

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE CONSTANTINE 1**



**INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES
THESE PRESENTEE EN VUE
DE L'OBTENTION DU DOCTORAT ES SCIENCES**

**Présentée par
KAHLOUCHE-RIACHI FOULLA**

**EVALUATION CHIMIQUE ET ACTIVITE
ANTIBACTERIENNE DE QUELQUES PLANTES
MEDICINALES D'ALGERIE**

Président :

Bererhi El. Hacene. Prof. Université Constantine1

Examineurs :

Bouzitouna Chafia. Prof. Université Constantine2

Tlidjane Madjid Prof. Université Hadj Lakhdar Batna

Belkhiri Abdemalek. Prof Université Constantine2

Djebbar Mohamed Réda Prof. Université Badji Mokhtar de Annaba

Rapporteur

Hamdi Pacha Youcef. Prof. E.N.V. El Harrach d'Alger

Année universitaire 2013-2014

Remerciements

Professeur Bererhi Hacene, Directeur de l'institut des Sciences Vétérinaires Université Constantine1 pour nous avoir incessamment stimulé à poursuivre notre thèse. Nous le remercions spécialement pour le grand honneur qu'il nous fait de présider le jury de cette soutenance malgré ses lourdes charges.

Professeur Hamdi Pacha Youcef, Directeur de Thèse, pour avoir dirigé cette thèse et m'avoir permis de la réaliser dans les meilleures conditions. Je tiens particulièrement à le remercier de la liberté d'action qu'il m'a donnée à chaque étape de cette aventure. J'espère avoir été digne de la confiance qu'il m'ait accordée et que ce travail est finalement à la hauteur de ses espérances. Quoi qu'il en soit, j'ai beaucoup appris à ses côtés et je suis très honoré de l'avoir eu pour encadrant.

Professeur Belkhir A. C'est un réel plaisir pour nous de vous compter parmi les membres de ce jury. Votre simplicité dans l'art de transmettre la connaissance nous a largement convaincu. Veuillez trouver ici l'expression de notre plus profond respect.

Professeur Bouzitouna C. Vous nous faites beaucoup d'honneur en acceptant de siéger dans ce jury. Veuillez trouver ici, l'expression de notre profond respect.

Professeur Djebbar d'avoir accepté de prendre de votre temps pour juger cette thèse.

Professeur Tlidjane pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Professeur Merghem du laboratoire de biochimie micro-moléculaire et phytochimie de la faculté des sciences de la nature et de la vie, université Constantine 1 pour son esprit de collaboration dans l'interprétation de nos résultats phytochimiques. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Dédicaces

A la mémoire de mes parents

Abdelkader Et mes enfants

La présente étude n'aurait pas été possible sans le bienveillant soutien de certaines personnes. Et je ne suis pas non plus capable de dire dans les mots qui conviennent, le rôle qu'elles ont pu jouer à mes côtés pour en arriver là. Cependant, je voudrais les prier d'accueillir ici tous mes sentiments de gratitude qui viennent du fond de mon cœur

A tous les miens

A Hadria

Au grand cœur qui donne tout et qui n'attend rien en retour, si n'est que mon amitié éternelle et tu l'as à jamais!!! Contre vents et marées notre amitié durera aussi fort et le restera dans nos cœurs pour la vie entière.

A mes collègues et amis de l'institut des sciences vétérinaires qui ont contribué par leur soutien et amitié, chacun à sa façon à la progression de mon travail dans une ambiance toujours amicale et stimulante

Foulla

Sommaire

Introduction	1
PREMIERE PARTIE : TRAVAUX ANTERIEURS	
Chapitre I : Les plantes en médecine	3
I.1. Définition d'une plante médicinale.....	3
I.2. Intérêt de l'étude des plantes médicinales.....	3
I.3. La phytothérapie.....	3
I.4. Métabolites des plantes.....	4
I.4.1. Les métabolites primaires.....	5
I.4.2. Les métabolites secondaires.....	5
I.4.2.1. Les alcaloïdes.....	8
I.4.2.2. Les terpènes.....	9
I.4.2.3. Les stérols.....	10
I.4.2.4. Les saponines.....	11
I.4.2.5. Composés phénoliques.....	11
Chapitre II: Activité antibactérienne	19
II.1. Les infections bactériennes.....	19..
II.2. Rappel sur les bactéries.....	19
II.2.1. : Exemple de classification des bactéries.....	20
II.2.1.1 : Bactéries en forme de sphère : les cocci.....	20
II.2.1.2. : Bactéries en forme de bâtonnet : les bacilles.....	20
II.2.1.3. Bactéries en forme de spirale : les spirochètes.....	20
II.2.1.4. Flore bactérienne anaérobie.....	21
II.2.2. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées.....	21
II.2.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	21
II.2.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
II.2.2.3. <i>Escherichia coli</i>	23
II.2.2.4. <i>Protéus vulgaris</i>	23

II.3. Les Antibiotiques.....	24
II.5. Résistance des antibiotiques	25
CHAPITRE III : MONOGRAPHIE DES PLANTES	27
III.1 <i>Artemisia herba alba</i>	27
III.1.1.Noms vernaculaires	28
III.1.2.Systématique.....	28
III.1.3. Présentation et description botanique	29
III.1.4. Chimie de la plante	31
III.1.5. Usage traditionnel.....	32
III.2. <i>Marrubium vulgare</i>	32
III.2.1.Noms vernaculaires	32
III.2.2. Systématique.....	33
III.2.3. Présentation et description botanique	33
III.2.4. Chimie de la plante	35
III.2.5. Usage traditionnel.....	36
III.3. <i>Pinus pinaster</i>	37
III.3.1. Noms vernaculaires	37
III.3.2.Systématique.....	37
III.3.3. Présentation et description botanique	38
III.3.4. Chimie de la plante	39
III.3.5. Usage traditionnel.....	40

DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES	41
I.1. Matériels.....	41
I.1.1. Lieux d'étude	41
I.1.2. Espèces végétales étudiées.....	41
I.2. Méthodes et techniques	42
I.2.1. Méthode d'obtention des extraits totaux	42
I.2.1.1. Préparations des substances végétales.....	42
I.3. Etude phytochimique des extraits	43
I.3.1. Analyse qualitative	43
I.3.1.1. Recherche des polyphénols.....	44
I.3.1.2. Détection des alcaloïdes	47
I.3.1.3. Détection des terpènes.....	48
I.3.1.4. Détection des saponines.....	49
I.4. Le fractionnement	49
I.4.1. Préparation des extraits pour l'affrontement	49
I.4.2. Extraction par les solvants organiques à polarité croissante	50
I.5. La spectrophotométrie UV-Visible	53
I.6. Essais de caractérisation par chromatographie sur couche mince (CCM)	55
I.6.1. Principe de la chromatographie sur couche mince (CCM)	56
I.6.2. Le dépôt.....	57
I.6.3. Développement des plaques	57
I.6.4. Révélation (Visualisation des tâches).....	58
I.6.5. Révélation par des méthodes chimiques	58
I.6.5.1. Identification des flavonoïdes : pulvérisation du Réactif de Neu.....	58
I.6.5.2. Identification des stérols et triterpènes : pulvérisation du réactif de Liebermann.....	59
I.6.5.3. Identification des tanins : pulvérisation du réactif du FeCl ₃	60
I.6.6. Applications.....	60

I.7. Essai de caractérisation par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	62
Chapitre II RESULTATS ET DISCUSSION	63
II.1. Extraction.....	63
II.2. Caractérisation des principaux constituants chimiques	64
II.3. Spectrophotométrie	66
II.4. Chromatographie analytique sur couche mince	69
II.4.1. Révélation au réactif de NEU (gel de polyamide)	70
II.4.2. Révélation au réactif de NEU (gel de silice).....	72
II.4.3. Révélation au réactif Liebermann-Burchard.....	76
II.4.4. Révélation au FeCl ₃	78
II.5. Chromatographie liquide à haute performance.....	83
Chapitre III : Etude biologique	86
III.1. Détermination de l'activité antibactérienne	86
III.1.1. Activité antibactérienne des extraits totaux	87
III.1.1.1. Méthode de diffusion en milieu solide.....	87
III.1.1.2. Limites de la méthode.....	87
III.1.1.3. Méthode de diffusion en milieu liquide.....	88
III.1.1.4. Limites de la méthode.....	88
III.1.2. Traitement statistique.....	88
III.1.3. Activité antibactérienne des phases.....	89
Chapitre IV Résultats et discussion de l'activité antibactérienne	90
IV.1. Des extraits totaux	90
IV.1.1. Activité antibactérienne des extraits sur <i>Staphylococcus aureus</i>	90
IV.1.2. Activité antibactérienne des extraits sur <i>Escherichia coli</i>	92
IV.1.3. Activité antibactérienne des extraits sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	94
IV.1.4. Activité antibactérienne des extraits sur <i>Proteus vulgaris</i>	96
IV.2. Activité antibactérienne des phases	102
IV.2.1. Activité antibactérienne des extraits sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	103
IV.2.2. Activité antibactérienne des extraits sur <i>Escherichia coli</i>	104
IV.2.3. Activité antibactérienne des extraits sur <i>Staphylococcus aureus</i>	104

IV.2.4. Activité antibactérienne des extraits sur <i>Protéus vulgaris</i>	104
CONCLUSION	109
REFEERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	111

INTRODUCTION

INTRODUCTION

A l'origine, la nature constituée essentiellement d'êtres végétaux servait d'alimentation aux animaux et aux Hommes peuplant la terre. Mais à côté de cette fonction nutritionnelle, l'Homme découvrit bien d'autres fonctions que pouvaient lui procurer les plantes, notamment le pouvoir de guérison. En effet cette faculté de guérison des plantes fut connue longtemps de nos ancêtres depuis, les temps reculés. Elle deviendra plus tard la médecine traditionnelle avec toutes les avancées notoires qu'on peut lui attribuer.

Selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques et ils possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques **(Bérubé-Gagnon, 2006)**.

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives **(Ferrari, 2002)**.

La flore Algérienne est caractérisée par sa diversité florale: Méditerranéenne, Saharienne et une flore Paléo Tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeable (15 %) d'espèces endémiques **(Ozenda, 1977)**. Ce qui a donné à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable.

Malgré les efforts des chimistes dans la synthèse de nouvelles molécules, plus de 25 % des médicaments prescrits dans les pays développés dérivent directement ou indirectement des plantes **(Newman et al, 2000)**. Cependant, en tant que sources de médicaments, les plantes restent encore sous exploitées surtout dans le domaine de la microbiologie médicale **(Kirby et al, 1996)**. Il est certain que la plupart des antibiotiques prescrits dérivent des microorganismes et que, un à trois antibiotiques sont mis sur le marché chaque année **(Clark, 1996)**, mais il est aussi évident que les agents antimicrobiens d'origine végétale ont leur place dans l'arsenal de médicaments prescrits par les cliniciens et à juste titre **(Cowan, 1999)**. Chaque antibiotique a une durée de vie effective limitée au bout de laquelle les microorganismes développent des résistances.

Le phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques est du en grande partie à la prescription massive d'antibiotiques par les médecins et leur mauvaise administration.

