratoire de biologie et physiologie végétale, université de Sétif).

Après récolte des parties aériennes de la plante, ces dernières sont séchées à température ambiante et à l'abri de la lumière puis finement broyées à l'aide d'un mixeur. Le broyat est ensuite conservé jusqu'à son utilisation.

II.1.2. Matériels relatifs au test antibactérien

- **Souches bactériennes :** Toutes les bactéries testées (**Tableau V**) sont conservées et maintenues en vie par des repiquages continus, sur des milieux de culture solides et liquides.

Tableau V : Provenance des germes bactériens étudiés

Souches utilisées	Code de la souche	Provenance
<u>Souches référencées :</u>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Laboratoire de microbiologie de l'Université de Constantine
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	
<u>Souches cliniques :</u>		
<i>Proteus sp.</i>		Isolées à partir de prélèvements faits auprès des malades ayant des infections urinaires, au niveau du laboratoire de bactériologie de l'hôpital de Jijel (EPH).
<i>Bacillus sp.</i>		
<i>Streptococcus epidermis</i>		

*(ATCC = American Type Culture Collection).

- **Milieux de culture :** Les milieux généralement utilisés au cours des tests antibactériens sont le bouillon nutritif (pour l'enrichissement et l'entretien des souches bactériennes), la gélose nutritive (pour l'isolement et la conservation) et la gélose Muller-Hinton (pour l'évaluation de la sensibilité aux agents antibactériens).
- **Disques d'antibiotiques :** Ils servent de contrôle positif et pour la détermination de la sensibilité des souches vis-à-vis de ces antibiotiques. Ces disques ont été procurés auprès du laboratoire de microbiologie de l'hôpital « Maghlawa » de Mila. Ces antibiotiques sont : Impénène (IMP), acide nalidixique (NA), ciprofloxacine (CIP) et céfoxitine (FOX) (**Tableau VI**).

Tableau VI : Listes des antibiotiques et leur famille.

ATB	Famille	Dose par disque
Impenène (IPM)	Bêta-lactamine	30 µg
Cefoxitine (FOX)	Bêta-lactamine	30 µg
Ciprofloxacine (CIP)	Quinolone	50µg
Acide nalidixique (NA)	Quinolone	30µg

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation des extraits (aqueux, méthanolique et chloroformique)

Les différents extraits de la plante *S. africana*, qui ont servi pour le screening phytochimique, l'étude qualitative par CCM et pour les tests d'activité antibactérienne ont été préparés par macération prolongée à température ambiante.

Trois prises d'essai, de 40 g chacune, de poudre fine de la partie aérienne (feuilles et tiges) de *S. africana* ont été réparties dans trois flacons différents contenant environ 300 ml d'eau distillée, de méthanol et de chloroforme respectivement. Les suspensions du matériel végétal ont été ensuite laissées à macérer pendant 5 jours en subissant des agitations occasionnelles.

A la fin de l'extraction, une série de filtration (sur tissu et sur coton) suivie d'une centrifugation (5000 tours/min pendant 10 minutes) ont été faites dans le but d'une élimination complète de toutes traces de résidus solides. Les filtrats obtenus ont été concentrés sous pression réduite au moyen d'un évaporateur rotatif (**Figure 5**), puis séchés

dans une étuve à la température de 40 à 45°C. Les résidus secs résultants sont mis dans des flacons teintés et conservés à basses températures pour l'utilisation ultérieure (Figure 6).



Figure 5 : Etape d'évaporation et de concentration de l'extrait au moyen d'un rotavapeur (Büchi R-134).

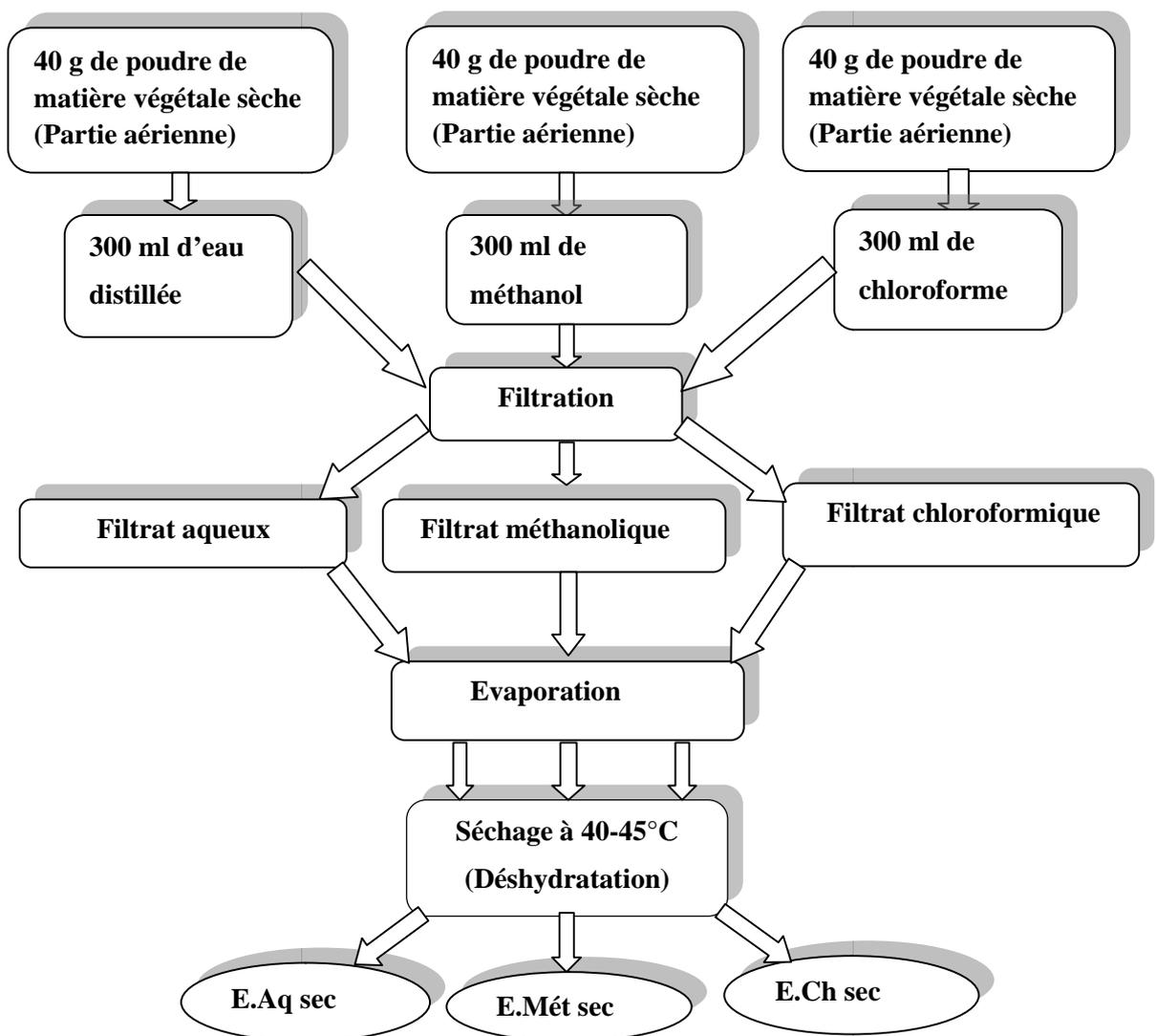


Figure 6 : Protocole d'extraction

II.2.2. Détermination des rendements d'extraction

Le rendement d'extraction brute donné par chacun des solvants utilisés a été calculé par la formule suivante:

$$R(\%) = (M/M_0) \times 100$$

R (%) : Rendement exprimé en %.

M : Masse en gramme de l'extrait sec résultant

M₀ : Masse en gramme du matériel végétal traité

II.2.3. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques (Screening) sont des tests purement qualitatifs permettant de mettre en évidence et de caractériser les différents groupes chimiques contenus dans les extraits végétaux. Ils sont basés sur des réactions de coloration et/ou de précipitation. Des observations sous lampe UV peuvent être aussi utiles.

Les résultats ont été évalués comme suite : (+): Test positif ou présence, (-) : Test négatif ou absence. Ces tests ont touchés les différents extraits de la partie aérienne de la plante.

➤ Détection des alcaloïdes en milieu acide

A 0.3 g de poudre de la plante, ajouter 3 ml de HCl dilué à 5% et laisser sous agitation pendant 30 minutes puis filtrer. Placer 1ml du filtrat dans un tube à essai et mettre quelques gouttes de réactif de Wagner ou de Mayer. La présence des alcaloïdes est confirmée par la formation d'un précipité ou d'un trouble brun (avec réactif Wagner) ou blanc (avec réactif de Mayer) (**wagner, 1984**).

➤ Détection des substances polyphénoliques

La caractérisation des polyphénols est basée sur une réaction au chlorure ferrique (FeCl₃). A 2 ml de chaque extrait (aqueux et méthanolique), une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2% est ajoutée. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée fut le signe de la présence des polyphénols (**Békro et al., 2007**).

➤ **Recherche des flavonoïdes**

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml de l'extrait avec 1 ml d'HCl concentré et 0,5 g de tournure de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe au bout de 3 minutes (**Bruneton, 1993**).

➤ **Recherche des anthocyanes**

La présence d'anthocyanes dans un décocté ou un infusé est indiquée par une coloration rouge qui s'accroît par l'addition de HCl dilué et vire au bleu-violacé-verdâtre par l'ajout d'ammoniaque (**wagner, 1984**).

➤ **Recherche des coumarines**

Les coumarines sont révélés à partir de 5 ml d'extrait placé dans un tube porté à ébullition jusqu'à l'obtention d'un volume de 1 ml, ce volume est additionné de 1ml d'eau chaude. Après agitation, le volume total est divisé en deux parties, l'une sert de témoin et l'autre est additionnée de 0.5 ml de NH₄OH à 10% puis examiné sous lampe UV. L'émission de la fluorescence indique la présence des coumarines (**Bruneton, 1999**).

➤ **Détection des tanins et tanins catéchiqes**

A 2 ml d'un filtrat obtenu par décoction de 0,5 g de poudre végétale, on ajoute quelques gouttes de FeCl₃ à 1 %. Le développement d'une coloration bleue-foncée, noire ou verte après agitation du mélange indique la présence de tanins.

Pour la recherche des tanins catéchiqes, on chauffe à 90°C un mélange constitué de 30 ml du filtrat précédent et 15 ml de réactif de Stiasny. L'obtention d'un précipité rose quantitativement important indique la présence de ces composés (**Wagner, 1984**).

➤ **Recherche des anthraquinones**

Pour la détection des anthraquinones, 10 ml d'extrait sont ajoutés à 5 ml de NH₄OH à 10%. Après agitation, l'apparition d'un anneau rouge indique la présence d'anthraquinone (**Oloyede, 2005**).

➤ **Recherche des composés réducteurs (les glycosides)**

Pour détecter ces molécules, un mélange constitué de 1 ml d'extrait, 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de liqueur de Fehling est chauffé à 90°C dans un bain marie. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique (**Trease et Evans, 1987**).

