



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Science de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biotechnologie et valorisation des plantes
Réf. :

Présenté et soutenu par :

ATMANE Khaoula

Le : Mercredi 17 juillet 2019

Thème

Extraction des polyphénols et évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits des trois plantes médicinales dans la région de Biskra

Mme.	BENAMEUR Nassima	MCB	Université de Biskra	Président
Mme.	KRIKER Soulef	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
M.	GUEMAZ Fateh	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Tout d'abord, Je tiens à remercier " Dieu" qui me donnée le courage, la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements et toute ma reconnaissance à mon encadreur Mme KRIKER Soulef Professeur au département de Biologie, Université Mohamed Kheider Biskra d'avoir accepté de réaliser ce travail.

Je remercie les membres de jury d'avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à mes chers parents pour leur soutien inconditionnel tout au long de mes études et la confiance qu'ils m'ont toujours témoignée.

J'exprime mes vifs remerciements à ma seule sœur, Soumia

Je tiens à remercie mon fiancé pour leur soutien et encouragement.

Merci à toute ma famille et mes amis pour leurs présence à mes côté.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents Fadila et Boubaker, ceux qui m'ont donné la vie, qui sont sacrifiés pour mon bonheur et ma réussite, qui m'ont toujours apportés tout l'effort et le soutien incessant. J'espère qu'un jour je pourrai leurs rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi,

que Dieu les bénisse et leur donne une longue vie.

A ma seule sœur, Soumia je vous souhaite une vie pleine de bonheur.

A mes chers frères, Riadh, Aymen, Hamada.

A mon cher fiancé Noureddine.

A tous mes oncles et mes tantes.

A mes grands-pères et mes grands-mères.

A tous membres de ma grande famille ATMANE.

A mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours de mon cursus à l'université : Meriem, Rayane, Soad, Djoumana, Oum hani, Radhia, Wided, Sa3ida, Samira.

Et toute la promotion de Biotechnologie Végétale 2018/2019.

A tous qui me connaissent de près ou de loin.

Merci du fond de cœur.

Khaoula ATMANE

Sommaire

Page de garde	
Remerciements	
Dédicaces	
Liste des tableaux	Erreur ! Signet non défini.
Liste des figures	Erreur ! Signet non défini.
Liste des abréviations	Erreur ! Signet non défini.
Introduction générale.....	Erreur ! Signet non défini.
Chapitre 1 : Généralité sur les plantes médicinales.....	Erreur ! Signet non défini.
1. Définition des plantes médicinales.....	Erreur ! Signet non défini.
1.1 <i>Matricaria pubescens</i> (Desf)	Erreur ! Signet non défini.
1.1.1 Classification systématique.....	Erreur ! Signet non défini.
1.1.2 Description morphologique	4
1.1.3 Habitat et répartition géographique	4
1.1.4 Usage traditionnel de la plante	4
1.1.5 Principes actifs	4
1.2 <i>Anvillea radiata</i> Coss. & Dur.....	Erreur ! Signet non défini.
1.1.1 Classification systématique.....	5
1.1.2 Description morphologique	5
1.1.3 Habitat et répartition géographique	6
1.1.4 Usage traditionnel de la plante	6
1.1.5 Principes actifs	6
1.3 <i>Astragalus armatus</i> L.....	6
1.1.1 Classification systématique.....	6
1.1.2 Description morphologique	7
1.1.3 Habitat et répartition géographique	7
1.1.4 Usage traditionnel de la plante	7
Chapitre 2 : Composés phénoliques	8
1. Définition des composés phénoliques	8
2. Biosynthèse	8
3. Classification des polyphénols	9
3.1 Les acides phénoliques.....	9

3.2 Flavonoïdes	9
3.3 Les tannins	9
4. Effets biologiques des polyphénols	10
Chapitre 3 : Matériel et méthodes	11
1 Matériel	11
1.1 Matériel végétal	11
1.2 Matériel biologique	11
2. Méthodes	12
2.1. Préparation des extraits bruts	12
2.2 Détermination du rendement des extraits secs (Djabou et Nigra, 2006)	Erreur ! Signet non défini.
2.3 Etude qualitative (Criblage phytochimique)	14
2.4 Etude quantitative (Méthodes chlorométriques)	Erreur ! Signet non défini.
2.5 Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits	17
2.6 Evaluation de l'effet antifongique.....	Erreur ! Signet non défini.
Chapitre 4 : Résultats et discussion.....	Erreur ! Signet non défini.
1. Détermination de rendement	Erreur ! Signet non défini.
2. Etude qualitative (Criblage phytochimique)	Erreur ! Signet non défini.
3. Etude quantitative (Méthodes chlorométriques).....	Erreur ! Signet non défini.
3.1 Dosage des polyphénols totaux.....	Erreur ! Signet non défini.
3.2 Dosage des flavonoïdes totaux.....	Erreur ! Signet non défini.
3.3 Dosage des tanins condensés	Erreur ! Signet non défini.
3.4 Dosage des triterpènes	Erreur ! Signet non défini.
4. Evaluation de l'activité antibactérienne	Erreur ! Signet non défini.
4.1 Activité antibactérienne des extraits bruts par la méthode des disques	Erreur ! Signet non défini.
4.2 Antibiogramme des différentes souches bactériennes utilisées	34
4.3 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice(CMI) et Bactéricide(CMB)	Erreur ! Signet non défini.
5. Evaluation de l'effet antifongique.....	Erreur ! Signet non défini.
Conclusion.....	Erreur ! Signet non défini.
Références bibliographiques	Erreur ! Signet non défini.
Résumé	

Liste des tableaux

Tableau 01. Structure des squelettes des polyphénols	10
Tableau 02. le rendement obtenu de l'extrait acétonique	22
Tableau 03. Résultats du criblage phytochimique des plantes étudiées.....	23
Tableau 04. Diamètre de la zone d'inhibition de l'extrait acétonique de <i>M. pubescens</i> en fonction de concentration (100,50 et 25 mg/ml).	31
Tableau 05. Sensibilité des souches bactériennes d'extrait de <i>Matricaria pubescens</i>	31
Tableau 06. Diamètre de la zone d'inhibition de l'extrait acétonique d' <i>Anvillea radiata</i> en fonction de concentration (100,50 et 25 mg/ml).	32
Tableau 07. Sensibilité des souches bactériennes d'extrait d' <i>Anvillea radiata</i>	33
Tableau 08. Diamètre de la zone d'inhibition de l'extrait acétonique d' <i>Astragalus armatus</i> en fonction de concentration (100,50 et 25 mg/ml).	33
Tableau 09. Sensibilité des souches bactériennes d'extrait d' <i>Astragalus armatus</i>	34
Tableau 10. Valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des extraits en (mg/ml).....	35

Liste des figures

Figure 01. <i>Matricaria pubescens</i> (Site web 1)	3
Figure 02. <i>Anvillea radiata</i> Coss & Dur (Site web).....	5
Figure 03. <i>Astragalus armatus</i> (Site web 3).....	7
Figure 04. Biosynthèse des composés phénolique le plus largement distribués par la voie de shikimate (Crozier et al, 2006).....	8
Figure 05. Etapes de préparation des extraits bruts.....	13
Figure 06. Repiquage des souches bactériennes.....	17
Figure 07. Le dépôt des disques d'aromatogramme	18
Figure 08. micro plaque de La concentration minimale inhibitrice	19
Figure 09. Rendement (%) d'extrait de <i>Matricaria pubescens</i> , <i>Anvillea radiata</i> , et <i>Astragalus armatus</i>	22
Figure 10. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux...	25
Figure 11. Teneur des polyphénols totaux des trois extraits.	25
Figure 12. Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.....	26
Figure 13. Teneur des flavonoïdes totaux des trois extraits	27
Figure 14. Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.....	28
Figure 15. Teneur des tanins condensés des trois extraits.....	28
Figure 16. Courbe d'étalonnage de l'acide ursolique pour le dosage des triterpènes	29
Figure 17. Teneur des triterpènes des trois extraits.....	30
Figure 18. Exemple de zone d'inhibition exercée par l'extrait de <i>M. pubescens</i> sur les souches bactériennes testées.	31
Figure 19. Exemple de zone d'inhibition exercée par l'extrait d' <i>A. radiata</i> sur les souches bactériennes testées.	32
Figure 20. Exemple de zone d'inhibition exercée par l'extrait d' <i>A. armatus</i> sur les souches bactériennes testées.	33
Figure 21. Les zones d'inhibition exercées par les antibiotiques sur les souches bactériennes testées	34
Figure 22. Exemple de l'effet antifongique des extraits sur <i>Aspergillus niger</i>	36

Liste des abréviations

Abs : Absorbance

AC : Acétone

AlCl₃ : trichlorure d'aluminium

ATB : Antibiotique

DMSO : Diméthylsulfoxyde

ET : Ecartype

HCL : Chlorhydrique concentré

MET : Méthanol

Mg EAG/ g MS : milligramme d'équivalent de l'acide gallique par gramme de matière sèche.

Mg EQ/g MS : Milligramme d'équivalent quercétine par gramme de matière sèche.

Mg ECA/g MS : Milligramme d'équivalent de catéchine par gramme de matière sèche.

Mg EAU /g MS : Milligramme d'équivalent d'acide ursolique par gramme de matière sèche.

MS : matière sèche.

Na₂CO₃ : carbonate de sodium.

TCP : Teneur en composés phénoliques.

Introduction générale

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments. (Maurice, 1997).

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent en premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques décroît (Harrar, 2012), les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires.

L'Algérie est riche en diverses plantes utilisées par nos ancêtres dans divers domaines, en particulier le domaine médical, comme *Matricaria pubescens*, *Anvillea radiata*, *Astragalus armatus*.

L'évaluation des propriétés antibactériennes et antifongiques demeure une tâche très intéressante et utile pour l'utilisation plus au moins fréquente dans les traditions locales médicinales et culinaires. Ces plantes représentent une nouvelle source des composés bioactifs.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de quantifier les composés phénoliques contenus dans les parties aériennes de trois plantes médicinales *M. pubescens*, *A. radiata*, *A. armatus*, et d'évaluer l'activité antibactérienne et antifongique des extraits de ces plantes.

Ce manuscrit est divisé en deux parties

La partie bibliographique est structurée autour de deux chapitres, le premier chapitre porte sur les plantes médicinales incluant la description (les caractères botaniques et la systématique) des espèces végétales étudiées, la répartition géographique et quelques utilisations en pharmacopée traditionnelle. Et le deuxième chapitre présente les métabolites secondaires

Chapitre 1 : Généralité sur les plantes médicinales

1. Définition des plantes médicinales

La définition d'une plante médicinale est très simple, en fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Ce sont des plantes qu'ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutique (Mohammedi, 2006).

1.1 *Matricaria pubescens* (Desf)

1.1.1 Classification systématique

La classification botanique de cette plante est décrite comme suit (Judd *et al.*, 2002 ; Ozenda , 2004).

Règne : Plantae

Embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Gamopétales

Ordre : Asterales

Famille : Compositae (asteraceae)

Genre : *Matricaria*

Espèce : *Matricaria pubescens* (Desf.)