Egalement, l'utilisation des antibiotiques en agriculture comme promoteurs de la croissance et dans la prévention des infections est suspectée de contribuer au développement de souches résistantes non seulement chez les animaux mais aussi chez les populations humaines.

Ces différentes difficultés ont suscité notre intérêt pour la recherche d'autres substances antibactériennes pouvant constituer une solution alternative contre les résistances aux antibiotiques.

Pour cela on propose notre contribution à l'étude de l'écorce de *Pinus pinaster* (*pinaceae*), des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* (*lamiaceae*) et des parties aériennes d'*Artémisia herba alba* (*asteraceae*) appartenant à des biotopes et familles botaniques différentes.

Dans ce contexte, le présent travail s'est fixé comme objectif l'identification des groupes phytochimiques, qui caractérisent l'extrait de la partie végétale de chaque plante et la recherche de l'activité antibactérienne et les potentialités que peuvent avoir ces extraits *in vitro*.

TRAVAUX ANTERIEURS

Chapitre I : Les plantes en Médecine

I.1. Définition d'une plante médicinale

Une plante médicinale est définie par la pharmacopée française comme une « drogue végétale au sens de la pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses ». Une « drogue végétale » est une plante ou une partie de plante, utilisée, soit le plus souvent sous la forme desséchée, soit à l'état frais (**Sofowora, 2010**).

L'expression drogue végétale ou, plus couramment, drogue, désigne donc une matière première naturelle servant à la fabrication des médicaments.

I.2. Intérêt de l'étude des plantes médicinales

La plupart des espèces végétales contiennent des substances qui peuvent agir, à un niveau ou un autre, sur l'organisme humain et animal. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie. Elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus (**Iserin, 2001**).

La raison fondamentale est que les principes actifs végétaux proviennent de processus biotiques répandus dans tout le monde vivant, alors que l'essentiel des médicaments de synthèse sont des xénobiotiques aux effets secondaires très mal maîtrisés (**Bruneton, 2009**). Les plantes médicinales sont donc importantes pour la recherche pharmaceutique et l'élaboration des médicaments, directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matière première pour la synthèse des médicaments ou comme modèle pour les composés pharmaceutiquement actifs (**Decaux, 2002**).

I.3. La phytothérapie

La phytothérapie est l'utilisation des plantes (de l'ensemble des éléments de la plante) à des fins thérapeutiques. Ce terme vient du grec : « phytos » la plante et « therapiea » la thérapie. Il s'agit d'une des sciences médicales les plus anciennes, elle est parfois connue aujourd'hui sous le nom de « remède de bonne femme », étymologiquement : Bona fama = grande renommée. Une citation de Galien dit : « la meilleure médecine, c'est la nature car elle guérit les trois quart de toutes les maladies ».

Aujourd'hui, 60 % des spécialités médicamenteuses employées en médecine courante sont issues, directement ou par hémi-synthèse, du règne végétal (**Grosmond, 2001**).

Toutefois, malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps, à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria.

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît.

La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, est souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en Occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme (**Iserin, 2001**). L'exploitation des ressources naturelles, et notamment du monde végétal, est encore capitale à l'heure actuelle. Elle est réalisée par :

- Etude chimiotaxonomique qui consiste à rechercher des catégories de molécules dans les plantes en fonction de leur appartenance botanique. Ainsi les Apocynaceae, les Rutaceae, les Rubiaceae renferment souvent des alcaloïdes et c'est parmi ces familles que l'on recherche d'abord les alcaloïdes.

- Etude ethnopharmacologique qui consiste à recueillir des renseignements sur l'utilisation des plantes auprès des populations vivant encore près de la nature en Amérique du Sud, dans les îles du Pacifique, en Afrique ou dans le Sud- Est Asiatique.

- Etude pharmacologique qui est caractérisée par l'observation du comportement des plantes dans leur environnement naturel. Les interactions plantes-plantes (allélopathie), plantes-microorganismes, plantes-insectes, plantes-animaux sont associées à des signaux chimiques (**Barnes et al, 2007**).

I.4. Métabolites des plantes

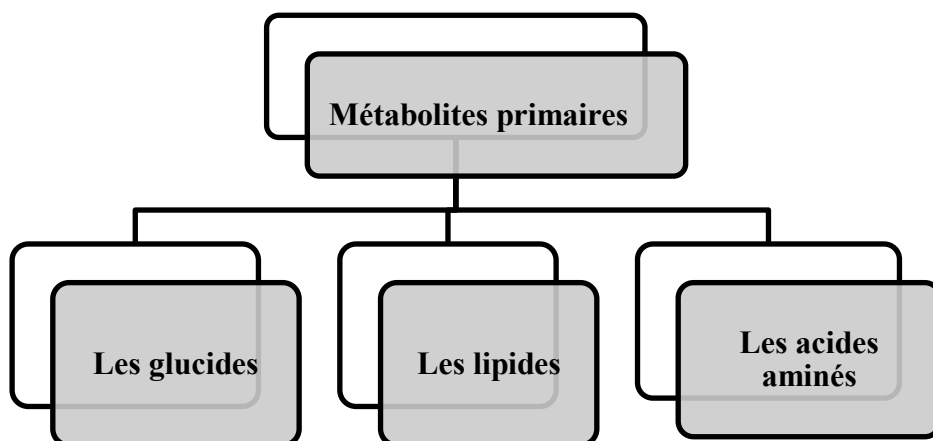
Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes. Elles renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme. Les métabolites sont les molécules issues du métabolisme des végétaux ou d'animaux.

On distingue deux classes de métabolites : métabolites primaires et métabolites secondaires (**Hartmann, 2007**).

I.4.1. Les métabolites primaires

Les métabolites primaires sont caractérisés par leur caractère nécessaire et vital à la survie de la cellule ou de l'organisme (**Diallo D., 2000**).

- Les glucides représentent une source d'énergie surtout au niveau des parois cellulaires (cellulose).
- Les lipides constituent aussi une source d'énergie présente dans les membranes cellulaires.
- Les amino-acides représentent une source primaire de construction des protéines



I.4.2. Les métabolites secondaires

Sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante.

Les produits du métabolisme secondaire qui sont émis en très faible quantité, sont d'une grande variété structurale (plus de 200000 structures définies). Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique. Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, ils ont un intérêt multiple, ils sont mis à profit aussi bien dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique.

Ils sont largement utilisés en thérapie comme vasculo-protecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles ou des matières premières pour la hémisynthèse de composés actifs. On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. L'isolement de principes actifs au XIX^{ème} siècle, a contribué à l'amélioration des connaissances des structures, ce qui a permis de passer progressivement d'une phytothérapie traditionnelle souvent empirique, acceptée parfois avec une certaine méfiance à une thérapie moderne, acceptée scientifiquement.

Au début du XX^{ème} siècle, des synthèses de composés analogues (métabolites secondaires) ont commencés à naître; et afin d'augmenter leurs efficacités pharmacologiques, des études des structures et des activités biologiques issues des dérivés prénylés de ces métabolites ont été réalisés. La prénylation consistait à la fixation d'une chaîne latérale (pentényle, géranyle et farnésyle) sur une molécule acceptante.

Les métabolites secondaires constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour leurs propriétés antioxydantes, anti microbiennes, anti-inflammatoires et anti carcinogènes ou mutagènes (**Epifano et al.2007**).

Ce sont des composés très hétérogènes tant par leur composition que par leur structure. Pendant longtemps, ces composés ont été considérés comme secondaires et métaboliquement inactifs, ils ne suscitaient donc que peu d'intérêt.

A l'heure actuelle, cette opinion a changé, du fait de nombreuses recherches qui ont largement montrées que ces composés ne sont pas inertes et contribuent efficacement dans la biosynthèse de divers métabolites de l'organisme.

Chez les végétaux, ils sont soumis à d'importantes variations quantitatives et qualitatives, ce qui témoigne d'une dynamique biochimique incontestable (**Brzozowska et al.1976**). Ils interviennent dans des processus vitaux les plus divers. D'où l'importance croissante des études consacrés à ces composés. Leurs mode d'action et leurs signification physiologique ne sont pas encore suffisamment claires, d'où la place de plus en plus large qui revient aux études de ces composés et de leurs fonctions.

On trouve des métabolites secondaires dans toutes les parties de plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre. Parmi les principales familles de métabolites secondaires trouvées chez les plantes on distingue :

- Les composés phénoliques qui interviennent dans les interactions plante-plante (allélopathie, inhibition de la germination et de la croissance). Parmi ces composés, on citera les polyphénols, les lignines, les stilbènes, les flavonoïdes, les phénylpropanoïdes, les anthocyanes et les tannins.

- Les alcaloïdes, renferme un atome d'azote dans la structure. Parmi ces derniers, certains relèguent de l'acide cyanhydrique quand les plantes sont abîmées. Ils sont synthétisés à partir d'acides aminés. On citera la nicotine, l'atropine, la codéine, la lupinine.

- Les mucilages: Ces sont des polymères complexes de fructose, d'acide glucorinique et d'acide manuronique. Les mucilages sont des mélanges colloïdaux qui gonflent avec l'eau (agar agar).

- Les gommes et les résines: Ces sont des substances produites par la plante à la suite d'une blessure.

- Les huiles essentielles: Ces sont des liquides concentrés et hydrophobes des composés aromatiques (odoriférants) volatils d'une plante, ces essences sont très volatiles et non miscibles à l'eau.

- Les latex: Ces sont des substances sécrétées ou fabriquées par des cellules laticifères (vraies ou anastomosées) et qui ont la particularité de se solidifier au contact de l'air.

Les principaux groupes de métabolites secondaires rencontrés dans les plantes et qui possèdent généralement une activité antimicrobienne sont : les composés phénoliques, les alcaloïdes, les terpénoïdes et stéroïdes.

I.4.2.1. Les alcaloïdes

Les composés azotés se divisent en deux groupes: les acides aminés et les alcaloïdes. Les acides aminés (qui n'appartiennent pas aux métabolites secondaires), sont à la base de la constitution des protéines et des autres peptides, même s'ils n'en sont pas toujours les mêmes uniques constituants, c'est le cas de l'hème, qui est un groupement prosthétique de l'hémoglobine. La structure générale des acides aminés et de quelques acides aminés porteurs du groupement fonctionnel guanidinium sont représentés ci-dessous. La plupart des composés de ces deux groupes sont très hydrosolubles.

Les alcaloïdes sont des substances organiques d'origine végétale, azotée et à caractère alcalin. Bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques (comme la strychnine ou l'aconitine), certains sont employés dans la médecine pour leurs propriétés analgésiques (comme la morphine, la codéine), dans le cadre de protocoles de sédation (anesthésie, atropine) souvent accompagnés des hypnotiques, ou comme agents antipaludéens (quinine, chloroquinine) ou agents anticancéreux (taxol, vinblastine, vincristine). La morphine a été le premier alcaloïde isolé dans l'opium (vers 1805). Puis on découvrit la strychnine (1818).

Les autres alcaloïdes plus connus sont : la colchicine, l'atropine, le tubocurarine, la théine, la cocaïne, la mescaline, l'acide lysergique et l'aconitine.

Les pyrazoles forment un groupe d'alcaloïdes contenant deux atomes d'azote dans le noyau aromatique, ceux-ci ne sont pas d'origine naturelle (**Bruneton, 1999 ; Zenk et Juenger, 2007**). Les alcaloïdes sont des composés organiques naturels hétérocycliques avec un atome d'azote comme hétéroatome.