➤ **Détection des composés terpéniques (huiles essentielles)**

Les stérols et les terpènes : macérer 1 g de poudre dans 20 ml d'éther pendant 24 heures, filtrer puis compléter de nouveau à 20 ml. Evaporer à sec 10 ml du filtrat dans une capsule puis dissoudre le résidu dans 1 ml d'anhydride acétique puis 1 ml de chloroforme. Partager le volume dans deux tubes à essai, dont l'un servira de témoin. Mettre dans le fond du second tube à l'aide d'une pipette 1 à 2 ml de H₂SO₄ concentré. Il se forme alors à l'interface des deux liquides un anneau rouge brunâtre et la couche surnageant devient verte ou violette en cas de présence de stérols ou de triterpène (**Mogode, 2005**).

➤ **Recherche des saponines (saponosides)**

Les saponosides ou saponines sont caractérisés par leur grand pouvoir tensio-actif naturel dû à leur caractère amphotère. Leur détection est basée sur la détermination de l'indice de mousse.

0,5 g de poudre de l'espèce sont placés dans une fiole conique renfermant 50 ml d'eau bouillante, une ébullition modérée est maintenue durant 30 minutes (chauffage à reflux) et la solution est filtrée. 10 ml du décocté sont transférés dans un tube à essai de 16 mm de diamètre et 16 cm de longueur puis agités énergiquement pendant 15 secondes. Après un repos de 15 minutes, la présence de saponosides est confirmée par une hauteur de mousse de plus de 1cm dans le tube (**Wagner, 1984**).

II.2.4. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM)

II.2.4.1. Principe

La CCM est une technique d'analyse physico-chimique qui permet de séparer et d'identifier les différents constituants d'un extrait ou d'un mélange donné. Elle utilise deux phases :

- une phase stationnaire constituée d'un adsorbant (généralement un gel de silice, d'alumine ou de cellulose), étalée uniformément sous forme d'une couche mince d'environ 0,25 mm d'épaisseur. Elle peut être appliquée sur une plaque de verre ou une feuille d'aluminium ou de plastique. Son rôle consiste à freiner le déplacement des composés à séparer.
- Une phase mobile constituée d'un mélange de solvants adéquats. Elle exerce une force d'entraînement sur les constituants permettant ainsi leur migration.

La résultante des deux forces d'adsorption et d'entraînement définit la distance qui sera parcourue par chacune des substances présentes.

II.2.4.2. Mode opératoire

L'analyse chromatographique de nos extraits a été réalisée sur des plaques de gel de silice de type 60F254 (support en aluminium). La phase mobile est constituée de quatre solvants : chloroforme/méthanol/acide acétique/eau, aux proportions respectives (200 : 30 : 0.6 : 1) (v/v/v/v) (Males et Medi-ari , 2001).

Pour réaliser cette chromatographie nous avons procédé comme suivant :

- Après désignation de la ligne de dépôt (à 1,5 cm du bord inférieur de la plaque), les plaques sont activées dans une étuve à 100°C pendant 10 minutes.
- Les échantillons sont ensuite déposés sous forme de bande. L'intervalle entre les bandes ne doit pas être inférieur à 1 cm.
- La plaque, étant prête, est déposée dans la cuve de développement préalablement préparée et saturée par les vapeurs du système de solvant.
- Une fois la migration terminée, la plaque est retirée, séchée puis observée à l'œil nu et sous UV aux longueurs d'ondes 254 nm et 365 nm.
- Les distances de migration des différents constituants présents sont alors mesurées et serviront pour le calcul de leur Rf caractéristique.

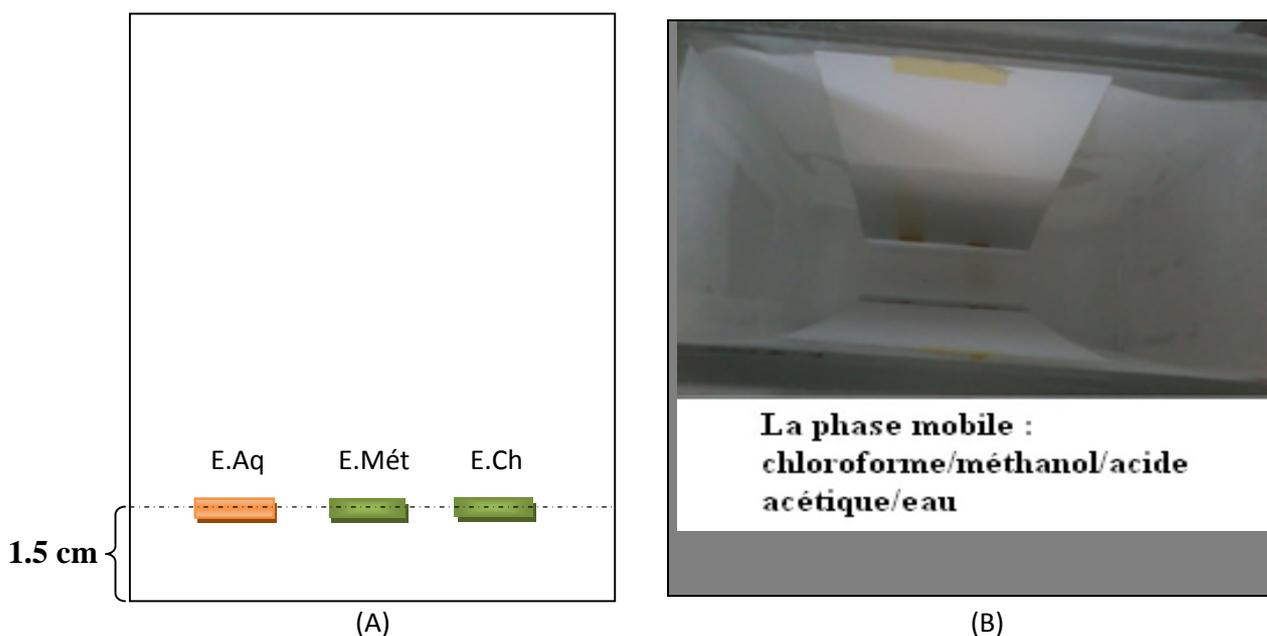


Figure 7 : Organisation de la plaque CCM (A) et vue plongeante d'une cuve de CCM (B)

Le calcul du Rf pour chaque tâche est réalisé par la formule suivante :

$$\text{Rf} = \frac{\text{Distance parcourue par le soluté}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

II.2.5. Screening de l'activité antibactérienne

Les tests d'évaluation de l'activité antimicrobienne nécessitent un travail dans des conditions d'asepsie rigoureuses afin d'éviter les problèmes de contamination. En outre, le matériel, les solutions et les milieux de cultures doivent être stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 15 minutes.

L'inhibition de la croissance bactérienne in vitro a été étudiée par la méthode de diffusion en puits sur gélose telle que décrite par **Berghe et Vlietinck (1991)**.

Le test a porté sur tous les extraits de *S. africana* préparés précédemment et s'est déroulé selon les étapes suivantes :

➤ Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture approprié à cette étude est la gélose Muller-Hinton préparé comme suite :

38 g de gélose Muller-Hinton sont dispersés dans un litre d'eau distillée puis bouillis sous agitation jusqu'à la dissolution complète. Le milieu est ensuite autoclavé à 121°C pendant 15 minutes, et coulé dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre. La gélose doit être répartie uniformément et avoir une épaisseur de 4 mm après refroidissement.

Les boîtes coulées sont conservées à basses températures jusqu'à leur utilisation.

➤ Préparation des suspensions bactériennes

Les souches bactériennes conservées sur gélose incliné sont tout d'abordensemencées sur gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24 heures pour optimiser leur croissance. A partir des cultures jeunes, 3 à 5 colonies bien isolées et identiques sont raclées à l'aide d'une anse de platine et mises en suspension dans 5ml d'eau physiologique stérile puis homogénéisées au moyen d'un vortex. La suspension doit avoir une opacité de 0,5 Mc Farland, correspondant à une densité optique, lue à la longueur d'onde de 625 nm, de 0.08 à 0.10.

Pour l'inoculum de *Staphylococcus aureus*, un ajustement a été effectué (DO de 0,15 à 0,25) afin d'obtenir des colonies confluentes suffisamment denses.

➤ **Préparation des dilutions des extraits de *S. africana***

Les extraits aqueux, méthanolique et chloroformique ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives au demi, sachant que la concentration de la solution mère de chaque extrait est de 300 mg/ml.

➤ **Ensemencement bactérien**

L'ensemencement est réalisée par écouvillonnage à partir d'une suspension bactérienne comptant approximativement 10^6 UFC /ml. Un écouvillon, trempé dans la suspension puis essoré en pressant sur la paroi interne du tube, est frotté en stries serrées sur la totalité de la surface gélosée (**Figure 8**).

Cette opération est répétée plusieurs fois en tournant la boîte de 60° à chaque reprise. L'ensemencement est achevé en passant l'écouvillon une dernière fois sur la surface périphérique de la gélose.



Figure 8 : Etape d'ensemencement par écouvillonnage

➤ **Découpage et remplissage des puits**

Après l'ensemencement des boîtes, des puits de 6 mm de diamètre ont été découpés dans la gélose, à l'aide de pipettes Pasteur puis soudés à leur base avec de la gélose fondue afin de limiter la diffusion des extraits sous le milieu de culture (**Figure 9**).

Dans chaque puits, 20 μ l d'une des dilutions préparées à partir des différents extraits sont introduits. La solution de DMSO a été utilisée comme témoin négatif (**Figure 10**).



Figure 9 : Découpage des puits sur gélose Muller-Hinton

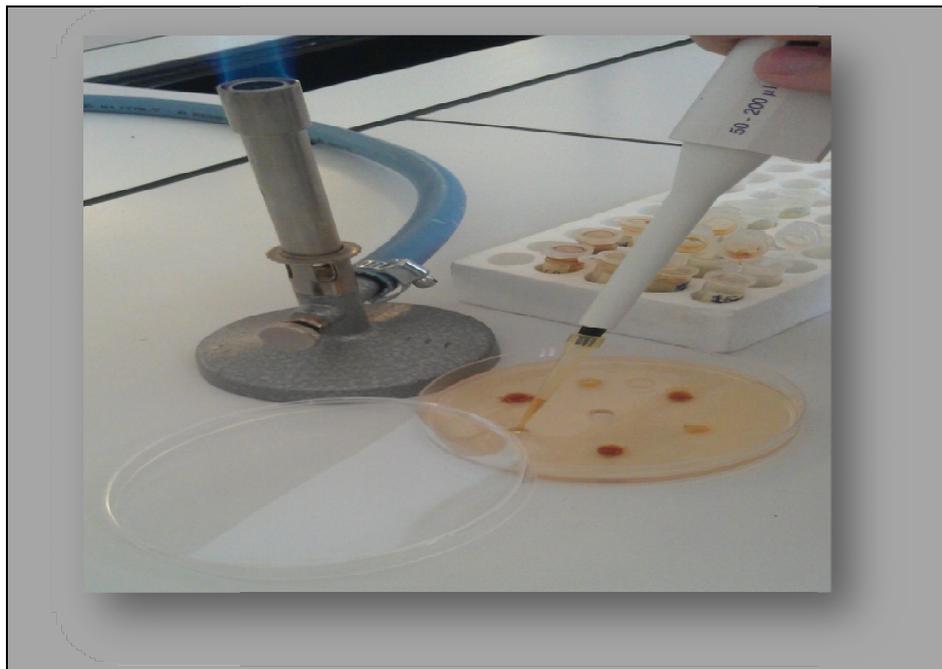


Figure 10: Distribution des différents extraits dans les puits

➤ **Incubation et lecture**

Une fois les différentes dilutions de chaque extrait sont distribuées dans les puits, les boîtes de pétri sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures.