Figure 01. *Matricaria pubescens* Desf (Site web 1)

1.1.2 Description morphologique

Matricaria pubescens est une petite plante annuelle, de 10 à 20 cm, à tiges nombreuses couchées puis redressées. Les tiges vertes sombres et minces sont juste légèrement ramifiées (Bounaga, 1999). Les feuilles profondément disséquées avec chaque extrémité du lobe en pointe blanche sont légèrement charnues. Les fleurs jaunes tubulaires sont groupées en têtes discoïdes hémisphériques. Les têtes des fleurs ont un diamètre de 5 à 8mm environ, et placées à la fin des tiges. Les fruits sont des akènes avec une petite aigrette membraneuse qui aide à la dispersion. La plante entière a une odeur très agréable. La floraison se voit en printemps au nord de Sahara algérien (Bounaga, 1999 ; Ozenda, 2004).

1.1.3 Habitat et répartition géographique

Matricaria pubescens est commune au Sahara algérien, c'est une plante endémique au nord d'Afrique (Benhouhou et Saadoun, 1986). Elle grandit dans les conditions du désert. Elle est toujours trouvée dans les Wadis non salés et les terrains du sable argileux protégé et occasionnellement dans les terrains sablés caillouteux (Bellakhdar, 1997).

1.1.4 Usage traditionnel de la plante

Elle est utilisée pour traiter la dysménorrhée, la toux, les maladies oculaires et rénales, les rhumatismes, les douleurs des maladies infectieuses et de l'abdomen, la sécheresse, la dentition, les allergies, et la morsure des scorpions. Chez les enfants, elle est utilisée contre la rougeole, les maux de dents, la fièvre et les maladies de la peau (dermatoses) (Hammiche et Maiza, 2006). Elle est également utilisée dans la saveur des soupes, en particulier au cours du mois de Ramadan. Elle peut être ajoutée au thé. Elle est récoltée et commercialisée à grande échelle (Ouchikh et Serier, 2004).

1.1.5 Principes actifs

Coumarines, flavonoïdes, amides, terpènes, hétérosides, sesquiterpènes lactones (Guignard, Cossen, Henry, 1985), des amides, polysaccharides, hydrocarbures, triglycérides et des acides gras (Stransky et *al.*, 1981).

1.2 *Anvillea radiata* Coss. & Dur.

1.2.1 Classification systématique (Quezel et Santa, 1963; Dupont et Guignard, 2007)

Embranchement : Spermatophytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicots

Sous classe : Astéridées

Ordre : Asterales

Famille : Asteraceae

Genre : *Anvillea*

Espèce : *Anvillea radiata* Coss. & Dur



Figure 02. *Anvillea radiata* Coss & Dur (Site web 2).

1.2.2 Description botanique

Arbuste très rameux, à tiges et rameaux ligneux à la base. Feuilles vert bleuté en forme de triangle allongé et à bord denté. Les inflorescences disposées en larges capitules jaunes orangés sont entourées de feuilles rayonnantes qui passent progressivement aux bractées coriaces et piquantes. La plante dégage un léger parfum agréable (Quezel et Santa, 1963).

1.2.3 Habitat et répartition géographique

Sud du Sahara septentrional, Sahara central dans les dépressions sablo argileuse. Espèce endémique saharienne (Quezel et Santa, 1963).

1.2.4 Usage traditionnel de la plante

L'infusion de la partie aérienne est utilisée contre les maux d'estomac, les maladies du foie et comme un remède pour le diabète (Hammiche et Maiza, 2006).

1.2.5 Principes actifs

Les tanins, les saponines, les pectines (Lakhdar et *al.* 2013 ; Hamada & Ladjel 2015).

1.3 *Astragalus armatus* L

1.3.1 Classification systématique (Sell et *al.*, 2002)

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Genre : *Astragalus*

Espèce : *Astragalus armatus* L (Sell et *al.* 2002).



Figure 03. *Astragalus armatus* L (Site web 3).

1.3.2 Description botanique

Plante vivace très épineuse, à tiges ligneuses dressées, ne dépasse guère 60 cm de haut. Feuilles pétiolées, imparipennées, composées de folioles étroites d'un vert foncé. Fleurs médiocres axillaires (Ntetws, 1984).

1.3.3 Habitat et répartition géographique

L'Astragale se trouve dans les montagnes et dans les pieds isolés et les lits des oueds, les résultats obtenus sont convenables avec (Chehma, 2006).

1.3.4 Usage traditionnel de la plante

Il est utilisé comme tonique, stimulant et en cas d'anémie (Khalfallah et *al.*, 2011). Augmenter l'endurance et les défenses immunitaires de l'organisme. Les racines séchées de cette plante sont de plus en plus prescrites, en Europe pour prévenir les rhumes et les infections virales et pour soulager les douleurs menstruelle (Hans, 2007)

Chapitre 2 : Composés phénoliques

1. Définition des composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins. (Boizot N et Charpentier J. P, 2006).

2. Biosynthèse

Les composés phénoliques constituent un groupe important de métabolites secondaires. La plupart des molécules phénoliques sont formées à partir de deux acides aminés aromatiques, tyrosine et phénylalanine. Ces acides aminés sont formés de façons variables suivant les végétaux, à partir de la voie de l'acide shikimique (Macheix et *al.*, 2005).

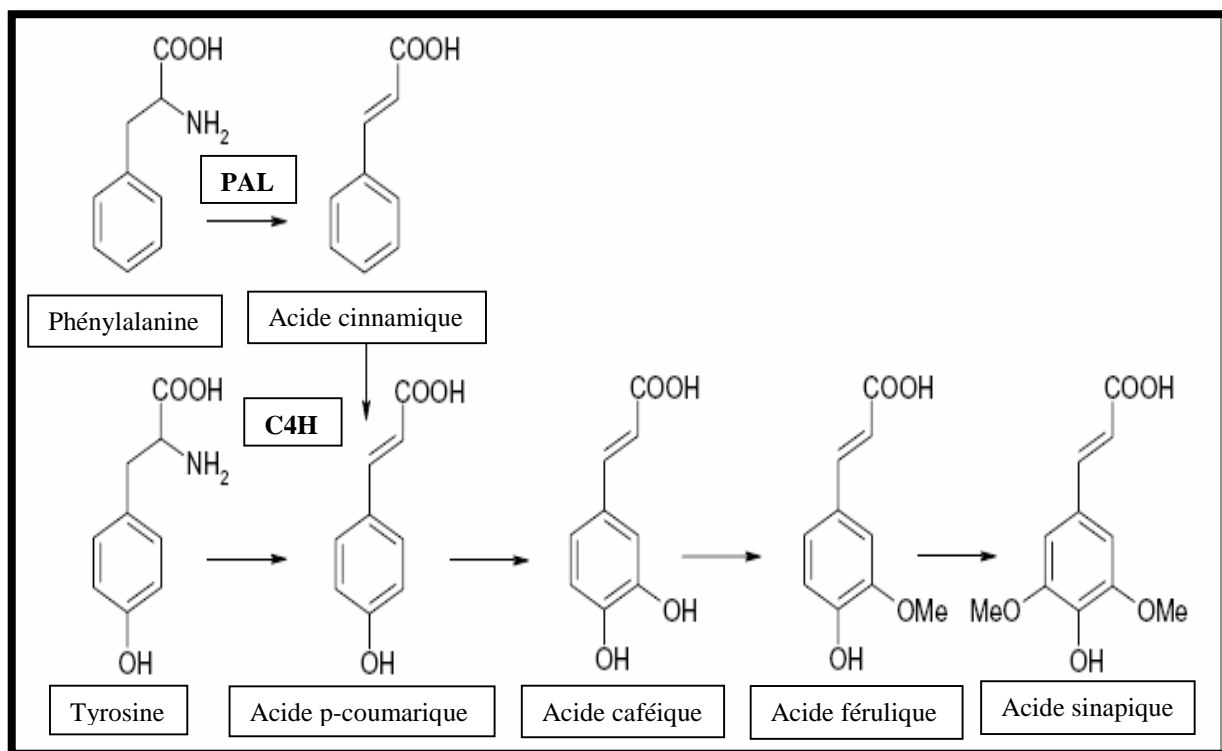


Figure 04 : Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate (Crozier et al, 2006). PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase

3. Classification des polyphénols

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones. Ces molécules sont généralement trouvés conjuguées aux sucres et les acides organiques.

3.1 Les acides phénoliques

Ces composés sont universellement rencontrés chez les plantes. Deux sous-groupes peuvent être distingués :

- Les acides hydroxybenzoïques, dont les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique
- Les acides hydroxycinnamiques, dont les plus abondants sont l'acide caféique et l'acide férulique. (NKHILI, 2009)

3.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules très répandues dans le règne végétal. Ce sont des pigments responsables de coloration jaune, orange et rouge de différents organes de végétaux. Ils sont rencontrés dans les fruits, légumes, les boissons (vin rouge, thé, café) et plusieurs plantes médicinales (Ghedira, 2005).

3.3 Les tannins

Les tannins sont des polyphénols polaires de haut poids moléculaire d'origine végétale existant dans presque toutes les parties de la plante : écorce, bois, feuilles, fruits et racines. Ils sont divisés en 2 groupes :

- Tannins hydrolysables (qui donnent après hydrolyse soit de l'acide gallique soit de l'acide ellagique)
- Tannins condensés ou catéchiques (constitués de la condensation des dérivés flavane). (HADJ SALEM, 2009).

Tableau 01. Structure des squelettes des polyphénols (Crozier *et al.*, 2006)

Nombre de Carbones	Squelette	Classification	Exemple
7	C6-C1	Acides phénols	Acide gallique
8	C6-C2	Acétophénonnes	Gallacetophénone
8	C6-C2	Acide phénylacétique	Acide hydroxyphénylacétique
9	C6-C3	Acides hydroxycinamiques	Acide coumarique
9	C6-C3	Coumarines	Esculitine
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone
13	C6-C1-C6	Xanthonnes	Mangiferine
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Resveratrol
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes	Naringénine

4. Effets biologiques des polyphénols

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs divers propriétés physiologiques comme les activités antiallergique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, cardioprotective et vasodilatatoire (Middleton *et al.*, 2000 ; Ksouri *et al.*, 2007).

Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (Nijveldt *et al.*, 2001).

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1 Matériel végétal

Notre étude a été portée sur la partie aérienne (tiges, feuilles et fleurs) des trois plantes médicinales étudiées

1.1.1 La récolte

Les plantes sont récoltées au mois de janvier 2019, dans la région de Biskra au sud-est du Sahara Algérien

1.1.2 L'identification

L'identification des plantes a été effectuée, par Mme Bouatrous Y. Dr au niveau de département de Biologie Biskra.

1.1.3 Lavage

Les plantes récoltées sont bien nettoyées et lavées avec l'eau afin de se débarrasser de toute poussière et matières étrangères comme le sable, le sol ...etc.

1.1.4 Le séchage

Nos échantillons sont séchés à une température ambiante dans un endroit aéré et à l'abri de la lumière pendant une semaine.