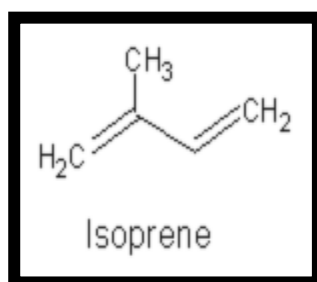
Leurs structures moléculaires sont complexes, plus ou moins basiques et douées des propriétés physiologiques prononcées même à faible dose (**Zenk et al. 2007**). Ils constituent un des groupes de métabolites secondaires contenant plus de 10000 à 12000 différentes structures (**Stöckigt et al. 2002**).

Les alcaloïdes sont des composés organiques azotés de faibles poids moléculaires. Ils possèdent des structures hétérocycliques et se retrouvent dans environ 20% de toutes les espèces de plantes (**Zhang et Björn, 2009**). Les alcaloïdes sont connus comme doués de propriétés antimicrobiennes (**Faizi et al. 2003**). Le mécanisme d'action des alcaloïdes est attribué à leur capacité à s'insérer avec l'ADN.

I.4.2.2. Les terpènes

Les terpènes forment une classe d'hydrocarbures, produits par de nombreuses plantes, en particulier les conifères. Ce sont des composants majeurs de la résine et de l'essence de térébenthine produite à partir de résine.

Les terpènes sont des dérivés de l'isoprène C_5H_8 et ont pour formule de base des multiples de celle-ci (C_5H_8). On peut considérer l'isoprène comme l'un des éléments de construction préférés de la nature. Leur squelette de carbone est constitué d'unités isopréniques reliées entre eux. C'est ce que l'on appelle la règle de l'isoprène. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des cycles.



En fonction du nombre n (entier) d'unités, on peut distinguer pour; $n = 2$: les monoterpènes (C_{10}), $n = 3$: les sesquiterpènes (C_{15}), $n = 4$: les diterpènes (C_{20}), $n = 5$: les sesterpènes (C_{25}), $n = 6$: les triterpènes (C_{30}) (Soldermann, 2002).

Le carotène est un tétraterpène ($C_{40}H_{64}$). Il joue le rôle de pigment en photosynthèse végétale. Des matières aussi diverses que le caoutchouc, la vitamine A1 ou le cholestérol sont construites essentiellement des «briques» d'isoprènes.

Parmi les terpènes les plus importants on trouve: l' α -pinène, le β -pinène, le δ -3-carène, le limonène, le carotène...

En revanche, les caroténoïdes qui contiennent des atomes d'oxygènes, ne sont pas à proprement parler des terpènes, mais des terpénoïdes (luteine).

Deux de propriétés fondamentales de terpènes sont leurs caractères odoriférants (géranium) et leurs sensibilités à la lumière. Un grand nombre d'entre eux possède des propriétés antiseptiques (Klaas et al. 2002).

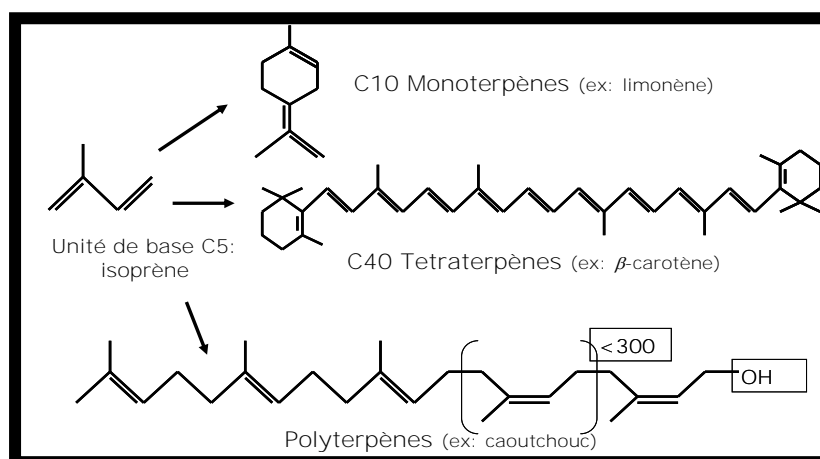


Figure 1: structure des différents terpènes.

► Rôle bioactif des terpénoïdes

Les terpénoïdes sont connus comme doués de propriétés antifongiques et antibactériennes. A titre illustratif, la buteline et l'acide 12-oxohardwickique isolés de l'écorce de *Croton macrostachys*, ont montré des activités antifongiques et antibactériennes. Le mécanisme des terpénoïdes n'est pas bien connu mais, il pourrait induire une destruction de la membrane du microorganisme par une action lipophile (Cowan, 1999).

Les terpénoïdes sont les plus représentés dans la constitution chimique des huiles essentielles (Brunetton, 1999).

Des investigations concernant les activités biologiques des mono-et des sesquiterpènes ont prouvé l'existence des effets suivants : anesthésique, antihistaminique (allergies), anti-rhumatismal, diurétique (β -eudesmol), insecticide, analgésique, toxique (sesquiterpènes) quelquefois, antibiotique, anti-inflammatoire, anti-cancéreux, irritant et calmant (mono et sesquiterpènes) (Hsiou-Y, 2000 ; Veličković, 2003).

I.4. 2.3. Les stérols

Ce sont des dérivés des phytostérols. Ces composés sont naturellement présents dans la fraction lipidique des plantes. Ils ne sont pas synthétisés par l'homme et l'animal, ils ne peuvent être apportés que par l'alimentation. Plusieurs études ont démontré que les phytostérols et les phytostanols réduisent l'absorption du cholestérol dans l'intestin grêle. L'exemple le plus courant de stérol est le : cholestérol. Leur structure générale est composée de 4 cycles dont les trois premiers 6 chaînons et le dernier à 5. Les principaux stérols dans les plantes, les champignons et les algues sont caractérisés par la présence, sur la chaîne latérale, d'un méthyle (ou éthyle) attaché au carbone C-24.

Ces différents types de stérols, appelés phytostérols, sont des constituants de membranes cellulaires qui jouent un rôle très important dans la perméabilité de celles-ci et aussi dans la prolifération cellulaire (**Bruneton, 1993 ; Rahal, 2004 ; Kartal, 2005**).

I.4.2.4. Les saponines

Le nom saponine dérive du mot latin «sapo», qui signifie savon, parce que ces composés moussent une fois agités avec de l'eau. Ils se composent d'aglycones non polaires liés à un ou plusieurs sucres. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires explique leur comportement moussant en solution aqueuse. Comme définition, on dirait qu'une saponine est un glycoside de stéroïde ou de triterpène. Fondamentalement, on distingue les saponines stéroïques et les saponines triterpéniques dérivant tous deux biosynthétiquement de l'oxyde de squalène (**Manach, 2004**).

I.4.2.5. Composés phénoliques

Le terme «*polyphénols*» est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. En fait, il devrait être réservé aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols. Ce qui exclurait alors les monophénols, pourtant abondants et importants chez les végétaux. Donc la désignation générale «composés phénoliques» concerne à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques (**Fleuriet, 2005**).

Les polyphénols possèdent plusieurs groupement phénoliques, avec ou non d'autres fonctions (alcoolique (OH), carboxylique (COOH),...). Ils sont probablement les composés

naturels les plus répandus dans la nature et de ce fait sont des éléments faisant partie de l'alimentation animale. Ces composés présentent une grande diversité de structures, divisées en non flavonoïdes et flavonoïdes. La première est représentée par les acides phénoliques, qui comprennent les acides benzoïques. La seconde classe est constituée d'un noyau phénolique porteur d'une chaîne latérale insaturée en C3.

La dernière classe est basée sur un squelette en C6-C3-C6, elle comprend plusieurs groupes qui se distinguent par le degré d'oxydation de l'hétérocycle central en C3.

Toutes les classes de composés phénoliques comportent un grand nombre de structures différentes en fonction du nombre et de la position des groupements hydroxyles sur le squelette de base. Ces structures peuvent également être diversement substituées (glycosylées, estérifiées, acylée) **(Robbers et al, 1996)**.

• Les coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone . Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarouna odorata*. Aujourd'hui, près de 1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les microorganismes. Dans les plantes, on les rencontre chez les Apiacées, les Astéracées, les Fabacées, les Rosacées, les Rubiacées, les Rutacées et les Solanacées. Du point de vue structural, ils sont classés en coumarines simples avec des substituants sur le cycle du benzène, les furanocoumarines , les pyranocoumarines, les coumarines substitués en position 3 et/ou 4. Le dernier groupe serait celui des dimères **(Sakagami , 2005)**.

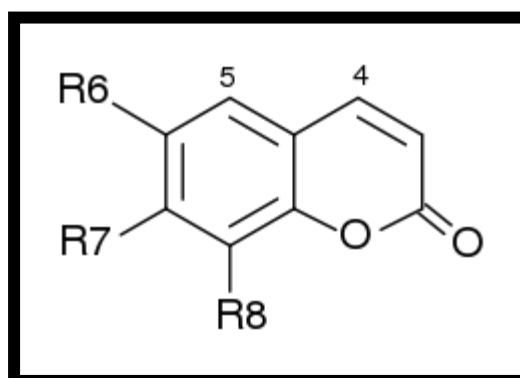


Figure 2 : Structure de base : coumarine

► **Intérêt des coumarines**

Les coumarines possèdent des propriétés physiologiques et antimicrobiennes. La warfarine est une coumarine utilisée comme anticoagulant qui posséderait également des propriétés antivirales (Cowan, 1999). De même, les coumarines présentes dans la plante *Galium odoratum*, seraient responsables de l'activité antibactérienne et antifongique de cette plante (Hostettmann, 1991).

• **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastides particuliers, les chloroplastes (Guignard, 1996).

Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. On dénombre près de 6500 flavonoïdes répartis en 12 classes (Stöckigt et al. 2002) et leur nombre ne cesse d'accroître. Par définition, les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun la structure du diphenylpropane (C6-C3-C6) (27); les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C (De Rijke et al. 2006).

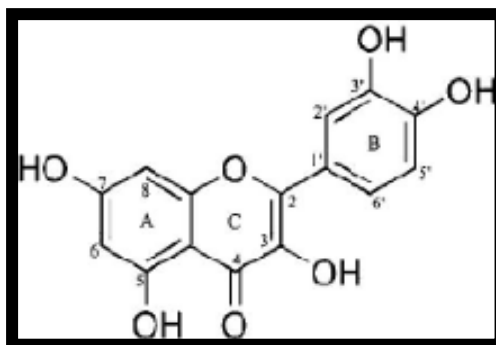


Figure 3 : Structure générale du noyau des flavonoïdes (Bruneton 1999)

Leur fonction principale semble être la coloration des plantes (au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bêtaïnes), même si leur présence est parfois masquée par leur présence sous forme "leuco", ce qui explique leur intérêt commercial dans l'industrie alimentaire (Gàbor et al. 1988).