L'appréciation de l'activité antibactérienne s'est effectuée en mesurant le diamètre (en mm) des zones d'inhibition provoquées par les différentes concentrations de nos extraits.

➤ **Test de l'antibiogramme (utilisation des antibiotiques comme témoins positifs)**

Ce genre de test est fréquemment utilisé au niveau des laboratoires des hôpitaux afin d'apprécier la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. Dans notre cas, les disques d'antibiotiques ont été employés comme témoins positifs.

Les disques renfermant les antibiotiques sont appliqués à la surface du milieu Muller-Hinton reparti dans des boîtes de pétri et inoculé (**Figure 11**). Après dépôt des disques, les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures. La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition.

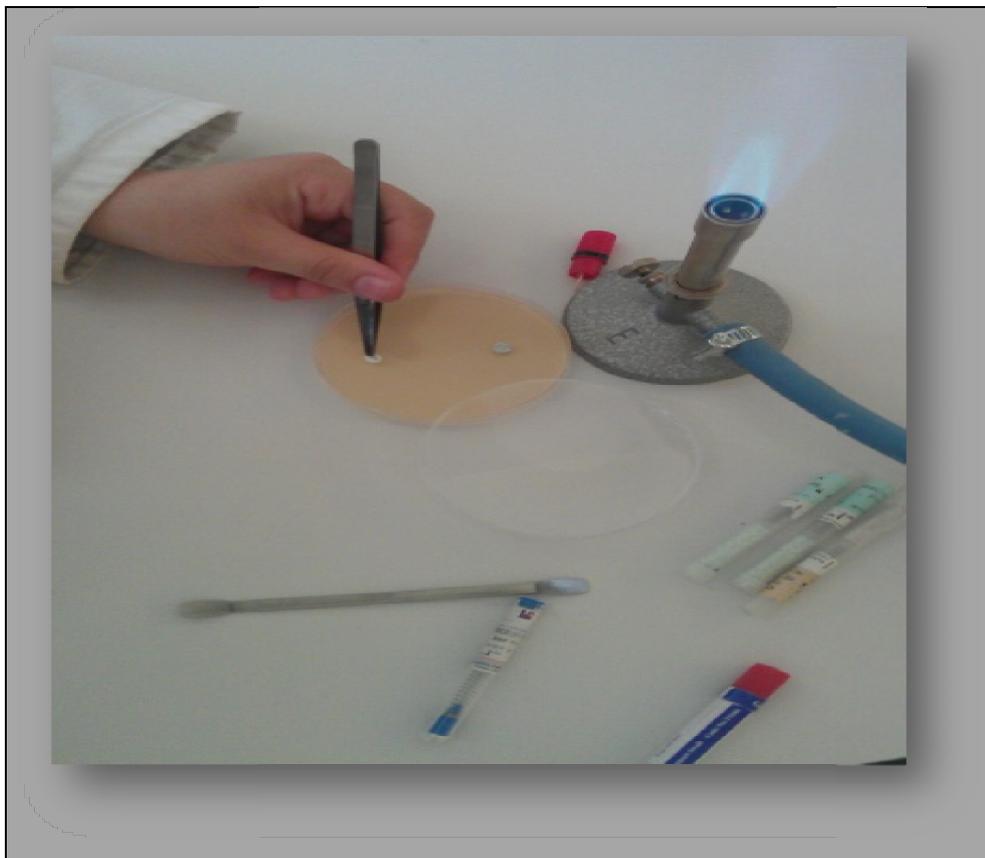


Figure 11 : Application des antibiotiques

Troisième partie :
Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III .1. Résultats

III.1.1. Rendements d'extraction

Nos extraits ont été préparés par macération (5jours) à température ambiante du broyat de la partie aérienne de *S. africana*. Celle-ci a été effectuée par des solvants présentant des polarités distinctes, à savoir l'eau, le méthanol et le chloroforme. Ainsi, trois extraits bruts d'aspect et de couleur différents ont été obtenus : L'extrait aqueux (E.Aq), l'extrait méthanolique (E.Mét) et l'extrait chloroformique (E.Ch).

Le rendement d'extraction, exprimé en pourcentage de la masse du résidu sec par rapport à la masse du broyat de la plante, pour chacun des solvants est présenté dans le **Tableau VII** et la **Figure 12**.

Tableau VII : Rendement et caractéristiques des différents extraits bruts de *S. africana*.

Extrait	Aqueux	Méthanolique	Chloroformique
Rendement (%)	5.17	9.7	3.73
Aspect	Poudreux	pâteux	Pâteux
Couleur	Marron	verte	Verte

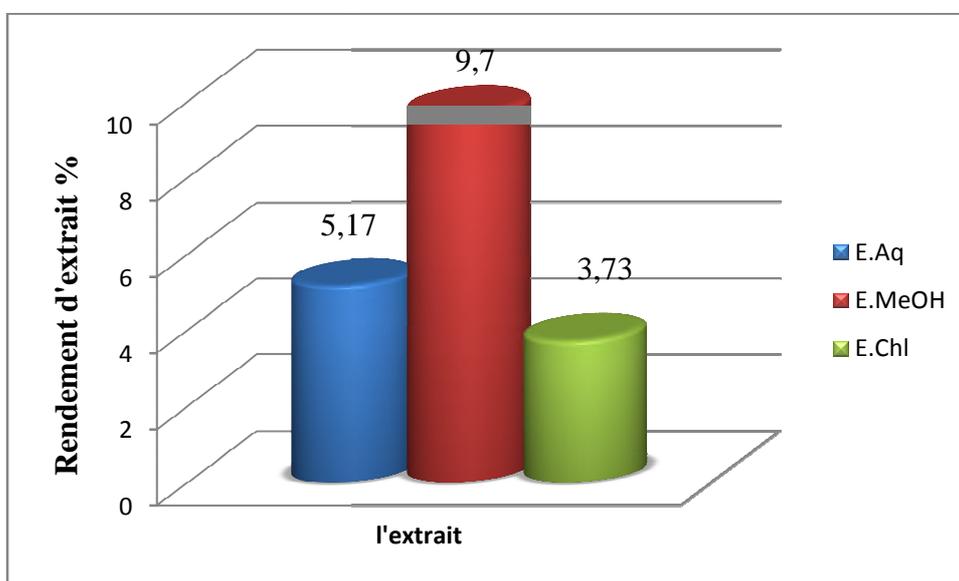


Figure 12 : Histogrammes représentant les rendements des différents extraits de *S. africana*.

Ces résultats montrent que l'extraction avec du méthanol est plus rentable avec un taux de 9.7%. Le chloroforme, par contre, donne le taux le plus faible (3.73%). La macération aqueuse a permis d'avoir 5.17% de résidu sec.

L'aspect général de l'E.Mét et de l'E.Ch est presque identique (pâteux, couleur verte), celui de l'E.Aq est plutôt poudreux et de coloration brune.

III.1.2. Etude phytochimique de *S. africana*

L'étude phytochimique a pour but de révéler les différents groupes de substances existants dans la partie aérienne (feuilles et tiges) de la plante étudiée en se servant des réactions qualitatives de caractérisation. Ces dernières reposent sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque catégorie de composés. Les résultats de cette étude sont montrés dans le **Tableau VIII**.

Dans la partie aérienne de *S. africana*, de nombreuses substances ont été mises en évidence à savoir les polyphénols, les tannins, les flavonoïdes, les coumarines, ainsi que les alcaloïdes et les terpénoïdes (stéroïdes et saponosides). D'un autre côté, l'absence des tanins catéchiques, des anthocyanes, et des anthraquinones a été notée.

Tableau VIII : Résultats des tests phytochimiques sur la partie aérienne de *S. africana*

Groupes chimiques		Test
Polyphénols	Polyphénols totaux	+
	Tanins	+
	Tanins catéchiques	-
	Anthraquinones	-
	Flavonoïdes	+
	Anthocyanes	-
	Coumarines	+
Composés azotés	Alcaloïdes	+
Composés réducteurs (Les glycosides)		+
Composés terpéniques	Stéroïdes	+
	Saponosides	+

(+) : Présence du composé recherché (-) : Absence du composé recherché

III.1.3. Analyse chromatographique sur couche mince (CCM) des extraits de *S. africana*

Les différents extraits obtenus par macération des parties aériennes de notre plante ont été soumis à une analyse chromatographique sur couche mince (CCM) en utilisant le

système de solvant (chloroforme/méthanol/acide acétique/eau) aux proportions volumiques respectives (100 :15 :0,3 :0,5). Ce dernier a été choisi parmi plusieurs systèmes testés pour leur efficacité quant à la séparation des constituants de nos extraits.

Après développement du chromatogramme, la plaque a été retirée de la cuve de chromatographie, séchée et examinée à l'œil nu et sous lampes UV (254 et 365 nm). Les résultats obtenus révèlent l'existence de nombreux composés dans les extraits soumis à l'étude (**Figure 13**).

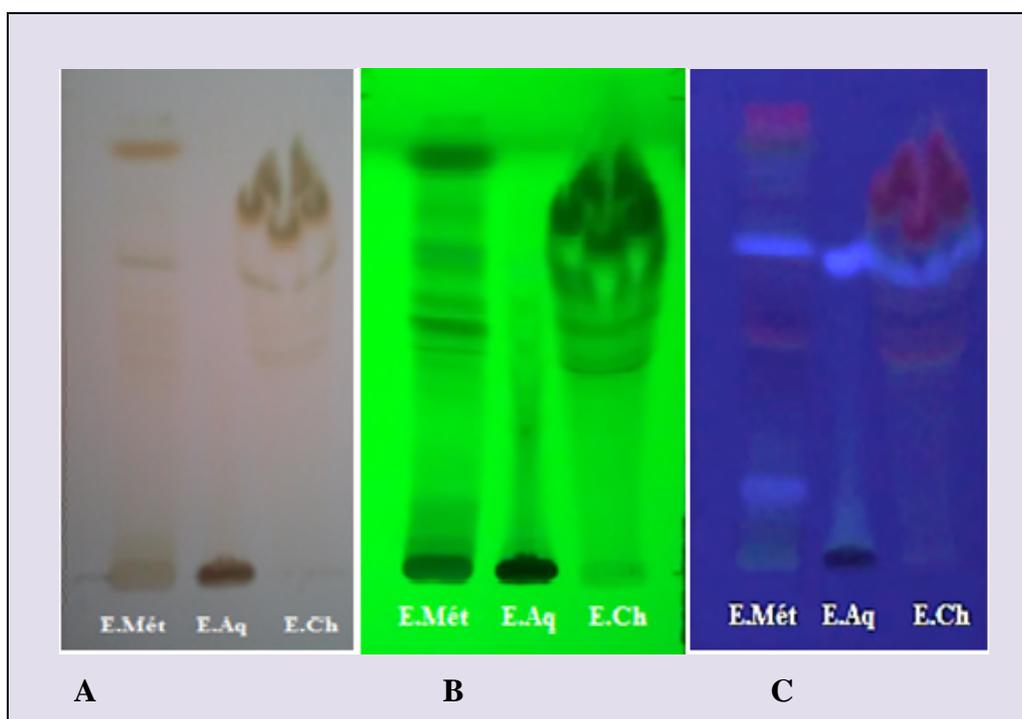


Figure 13 : Chromatogramme des extraits méthanolique (E.Mét), chloroformique (E.Ch) et aqueux (E.Aq). (A) : Observation à l'œil nu ; (B) : Révélation à l'UV ($\lambda= 254\text{nm}$) ; (C) : Révélation à l'UV ($\lambda= 365\text{nm}$).