1.1.5 Broyage et Conservation

Nos échantillons sont broyés à partir d'un mortier, les poudres ont été conservées jusqu'à l'utilisation.

1.2 Matériel biologique

1.2.1 Les souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans notre étude sont

1.2.1.1 *Escherichia coli* ATCC25922

C'est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif de l'homme et de l'animal, de forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 μm , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 μm , *E. coli* représente la bactérie

la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, diarrhée infantile et les intoxications alimentaires (Harrar, 2012).

1.2.1.2 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27353

Ce sont des bacilles Gram négatif, de forme non sporulée, elles sont aérobies, mobiles grâce à la présence de 1 à 2 flagelles, ce type de bactérie synthétise de types principaux de pigments pyocyanine : bleue phénazine, pyoverdine: jaune vert, il s'agit de bactéries résistantes pour plusieurs antibiotiques. *Pseudomonas aeruginosa* est responsable de 16% des cas de pneumonie nosocomiale, 12% des infections urinaires, 8 % des infections suites aux blessures chirurgicales (Harrar, 2012).

1.2.1.3 *Staphylococcus aureus* ATCC25923

Ce sont des cocci Gram positif avec un diamètre de 0,5 à 1,5 µm, de forme non sporulée, qui tendent à se grouper en paires, petites chaînes, elles sont habituellement non capsulée, ou possédant des capsules limitées, elles sont anaérobies facultatives. *Staphylococcus aureus* représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures, endocardite aiguë, intoxication alimentaire (Harrar, 2012).

Conservation des souches

La conservation des souches se fait au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à l'utilisation.

1.2.2 Les souches fongiques

1.2.2.1 *Aspergillus niger*

2. Méthodes

2.1. Préparation des extraits bruts

50g de chaque plante broyée, additionné au 500 ml d'acétone/eau distillée (350 /150). Portés à l'ébullition .on laisse 30 min sous reflux .Et on filtre puis on renouvelle l'opération deux fois. Après filtration les extraits organiques subissent une évaporation (55°C) à l'aide d'un rota-vapeur (Heidolph) pour éliminer l'acétone, puis séché dans l'étuve (40°C). L'extrait est gardé dans le réfrigérateur à une température de 4°C jusqu'à l'analyse. (Himour, 2016).

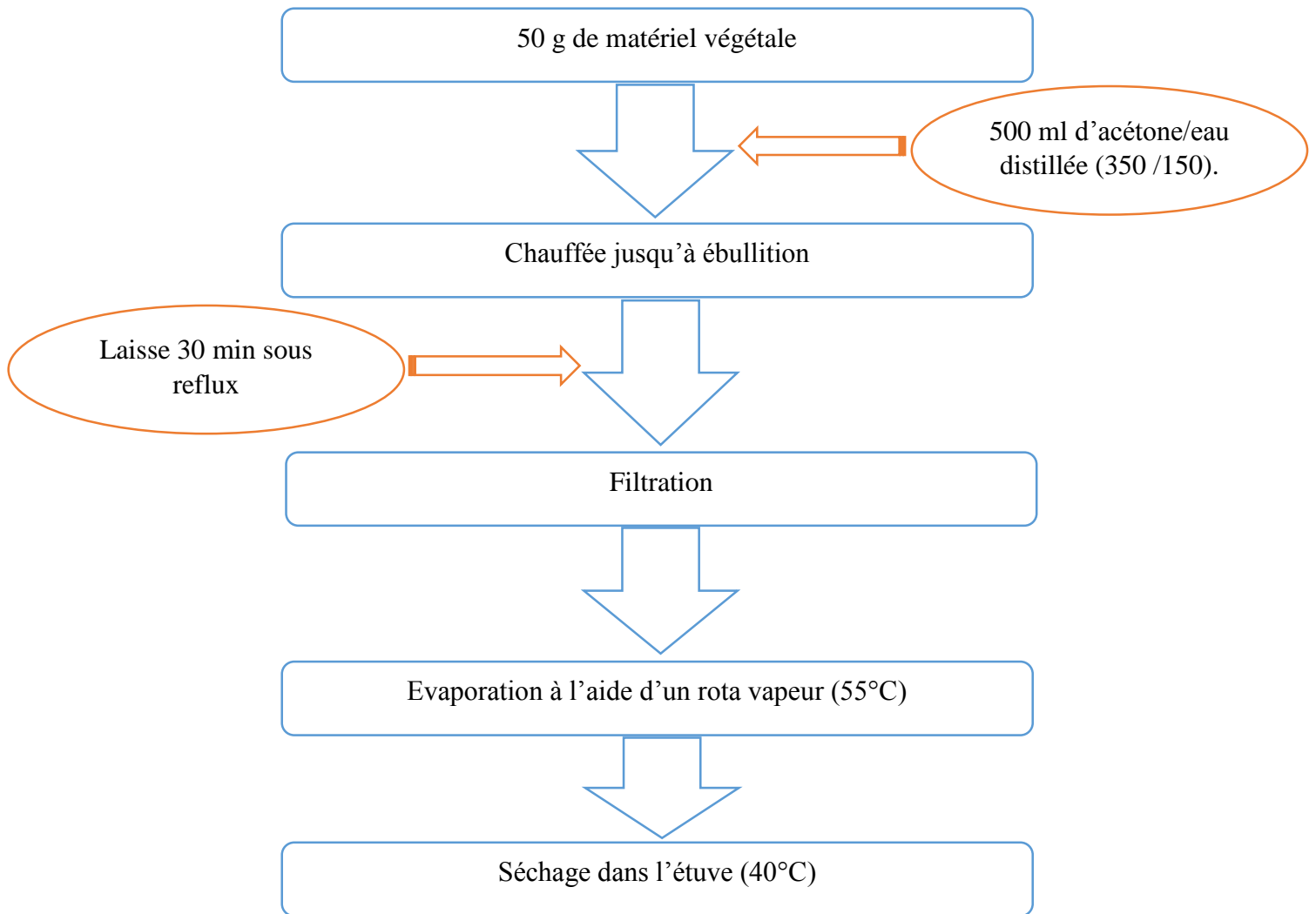


Figure 05. Etapes de préparation des extraits bruts

2.2 Détermination du rendement des extraits secs (Djabou et Nigra, 2006)

Le rendement est déterminé par le rapport du poids de l'extrait sec après évaporation sur le poids de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction, multiplié par 100

$$\text{Rd \%} = (m1 \times 100) / m0$$

Où :

m1 : masse en gramme de l'extrait sec.

m0 : masse en gramme de la matière végétale sèche.

Rd% : rendement.

2.3 Etude qualitative (Criblage phytochimique)

Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation ainsi qu'à des examens en lumière ultraviolette. Ces techniques permettent de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal.

Un criblage phytochimique a été réalisé avec des extraits à l'acétone d'extraits de *M. pubescens*, *A. radiata*, *A. armatus* en utilisant des procédures standard telles que décrites par Sofowora, 2008; Trease et Evans 1989; Odebiyi et Sofowora 1978 et Harborne 1973.

2.3.1 Test des alcaloïdes

Ont été caractérisés grâce aux réactifs de Mayer et de Dragendorff ; un extrait sulfurique a été préparé à partir de 5 g de poudre et de 25 ml de H₂SO₄ à 10%. Après agitation, il fut laissé en macération pendant 24 h à la température ambiante du laboratoire, puis filtré sur papier filtre et lavé à l'eau distillée de manière à obtenir 25 ml. Le procédé a consisté à utiliser 1 ml de ce filtrat dans 2 tubes à essai et à ajouter 5 gouttes du réactif de Dragendorff dans le premier tube et 5 gouttes du réactif de Mayer dans le deuxième tube, l'apparition de précipités indique la présence d'alcaloïdes.

2.3.2 Test de tannin

0,5 g d'extrait de plante a été mélangé avec 2 ml d'eau et chauffé au bain-marie. Le mélange a été filtré et 1 ml de solution de FeCl₃ à 10% ont été ajoutés au filtrat. Une solution bleu-noir indique la présence de tanin

2.3.3 Test de flavonoïde

5 ml d'eau distillée et environ 0,2 g d'extrait de plante ont été mélangés soigneusement. Et 1 ml de solution à 1% d'AlCl₃ a été ajouté et agité. Un précipité jaune clair indique la présence de flavonoïdes.

2.3.4 Test de phénol

Environ 0,5 g d'extrait de plante a été ajouté à 1 ml de solution de FeCl₃ à 10%. Une coloration vert bleuâtre foncée était une indication de la présence de phénol.

2.3.5 Test de saponine

Environ 0,2 g d'extrait de plante ont été agités avec 4 ml d'eau distillée, puis chauffés à ébullition au bain-marie. L'apparence de manque crémeux de petites bulles (Frothing) montre la présence de saponine

2.3.6 Test de glycoside

0,2 g d'extrait de plante et 2,5 ml d'acide sulfurique dilué ont été mélangés et bouillis pendant 15 minutes, refroidis et neutralisés avec 5 ml de solution de Fehling A et B. La formation de précipité rouge brique a confirmé la présence de glycoside.

2.3.7 Test d'huile volatile

0,2 g d'extrait de plante et 2 ml d'éthanol ont été mélangés et quelques gouttes de solution de chlorure ferrique ont été ajoutées. Une coloration verte indique une huile volatile

2.3.8 Test de stéroïdes (test de Salkowski)

0,2 g d'extrait de plante et 2 ml de chloroforme ont été ajoutés, 2 ml d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés pour former une couche. La formation d'un anneau violet / bleu / vert / brun rougeâtre à l'interface indique la présence d'un anneau stéroïdien.

2.4 Etude quantitative (Méthodes chlorométriques)

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une structure chimique donnée en solution (latifou, 2005).

2.4.1 Dosage des polyphénols totaux

Mode opératoire

Le dosage des polyphénols totaux a été déterminé par spectrophotométrie, selon la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait.

Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par (Singleton et Ross, 1965) en y apportant quelques modifications. Brièvement, dans des tubes à hémolyse en verre, un volume de 200µl de chaque extrait a été ajouté, avec un mélange de 1 ml de réactif Folin-Ciocalteu dilué 10 fois, et 800µl d'une solution de carbonate de sodium à 7,5 %. Les tubes sont agités et conservés pendant 30 min. L'absorbance est lue à 765 nm.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (Ali-Rachedi, 2018).

2.4.2 Dosage des flavonoïdes totaux

Mode opératoire

La détermination de la teneur des flavonoïdes totaux a été effectuée par une méthode adaptée par (Bahorun et al., 1996) avec le trichlorure d'aluminium.

Dans des tubes à hémolyse en verre 1ml d' AlCl_3 à 2 % est ajouté à 1ml d'extrait, puis le mélange est agité. L'absorbance est lue à 430 nm après incubation de 15 minutes à l'obscurité, contre un blanc.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant le Quercétine à différentes concentrations. (Saffidine, 2015)

2.4.3 Dosage des tanins condensés

Mode opératoire

La teneur en tanins condensés a été déterminée par la méthode de vanilline décrite par (Julkunen-Titto, 1985)

Un volume de 50 μl de chaque extrait a été ajouté à 1500 μl de la solution vanilline/méthanol à 4 %, puis mélangé vigoureusement. Ensuite, un volume de 750 μl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) a été additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à température ambiante pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant le Quercétine à différentes concentrations. (Ali-Rachedi, 2018).