On distingue différentes structures des flavonoïdes parmi lesquels se trouvent : les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanonols, les flavanes, les flavan - 3-oles, les flavylum, les chalcones, les aurones, les isoflavones, les isoflavonols, les isoflavanes, lesptérocarpanes, les coumaronochromones, les 3-arylcoumarines, les coumestanes, les roténoïdes. **De Rijke et al. (2006)** ont classé les flavonoïdes en 6 familles qui impliquent les flavonols, les flavones, les flavanes, les isoflavones, les anthocyanines et les flavanols. Au sein de ces six familles, deux types de structures ont été relevés, celui des flavonoïdes au sens strict dont la structure porte le noyau aromatique B en position 3 sur la chaîne C3 et celui des

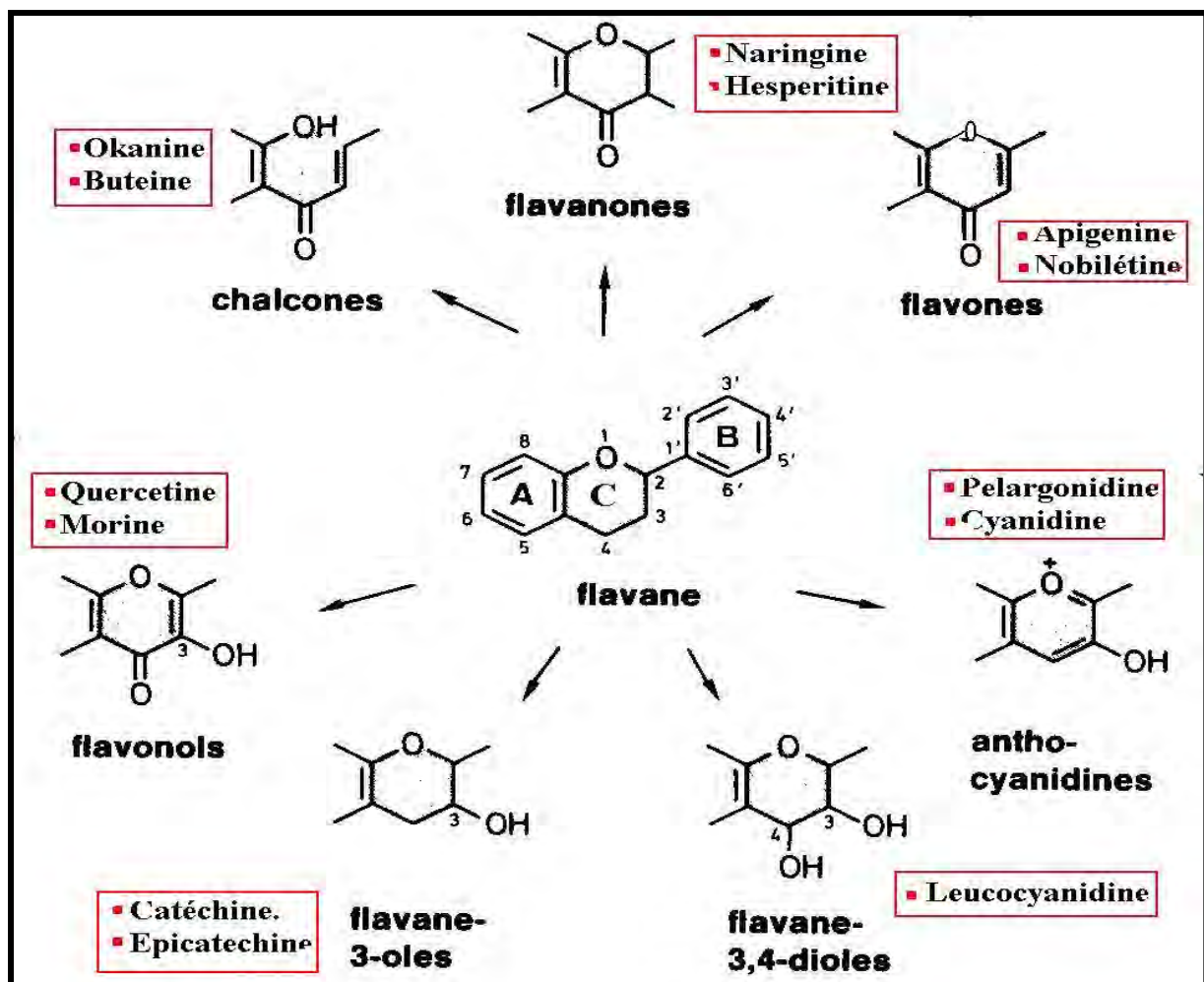


Figure 4 : Définition des différents types de flavonoïdes à partir du squelette flavane. (Dacosta, 2003 ; Louis, 2004)

► Activité antibactérienne des flavonoïdes

Une activité antibactérienne est connue pour les flavonoïdes. En effet, ils sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries : *Staphylococcus aureus* (Babayi 2004), *Escherichia coli* (Ulanowska 2006), *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Heliotropium sinuatum*, *Proteus mirabilis* (**Didrak 1999 ; Modak 2001 ; Okigbo 2005 ; Mamatha 2005**).

Chaque composé agit spécifiquement sur un ou plusieurs germes. Ex : l'apigénine ne montre une faible activité que contre *Staphylococcus aureus* et la galangine une activité seulement contre cette même espèce (**Basile 1999 ; Cushnie 2003 ; Martini 2004**).

Aussi dans certains travaux, il est cité que les flavonoïdes extraits avec du méthanol 95% sont actifs sur certaines bactéries, alors que ceux extraits avec du méthanol 60% de la même plante ne le sont pas, comme c'est le cas des flavonoïdes de *Linum capitatum* contre *Staphylococcus aureus* (**Slavica et al. 2004**).

La diffusion radiale est souvent utilisée pour mettre en évidence cette activité, mais la mesure par le biais de cette méthode demeure difficile du fait que les zones sont parfois diffusionnelles (**Ilic et al. 2004**). Les flavonoïdes sont des composés phénoliques qui possèdent une unité C6-C3 liée à un noyau aromatique (**Zhang et Björn, 2009**).

Etant donné que les flavonoïdes sont synthétisés par les plantes suite à une infection microbienne, il n'est donc pas surprenant qu'ils possèdent des propriétés antimicrobiennes (**Cowan, 1999**). Leur activité est probablement due à leur capacité de se complexer aux protéines extracellulaires et solubles. Mais, les flavonoïdes à caractère lipophile peuvent détruire les membranes microbiennes en augmentant la fluidité des lipides membranaires (**Prasad et al. 2004**).

• Les tannins

Le terme tanin dérive de la capacité de tannage de la peau animale en la transformant en cuir par le dit composé. Les tannins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire. Les tannins sont des molécules fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux (**Alkurd et al. 2008**). On distingue: les tannins hydrolysables et condensés.

► **Les tannins hydrolysables**

Ces tannins sont des dimères d'acide gallique condensés sur un dérivé glycosyle, Ils comprennent l'acide gallique et les produits de condensation de son dimère, l'acide hexahydroxydiphénique. Comme leur nom l'indique, ces tannins subissent facilement une hydrolyse acide et basique, ils s'hydrolysent sous l'action enzymatique et de l'eau chaude (Conrad *et al.* 1998).

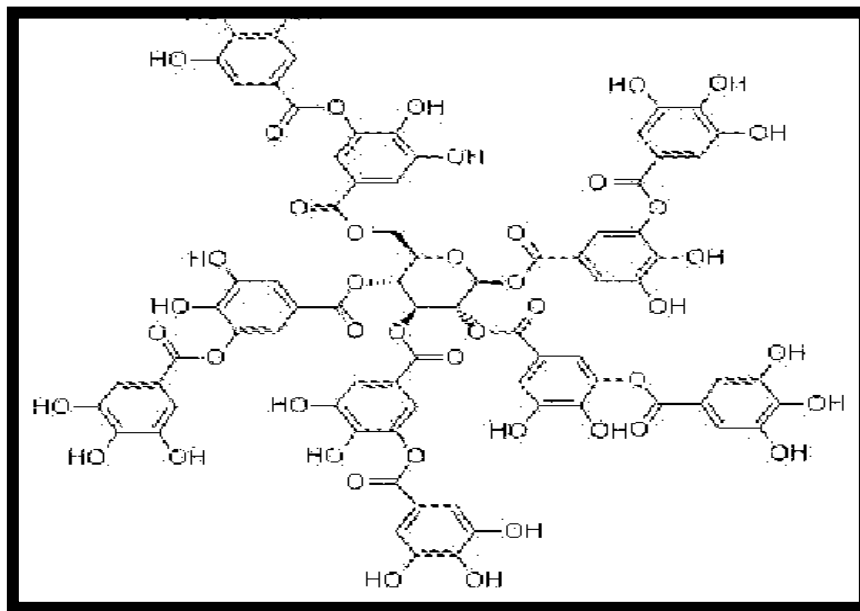


Figure 5 : Structure des tannins hydrolysables (Bruneton, 1999)

► **Les tannins condensés**

Appelés aussi proanthocyanidines ou procyanidines, les tannins condensés, sont des polyphénols de masse molaire élevées. Ils résultent de la polymérisation autooxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diol liées majoritairement par les liaisons C4-C8 (parfois C4-C6) des unités adjacentes, et se nomment ainsi pro anthocyanidines de type B. Lorsque la condensation se produit entre les unités adjacentes par la liaison C4-C8 et par une liaison d'éther additionnelle entre C2 et C7, les proanthocyanidines sont dits de types A (Wollgast, 2000 ; Dykes, 2006).

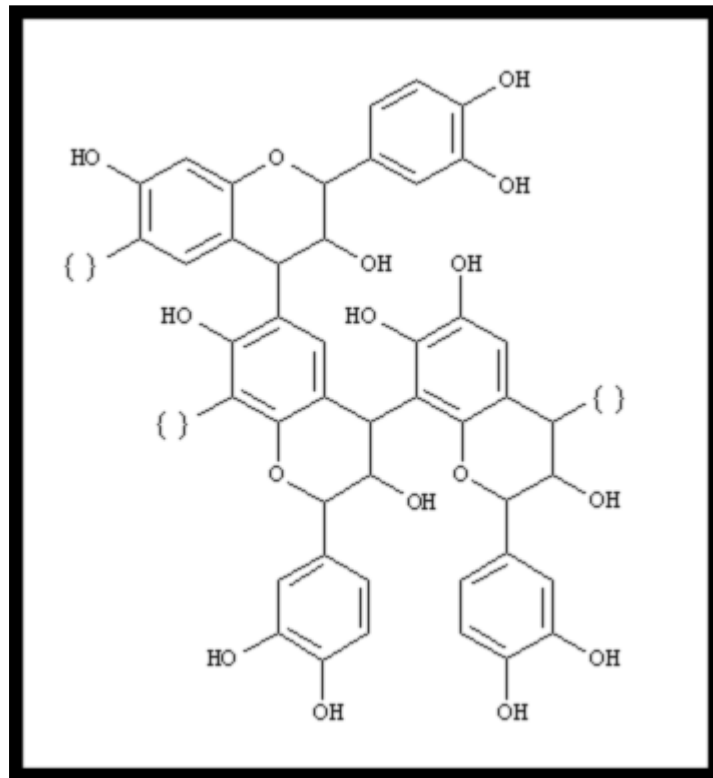


Figure 6 : Structure des tannins condensés (Li, 2004)

► **Activité antibactérienne des tannins :**

Les tannins ont une action antibactérienne puissante leur permettant d'inhiber la croissance des bactéries ruminales (dont certaines sont sporogènes) comme *Clostridium aminophilum*, *Butyrivibrio fibrisolvans*, *C. proteoclasterium* (Chatterjee et al. 2004 ; Leitao 2005), ainsi que les bactéries responsables de différentes infections chez l'homme : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis*. L'inhibition bactérienne par les tannins est dépendante de la structure et du degré de polymérisation de ces derniers, mais ceci n'est pas toujours le cas (Sivakumaran 2004).