Les rapports frontaux (Rf) et les couleurs caractérisant les différentes bandes correspondantes aux substances présentes dans les extraits sont reportés dans les tableaux qui suivent (**Tableaux IX, X, XI et XII**).

Tableau IX : Rf et couleur des bandes des différents extraits observées à l'œil nu.

E.Mét		E.Aq		E.Ch	
Rf	Couleur des spots	Rf	couleur des spots	Rf	couleur des spots
0.42	Marron	0.42	Marron	0.42	Marron
0.46	Marron	0.66	Marron	0.44	Vert
0.49	Vert clair	--	--	0.49	Vert clair
0.52	Marron	--	--	0.58	Vert
0.64	Vert	--	--	0.66	Orange
0.70	Marron	--	--	--	--
0.86	Orange	--	--	--	--
0.93	Vert	--	--	--	--

Tableau X : Rf et apparence des bandes séparées de l'E.Mét révélées sous lampes UV.

Rf	Visibilité sous U.V à 254nm	Coloration sous U.V à 365nm
0.04	Visible	Vert foncé
0.08	---	Vert clair
0.13	---	Blanc
0.40	---	Marron
0.41	visible	Jaune
0.46	visible	Orange
0.48	visible	Marron
0.52	---	Jaune
0.53	visible	Marron
0.57	----	Jaune
0.61	---	Orange
0.62	Visible	Marron
0.66	Visible	Blanc
0.73	Visible	Marron
0.86	Visible	Jaune
0,93	Visible	Orange

Tableau XI : Rf et apparence des bandes séparées de l'E.Ch révélées sous lampes UV

Rf	Visibilité sous U.V à 254nm	Coloration sous U.V à 365nm
0.41	visible	Jaune
0.46	visible	Orange
0.48	visible	Marron
0.57	--	Jaune
0.58	--	Marron
0.66	visible	Blanc
0.70	--	Jaune
0.73	---	Orange

Tableau XII : Rf et apparence des bandes séparées de l'E.Aq révélées sous lampes UV.

Rf	Visibilité sous U.V à 254nm	Coloration sous U.V à 365nm
0,20	--	Jaune
0,40	visible	Jaune
0,66	--	Blanc

D'après les résultats reportés dans les tableaux ci-dessus, le système de solvant utilisé dans cette analyse chromatographique a permis de révéler un nombre variable de substances dans les différents extraits analysés. Observé sous lampes UV, l'extrait méthanolique s'avère le plus riche avec 16 bandes visibles et de couleur variable suivi de l'extrait chloroformique qui compte 8 spots. La séparation des constituants de l'extrait aqueux ne montre par contre que 3 bandes.

L'observation du chromatogramme à l'œil nu ne permet de distinguer que 8 spots, 5 spots et 2 spots respectivement dans l'E.Mét, l'E.ch et l'E.Aq.

III.1.4. Activité antibactérienne des extraits de *S. africana*

III.1.4.1. Détermination des antibiogrammes des souches testées

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité ou la résistance des souches vis-à-vis des antibiotiques. L'antibiogramme a été réalisé par la méthode standard des disques. Nos souches bactériennes ont été soumises à l'action de quatre types d'antibiotique à savoir l'imipénème (IMP), l'acide nalidixique (NA), la ciprofloxacine (CIP) et la cifoxcitine (FOX) (**Figure 14**).

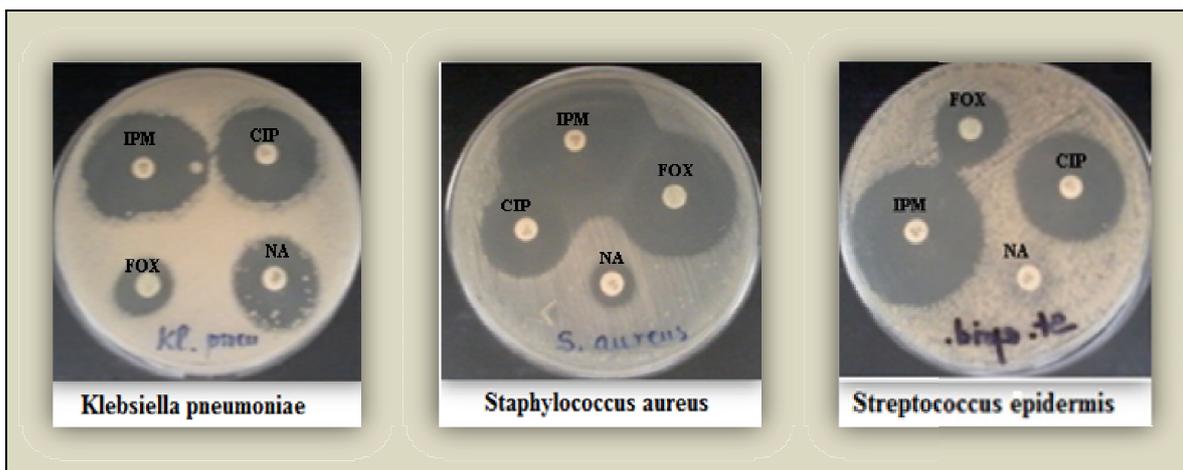


Figure 14: Effet inhibiteur des antibiotiques sur la croissance des souches bactériennes testées.

Les diamètres des zones d'inhibition, exprimés en millimètre, sont présentés dans la **Figure 14** et le **Tableau XIII**. D'après les résultats enregistrés, les souches bactériennes montrent des sensibilités différentes aux quatre antibiotiques utilisés. La majorité des souches, principalement *S.epidermis*, *Bacillus sp.* et *P.aeruginosa*, ont manifesté une grande résistance à l'acide nalidixique. L'imipénème, par contre, est l'antibiotique possédant le pouvoir inhibiteur le plus élevé, avec 40 mm de zone éclairée contre *S. aureus*, 36 mm contre *S.epidermis* et 30 mm vis-à-vis de *K.pneumoniae* et *E.coli* (**Figure 15**).

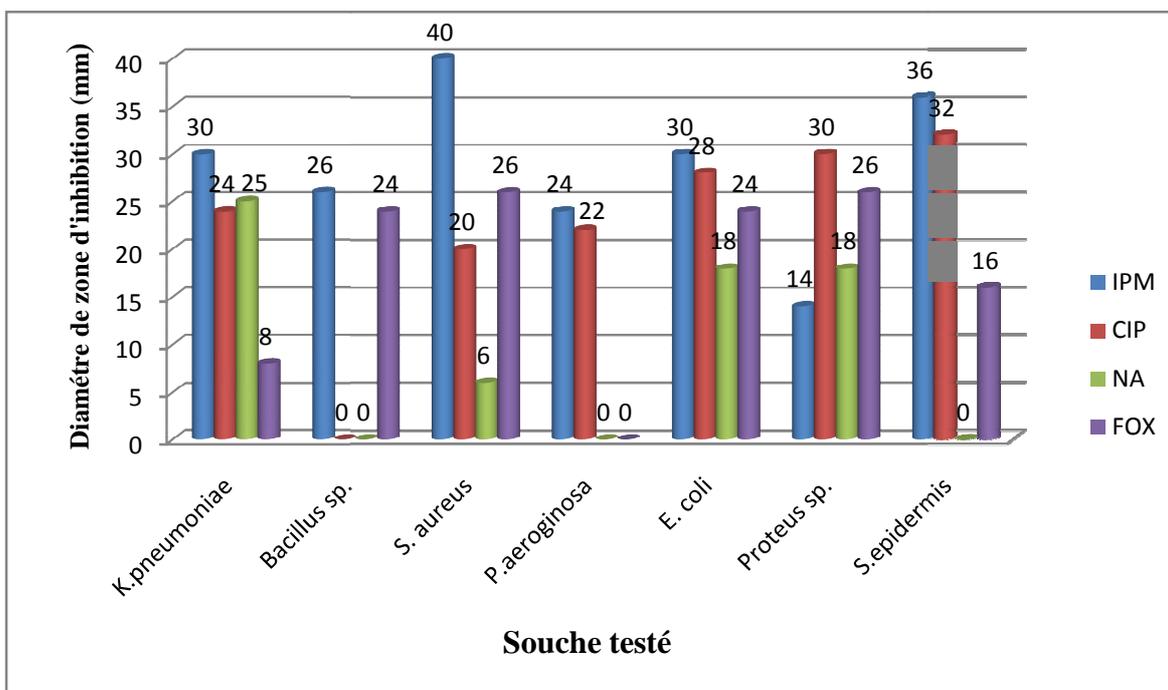


Figure 15 : Histogrammes de sensibilité des souches bactériennes testées vis-à-vis des antibiotiques utilisés (IPM, CIP, NA, FOX).

III.1.4.2. Activité antibactérienne des extraits de *S. africana* sur les souches testées

L'effet inhibiteur des extraits méthanolique, chloroformique et aqueux, a été déterminé par la méthode des puits de diffusion. Pour qu'un extrait soit considéré comme actif, il doit induire une zone d'inhibition supérieure ou égale à 9 mm de diamètre.

Selon les résultats enregistrés (**Figure 16 ; Tableau XIII**), les différents extraits de notre plante n'ont exprimé aucune activité contre les bactéries suivantes : *Bacillus sp.*, *Proteus sp.*, *P. aeruginosa* et *E. coli*. Les autres souches, à savoir *K. pneumoniae*, *S. aureus* et *S. epidermis*, ont montré une certaine sensibilité, bien que faible, aux concentrations élevées (supérieures à 150mg/ml) des extraits méthanolique et chloroformique (**Figure 17**).

Dans l'ensemble, les diamètres d'inhibition induits par les extraits de la plante *S. africana* n'ont pas dépassés les 10 mm, loin des valeurs obtenues avec les antibiotiques.