2.4.4 Dosage des triterpènes

Mode opératoire

La détermination des triterpènes a été effectuée par la méthode décrite par (Chang, 2006). Le principe de cette méthode est la réaction des triterpènes oxydés avec la vanilline, ou l'acide sulfurique est utilisé comme oxydant.

Dans des tubes à essais 20 μl d'extrait sont mélangé avec 30 μl de vanilline, 100 μl d'acide perchlorique, le mélange est homogénéisé puis, il est mis en incubation pendant 45 minutes à 60°C à l'obscurité. Après refroidissement dans un bain glacé, 450 μl d'acide acétique sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 548 nm contre un blanc.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide ursolique à différentes concentrations.

2.5 Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits

2.5.1 Méthode de diffusion sur disque en milieu solide

2.5.1.1 Repiquage des souches bactériennes

Les souches bactériennes sont repiquées par la méthode des stries sur la surface des boîtes de pétries pré-coulés en gélose nutritive pour obtenir des colonies bien isolées après incubation à l'étuve à 37 °C pendant (18-24) heures.

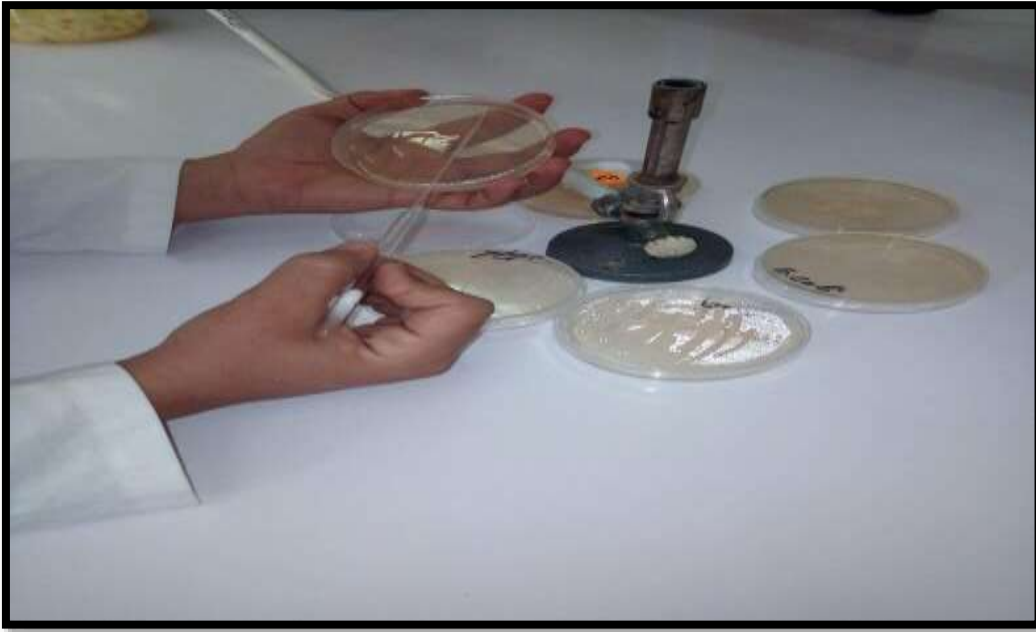


Figure 06. Repiquage des souches bactériennes

2.5.1.2 Préparation des milieux de culture

La gélose de Muller Hinton stérile prête à l'usage a été coulée dans des boîtes de pétrie stériles de 90 mm de diamètre. L'épaisseur de la gélose est de 2 mm répartie uniformément dans les boîtes et qu'on a laissé refroidir et solidifiée sur la paillasse.

2.5.1.3 Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure de 18-24h, des colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées, puis déchargées dans 9 ml d'eau physiologique stérile et bien homogénéisée. L'opacité de l'inoculum doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une densité optique de 0,08 à 0,10 à 625 nm (ce qui correspond à environ 108 UFC/ml).

2.5.1.4 Ensemencement et dépôt des disques

Un écouvillon stérile est imbibé dans la suspension bactérienne, puis essoré sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées. L'opération est répétée trois fois, en tournant la boîte de 120° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même et en le passant sur la périphérie de la gélose.

Des disques de papier Wattman N°3 de 6mm de diamètre, stérilisés (120 °C pendant 15 min) imbibés de 10µl de chaque extrait avec une gamme de concentrations (200mg/ml, 100mg/ml, 50mg/ml et 25 mg/ml). Ces disques sont placés à la surface des géloses. Le test est répété deux fois pour l'obtention des résultats fiables. Les boîtes de pétri ont été incubées à 37°C pendant 24 heures dans l'étuve. A la fin de l'incubation, nous avons noté l'activité des extraits, en mesurant la zone d'inhibition, autour des disques, à l'aide d'une règle.

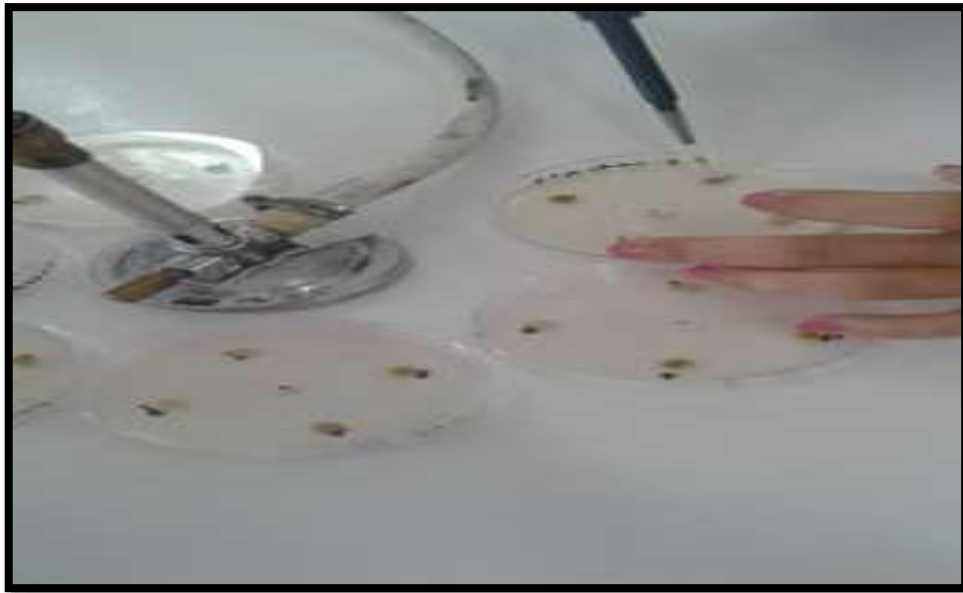


Figure 07. Le dépôt des disques d'aromatogramme

2.5.1.5 Lecture des résultats

Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des extraits (Ponce et *al.* 2003).

Non sensible (-) ou résistante : diamètre <8mm

Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14mm

Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19mm

Extrêmement sensible (+++) : diamètre >20mm

2.5.2 Méthode des micro-dilutions en milieu liquide

Ce test en milieu liquide a pour objectif de déterminer la valeur des paramètres antimicrobiens dont la Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) ont été déterminées en utilisant la technique de micro-dilution avec le bouillon Muller Hinton.

La micro-dilution est généralement effectuée dans des plaques de 96 puits à fond arrondi (NCCLS, 2000).

2.5.2.1 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

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

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



Figure 08. Micro plaque de La concentration minimale inhibitrice

2.5.2.2 Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

La CMB de nos extraits a été déterminée à partir de la première boîte dépourvue de bactérie, et a été déterminée en prélevant 100 µl de chaque suspension dans les puits sans croissance visible et en ensemençant sur gélose MH. L'incubation s'est faite à 37 °C pendant 24 heures

2.6 Evaluation de l'effet antifongique

Pour l'étude de l'activité antifongique des extraits en vers les moisissures, on a opté pour la méthode de confrontation directe (Bouaoud et *al.*,2017). Cette méthode consiste à placer au centre d'une boîte de Pétri contenant la gélose PDA un disque mycélien (6 mm de diamètre) du champignon cible obtenu d'une culture de 4 jours de chaque champignon, Sur la même boîte, 4 disques imprégnés des extraits (20µL) à étudier sont prélevés et chacun est placé à une distance de 2,5 cm du disque de pathogène. Une boîte contenant le pathogène seul est préparée, elle est utilisée comme témoin et incubée en même temps avec les autres boîtes.

2.6.1 Préparation des milieux de cultures

2.6.1.1 Milieux PDA (Potato Dextrose Agar)

Le milieu utilisé pour l'incubation, l'entretien et la réalisation de l'antifongigramme pour les moisissures est le PDA (Potato Dextrose Agar).

- Peser 200 g de pommes de terre lavées coupées en tranches fines.
- Faire cuire dans 1L d'eau distillée pendant 1h.
- Filtrer sur plusieurs couches d'étamine.
- Ajouter 20 g d'agar agar et 20 g de glucose et compléter à 1L si nécessaire.
- Placer le milieu sous agitation magnétique avec chauffage pendant 30 minutes.
- Ajuste le pH à 5,5
- Autoclave 121°C /15 minutes.

2.6.1.2 Préparation des disques

Les disques sont préparés à partir du papier Wattman N°3 à l'aide d'un perforateur de papier, avec un diamètre de 6 mm, ces disques sont mis dans un tube à essai, puis autoclaves à 121° C pendant 15 minutes.

2.6.1.3 Repiquage des souches

Les souches fongiques utilisées ont été repiquées sur milieu PDA en déposant un disque mycélien (issu d'une culture jeune) au centre d'une boîte de PDA déjà coulée puis incubées aux températures idéales à 28°C (Celis-Arias et al. 2013)

2.6.1.4 Préparation des boîtes

- ❖ Coulage de boîtes en utilisant le milieu PDA
- ❖ Les boîtes sont repérées à raison de 5 points par boîte (4 points pour les extraits et un point central) pour le disque mycélien du champignon

2.6.1.5 Application des disques

Les disques des extraits sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince flambée. Le disque mycélien (préparé à l'aide d'un emporte-pièce) du champignon cible a été déposé au centre de la boîte.

Une boîte ne contenant que le disque du champignon cible est incubée dans les mêmes conditions est considérée comme témoin.

2.6.1.6 Interprétation des résultats

Pour évaluer l'activité antifongique des extraits le pourcentage d'inhibition mycélien a été calculé selon la formule de (Whipps, 1987)

$$\text{PGI}\% = [(R1-R2)/R1]*100$$

PGI (%) : pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne.

R1 : Rayon de la croissance mycélienne du champignon en absence des extraits (témoin). La distance est calculée entre le centre du disque de pathogène et le front du mycélium.