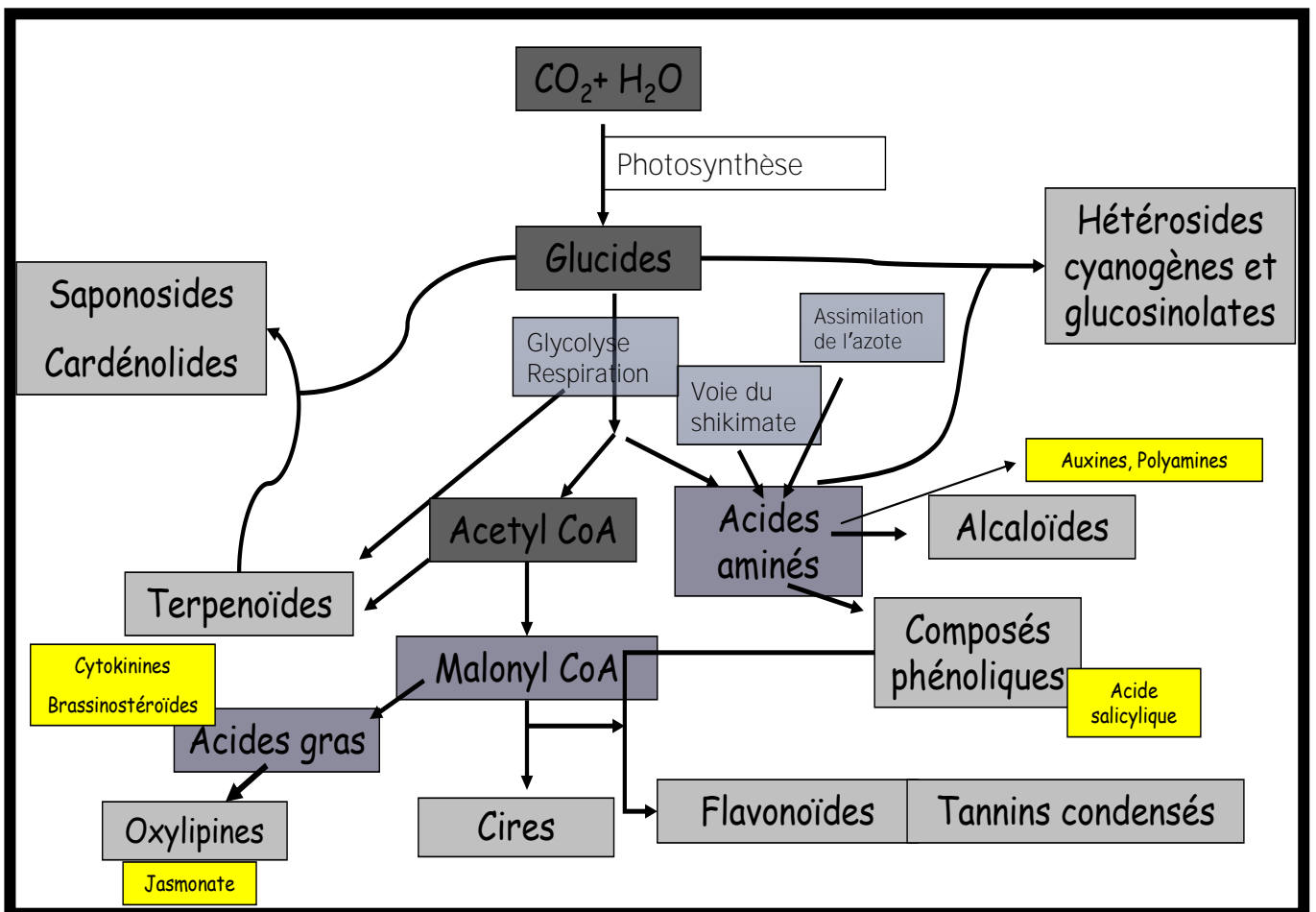
Chung et ses collaborateurs ont trouvé que l'acide tannique a inhibé la croissance des bactéries des aliments comme : *Alealigenes faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *K pneumonia*, *Proteus vulgaris*, *Pseud fluorescens*, *Salmonella enteritidis*, *S paratyphi*, *Staph aureus*, *Strept faecalis*, *Strept pyogenes* et *Yersinia enterocolitica*. Les bactéries intestinales humaines comme : *Bacteroides fragilis*, *Clostridium clostridiiforme*, *C perfringens*, *C paraputrificum*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* sont inhibées par l'acide tannique (Chung et Wei, 2001).

I.5. Relations entre métabolisme secondaire et métabolisme primaire

Les jonctions entre métabolisme primaire et secondaire sont nombreuses et parfois complexes. Les principales sont synthétisées dans le schéma suivant qui indique également l'origine biosynthétique des principales phytohormones. Les étapes enzymatiques les plus représentatives sont :

- la phénylalanine ammonia lyase (PAL) qui initie la synthèse de la plupart des composés phénoliques à partir d'un acide aminé
- la chalcone synthase qui initie la synthèse des flavonoïdes à partir du malonyl CoA et d'un élément phénylpropane
- la voie mévalonate indépendante de la biosynthèse de l'isopentényl diphosphate (IPP), à l'origine de la synthèse de plus grande partie des terpénoïdes

Relations entre métabolisme secondaire et métabolisme primaire



Chapitre II: Activité antibactérienne

Il est connu que le traitement des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. Mais, la consommation à grande échelle de ces « médicaments » a entraîné la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouveaux substituts, surtout les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration dans les recherches médicales (Ali-Shtayeh et al. 1998).

II.1. Les infections bactériennes

Une infection bactérienne est un ensemble de troubles qui résultent de la pénétration d'une bactérie pathogène dans un organisme. Elle peut être :

- locale, lorsqu'elle se manifeste uniquement au niveau où les germes ont pénétré ;
- générale, lorsqu'un germe franchit les barrières opposées par l'organisme à son entrée (peau, muqueuses) ou au niveau des ganglions, il pénètre dans le sang et se dissémine par celui-ci dans tout l'organisme ;
- focale : c'est l'infection en foyer dans les tissus ou organes où les germes sont apportés par la circulation sanguine. (Pocidalo et al. 1989 ; Marc et al. 2001).

II.2. Rappel sur les bactéries

Une bactérie est un microbe formé d'une seule cellule, visible au microscope, appartenant à une zone de transition entre le règne animal et le règne végétal.

Comme toute cellule, les bactéries sont constituées d'un noyau, isolé ou diffus, un protoplasme contenant des granulations et des vacuoles, une paroi parfois d'une capsule.

Certaines bactéries sont mobiles grâce à des cils vibratiles. Selon leur mode de nutrition et leur comportement vis-à-vis de l'oxygène, les bactéries sont classées en aérobies et en anaérobies.

Les bactéries se reproduisent selon deux modes :

- la division simple ou scissiparité ;
- la sporulation, la spore représentant la forme de résistance et de dissémination du germe.

Pour croître, les bactéries doivent trouver dans le milieu extérieur des conditions physicochimiques favorables qui leur sont nécessaires et les aliments couvrant leurs besoins énergétiques élémentaires et spécifiques. Sur le plan pratique, ces besoins sont satisfaits dans des milieux élaborés par l'homme en vue d'étudier les bactéries et sont appelés de ce fait, milieux de culture (Leclerc *et al.* 1995 ; Madigan *et al.* 1997 ; Marc *et al.* 2001).

II.2.1. : Exemple de classification des bactéries

II.2.1.1 : Bactéries en forme de sphère : les cocci

► Cocci Gram positif

Nous avons les genres *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Pneumococcus*,
Enterococcus.

► Cocci Gram négatif

Nous avons le genre *Neisseria*.

II.2.1.2. : Bactéries en forme de bâtonnet : les bacilles

► Bacilles Gram positif

Nous avons les genres *Listeria*, *Erysipelothria*, *Bacillus*, *Cynetobacter*, *Actynomyces*.

► Bacilles Gram négatif

Nous avons les genres *Enterobacter*, *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Brucella*,
Francisella, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vibrion*, *Campylobacter*, *Moraxella*, *Aeromonas*,
Escherichia, *Klebsiella*. *Benbrinis soumia*

► Bacilles acido-alcool résistants (BAAR)

Ici, nous retrouvons le bacille de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) et celui de la lèpre (*Mycobacterium leprae*).

II.2.1.3. Bactéries en forme de spirale : les spirochètes

Nous avons les genres *Treponema*, *Leptospira*, *Borrella*, *Spirillum*.

II.2.1.4. Flore bactérienne anaérobie

► Gram positif

Nous avons les genres *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionobacterium*, *Bifidobacterium*.

► Gram négatif

Nous avons les genres *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Bacteroides* (Lechat et al. 1992 ; Marc et al. 2001).

II.2.2. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées

II.2.2.1. *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des bactéries sphériques, qui se divisent sur plusieurs plans pour former des amas réguliers ou irréguliers en grappe de raisin, d'où leur nom (en grec staphylos), ils sont immobiles et cultivent sur des milieux contenant 5% de Na Cl et pour certains jusqu'à 10 et même 15%. Ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs.

Les staphylocoques sont des germes ubiquistes largement distribués dans l'environnement naturel de l'homme, mais ils le sont plus fréquemment et en plus forte densité sur les surfaces cutano – muqueuses des mammifères.

Il existe une certaine relation entre les espèces de staphylocoques et l'hôte qui les héberge. *Staphylococcus epidermidis* est l'espèce la plus fréquente et la plus abondante sur les surfaces cutanées de l'homme. *Staphylococcus aureus* est l'espèce prédominante chez l'homme et autres mammifères, la cavité nasale de l'homme est sa niche préférentielle. Les staphylocoques ont un pouvoir pathogène opportuniste extrêmement large qui s'exerce avec une grande fréquence en milieu hospitalier. L'espèce *Staphylococcus aureus*, responsable d'infections pyogènes de la peau et des muqueuses (furoncle, impétigo, staphylococcie maligne de la face, staphylococcies bulleuses, etc.), mais aussi osseuses (ostéomyélite), digestives (entérocolites post-antibiotiques), septicémiques. *Staphylococcus epidermidis* un agent de plus en plus fréquent d'infections nosocomiales (Leclerc et al. 1995).