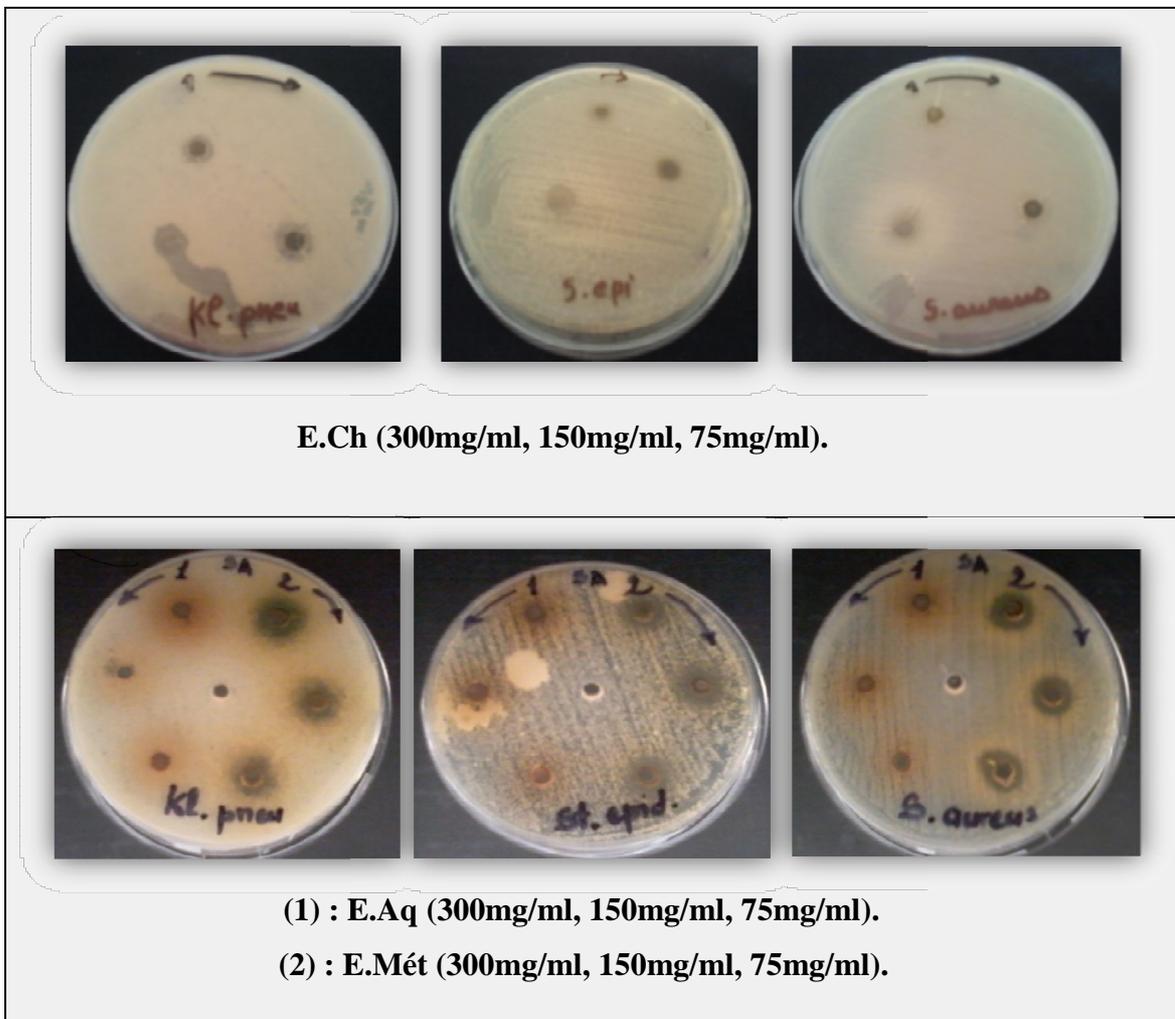


Figure 16 : Action inhibitrice des extraits méthanolique, chloroformique et aqueux sur les trois bactéries *K. pneumoniae*, *S. aureus* et *S. epidermis*.

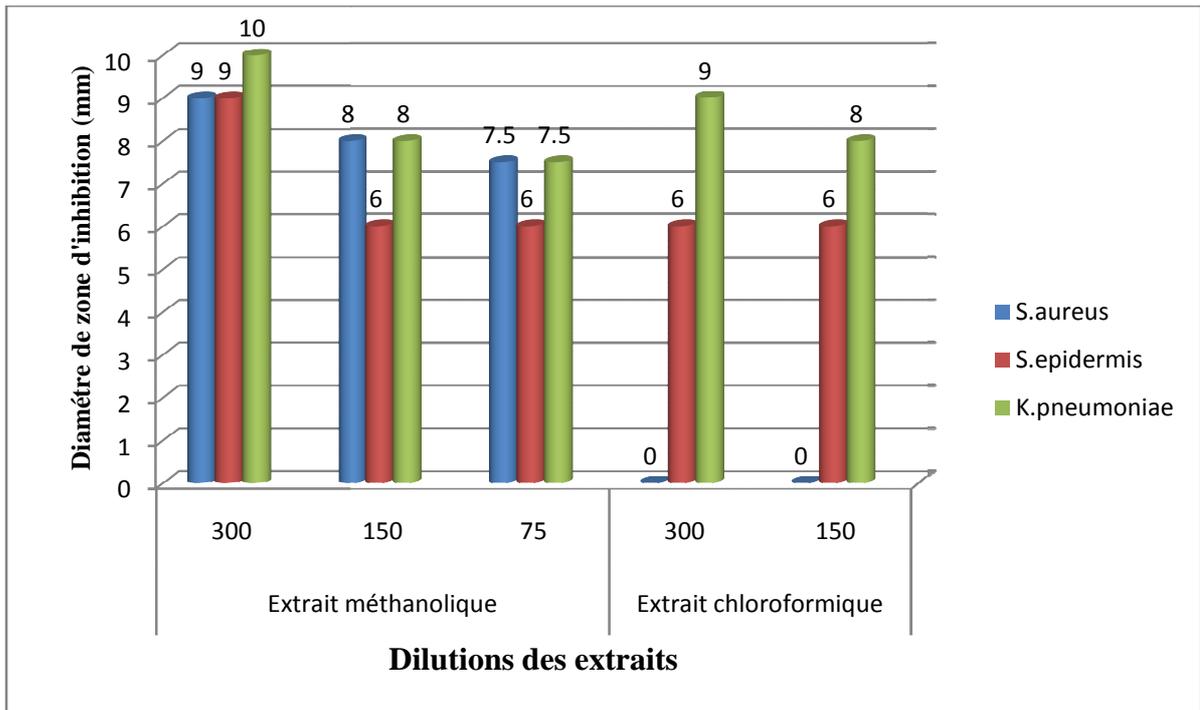


Figure 17 : Histogramme de sensibilité de *K. pneumoniae*, *S. aureus* et *S. epidermis* vis-à-vis des extraits méthanolique et chloroformique.

Tableau XIII : Diamètres des zones d'inhibition induites par les extraits de *S. africana* et par les antibiotiques NA, FOX, IPM (30µg/disque) et CIP (50µg/disque). (-) : Aucun effet .

		Diamètres des zones d'inhibition (mm) en fonction des différentes concentrations d'extraits (mg/ml).														ATB (témoins positifs)				Témoin négatif (DMSO)
Types d'extrait	Concentrations (mg/ml)	E.Aq					E.Mét					E.Ch				IPM	CIP	NA	FOX	
		300	150	75	8	4	300	150	75	8	4	300	150	8	4					
Souches bactériennes	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	28	18	24	-
	<i>Bacillus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26	-	-	24	-
	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	10	8	7,5	6	6	9	8	-	-	30	24	25	8	-
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24	22	-	-	-
	<i>Proteus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	30	18	26	-
	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	9	8	7,5	-	-	-	-	-	-	40	20	6	26	-
	<i>S. epidermis</i>	-	-	-	-	-	9	6	6	-	-	6	6	-	-	36	32	-	16	-

III.2. Discussion

III.2.1. Préparation des extraits et rendements d'extraction

S. africana est une plante aromatique rencontrée dans différentes régions de notre territoire et qui est utilisée traditionnellement pour ses vertus thérapeutiques. Pour déterminer son activité biologique notamment antibactérienne, des extractions sur cette plante, plus précisément sur un broyat fin de sa partie aérienne sèche, ont été alors faites.

Le séchage du matériel végétal est recommandé surtout lorsqu'il est destiné à être conservé pour une certaine période avant utilisation. Ceci, en effet, prévient les dégradations enzymatiques ou par fermentation microbienne des molécules qui s'y trouvent telles que les flavonoïdes et particulièrement les glycosides (**Seidel, 2005 ; Marston et Hostettmann, 2006 in Benbrinis, 2012**).

L'utilisation du broyat au lieu de la plante entière a pour but d'améliorer l'extraction en rendant l'échantillon plus homogène, en augmentant la surface de contact avec le solvant et en facilitant sa pénétration à l'intérieur des cellules qui ne sont pas détruites après le broyage.

Les extraits ont été préparés par macération prolongé (5 jours) à température ambiante du matériel végétal dans des solvants de polarités différentes à savoir l'eau distillée, le méthanol et le chloroforme. Ces conditions ont pour avantage d'extraire le maximum de composés, de prévenir leur dénaturation ou modification probable due aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction et d'obtenir des extraits riches en composés variables.

Le calcul du rendement d'extraction, exprimé en pourcentage par rapport au poids total de la poudre de *S. africana*, montre que le méthanol et l'eau distillée fournissent les proportions les plus élevées en résidus secs avec des valeurs de 9,7% et 5,17% respectivement. Le chloroforme, par contre, n'a pu donner qu'un rendement de 3,73%. Cela pourrait s'expliquer par la nature et la concentration des solutés présents dans les feuilles et les tiges de la plante et leur comportement vis-à-vis des solvants d'extraction.

Il ressort de ces résultats que la partie aérienne de *S. africana* renferme probablement des concentrations appréciables de substances solubles dans les solvants polaires que dans ceux apolaires. Des travaux de recherche antérieurs ont signalé que le méthanol et l'eau ainsi que leur mélange à différents ratios sont les solvants les plus utilisés pour une meilleure extraction de composés phénoliques (**Bouزيد et al., 2011**). En effet, ces solvants sont capables d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires facilitant ainsi l'extraction

d'un plus grand nombre de molécules polaires, de moyenne et de faible polarité (**Seidel, 2005**)

D'une manière générale, les rendements des extractions sont dépendantes de plusieurs facteurs tels que la méthode choisie, les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée, ainsi qu'à l'origine géographique de la plante. Ces facteurs peuvent affecter le contenu total en phénols et flavonoïdes, et par conséquent les activités biologiques médiées par ces métabolites (**Lee et al., 2003**).