R2 : Rayon de la croissance mycélienne du pathogène en présence des extraits (distance calculée entre le centre du disque du champignon et le front du mycélium sur la ligne entre le disque du pathogène et celui de l'extrait).

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés en mm.

Chapitre 4 : Résultats et discussion

1. Détermination de rendement

Le rendement est exprimé en pourcentage de la masse d'extrait par rapport à la masse de la plante sèche.

Tableau 02. Le rendement obtenu de l'extrait acétonique

La plante	Masse de la plante sèche (g)	Masse d'extrait en (g)	Rendement (%)
<i>Matricaria pubescens</i>	50	10,69	21,38
<i>Anvillea radiata</i>	50	12,65	25,3
<i>Astragalus armatus</i>	50	8,21	16,42

Les résultats du rendement sont présentés graphiquement comme suit

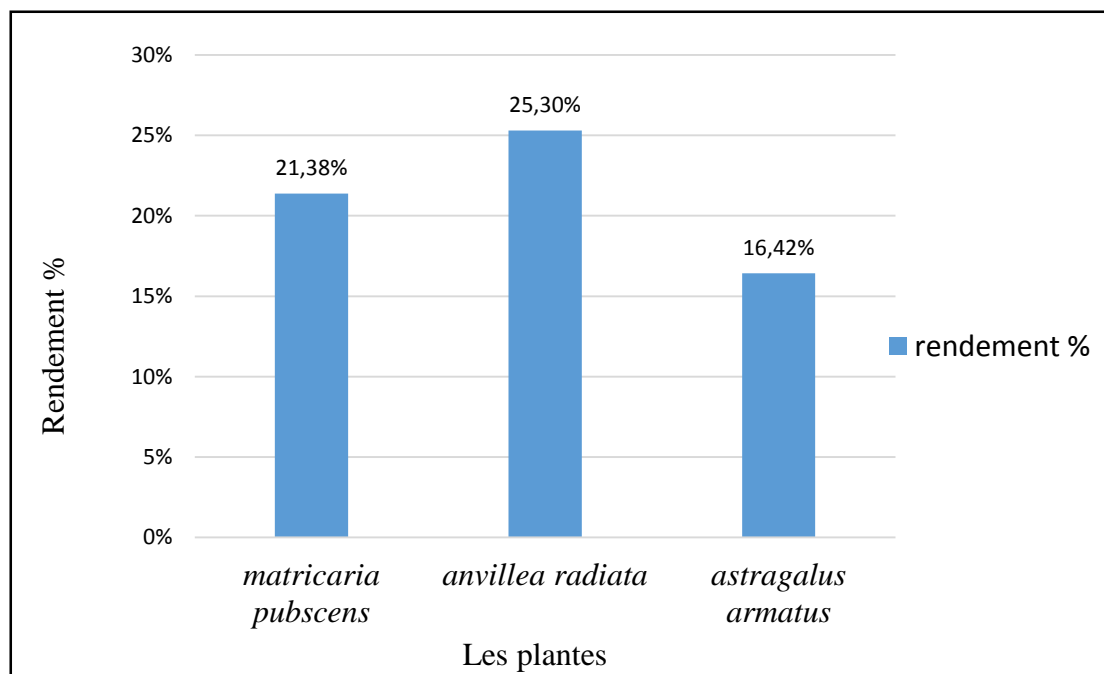


Figure 09. Rendement (%) d'extrait de *Matricaria pubescens*, *Anvillea radiata*, et *Astragalus armatus*.

Les résultats présentés dans la Figure (09) montrent que le rendement de l'espèce *Anvillea radiata* présente la plus grande valeur (25,30%) suivie par l'espèce *Matricaria pubescens* avec un rendement de (21,38%), puis l'espèce *Astragalus armatus* (16,42%).

Bouchouka (2016) trouve que le rendement des extraits de l'espèce *A.radiata* est de (16,42%), ces résultats sont inférieurs à nos résultats.

Bouden (2018) trouve que le rendement des extraits de l'espèce *M. pubescens* est égale (9.24%), ces résultats sont inférieurs à nos résultats.

Moghazi (2000) qui dit que la condition de l'environnement a une influence sur la quantité et la qualité des substances bioactives des plantes médicinales comme le sol et le climat. Ainsi que la diversité géographique.

Cette différence pourrait être expliquée aussi par Kelen et Tepe (2008) par les choix de la période de récolte car elle est primordiale en termes de rendement et qualité d'extrait végétale.

Selon Mohammedi (2013) Le rendement varie en fonction des conditions de séchage et la nature de solvant utilisé dans l'extraction.

2. Etude qualitative (Criblage phytochimique)

L'analyse qualitative des extraits des plantes qui a pour but la mise en évidence la présence de certains types de métabolites secondaires, basées sur des réactions de colorations, de précipitation par des réactifs chimiques spécifiques.

Les résultats de l'analyse phytochimique sont présentés dans le tableau ci-dessous

Tableau 01. Résultats du criblage phytochimique des plantes étudiées.

Plantes	<i>Matricaria pubescens</i>	<i>Anvillea radiata</i>	<i>Astragalus armatus</i>
Alcaloïdes	-	-	-
Flavonoïdes	+	+	+
Tanins	+	+	-
Phénols	+	+	+
Stéroïdes	+	-	+
Glucosides	-	+	+
Saponines	-	+	+
Huiles volatiles	+	+	+

+ : Réaction positive / - : Réaction négative

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques réalisés sur les extraits des plantes étudiées, montrent la présence des flavonoïdes, des phénols, des huiles volatiles, dans les trois plantes et l'absence totale des alcaloïdes.

Nous remarquons aussi la présence des tanins dans les plantes *Matricaria pubscens*, *Anvillea radiata* et l'absence dans *Astragalus armatus*. Et la présence des glucosides et des saponines chez *Anvillea radiata*, *Astragalus armatus*, et l'absence des deux chez *Matricaria pubscens*. Enfin nos résultats montrent la présence des stéroïdes chez *Matricaria pubscens*, *Astragalus armatus*, par contre l'absence chez *Anvillea radiata*.

Selon Makhloufi (2012) le criblage phytochimique des parties aériennes *Matricaria pubscens* a indiqué la présence : les flavonoïdes, les tanins, les saponines, les huiles volatiles, les stéroïdes et l'absence des alcaloïdes. Alors que Bouden (2018) a montré dans la même espèce : la présence des flavonoïdes, tanins avec grande quantité, et saponines, glucosides avec une quantité faible, par contre une absence des alcaloïdes. Ces résultats sont légèrement identiques à nos résultats

Bouchouka (2016) est étudié le criblage phytochimique de l'espèce *Anvillea radiata*, il a montré : la présence des alcaloïdes, flavonoïdes et tanins, par contre une absence des saponines. Ces résultats sont proches à nos résultats

3. Etude quantitative (Méthodes chlorométriques)

3.1 Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par g de l'extrait sec (mg EAG/g Ex), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

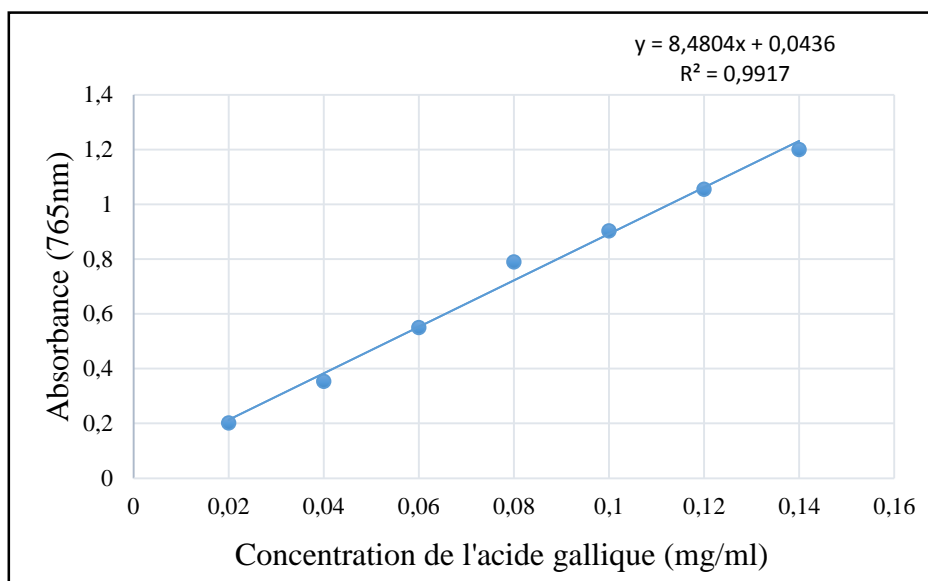


Figure 10. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

À partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des polyphénols totaux des extraits acétoniques de *Matricaria pubescens*, *Anvillea radiata* et *Astragalus armatus* sont respectivement ($23,11 \pm 0,59$ mg EAG/g Ex), ($20,55 \pm 0,45$ mg EAG/g Ex), ($15,56 \pm 0,36$ mg EAG/g Ex).

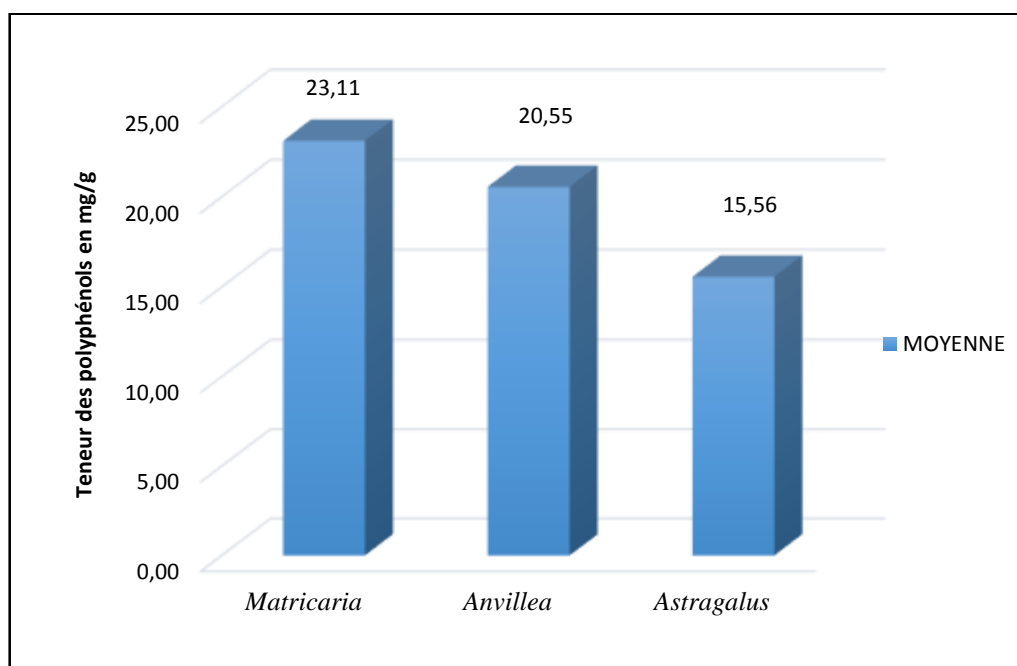


Figure 11. Teneur des polyphénols totaux des trois extraits.