II.2.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Ce genre appartient à la famille des *Pseudomonadaceae*. Les bactéries de cette famille sont des bâtonnets, mobiles par cils polaires, aérobies strictes. Les *Pseudomonas* cultivent facilement sur milieux usuels, en aérobiose, à la température de 30°C, certaines espèces comme *Pseudomonas aeruginosa* en sont capables à 41°C et même 43°C; ce caractère étant utilisé pour le diagnostic. La production d'un pigment est assez commune dans le genre. Deux sont particulièrement fréquents et utiles pour la reconnaissance des espèces: la pyocyanine, pigment phénazinique, soluble dans l'eau et le chloroforme, spécifique de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*; la pyoverdine, ou pigment vert fluorescent, soluble uniquement dans l'eau et élaborée en particulier par *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens*. Ces bactéries sont capables d'utiliser une variété très large de substrats comme source de carbone et d'énergie.

Ceux-ci comprennent les glucides, lipides, acides aminés, acides organiques, et aussi un grand nombre de corps aromatiques benzéniques, phénoliques, terpénique, des stéroïdes.

Dans le genre *Pseudomonas* quelques espèces se signalent à l'attention, du fait de leur pouvoir pathogène opportuniste. *Pseudomonas aeruginosa*, l'espèce type, est un germe ubiquiste communément rencontré dans le sol et plus encore dans les eaux, capable de se multiplier à 41°C, contrairement à *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. Fréquemment isolé sur la peau et les muqueuses de l'homme ou de l'animal, il est aussi particulièrement résistant aux antibiotiques et même aux antiseptiques. En milieu hospitalier il est à l'origine de surinfections et de suppurations locales ou profondes, isolé essentiellement chez des patients présentant une immunodéficience locale ou générale (brûlés, cancéreux, etc.), et très fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales (infections pulmonaires, cutanées...). De même qu'il est phytopathogène avec beaucoup d'autres espèces du même genre (Leclerc et al. 1995).

II.2.2.3. *Escherichia coli*

Ce genre comprend 5 espèces, mais *Escherichia coli* est la plus importante. Cette espèce est subdivisée en sérotypes sur la base des antigènes présents.

Escherichia coli, un hôte commun de l'intestin de l'homme ($10^8/g$ de selles), et des animaux ; elle est recherchée à ce titre, comme genre témoin de contamination fécale, dans l'eau et les aliments.

A l'intérieur de l'espèce il y a des pathotypes souvent associés à des sérotypes particuliers. Certains de ces pathotypes sont responsables d'infections intestinales (gastro-entérites et diarrhées) leur pouvoir pathogène est induit par des facteurs d'adhésion et/ou la production d'entérotoxines. *Escherichia coli* entérotoxigène (diarrhées infantiles), *Escherichia coli* entérotoxino-gène (tourista), *Escherichia coli* entéroinvasif (invasion des cellules intestinales), *Escherichia coli* entérohémorragique (diarrhées sanglantes), *Escherichia coli* entéroadhérent (diarrhée du voyageur).

D'autres responsables de méningites néonatales, provoquent des infections du tractus urinaire, ou encore des septicémies qui correspondent à un nombre restreint de sérotypes (Leclerc et al. 1995).

II.2.2.4. *Protéus vulgaris*

Caractérisés par leur grande mobilité, et sont vraisemblablement d'origine tellurique. Certaines espèces d'intérêt médical tels *Protéus mirabilis*, *Protéus vulgaris*, *Morganella morganii* (ancien *Proteus morganii*), peuvent induire des infections des voies urinaires (dans 60% des cas d'infections urinaires), des infections cutanées (surinfections des plaies chirurgicales, brûlures...), des infections des voies respiratoires (otites chroniques suppurées, sinusites), et même des septicémies (Berche et al. 1989).

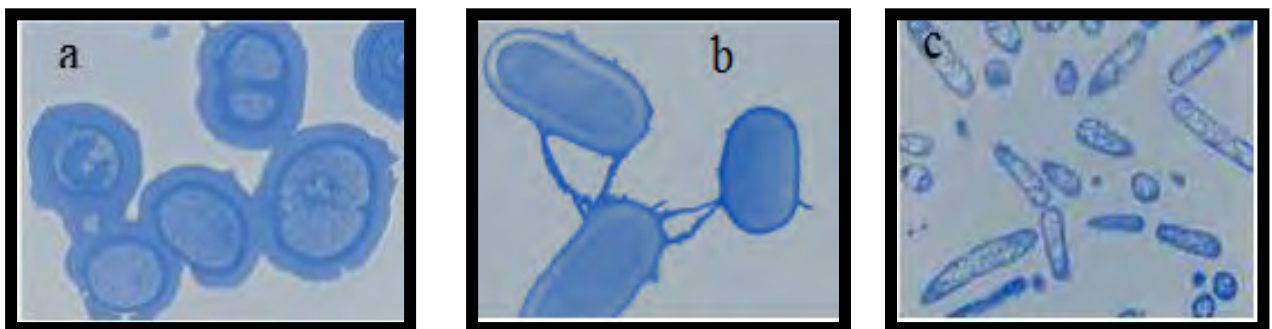


Figure 7 Aspect morphologique des micro-organismes étudiés (Pieri et Kirkiacharian, 1992) (a) : *S. aureus* ; (b) : *E. coli* ; (c) : *P. aeruginosa*

II.3. Les Antibiotiques

Pour de multiples raisons, il est apparu utile et, dans certains cas indispensable, de contrôler le développement des microorganismes, car certaines bactéries sont hautement pathogènes pour l'homme ou l'animal et qu'il fallait tout naturellement se protéger de leurs effets néfastes et empêcher la transmission des maladies infectieuses. Les bactéries ne sont pas seulement nuisibles pour l'homme et l'animal, mais d'autres produits, substances ou matériaux peuvent être détruits ou altérés sous l'effet de leur multiplication: détérioration des produits alimentaires; plusieurs monuments d'un grand intérêt historique sont dégradés (maladie de la pierre); les canalisations aussi peuvent être perforées.

Alors, il est devenu indispensable à l'homme de mener une lutte contre l'envahissement des microorganismes, pour conserver ses biens, son potentiel industriel, son patrimoine artistique et pour "protéger son existence" même. Les moyens de lutte sont nombreux, les agents physiques (température, rayonnements...), les agents chimiques (métaux lourds, chlore et dérivés, alcools...) sont très actifs mais nocifs, aussi bien pour les bactéries que pour les cellules humaines ou animales.

Mais il y a d'autres agents, possédant une "toxicité sélective": ils s'opposent à la multiplication bactérienne sans nuire aux cellules de l'hôte, et sont utilisés pour cette raison en thérapeutique, ce sont les "Antibiotiques" (Leclerc *et al.* 1995).

II.4. Principe de base d'une antibiothérapie

La prescription et la dispensation d'un antibiotique doivent être rigoureuses. Il est donc nécessaire de convaincre le patient de la durée, de la posologie et des précautions d'emplois de l'antibiotique (ATB).

C'est sur la base d'un diagnostic clinique complété par des connaissances biologiques que vont se fonder la décision et le choix d'une antibiothérapie (Pichard *et al.* 2002).

II.5. Résistance des antibiotiques

La résistance d'un germe peut exister, si le germe appartient à la même espèce (résistance naturelle) alors la résistance acquise n'intéresse que certaines souches. La résistance acquise d'une espèce bactérienne à un antibiotique se développe au fur et à mesure que l'antibiotique est administré. Elle se traduit par une augmentation de la concentration minimale inhibitrice.

Dans 10%, cette résistance acquise est due à des modifications génétiques de la bactérie, alors que dans 90% des cas cette résistance est due à l'acquisition de plasmides qui sont des molécules d'ADN se trouvant dans le cytoplasme des bactéries. Le transfert des plasmides se fait par conjugaison, par mobilisation ou par transformation.

La résistance plasmidique permet à la bactérie d'élaborer des enzymes capables de détruire la molécule d'antibiotique par exemple des β lactamases pour les β lactamines, des adénylases-acétylase-phosphorylases pour les aminosides, les tétracyclines, et les sulfamides.

Cette résistance des germes aux antibiotiques explique l'importance de l'antibiogramme qui permet de choisir l'antibiotique le plus efficace vis à vis d'un germe déterminé et la mise en évidence des germes multirésistants dont la dissémination doit être évitée en milieu hospitalier (**Berche et al. 1989 ; Hamza, 1993 ; Fatorrusso et al. 2001**).

II.6. Mécanisme d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent : Sur la synthèse de la paroi bactérienne : la paroi est constituée de mucopeptide. Les antibiotiques bloquent la transpeptidase qui intervient pour synthétiser la paroi des cellules-filles en provoquant la formation de paroi incomplète aboutissant à l'éclatement de la bactérie. Exemples : β lactamines, la bacitracine, la vancomycine.

- Sur la structure de la membrane cytoplasmique

Les antibiotiques altèrent la membrane cytoplasmique et la dissocient ce qui entraîne une fuite du cytoplasme. Exemple : polymyxine et la colistine.

- Sur la synthèse des protéines bactériennes

L'ADN du noyau transmet à l'ARN messager (ARNm) le code de synthèse des protéines.

Cet ARNm vient en contact du ribosome rencontré l'ARN de transfert (ARNt) qui apporte les aminoacides. Certains antibiotiques empêchent la libération de l'acide aminé par la ARN_t. Exemple : les tétracyclines.

D'autres gênent la lecture du code de synthèse sur l'ARN messager. Exemple : les aminosides. Le chloramphénicol inhibe l'enzyme qui permet aux acides aminés codés de s'assembler en polypeptide utile.

Sur l'ADN nucléaire ces antibiotiques agissent en gênant la réplication de l'ADN. Exemple : rifampicine, l'acide nalidixique (Duval et al. 1985).

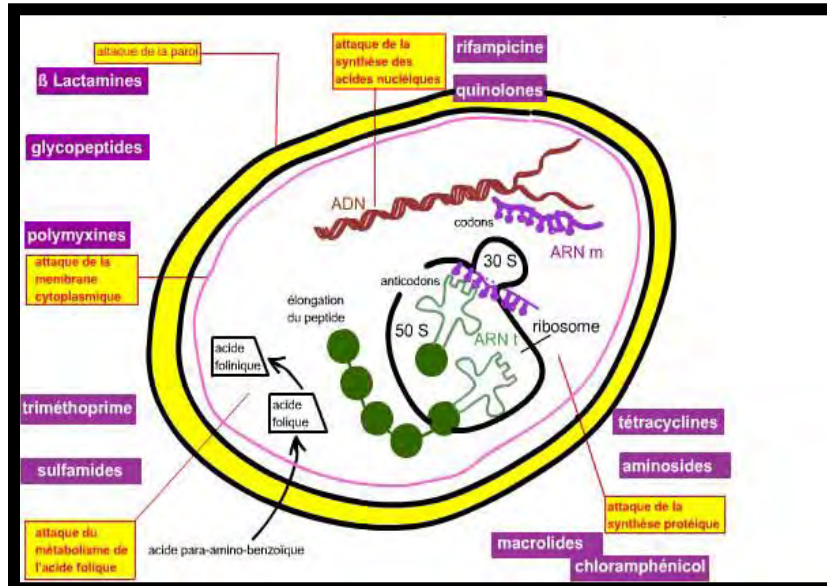


Figure 8 Mécanisme d'action des antibiotiques

CHAPITRE III : MONOGRAPHIE DES PLANTES

III.1 *Artemisia herba alba*

Le genre *Artemisia* est un membre d'une grande variété de plantes appartenant à la famille des *Asteraceae* (Compositae). Plus de 300 différentes espèces de ce genre se trouvent principalement dans les zones arides et semi arides d'Europe, d'Amérique, l'Afrique du Nord ainsi qu'en Asie. Les espèces d'*Artemisia* sont largement utilisées comme plantes médicinales en médecine traditionnelle. Certaines espèces, telles que l'*Artemisia absinthium*, l'*Artemisia annua* ou l'*Artemisia vulgaris* sont incorporés dans les Pharmacopées de plusieurs pays européens et asiatiques (Proksch, 1992). En Algérie, plus d'une dizaine d'armoises sont répertoriées. Certaines sont très rares dans les hautes montagnes. En revanche, d'autres sont très répandues et abondantes dans les régions steppiques et sahariennes. Sa détermination est très connue des populations, car elle est vivace et d'une odeur aromatique très caractéristique (Temani, 2005).