III.2.2. Screening phytochimique et analyse chromatographique (CCM) des extraits

Le Screening phytochimique de la partie aérienne de la plante vise à caractériser les différentes familles de substances qu'elle contient. Les résultats montrent la présence de plusieurs groupes phytochimiques importants tels que les composés phénoliques, azotés, réducteurs et terpéniques. Cela a été confirmé par l'analyse chromatographique sur couche mince des différents extraits qui montre l'existence d'une gamme très variée de molécules principalement dans l'extrait méthanolique. Ces résultats concordent ainsi avec ceux publiés par Elrhafari (2008) où il confirme la présence des flavonoïdes dans la plante *S. africana*. Selon Djeridane et ses collaborateurs (2006), la famille des astéracées, à laquelle appartient cette plante, se caractérise par l'abondance des composés polyphénoliques comme les coumarines, les flavonoïdes mais aussi par des terpènes (**Silván et al., 1996**). Cela pourrait être relié aux conditions climatiques dures des endroits où elles poussent (température élevée, grande exposition au soleil, la sécheresse et la salinité) qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires comme les polyphénols (**Falleh et al., 2008**).

La richesse de nos extraits en ces substances est confirmée par l'analyse chromatographique sur couche mince. En effet les chromatogrammes de séparation correspondants aux extraits, visualisés sous UV à 365nm, font apparaître de nombreuses bandes de couleur marron, jaune, bleu, orange, rouge et blanche qui peuvent correspondre à plusieurs classes de métabolites secondaires : jaune, vert (coumarines) (**Georgievskii, 1990**) ; orange (xanthones) (**Ladiguina et al., 1983 in N'gaman et al., 2009**); jaune quelconque (flavonols et/ou auronés); bleu, pourpre (coumarines, flavones méthylées) (**Dawson et al., 1991**). Selon Wagner et Sabine (1996), les fluorescences jaunes et jaunes vertes correspondent à des flavanols et flavanones.

Il est maintenant bien établi que les composés auto-fluorescents observés chez les plantes supérieures, après excitation dans l'UV, correspondent à des composés

phénoliques (**Bennet et al., 1996**). Mais en l'absence de témoins authentiques, il ne nous est pas possible à ce stade, de confirmer l'identité des molécules présentes dans nos extraits. Néanmoins, et en application des données bibliographiques précédentes à l'ensemble des résultats que nous avons obtenus, nous pouvons dire que certaines de ces molécules pourraient s'agir des coumarines (couleur bleu, jaune et verte), des flavanols et flavanones (couleur jaune et jaune verte), des xanthones (couleur orange).

III.2.3. Activité antibactérienne

L'évaluation de l'effet antibactérien des extraits méthanolique, chloroformique et aqueux préparés à partir de *S. africana* a été réalisée contre 7 souches bactériennes. Leur pouvoir inhibiteur est évalué par la présence ou non des zones d'inhibition après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C.

Les résultats enregistrés révèlent que nos extraits, en particulier l'extrait aqueux, n'ont exercé aucune inhibition sur la croissance de la plupart des souches testées. Néanmoins des zones d'inhibition modestes (inférieures ou égales à 10 mm) induites par les extraits méthanolique et chloroformique sont observées sur certaines bactéries.

Ces résultats pourraient être attribués à la nature des molécules extraites par chacun des solvants. Plusieurs études ont rapporté de leur part que les extraits aqueux de différentes plantes de la famille des astéracées ne présentent aucune activité antibactérienne, alors que leurs extraits organiques et leurs huiles essentielles inhibent très significativement la croissance des souches testées (**Sokmen et al., 2004**).

Selon Candan et ses collaborateurs (2003), les substances polaires exercent un effet plus faible comparativement à celui des substances apolaires. Cela réfère probablement à la capacité des molécules liposolubles de s'insérer dans les membranes bactériennes et les endommager. En outre, Bouzid et ses collaborateurs (2011) ont trouvé que l'extrait méthanolique de *Crataegus monogyna* renferme une quantité appréciable de polyphénols (notamment les flavonoïdes, les tanins, les acides phénoliques, les terpènes et les pectines) mais il n'a montré qu'une faible activité antibactérienne.

Selon Bennis et Chami (2004), les Polyphénols, notamment les tannins et les flavonoïdes comme l'epigallocatechine, la catéchine, la myricétine, la quercétine, et la lutéoline, sont des substances antibactériennes importantes ; les phénols sont en fait capables d'engendrer des dégâts irréversibles au niveau de la membrane.

Indépendamment de la nature de l'extrait ou de sa concentration, les bactéries à Gram(-) comme *Proteus sp.*, *P. aeruginosa*, et *E. coli* possèdent une forte résistance. Cette résistance n'est pas surprenante, elle est en relation avec la nature de leurs membranes externes (imperméable à la plupart des agents biocides) (**Faucher et Avril, 2002**). Alors que l'hypersensibilité de *S. aureus* ATCC peut s'expliquer par la probabilité de sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH et les extraits naturels dus à l'absence de la membrane externe (**Balentine et al., 2006**).

L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie) de différents composés (**Essawi et Srour, 2000**). La faible activité d'un extrait, dans la limite de la quantité utilisée, pourrait être due à plusieurs facteurs tels que :

- Les facteurs inhérents (variété, conditions ambiantes, facteurs écologiques, variations saisonnières).
- Les méthodes d'extraction (**Turkmen et al., 2007**).
- Les conditions de séchage et de stockage de la plante après sa collecte (**Seidel, 2005**).
- Le broyage est aussi à l'origine de la génération de chaleur responsable de la perte des molécules volatiles ainsi que de la décomposition et l'oxydation des molécules thermolabiles (**Jones et Kinghorn, 2005**).
- Finalement, l'organe de la plante utilisé (**Natarajan et al., 2005**).

CONCLUSION

Conclusion

Actuellement, les travaux de recherche menés dans de nombreux laboratoires spécialisés se sont focalisés sur un même thème général : les plantes médicinales. Ceci revient en fait à la richesse de ces dernières en substances naturelles douées de propriété bioactives importantes capables de fournir une meilleure médication par une thérapie plus douce.

La propriété à laquelle nous nous sommes intéressées dans ce présent travail concerne le pouvoir antibactérien des extraits bruts aqueux (E.Aq), méthanolique (E.Mét) et chloroformique (E.Ch) de la partie aérienne de *Santolina africana* rencontrée dans plusieurs régions d'Algérie.

La macération de la plante dans les différents solvants utilisés a donné des rendements en résidus sec variables. Le plus élevé est obtenu avec le méthanol, le plus faible par contre revient au chloroforme.

L'analyse qualitative des extraits, réalisée à l'aide de tests phytochimiques et par CCM, a révélé la présence de plusieurs familles de composés naturels à savoir les flavonoïdes, les tanins, les alcaloïdes et les terpénoïdes. Ces substances sont généralement responsables de l'activité biologique des extraits de plantes médicinales. L'extrait méthanolique renferme beaucoup plus de molécules séparées que les extraits chloroformique et aqueux. Ce dernier en contient le moins.

L'évaluation du pouvoir antibactérien des trois extraits a été réalisée sur 7 souches bactériennes : 4 de référence (*P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *S.aureus* et *E.coli*) et 3 d'origine clinique (*Bacillus sp.*, *Proteus sp.*, *S.epidermis*). Les différents extraits de la plante, en particulier l'extrait aqueux, n'ont exprimé aucune activité contre *Bacillus sp.*, *Proteus sp.*, *P.aeruginosa* et *E.coli*. Les autres souches, à savoir *K.pneumoniae*, *S.aureus* et *S.epidermis*, ont montré une certaine sensibilité, bien que faible, aux concentrations élevées (supérieures à 150mg/ml) des extraits méthanolique et chloroformique.

La chose certaine est que les plantes médicinales présentent des activités biologique et thérapeutique variables selon la nature des substances renfermées. Les mécanismes d'action de ces dernières restent complexes. Il serait donc important, lors des investigations, d'étudier les différentes activités de chaque plante considérée et de mettre en relief les molécules responsables. L'étude *in vitro* est une étape nécessaire mais elle doit être complétée par une autre *in vivo* pour une meilleure approche concernant ce sujet.

*Références
bibliographique*

Références

- Abdelly C., 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus L.* organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, **331**: 372 - 379
- Ahuja A., Bakshi S.K., Sharma S.K., Thappa R.K., Agarwal S.G., Kichlu S.K., Paul R. and Kaul M.K., 2005.** Production of volatile terpenes by proliferating shoots and micropropagated plants of *Santolina chamaecyparissus L.* (cotton lavender). *Flavour Fragrance Journal*, **20** : 403 - 406
- Aït Youssef M., 2006.** Plantes médicinales de Kabylie. Ed Ibis Press . Paris, France. 349 p
- Balentine C.W., Crandall P.G., O'Bryan C.A., Duong D.Q. and Pohlman F.W., 2006.** The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*, **73** : 413 - 421
- Barrero A.F., Mar Herrador M., Quilez J.F., Alvarez Manzaneda R., Portal D., Gavin J.A., Gravalos D.G., Simmonds M.S.J. and Blaney W.M., 1999.** Bioactive sesquiterpenes from *Santolina rosmarinifolia* subsp. *Canescens*. A conformational analysis of the germacrane ring. *Phytochemistry*, **51**: 529 - 54
- Bastien F., 2008.** Effet larvicide des huiles essentielles sur *Stomoxys calcitrans* la réunion. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, p : 25-26.
- Beecher G.R., 2003.** Overview of dietary flavonoids : nomenclature, occurrence and intake . *J. Nutri*, **133 (10)** : 3248S - 3254S
- Békro Y.A., Békroj A.M., Bouab.B., Trab F.H. and Ehilé E.E., 2007.** Etude ethnobotanique et Screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana*. (Bai) Herend et Zarucchi (caesalpinaceae). *Rev. Sci. Nat*, **4 (2)**: 217-225
- Bellakhdar J., 1997.** La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ed. Ibis Press. Paris, France, 766 p.
- Beloued A., 2009.** Plantes médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires. Ed. (5), Ben-Aknoun. Alger, p 194.
- Benbrinis S., 2012.** Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de *Santolina chamaecyparissus* . Thèse de magister. Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de Sétif, 84 p .
- Bennet M., Gallagher M., Fagg J., Bestwick C., Paul T., Beale M., and Mansfield J., 1996.** The hypersensitive reaction, membrane damage and accumulation of autofluorescent phenolics in lettuce cells challenged by *Bremialactucae*. *Plant J*, **9**: 851 – 865
- Bennis S.S. et CHAMI F.S., 2004.** Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Letters in Applied Microbiology*, **38** : 454 – 458
- Berghe V.A. et Viletinck A.J., 1991.** Screening Methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Method for Plant Biochemistry*, **6** : 47- 68