Les résultats montrent que les parties aériennes de *Matricaria pubescens* et *Anvillea radiata* sont les plus riches en polyphénols totaux ($23,11 \pm 0,59$ mg EAG/g Ex ; $20,55 \pm 0,45$ mg EAG/g Ex) respectivement. Par contre la teneur la plus faible a été enregistrée dans l'espèce *Astragalus armatus* est la plus faible en polyphénols totaux ($15,56 \pm 0,36$ mg EAG/g Ex).

Les teneurs trouvés par Bouden(2018) dans les extraits acétoniques de *Matricaria pubescens* est de $129,12$ mgEAG/g MS, ces résultats sont supérieurs à nos résultats.

Bouchouka (2016), trouve une valeur des polyphénols totaux dans les parties aériennes d'*Anvillea radiata* égale $20,88 \pm 0,08$ mg EAG/g MS. Ce résultat est similaire à nos résultats.

Des études ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que les facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (Bouزيد et al., 2011).

3.2 Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux a été estimée par la méthode colorimétrique de trichlorure d'aluminium.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent de quercétine par g de l'extrait sec (mg EQ/g Ex), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de quercétine.

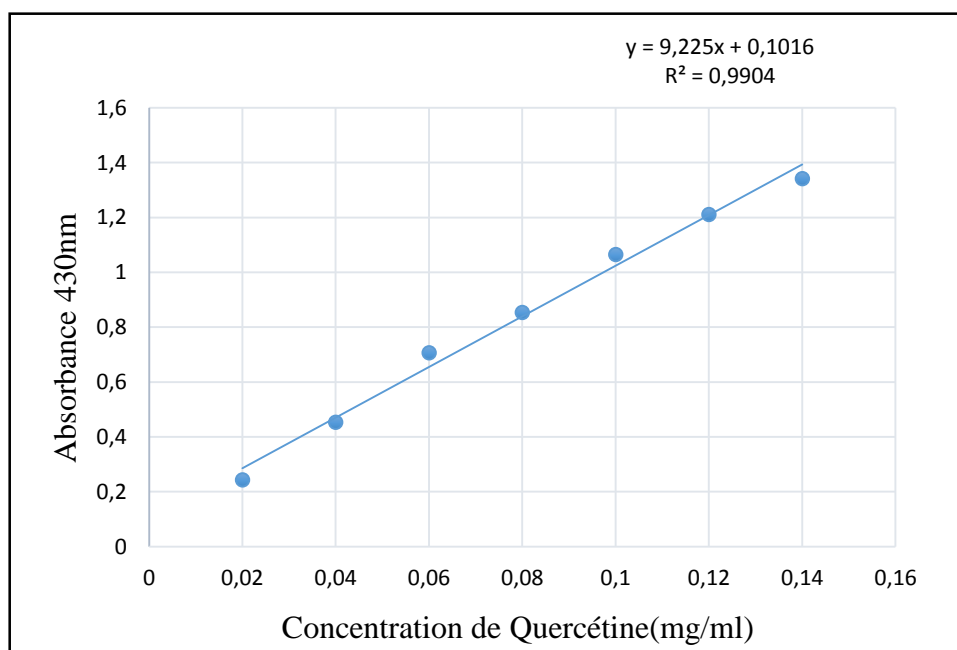


Figure 12. Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

À partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des flavonoïdes totaux des extraits acétoniques de *Matricaria pubescens*, *Anvillea radiata* et *Astragalus armatus* sont respectivement (20,59±0,62mg EQ/g Ex), (15,18±0,62mg EQ/g Ex), (13,74±1,08mg EQ/g Ex).

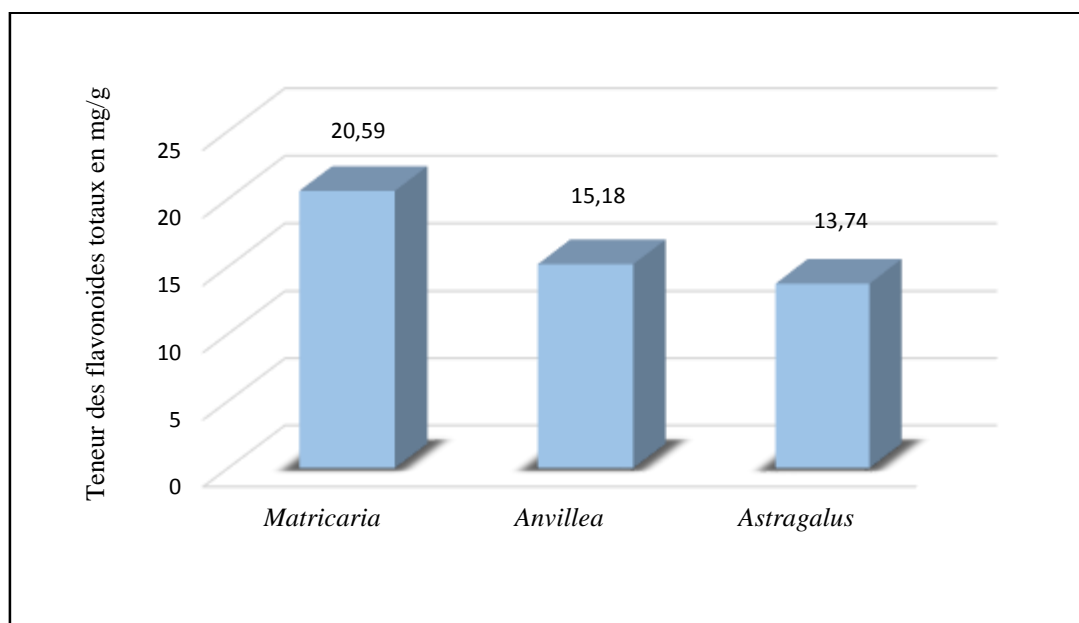


Figure 13. Teneur des flavonoïdes totaux des trois extraits

Les résultats montrent que les parties aériennes *Matricaria pubescens*, *Anvillea radiata* sont les plus riches en flavonoïdes totaux avec (20,59±0,62mg EQ/g Ex ; 15,18±0,62mg EQ/g Ex) respectivement. La teneur la plus faible a été enregistrée dans les parties aériennes d'*Astragalus armatus* (13,74±1,08mg EQ/g Ex).

Bouden (2018) a montré dans l'extrait acétonique de *Matricaria pubescens* les teneurs des flavonoïdes totaux (44,48 mg EQ/g Ex). Ces résultats sont supérieurs à nos résultats.

Beddou (2015) trouvé que les feuilles d'*Anvillea radiata* renferment des teneurs égales (43,72 mg EQ/g Ex). Ces résultats sont supérieurs à nos résultats.

3.3 Dosage des tanins condensés

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent de catéchine par g de l'extrait sec (mg ECa/g Ex), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de catéchine.

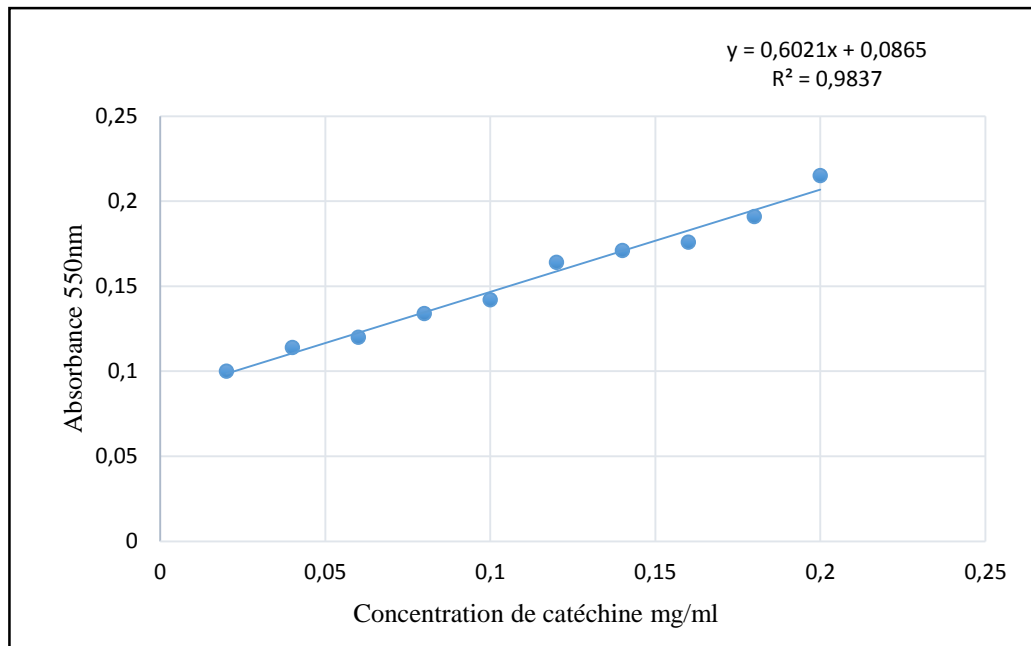


Figure 14. Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés

À partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des tanins condensés des extraits acétoniques de *Matricaria pubescens*, *Anvillea radiata* et *Astragalus armatus* sont respectivement ($3,36 \pm 0,72$ mg ECa/g Ex), ($5,38 \pm 0,24$ mg ECa/g Ex), ($9,98 \pm 0,41$ mg ECa/g Ex).

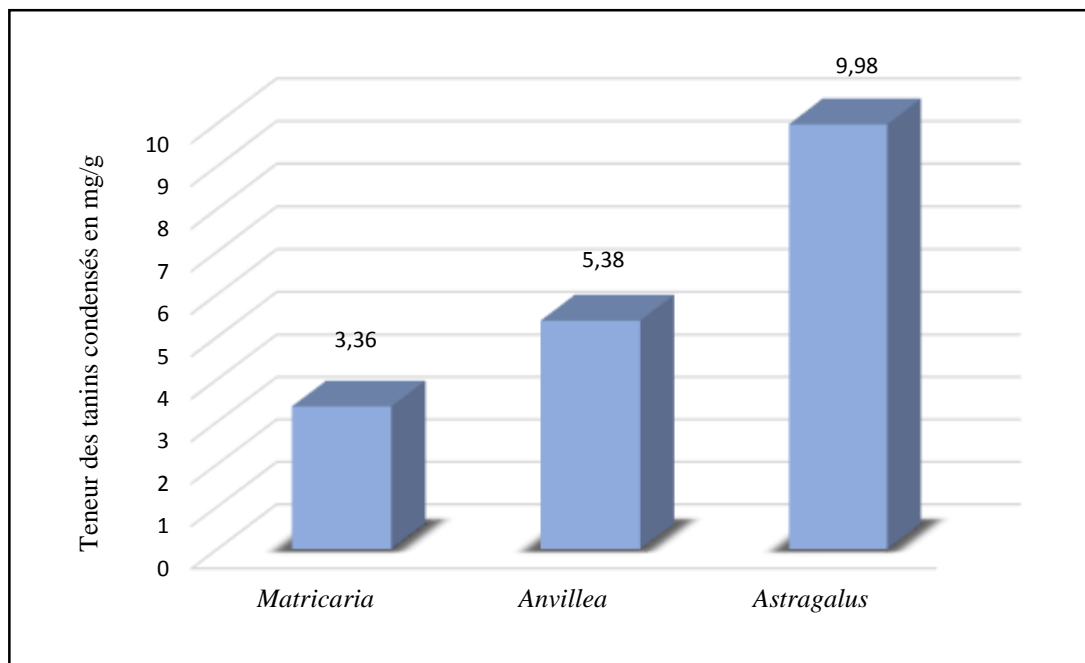


Figure 15. Teneur des tanins condensés des trois extraits

Les résultats montrent que les parties aériennes d'*Astragalus armatus* sont les plus riches en tanins ($9,98 \pm 0,41$ mg ECa/g Ex). Suivie par *Anvillea radiata* avec ($5,38 \pm 0,24$ mg ECa/g Ex), par contre la plus faible teneur est enregistré dans *Matricaria pubescens* ($3,36 \pm 0,72$ mg ECa/g Ex).