En commun avec plusieurs d'autres espèces de ce genre, l'*Artemisia herba alba* Asso, plante caractéristique du moyenne-orient et d'Afrique du Nord (Feinbrun-Dothan, 1978), est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies.

Des plantes du genre *Artemisia* (*Asteraceae*) ont été employées dans la médecine traditionnelle par beaucoup de cultures depuis les périodes antiques. Des thés de fines herbes de ces espèces ont été employées comme agents analgésiques, antibactériens, anti-plasmodique, et hémostatiques, anthelminthique, anti-diarrhéique et diurétique (Jakupovic, 1987 ; Alshamaony, 1994) alors que plusieurs extraits et huiles essentiels montraient un certain nombre d'activités biologiques telles que antihyperglycemique (Kwak, 1997), antimicrobien, antioxydant (Abu-Zarga, 1971 ; Hu, 1996) et anti-inflammatoire (Khafagy, 1971; Sharma, 1991). En outre, quelques espèces du genre sont fréquemment utilisées pour le traitement de certaines maladies telles que la malaria, l'hépatite, le cancer et les infections par des champignons, des bactéries, et des virus (Merikli, 1988 ; Zheng, 1996). Historiquement, l'armoise a été un genre productif dans la recherche de nouveaux composés biologiquement actifs. Les investigations phytochimiques ont montré que ce genre est riche en sesquiterpènes, monoterpènes, flavonoïdes et coumarines (Marco, 1989 ; Ahmed, 1990).

III.1.1.Noms vernaculaires

Thym des steppes, absinthe du désert. Les noms vernaculaires (populaires) sont très nombreux pour cette plante.

Nom français	armoïse blanche
Nom anglais	<i>wormwood</i>
Nom arabe	<i>shih</i> (الشوح)

III.1.2.Systématique

Artemisia est le nom de genre des armoïses, il provient de celui de la déesse grecque de la chasse Artémis; herba-alba signifie herbe blanche. *Artemisia herba-alba* est une espèce dans le genre *Artemisia* qui contient environ de 521 à 696 espèces et fait partie de la famille des *Asteraceae* (*Asteracées*).

Phylum:	<i>Angiospermeae.</i>
Sous Phylum:	<i>Dicotylédones</i>
Ordre:	<i>Gampanulatae</i>
Famille:	<i>Asteraceae.</i>
Sous-famille:	<i>Asterioideae.</i>
Tribu:	<i>Anthemideae.</i>
Sous-tribu:	<i>Artemisiinae.</i>
Genre:	<i>Artemisia.</i>
Espèce:	<i>Herba-alba.</i>

Et que son nom scientifique est *Artemisia herba-alba* asso. Ou *Artemisiaincultadel.*

III.1.3. Présentation et description botanique

L'espèce *Artemisia herba-alba* (armoïse herbe blanche) connue depuis des millénaires, a été décrite par l'historien grec Xénophon, dès le début du IV^e siècle av. J.-C., dans les steppes de la Mésopotamie (**Francis Joannès, 2001**). Elle a été répertoriée en 1779 par le botaniste espagnol Ignacio Jordán Claudio de Assoy del Rio (**IPNI**). C'est une plante essentiellement fourragère, très appréciée par le bétail comme pâturage d'hiver. Elle présente une odeur caractéristique d'huile de thymol et un goût amer d'où son caractère astringent (**Nabli, 1989**). Plusieurs noms sont attribués à *l'Artemisia herba-alba*; thym des steppes, absinthe du désert

L'Artemisia Herba-Alba est une plante herbacée à tiges ligneuses et ramifiées, de 30 à 50 cm, très feuillée avec une souche épaisse. Les feuilles sont petites, sessiles, pubescentes et à aspect argenté. Les fleurs sont groupées en grappes, à capitules très petites (3/1,5mm) et ovoïdes. L'involucre est à bractées imbriquées, les externes orbiculaires et pubescentes. Le réceptacle floral est nu avec 2 à 5 fleurs jaunâtres par capitule toutes hermaphrodites. *L'Artemisia Herba-Alba* est largement répandue depuis les îles Canaries et le sud-est de l'Espagne jusqu'aux steppes d'Asie centrale (Iran, Turkménistan, Ouzbékistan) et à travers l'Afrique du Nord, l'Arabie et le Proche-Orient. En Afrique du nord, cette espèce couvre d'immenses territoires évalués à plus de dix millions d'hectares, *l'Artemisia herba-alba* est absente des zones littorales nord. Cependant, l'espèce se raréfie dans l'extrême sud. Elle pousse sur des sols bruns steppiques de texture moyenne et en extrême sud sur des sols sableux. L'armoïse résiste à la sécheresse, supporte le gypse et des niveaux de salinité modérément élevés (**Nabli, 1989**).

La croissance végétative de *l'Artemisia herba alba* Asso a lieu à l'automne, la floraison commence en Juin et se développe essentiellement en fin d'été. L'armoïse blanche se développe dans les zones bioclimatiques qui vont de la partie supérieure semi-arides à la partie inférieure Subsaharienne (**Gharabi et al.2008**).



Figure 9 : la plante dans son milieu naturel au début de la saison de floraison



Figure 10 : la plante dans son milieu naturel à la fin de la saison de floraison.

II.1.4. Chimie de la plante

Plusieurs métabolites secondaires ont été isolés de *l'Artemisia herba alba*, les plus importants sont les sesquiterpènes lactones. D'autres études ont été portées sur les flavonoïdes et l'huile essentielle.

Plusieurs types de sesquiterpènes lactones ont été trouvés dans les parties aériennes de

l'Artemisia herba alba Asso. Les Eudesmanolides suivie par germacranolides semblent les types les plus abondants dans cette espèce (**Ahmed et al. 1990 ; Boriky et al. 1996**). Les flavonoïdes détectés dans *l'Artemisia herba alba* montrent aussi une diversité structurale, allant des flavonoïdes communs (flavones glycosides et favonols) jusqu'à les flavonoïdes méthylés qui sont très inhabituel (**Saleh et al. 1985, Saleh et al. 1987**).

Les flavonoïdes glycosides comprennent des O-glycosides tels que quercitrine-3-glucoside, mais aussi des flavones C-glycosides qui sont rares dans le genre *Artemisia*, ainsi que dans l'ensemble des *Astraceae*.

En plus des sesquiterpènes lactones et des flavonoïdes l'analyse phytochimiques a porté sur la composition des huiles essentielles de *l'Artemisia herba alba* Asso. Parmi les composants les plus importants des huiles essentielle de *l'Artemisia herba alba* Asso on trouve les monoterpènes tels que le 1,8-cineole et le terpène 4 ol (**Feuerstein et al. 1986**).

Des santonines, des coumarines, des triterpènes pentacycliques et les tanins (**Gharabi et al. 2008**).

L'Artemisia herba alba Asso est très utilisé au Moyen-Orient et en Afrique du nord contre plusieurs maladies y compris l'entérite et les troubles intestinaux (**Yashphe et al. 1987**). L'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* Asso a montré une activité antibactérienne contre plusieurs bactéries telle que *l'Escherichia coli*, *Shigella sonnei* et la *Salmonelle typhose*. Cette activité a été assimilée à linalool, pinocarvèneol et surtout terpène 4-ol.

L'effet antispasmodique de l'huiles essentielle d'*Artemisia herba alba* Asso a été expérimentalement 100 - 1000 fois plus élevé que l'effet antibactérien observé (**Yashphe et al. 1987**).

III.1.5. Usage traditionnel

Artemisia. herba alba représente une importante ressource fourragère (Aidoud, 1983) D'après des éleveurs, cette espèce est souvent préconisée dans l'alimentation des ovins comme vermifuge. Elle est aussi utilisée dans la médecine traditionnelle pour faciliter la digestion, calmer les douleurs abdominales et celles du foie, dans le traitement du diabète et comme vermifuge (Belakhdar, 1997). Les racines sont efficaces contre les convulsions (Baba Aissa, 2000).

III.2. *Marrubium vulgare*

La famille des *Lamiacées (Lamiaceae)* ou *Labiées (Labiatae)* est une importante famille de plantes dicotylédones, qui comprend environ 4000 espèces et près de 210 genres (Spichiger, 2004 ; Naghibi et al. 2005). Cette famille comporte de nombreuses plantes exploitées pour les essences ou cultivées pour l'ornementation et la plupart de ces espèces sont aussi bien utilisées dans la médecine traditionnelle que dans la médecine moderne (Judd et al. 2002).

Un très grand nombre de genres de la famille des *Lamiaceae* sont des sources riches en terpénoides, flavonoïdes et iridoides glycosylés. Le genre *Phlomis* comprend près de 100 espèces est particulièrement riche en flavonoides, phénylethanoides, phenylpropanoides et en iridoides glycosylés. Le genre *Salvia* (Sauge), comprenant près de 900 espèces majoritairement riches en diterpénoides et le genre *Marrubium* (Marrube) qui est l'objectif de notre recherche comprend près de 30 espèces qui peuvent se trouver dans de nombreux pays du globe (Naghibi et al. 2005).

III.2.1.Noms vernaculaires

Nom français	Marrube blanc
Nom anglais	White horehound
Nom arabe	Maroubia ,elfrassioun , arriouat

III.2.2. Systématique

Sous royaume	<i>Tracheobiontes</i>
Embranchement	<i>Spermatophytes</i>
Division	<i>Magnoliophytes</i>
Classe	<i>Magnolipsides</i>
Sous classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Marrubium</i>
Espèce	<i>Marrubium vulgare</i>

III.2.3. Présentation et description botanique

Le Marrube vulgaire est une plante, d'aspect blanchâtre à odeur forte et désagréable, de 30 à 80cm de hauteur. Ses fleurs blanches, relativement petites, apparaissent du mois de Mai jusqu'au mois de Septembre, et parfois encore en hiver. Les feuilles ont toutes un pétiole. Ce dernier est très allongé chez les feuilles inférieures, au contraire très court et bordé par deux prolongements du limbe chez les feuilles supérieures (Boukef. 1986). Le limbe est fortement ridé en réseau, irrégulièrement crénelé, à contour largement ovale ou arrondi, se rétrécissant en coin à sa base, velues cotonneux et blanchâtre sur la face inférieure, poilue mais verte (rarement blanchâtre) sur la face supérieure. L'inflorescence est allongée et formée de groupes successifs renfermant chacun de nombreuses fleurs. Les petites bractées qui accompagnent les fleurs sont très étroites et crochues dans leurs parties supérieures. Le calice est velu-cotonneux, avec un anneau de poils vers l'intérieur en haut du tube du calice, il est terminé par 6 à 10 dents crochues. La corolle, couverte de petits poils à l'extérieur, présente un tube courbé, resserré, vers le milieu et ayant, à ce niveau, à l'intérieur, un anneau de poils, qui est disposé transversalement. La lèvre supérieure est dressée en deux lobes obtus à leur sommet. Le lobe médian de la lèvre inférieure est de contour arrondi et crénelé à son sommet. Les nectaires forment 4 lobes alternant avec les 4 parties de l'ovaire, qui sont aiguës à leur sommet dont l'antérieur est un peu plus large que les autres.