- Beta T., Nam S., Dexter J.E. and Sapirstein H.D., 2005.** Phenolic content and antioxydants Activity of Pearled wheat and Roller-Milled.Fractions. *Cereal chem*, **82 (4)** : 390 - 393
- Bouزيد W., Yahia M., Abdeddaim M., Aberkane M.C. et Ayachi A., 2011.** Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de *L'Aubepine Monogyne*. Lebanese. *Science Journal*, **12 (1)** : 59 – 69
- Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation. Ed.(2è) . Lavoisier. Paris, p 274-285.
- Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation. Ed .(3). Lavoisier, Paris, p : 199-388.
- Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sökmen A. and Akpulat H A., 2003.** Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* sub sp. *Millefolium Afan.* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **87** : 215 - 220
- Cermak R., Follmer U. et Wolfram S., 1998.** Dietary flavonol quercetin induces chloride secretion in rat colon. *Am J Physiol*, **275** : G1166 - G1172
- Christensen L.P., 1992.** Acetylenes and related compounds in Anthemideae. *Phytochemistry*, **31** : 7- 49
- Cowan M.M., 1999.** Plant products as antimicrobial agent. *Clinical Microbiology Reviews*, **12 (4)** : 564 - 582
- Dawson R.M.C., Elliott D., Elliott W. et Jones K., 1991.** Dictionnaire de biochimiste. Ed. Mir, Moscou.
- Derbesy M., Touche J. and Zola A., 1989.** The essential oil of *Santolina chamaecyparissus* L. *Journal of Essentiel Oil Research*, 1: 269-275.
- Djeridane M., Yousfi B., Nadjemi D., Boutassouna P. and Stocker N., 2006.** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, **97** : 654 - 660
- Duraffourd C. et lepraz J.C., 2002.** Traité de phytothérapie clinique. Ed. Masson. 827 p.
- Elqaj M., Ahami A. et Belghyti D., 2007.** La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Communication affichée (A18). Département de Biologie. Faculté des Sciences. Université IBN TOFAIL. Kenitra, Maroc.
- EL Rhaffari L., 2008.** Catalogue des plantes potentielles pour la conception de tisanes. Errachidia, p 11 .
- Essawi T. and Srour M., 2000.** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal Ethnopharmacol*, **70** : 343 - 349
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N.,Trabelsi N., Boulaaba M., Sokmen A., Sokmen N., Daferera D., Polissiou M., Candan F., Unlu M. and Akpulat**

- A., 2004.** The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and methanol extracts of *Achillea biebersteinia* fan. (Asteraceae). *Phytotherapy Research*, **18**: 451- 456
- Farnsworth N.R., Akerele O., Bingel A.S., Soejarto D.D. et Guo Z., 1986.** Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé*, **64 (2)** : 159 - 164
- Fenni M., 1991.** Contribution à l'étude des grands messicoles des hautes plaines sétifiennes. Thèse de magister. Université de Sétif.
- Ferrari B., Tomi F. and Casanova J., 2005.** Terpenes and acetylene derivatives from the roots of *Santolina corsica* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**: 445-449
- Formica J.V. et Regelson W., 1995.** Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food ChemToxicol*, **33 (12)** : 1061–1080
- Frank S., Valérie G., Martine B., 2009.** Génétique moléculaire des plantes. Ed. Quæ, p 230
- Gabriel I., Alleman F., Dufourcq V., Perrin F. et Gabarrou J.F., 2013.** Utilisation des huiles essentielles en alimentation des volailles. Hypothèses sur les modes d'action impliqués dans les effets observés. *INRA. Productions Animales*, **26 (1)**: 13 - 24
- Gamet P.L., Payraastre L., Manenti S., Gratacap M.P., Tulliez J., Chap H. et Payraastre B., 1999.** Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *General Pharmacology*, **32**: 279 – 286
- Georgievskii V.P., Komissarenko N.F. et Dmitrouk S.E., 1990.** Substances bioactives des plantes médicinales. Ed. « Naouka » Novosibirsk, 336 p.
- Ghestem A., Seguin E., Paris M. and Orecchioni A.M., 2001.** Le préparateur en pharmacie dossier. Ed.(2è) . Technique et Documentation, Paris, P 275.
- Giner Pons R.M. et Rios Canavate J.L., 2000.** *Santolina chamaecyparissus* : Especie mediterranea con potenciales aplicaciones terapeuticas en procesos inflamatorios y transtornos digestivos. *Revista de Fitoterapia*, **1** : 27 - 34
- Grunwald J. et Jaricke C., 2006.** Guide de la phytothérapie. Ed. Marabout. 416 p
- Hahlbrock K., 1981.** Flavonoids. *In: The biochemistry of plants*. Ed. Academic Press, Inc. London, p: 425 - 455
- Hans W. K., 2007.** 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition , p 6 - 7.
- Haslam E., 1993.** Polyphenol complexation. *In: Polyphenolic phenomena*. Ed. Scalbert A. INRA (Paris), p: 23 – 31.
- Herbert R.B., 1989.** The Biosynthesis of secondary metabolites. Ed.(2è) .Chapman and Halle 2, p 11 - 115.

- Hong X.Y., Wan M., Dong H., But P.P.H. et Foo L.Ycap., 2000.** Inhibitory activity of flavonoids and tannins against HIV-1 protease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **23(9)** : 1072 - 1076
- Hopkins W.G., 2003.** Physiologie végétale. Ed. De Boeck Université, p 267 - 280.
- Hurabielle M et Paris M., 1981.** Abrégé de matière médicale (pharmacognosie Tome1). Ed. Masson, Paris . P 9 – 13, 17 – 24, 182 – 184.
- Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., De Laage de Meux A., Moulard F., Zha E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deelesalle–Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J. et Botrel A., 2001.** Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Ed. Larousse. p10 - 16
- Jones W.P. and Kinghorn A.D., 2005.** Extraction of plant secondary metabolites .In: Sarker S.D., Latif Z. and Gray A.I. Natural products isolation. Ed. Humana Press (Totowa), p 323 - 411
- Kaur S.J., Grover I.S. and Kumar S. 2000.** Modulatory effects of tannin fraction isolated from Terminalia arjuna on the genotoxicity of mutagens in *Salmonella typhimurium*. *Food and Chemical Toxicology*, **38(12)**: 1113 - 1119
- King A., Young G., 1999.** Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. of the American dietetic association*, **99**: 213-218
- Kisiel W., Dawid-Pač R., Grabarczyk H. and Nowak G., 2003.** Germacrane Derivatives from *Santolina pinnata* subs. *neapolitana*. *Zeitschrift für Naturforschung*, **58** : 793 - 796
- Kone D., 2009.** Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes - extraction - identification d'alcalloïdes –caractérisation ,quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante . Thèse de doctorat de l'université de bamako, p 22.
- Kueny-Stotz M., 2008.** Contribution à la chimie des flavonoïdes : élaboration de squelettes flavylium sophistiqués, nouvelle voie d'accès aux flavan-3-ols et aux proanthocyanidines. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg. France.
- Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J. et Lee C.Y., 2003.** Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine .*J.Agric. FoodChem*, **51** : 7292 - 7295
- Lee H., Wang H.W., Su H.Y. and Hao N.J., 1994.**The structure-activity relationships of flavonoids as inhibitors of cytochrome P- 450 enzymes in rat liver microsomes and the mutagenicity of 2-amino-3-methyl-imidazo [4;5-f] quinoline. *Mutagenesis*, **9 (2)**: 101–106
- Lhuillier A., 2007.** Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de doctorat. Toulouse.

- Macheix J.J., Fleriet A. et Christian A., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. Ed. PPTUR Lausanne. 170 p
- Males Z. et Medić-Šarić M., 2001.** Optimization of TLC analysis of flavonoids and phenolic acids of *Helleborus atrorubens waldst.* Et Kit. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **24** : 353 - 359
- Markham K.R., 1982 .** Techniques of flavonoid identification. Ed. Academic Press (London), p: 1 – 113
- Martin S. et Andriantsitohaina R., 2002.** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, **51**: 304-315
- McCalley D.V., 2002 .** Analysis of the Cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques, Review. *Journal of Chromatography A*, **967** : 1–19
- Merghem R., 2009.** Elément de biochimie végétale à l'usage des étudiants en pharmacie, en sciences alimentaires et en sciences de la nature et de la vie. Bahaeddine Edition, Algérie, p 107-132.
- Millogo H., Guisson I.P., Nacoulma O. et Traore A., S., 2005.** Savoir traditionnel et médicaments traditionnels améliorés. Colloque du 9 décembre. Centre européen de santé humanitaire. Lyon.
- Mogode D.J., 2005.** Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpinaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad. Université de Bamako.
- Natarajan D., John Britto S., Srinivasan K., Nagamurugan N., Mohanasundari C., Perumal G., 2005.** Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis* a rare medicinal herb. *J Ethnopharmacol*, **102**, p : 123 – 126
- N'gaman K.C.C., Békro Y.A., Mamyrbékova B. J.A., Bénéié A., Gooré B.S., 2009.** Sur la composition en métabolites secondaires et l'activité anti-oxydante d'extraits bruts de *Gmelina arborea Roxb.* (Verbanaceae) de Côte d'Ivoire, Afrique de l'Ouest: Analyse par Chromatographie en Couche Mince. *European Journal of Scientific Research* , **36(2)** : 161-171
- Ohemeng K.A., Schwender C.F., Fu K.P. et Barrett J.F., 1993.** DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **3 (2)** : 225- 30
- Oloyede O.I., 2005.** Chemical profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. *Pakistan journal of nutrition*, **4**: 379-381
- Pascal R.G., 1968.** Phénols et composés phénoliques chez les végétaux. Dunod Université de Cornell. États-Unis, **254**, p : 23 - 24, 72, 220 –222

- Pierpoint W. S., 1986.** Flavonoids in the human diet. In “Plant flavonoids in biology and medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships”. Eds. Cody V., Middleton E., Harborne J.B., Alan R. Liss.Inc (New york), p: 125–140.
- Rios J.L. and Recio M.C., 2005.** Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **100**: 80 - 84
- Sala A., Recio M. C., Giner R. M., Mdfiez S. and Rios J., 2000.** Antiphosphopase A2 and anti-Inflammatory activity of *Santolina chamaecyparissus*. *Life and Sciences*, **66 (2)** : 35 – 40
- Sarni-Manchado P. et Cheynier V., 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Technique et Documentation, Paris, p 2 - 10.
- Seidel V., 2005.** Initial and Bulk Extraction. In: Sarker S.D., Latif Z. and Gray A.I. Natural products isolation. *Humana Press (Totowa)*, p : 27-37.
- SFA. Société Française des Antioxydants. 2005.** Compte rendu de la conférence polyohenols (23/24 NOV. 2005). Institut des corps gras. ITERG.
- Silván A.M., Abad M.J., Bermejo P., Sollhuber M. and Villar A., 1996.** Anti-inflammatory activity of coumarins from *Santolina oblongifolia*. *J. Nat. Prod.* **59 (12)**: 1183 - 1185
- Sokmen A., Sokmen N., Daferera D., Polissiou M., Candan F., Unlu M. and Akpulat A., 2004.** The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and methanol extracts of *Achillea biebersteiniafan*. (Asteraceae). *Phytotherapy Research*, **18** : 451-456
- Stöckigt J., Sheludko Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H. et Stöckigt D., 2002.** High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic–electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Review Journal of Chromatography A*, **967** : 85–113
- Strang C., 2006.** Larousse medical. Ed. Larousse. 1219 p.
- Tapiero H., Tew K.D., Nguyen B.G., et Mathé G., 2002.** Polyphenol do they play a role in the prevention of the human pathologies. *Biomed. Pharmacother.*, **56**: 200 - 207
- Tim cushnie T.P. et Lamb J.A., 2005.** Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **26**: 343 – 356
- Trease E. et Evans W.C., 1987.** Pharmacognosy Billiaire. Ed. Tindall London. **13**: 61-62
- Turgeon M., 2001.** Profil des produits forestiers (premiers transformation huiles essentielles). Québec. 9 p.
- Turkmen N., Velioglu Y.S., Sari F. and Polat G., 2007.** Effect of Extraction Conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea *Molecules*, **12** : 484 - 496

Urquiaga I. N. E. S. and Leighton F. E. D. E., 2000. Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol. Res*, **33** : 55 - 64

Wagner H. et Blatt, S., 1984. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas EdSpringer, New-York. 320 p

Wagner.H. et Sabine B., 1996. Plant drug analysis, a thin layer chromatography, Ed.(2è) Atlas, p 195 -244.