Beddou (2015) montre que les feuilles d'*Anvillea radiata* contiennent une valeur des tanins égale ($4,62$ mg ECa/g Ex), ces résultats sont inférieur à nos résultats.

3.4 Dosage des triterpènes

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent de l'acide ursolique par g de l'extrait sec (mg EUr/g Ex), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide ursolique.

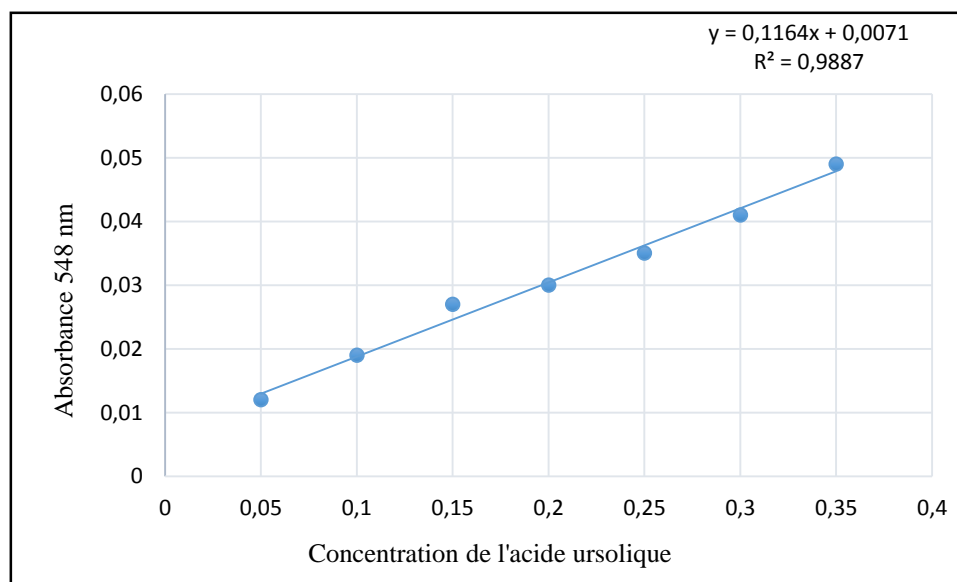


Figure 16. Courbe d'étalonnage de l'acide ursolique pour le dosage des triterpènes

À partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des triterpènes des extraits acétoniques de *Matricaria pubescens*, *Anvillea radiata* et *Astragalus armatus* sont respectivement ($4,54 \pm 1,58$ mg EAU/g Ex), ($7,37 \pm 0,00$ mg EAU/g Ex), ($8,32 \pm 0,12$ mg EAU/g Ex).

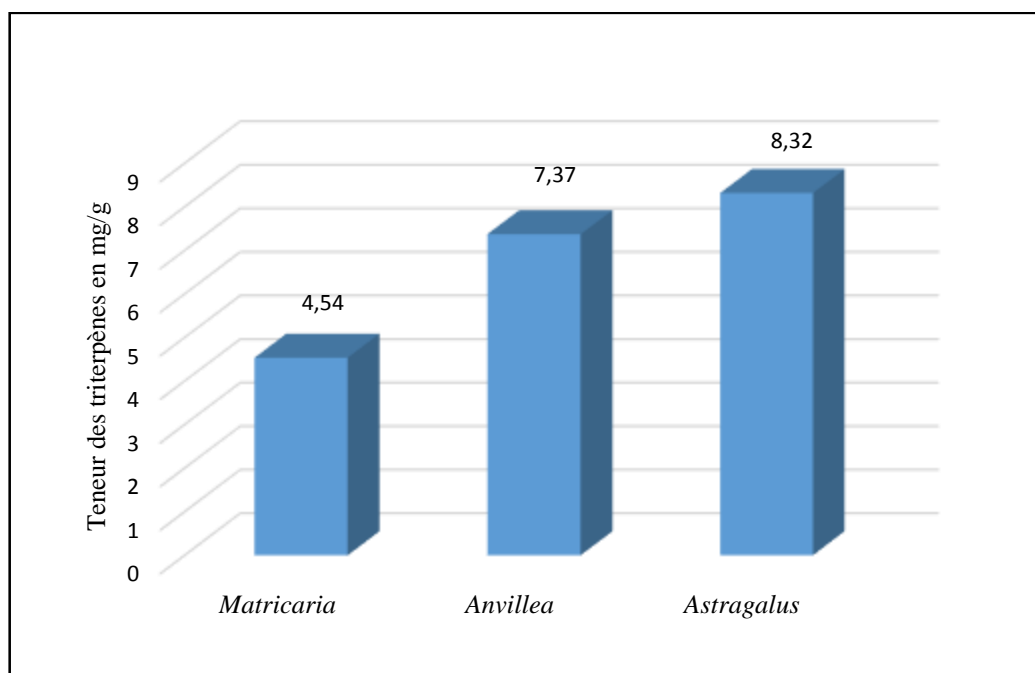


Figure 17. Teneur des triterpènes des trois extraits

Les résultats montrent que les parties aériennes d'*Astragalus armatus* les plus riches en triterpènes ($8,32 \pm 0,12$ mg EAU/g Ex), suivie par *Anvillea radiata* et *Matricaria pubescens* avec ($7,37 \pm 0,00$ mg EAU/g Ex), ($4,54 \pm 1,58$ mg EAU/g Ex) respectivement.

4. Evaluation de l'activité antibactérienne

4.1 Activité antibactérienne des extraits bruts par la méthode des disques

La méthode d'aromatogramme est la technique utilisée pour déterminer l'activité antimicrobienne de nos extraits. C'est la technique la plus répandue de l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits. Elle sert à prédire la sensibilité d'un germe aux substances étudiées.



Figure 18. Exemple de zone d'inhibition exercée par l'extrait de *M. pubescens* sur les souches bactériennes testées.

Tableau 02. Diamètre de la zone d'inhibition de l'extrait acétonique de *M. pubescens* en fonction de concentration (100,50 et 25 mg/ml).

	Diamètre de la zone d'inhibition en mm		
	Concentrations testées de l'extrait acétonique de <i>Matricaria pubescens</i>		
Les souches	100mg/ml	50mg/ml	25mg/ml
<i>E. coli</i>	/	/	/
<i>S. aureus</i>	6,1±0,14	/	/
<i>P. aeruginosa</i>	8,25±0,35	/	/

Les résultats de sensibilité des souches bactériennes sont repris ci-dessous

Tableau 05. Sensibilité des souches bactériennes d'extrait de *Matricaria pubescens*

Les souches	Sensibilité (+/-)		
	100mg/ml	50mg/ml	25mg/ml
<i>E. coli</i>	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-

Les résultats de la sensibilité montrent que les trois souches testées sont résistantes pour l'extrait de *Matricaria pubescens*.



Figure 19. Les zones d'inhibition exercées par l'extrait d'*A. radiata* sur la souche bactérienne testée *S. aureus*.

Tableau 06. Diamètre de la zone d'inhibition de l'extrait acétonique d'*Anvillea radiata* en fonction de concentration (100,50 et 25 mg/ml).

	Diamètre de la zone d'inhibition en mm		
	Concentrations testées de l'extrait acétonique d' <i>Anvillea radiata</i>		
Les souches	100mg/ml	50mg/ml	25mg/ml
<i>E. coli</i>	/	/	/
<i>S. aureus</i>	27,00±0,00	20,00±0,00	11,00±0,00
<i>P. aeruginosa</i>	17,50±0,71	12,00±0,00	08,50±0,71

Les résultats de sensibilité des souches bactériennes sont repris ci-dessous

Tableau 07. Sensibilité des souches bactériennes d'extrait d'*Anvillea radiata*.

Les souches	Sensibilité (+/-)		
	100mg/ml	50mg/ml	25mg/ml
<i>E. coli</i>	-	-	-
<i>S. aureus</i>	+++	++	+
<i>P. aeruginosa</i>	++	+	-

Les résultats de la sensibilité montrent que la souche *E. coli* est résistante pour l'extrait d'*Anvillea radiata*. Par contre la souche *S. aureus* est très sensible pour l'extrait.

**Figure 20.** Les zones d'inhibition exercées par l'extrait d'*A. armatus* sur les souches bactériennes testées.**Tableau 08.** Diamètre de la zone d'inhibition de l'extrait acétonique d'*Astragalus armatus* en fonction de concentration (100,50 et 25 mg/ml).

Les souches	Diamètre de la zone d'inhibition en mm		
	Concentrations testées de l'extrait acétonique d' <i>Astragalus armatus</i>		
	100mg/ml	50mg/ml	25mg/ml
<i>E. coli</i>	/	/	/
<i>S. aureus</i>	8,05±0,07	/	/
<i>P. aeruginosa</i>	/	/	/

Les résultats de sensibilité des souches bactériennes sont repris ci-dessous

Tableau 09. Sensibilité des souches bactériennes d'extrait d'*Astragalus armatus*.

Les souches	Sensibilité (+/-)		
	100mg/ml	50mg/ml	25mg/ml
<i>E. coli</i>	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-

Les résultats de sensibilité montrent que tous les souches sont résistantes pour l'extrait d'*Astragalus armatus*

4.2 Antibiogramme des différentes souches bactériennes utilisées

Les résultats de la technique de Vincent par l'utilisation des antibiotiques sur les différentes souches bactériennes étudiées.