Williams C.A.et Grayer R.J., 2004. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep*, **21(4)**: 539 - 573.

Zeghad N., 2009. Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Thèse de magister. Université de Constantine. 130 p.

Annexes

Annexe1 : Solvants et réactifs

➤ Solvants utilisés

- Méthanol
- Chloroforme
- Acide sulfurique
- Anhydride acétique
- Iodure de potassium
- Acide chlorhydrique
- Hydroxyde d'ammonium
- Copeaux de magnésium
- Chlorure ferrique
- Iode
- Formol
- DMSO

➤ Réactifs utilisés

Réactif de Wagner

Dissoudre 2g de Iodure de potassium (KI) dans 50ml d'eau, y ajouter 1.27 g d'Iode et compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.

Réactif de Stiasny

Solution constituée de formol à 30% et de HCl concentré dans les proportions (2:1)

Solution du Liqueur de Fehling

Solution A

$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ 35g puis ajouter
 H_2SO_4 5ml et compléter à 1 litre avec de l'eau déminéralisée

Solution B

Tartrate double de Na et K 200g, les dissoudre dans de la
Lessive de soude 375ml, et compléter à 1 litre avec de l'eau déminéralisée.

Annexe 2 : Appareillage et verreries

➤ **Appareillage**

- Broyeur électrique (Marque RETSCH, Type SM 100)
- Rota vapeur (Büchi R-134).
- Spectrophotomètre (type Spectronic 20 Genysis TM).
- Centrifugeuse N-6P (Sigma)
- Lampes UV (254et 365nm)
- Balance électrique
- Etuve
- Bain-marie
- Agitateur magnétique

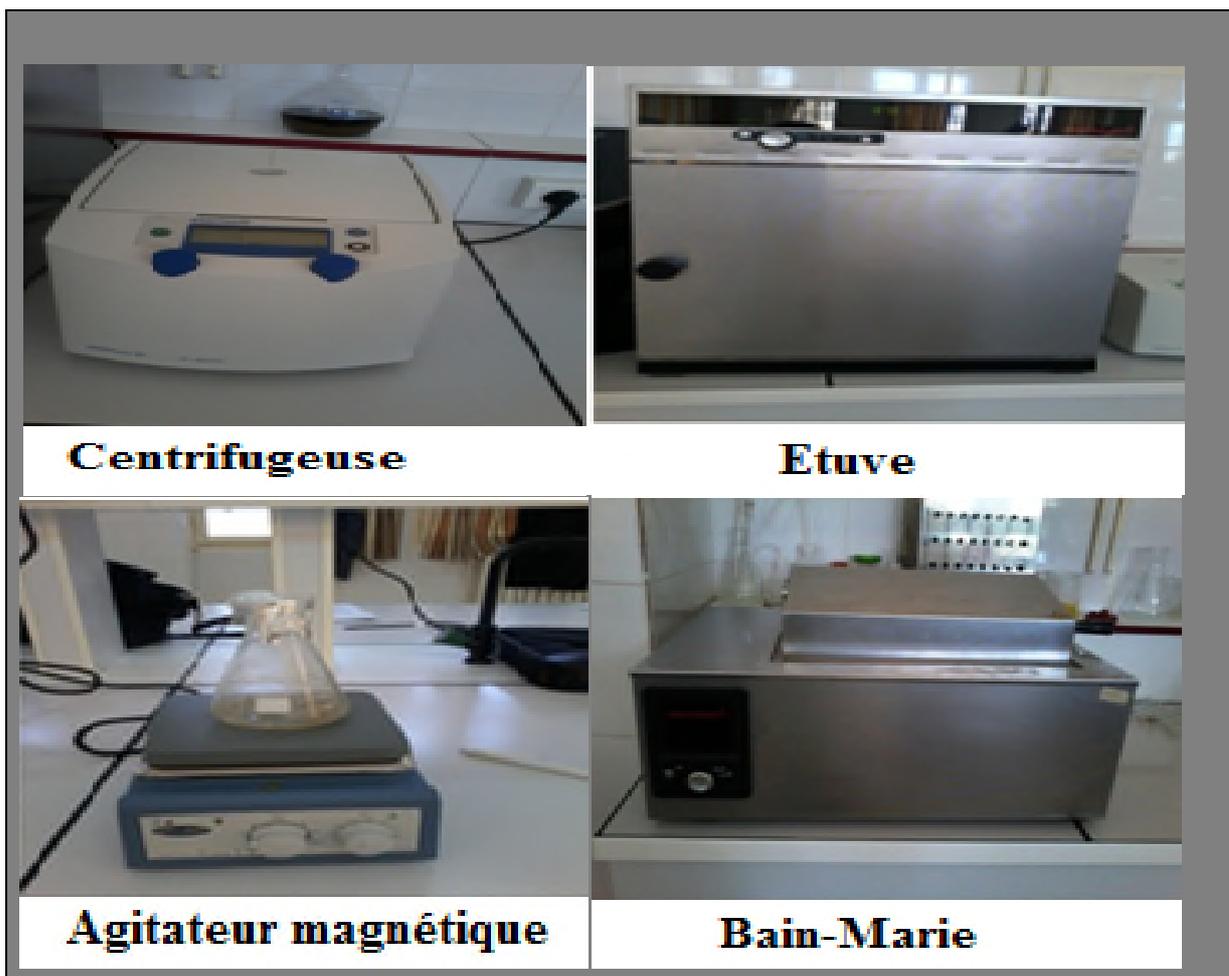


Image représentant les appareils utilisés

➤ **Verrerie**

-Fioles, tubes à essais, entonnoirs, pipettes pasteur, bécher

-Ampoule à décanter 250ml

-Ballon

-Burette graduée

-Boîtes de pétri

-Verres à montre

-Papier filtre sans cendre

-Erlenmeyer

-Plaque de couche mince (CCM) : TLC Silica gel 60F254.

Annexe 3 : Préparation de milieux de cultures

-Muller Hinton

Hydrolysate acide de caséine 18,5 g/L

Infusion de viande 2 g/L

Amidon soluble 1,5 g/L

Agar bactériologie 17 g/L

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C 7,3.

-Gélose nutritif

Tryphone 5g/L

Meat extract Bacteriological agar 12g/L

-Bouillon nutritive

Tryptone 10g/l

Meat extract 5g/l

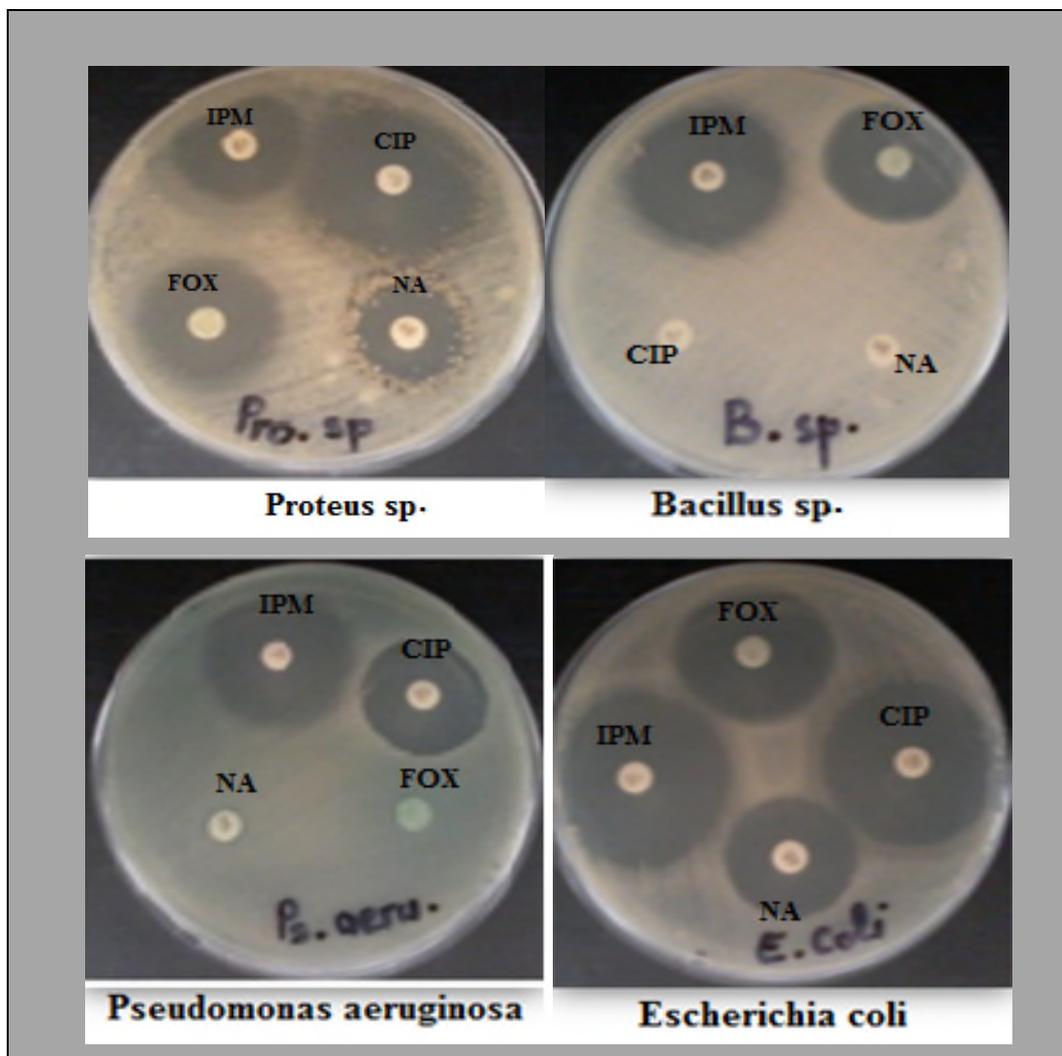
Sodium chloride 5 g/L

-Eau physiologique :

Na Cl 9 g

Eau distillé 1000 ml

Annexe 4 : Image représentant l'action inhibitrice des antibiotiques sur quelques souches bactériennes testés



Annexe 5: Image représentant l'action inhibitrice des extraits méthanolique, chloroformique et aqueux aux concentrations (8mg/ml) et (4mg/ml) sur quelques souches bactériennes testés.