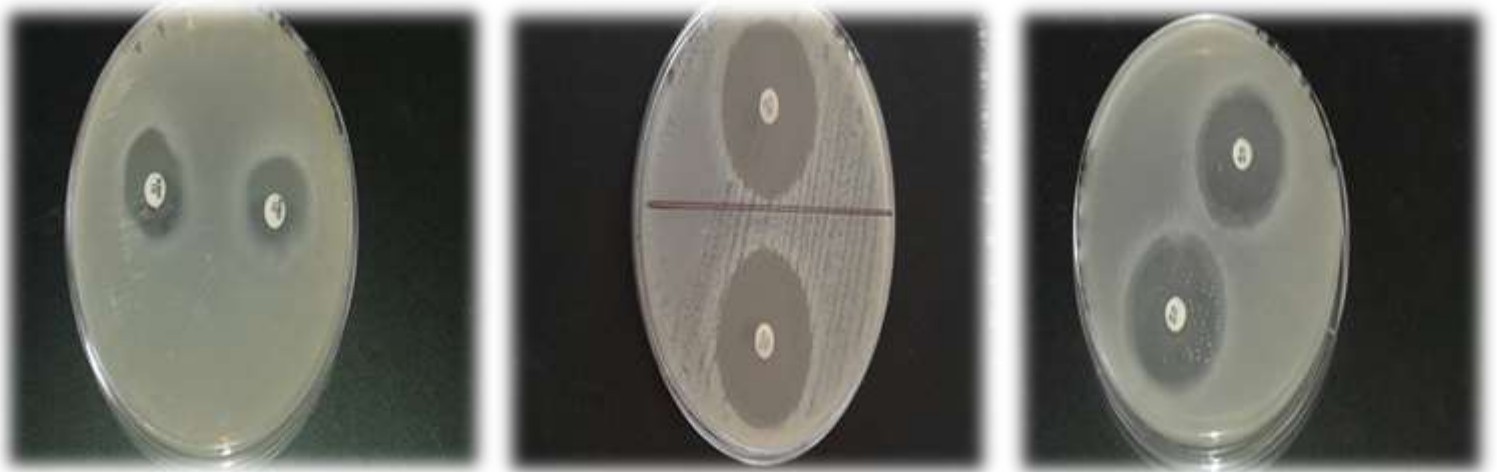


Figure 21. Les zones d'inhibition exercées par les antibiotiques sur les souches bactériennes testées.

Au vu des résultats, Aucune inhibition des bactéries *E.coli* n'a été enregistrée avec l'extrait acétonique de *M. pubescens*. Alors que *S. aureus* et *P. aeruginosa* ont été inhibées par

l'extrait à la concentration 100mg/ml avec diamètre de zone d'inhibition 6,1 ; 8,25 mm respectivement.

L'extrait acétonique d'*A. radiata* inhibé la croissance de *S. aureus* et *P. aeruginosa* avec des diamètres de zone d'inhibition de 27 ; 17,5 mm à la concentration 100mg/ml et 20 ; 12 mm à la concentration 50mg/ml et 11 ; 8,5 mm à la concentration 25mg/ml respectivement. Par contre il n'exerce aucun effet sur *E. coli*.

L'extrait acétonique d'*A. armatus* n'exerce aucune inhibition sur les deux bactéries *E. coli* et *P. aeruginosa*, Par contre il inhibé *S. aureus* dans la concentration 100mg/ml avec diamètre de zone d'inhibition 8,05 mm

Bouchouka (2016) a trouvé que l'extrait d'*A. radiata* donné une activité inhibitrice sur la souche *S. aureus* avec diamètre de zone d'inhibition 8,4 mm à la concentration 100mg/ml.

Bouden (2018) montré que les extraits bruts de *M. pubescens* sont pourvus d'effet inhibiteur important sur les trois souches testées.

Les résultats de l'activité antibactérienne montrent une sensibilité *S. aureus*, et que *E. coli* possède un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne des trois extraits.

4.3 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice(CMI) et Bactéricide(CMB)

La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la concentration la plus bas se rapportée pour donner une inhibition complète des bactéries testées après 48 heures d'incubation (Wan et *al.*, 1998 ; Canillac et Mourey, 2001).

La CMB est la plus faible concentration d'un agent antibactérien capable d'entraîner la mort d'au moins 99,99% des bactéries d'un inoculum.

Tableau 10. Valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des extraits en (mg/ml).

Bactérie Extraits	<i>S.aureus</i>			<i>P.aeruginosa</i>		
	CMI	CMB	CMB/CMI	CMI	CMB	CMB/CMI
<i>M.pubescens</i>	25	50	2	50	50	1
<i>A.radiata</i>	12,5	25	2	3,125	6,25	2
<i>A.armatus</i>	/	/	/	100	/	/

L'espèce *M. pubescens* a montré la même valeur de CMB pour les deux souches de 50mg/ml. Pour l'espèce *A. radiata* nous avons remarqué la valeur CMI la plus faible qui est égale 3,125mg/ml.

Selon Kone et *al* le rapport de : $CMB/CMI \leq 4$ l'effet est bactéricide, $CMB/CMI > 4$ l'effet est bactériostatique.

Selon les résultats obtenus on constate des variations des valeurs de CMI et CMB d'un microorganisme à un autre, et après calcul du rapport CMB/CMI on peut classer les extraits de *M. pubescens* et *A. radiata* comme des substances à action bactéricide ($CMB/CMI < 4$)

5. Evaluation de l'effet antifongique

Les résultats de l'activité antifongique des extraits acétoniques des trois plantes étudiées par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélose sur souche fongique.



Figure 22. exemple de l'effet antifongique des extraits sur *Aspergillus niger*.

Les résultats obtenus montrent que la champignon testée n'exerce aucune effet sur les extraits acétoniques des trois plantes étudiées

Conclusion

Le présent travail est effectué sur trois plantes médicinales *Matricaria pubescens*, *Anvillea radiata* et *Astragalus armatus*. Il a permis de mettre en évidence à travers une analyse phytochimique, la richesse de ces plantes en composés phénoliques.

La détermination du rendement en extraits bruts a montré que les rendements d'extraction varient considérablement selon l'espèce. Le meilleur résultat est enregistré chez *A. radiata* avec de pourcentage allant de (25,3%).

L'analyse qualitative par les tests phytochimiques a montré la présence de certains composés bioactifs : des flavonoïdes, des phénols, des huiles volatiles, tanins, dans les parties aériennes des plantes.

La quantification des polyphénols totaux en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu révèle la présence des quantités moyennement importantes en polyphénols. De même nous avons dosé les flavonoïdes par la méthode d' $AlCl_3$ qui nous mène à conclure que ces plantes contiennent une quantité considérable de flavonoïdes. Nous avons aussi dosé les tanins condensés par la méthode à vanilline en milieu acide qui nous a montré que ces plantes porte une valeur faible des tanins, et enfin nous avons dosé les triterpènes qui révèle une présence moyennement faible en triterpènes.

L'activité antimicrobienne de nos extraits évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé montre que nos extraits sont relativement actifs sur les souches bactériennes testées.

Staphylococcus aureus est la souche la plus sensible pour tous les extraits et *Escherichia coli* la souche résistante à tous les extraits.

Les résultats de l'activité antifongique montrent que les extraits acétoniques des trois plantes étudiées n'exercent aucune activité sur le champignon testé.

Cette étude est préliminaire, elle doit être complétée par d'autres travaux :

- Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles de ces plantes médicinales
- Le test de ces extraits sur d'autres souches bactériennes et fongiques.
- Etude d'autre activité biologique telle que l'activité antioxydant, antivirale, anti inflammatoire...etc.

- ❖ Makhloufi A. 2012. Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* Desf.) et (*Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru : Microbiologie et sécurité sanitaire des aliments, Thèse de Doctorat, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.
- ❖ Maurice N. 1997. L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle. Ed. Tec et Doc, Paris. France. Pp 12-14.
- ❖ Messai A. 2014. L'extraction des lectines à partir de quelques plantes médicinales et leurs études biologiques : Biologie Appliquée. Diplôme de magistère, Université Constantine1.
- ❖ Mohammedi Z. 2013. Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie. Substances naturelles, Activités Biologiques et Synthèses. Thèse de Doctorat. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.
- ❖ Nkhili Z. 2009. Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Sciences des Aliments. Thèse de doctorat, Université de Marrakech.
- ❖ Site web 01 <https://www.touggourt.org/tpnjrhoo-matricaria-pubescens.html>.
- ❖ Site web 02 <https://www.teline.fr/fr/photos/asteraceae/anvillea-garcinii-subsp.-radiata>.
- ❖ Site web 03 https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Astragalus_armatus_
نبات_القتاد_المسلح

ملخص :

الهدف من هذا العمل هو تقييم النشاط المضاد للبكتيريا والنشاط المضاد للفطريات لمستخلصات الاسيتون لثلاثة نباتات طبية صحراوية القرطوفة، النقد، الكداد. تم حساب إجمالي المركبات الفينولية باستخدام فحص Folin-Ciocalteu حيث سجلنا أكبر معدل عند نبتة القرطوفة (23,11±0,59 mg EAG/g Ex) كما تم تقييم كل من الفلافونويدات والتانينات والتاربيينات. قمنا بعد ذلك بتحديد نشاط مضادات الميكروبات، من خلال طريقة النشر على الأقراص في وسط جامد. حيث أظهرت النتائج ان السلالة *S. aureus* الأكثر حساسية للمستخلصات التي قمنا بدراستها مع قطر تثبيط يتراوح (27mm). تمت دراسة تأثير المستخلصات على الفطر *Aspergillus niger* حيث أظهرت النتائج ان الفطر مقاوم للمستخلصات.

الكلمات المفتاحية: نباتات طبية. المركبات الفينولية. نشاط مضاد للبكتيريا. نشاط مضاد للفطريات.

Résumé :

Le but de ce travail est d'évaluer l'activité antibactérienne et l'activité antifongique des extraits acétoniques de trois plantes médicinales *Matricaria pubescens*, *Anvillea radiata*, *Astragalus armatus*. La teneur des polyphénols totaux a été évalué par la méthode de Folin-Ciocalteu, où nous avons enregistré le taux le plus élevé chez l'espèce *M. pubescens* (23,11 ± 0,59 mg EAG / g Ex) nous avons aussi évaluées la teneur des flavonoïdes, des tanins, et des triterpènes. L'évaluation de l'activité antibactérienne par la méthode des disques en milieu solide, afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice. Les résultats obtenus montrent que la souche *S. aureus* est la plus sensible pour nos extraits avec diamètre de zone d'inhibition (27mm). L'étude de l'effet antifongique montre que le champignon *Aspergillus niger* est résistant aux nos extraits.

Mots clés : Plantes médicinales, polyphénols, activité antibactérienne, activité antifongique.

Abstract :

The purpose of this work is to evaluate the antibacterial activity and antifungal activity of acetone extracts of three medicinal plants *Matricaria pubescens*, *Anvillea radiata*, *Astragalus armatus*. The total polyphenol content was evaluated according to the Folin-Ciocalteu method, where we recorded the highest rate in *M. pubescens* (23.11 ± 0.59 mg EAG / g Ex). we also evaluated the content of flavonoids, tannins, and triterpenes. The evaluation of the antibacterial activity by the method of the disks in solid medium, in order to determine the minimal inhibitory concentration. The results obtained show that the *S. aureus* strain is the most sensitive for our extracts with inhibition zone diameter (27mm). The study of the antifungal effect shows that the fungus *Aspergillus niger* is resistant to our extracts.

Keywords : Medicinal plants, Polyphenols, Antibacterial activity, Antifungal activity.