C'est une plante vivace, à tiges épaisses, cotonneuses, très feuillées, qui se perpétue et se multiplie par des bourgeons nés sur la tige souterraine Bonnier. Elle pousse dans toute l'Afrique du nord et presque toute l'Europe (Quezel, 1962-1963 ; Bellakhdar, 1997).



Figure11 : sommités fleuris du *Marrubium vulgare*



Figure 12 : *Le marrubium vulgare*

III.2.4. Chimie de la plante

Une recherche bibliographique exhaustive faite sur l'espèce *Marrubium vulgare* a permis de révéler la présence des diterpènes et les phenyléthanoides glucosidiques où elle contient un principe amer dû à la présence de γ -lactone (Novak, 1966).

Françoise et collaborateur ont pu isoler cinq composés phenyléthanoides glucosidiques (Hill, 1991). Les mêmes résultats ont été obtenus par Sevser et collaborateur (Finar, 1994). Ces structures sont : Acteoside, Forsythoside, Aenarioside, ballotetroside, et un phenylethanoïde non glucosidique; (+) E-Caffeoyl-L-malique acide. Ces composés ont été trouvés dans les parties aériennes de l'extrait butanolique. Une autre étude plus récente effectuée sur l'extrait méthanolique des parties aériennes du *Marrubium vulgare* (Mann, 1994) a révélé deux produits phenylethanoidiques le premier: 3,4-dihydroxy- β -phenylethoxy-O-[β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2) α -L rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-[β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)]-4-O-caffeoyl- β -D-glucopyranoside = Marruboside, le deuxième composé est Marruboside acétylé.

Ces structures sont identifiées par les différentes méthodes d'analyse spectroscopique UV, RMN et spectrométrie de masse ESI-MS. Popa et collaborateur ont pu isoler deux composées diterpénique : Marrubiol, 13 Labdene-8,15-diol ; (5 β , 8 α , 13E)-form. Ces structures ont été identifiées par IR spectroscopie (Courtios, 1971).

La réaction de Marrubiol avec l'acétique anhydride dans la pyridine donne facilement un mono acétate d'où l'oxydation de ce dernier avec l'acide chromique donne un hydroxycétone

Un autre travail récent réalisée par Sanae et collaborateur (Boulanger, 1966) a permis de déterminée l'activité de relaxation du marrubiol.

M.S.Henderson et collaborateur ont pu isoler un produit majoritaire de l'extrait acétonique des parties aériennes. Il s'agit de : Premarrubiin, comme on peut l'obtenir par une petite conversion de la Marrubiin par la chaleur (Grassé, 1969).

III.2.5. Usage traditionnel

Les espèces *Marrubium*, connues pour leurs propriétés médicinales, trouvent d'ores et déjà une large utilisation en médecine traditionnelle et en phytothérapie. Associé à du miel ou à du sucre, le *Marrubium vulgare* était employé, dans l'Antiquité, contre les affections respiratoires. Le médecin grec Dioscoride (40-90 apr. J.-C.) le recommandait déjà en décoction pour soigner la tuberculose, l'asthme et les toux (**Iserin, 2001**).

Actuellement, quelques espèces *Marrubium* demeurent utilisées, pour le traitement des troubles gastro-intestinaux, diabète de type 2, difficultés respiratoires, bronchites asthmatiformes, tuberculose, toux sèches, coqueluches, fièvres et diverses affections cutanées. (**Issan çalis, 1992; Paul Iserin, 2001; J. VanderJagt, 2002; Herrera-Arellano, 2004; Hellen K. Stulzer, 2006; Amal G. Al-Bakri, 2007**).

Une bonne activité antimicrobienne de l'espèce *Marrubium globosum* a également été observé (**Rigano, 2006 ; Al-Bakri, 2007**). L'action antioxydante du marrube semble protéger contre l'oxydation du « mauvais » cholestérol (LDL) et accentuer l'action du « bon » cholestérol (HDL) (**Matkowski, 2006**). La plante pourrait donc contribuer à prévenir l'athérosclérose (**Berrougui, 2006**).

On en sait très peu au sujet des composants du marrube et de leur mode d'action pharmacologique. En juin 2002, des chercheurs français isolaient d'ailleurs dans la plante un glucoside jusqu'alors inconnu, le marruboside (**Sahpaz, 2002**).

III.3. *Pinus pinaster*

Selon William Aiton ,1789, *Pinus* est le genre des conifères le plus largement étendu dans la famille des *Pinaceae* avec plus de 100 espèces (Farjon, 1984; Price et al. 1998), comprenant notamment le pin maritime (*Pinus pinaster* ou *Pinus maritima*).

III.3.1. Noms vernaculaires

Nom français	pin maritime
Nom anglais	maritime pine
Nom arabe	الصنوبر البحري

III.3.2. Systématique

Le genre *Pinus* contient plus d'espèces que n'importe quel autre genre du groupe des conifères. Le sous-genre des *Pinus* (Diploxylon) est lui-même subdivisé en sections et sous sections. La position systématique du pin maritime (*Pinus pinaster* Ait. Ou *Pinus maritima* Mill.) dans la classification actuelle est la suivante (Farjon, 1984).

Sous embranchement	<i>Gymnosperme</i>
Classe	<i>Pinopsida</i>
Ordre	<i>Pinal</i>
Famille	<i>Pinaceae</i>
Genre	<i>Pin</i>
Espèce	<i>Pinaster</i>

III.3.3. Présentation et description botanique

Présent naturellement sur tout le pourtour méditerranéen, le pin maritime est essentiellement planté pour la production dans les Landes françaises (**CIRAD, 2012b**). L'espèce *Pinus pinaster* d'Espagne, du Portugal et du sud de la France a montré une forte variabilité dans ses aspects morphologiques (**Tapias et al. 2004**). Le pin maritime est un pin de taille moyenne, qui peut atteindre 30 m de hauteur avec une écorce d'un brun rouge-clair. Son feuillage a un port de conifère étalé et ses aiguilles sont portées par paires. Ses cônes sont ovales, de couleur brune et d'une hauteur de 2 cm de long (**Pullaiah, 2006**).

Le pin maritime se trouve dans le sud-ouest et le sud-est de la France, en Corse, au Portugal, en Espagne, sur le littoral nord africain (Rif et Atlas marocains, Algérie, Tunisie), ainsi qu'en Italie (**Bettayeb, 2010**).



Figure 13 : Photographie de pin maritime et ses feuilles réduites ou aiguilles



Figure 14 : Photographie de pin maritime son fruit ou cône et son écorce.

III.3.4. Chimie de la plante

Chimiquement, la famille des *Pinaceae*, dont les pins font partie, est surtout caractérisée par la présence de résines, de tanins, de terpènes, de lignans et de quelques stilbènes (LaFever *et al*, 1994). La résine des pins est un mélange complexe de terpènes constitué d'une partie volatile appelée térébenthine et d'une partie non volatile appelée colophane (rosin). La térébenthine contient principalement des monoterpènes et quelques sesquiterpènes. Le (3-pinène , l'a-pinène , et le 3-carène sont les plus répandus alors que les composés mineurs généralement présents sont le dipentène, le p-phellandrène, le terpinolène, l'a-terpinène, le p-cymène et le myrcène (Zinkel *et al*, 1989a). La colophane contient essentiellement des acides diterpéniques (Phillips *et al*, 1999).

Les principaux tanins retrouvés dans les pins, surtout étudiés à partir du pin maritime (*Pinus maritima* L.), sont des oligomères de deux à sept unités de flavan-3-ol. Les plus fréquemment retrouvés sont les procyanidines, c'est-à-dire des oligomères de catéchine ou d'epicatéchine (Romani *et al*, 2006).

Une très grande variété de terpènes a été identifiée dans le genre *Pinus*. Les compositions en terpènes volatils des aiguilles de plusieurs espèces de pin ont déjà été analysées (Tsitsimpikou *et al*, 2001; Yu *et al*, 2004; Hong *et al*, 2004 Ka *et al*, 2005). Les composés présents en plus grandes quantités sont des mono ou des sesquiterpènes et leurs concentrations varient d'une espèce à l'autre. Le 3-pinène, l'a-pinène, et le 3-phellandrène sont les plus répandus.

Plusieurs diterpènes ont été isolés tant dans la colophane que dans différentes parties des pins. On retrouve principalement dans la littérature des diterpènes avec des squelettes de type abietane, pimarane, isopimarane et labdane . Structures des sesquiterpènes et de diterpènes chez le genre *Pinus*.

Les composés phénoliques retrouvés dans les pins sont très variés. Les lignans, qui sont dérivés des phénylpropanes, sont souvent présents en grande quantité. Ceux principalement rencontrés dans le bois de coeur, les noeuds et l'écorce sont le lariciresinol, Tisolariciresinol, le secoisolariciresinol et le (-)-nortrachelogenin (**Suga et al, 1993; Willför et al, 2003a; Willför et al, 2003b**). Le xylopyranoside de (+)-isolarisiresinol est un glycoside de lignan isolé dans un extrait au MeOH des aiguilles de *Pinus densiflora* (**Jung et al, 2003**). Les stilbènes constituent aussi des composés phénoliques majoritaires dans le bois interne de plusieurs pins. Certains agissent comme phytoalexin, c'est-à-dire que leur présence a été induite par un stress provenant d'une attaque fongique ou bactérienne. Les plus rencontrés dans le genre *Pinus* sont le pinosylvin , le pinosylvin monomethyl ether et le pinosylvin dimethyl ether. Ces derniers sont des constituants caractéristiques du bois interne du genre *Pinus* (**Rowe, 1989c**)

En terminant cette revue de littérature sur la composition chimique des pins, mentionnons l'identification d'une série d'alcaloïdes de type piperidine. Les premiers à être identifiés furent Pa-pipecoline et le (-) pinidine à partir des feuilles de *Pinus sabiniana* (**Tallent et al, 1955**). Plusieurs autres alcaloïdes de ce type ont ensuite été identifiés (**Tawara et al, 1993**) et **Stermitz et al.1994**, ont déterminé leur présence dans plusieurs espèces de pins.

III.3.5. Usage traditionnel

L'utilisation des extraits d'écorces de pin maritime comme source de bienfaits pour la santé humaine remonte à Hippocrate, le « Père de la Médecine », qui mentionnait leurs effets thérapeutiques sur les maladies inflammatoires (**Packer et al. 1999**). En Amérique, l'extrait d'écorces de pin maritime était utilisé par les Indiens natifs comme remède pour les plaies enflammées ou les ulcères (**Yougken, 1924; Chandler et al. 1979**). Plus tard, l'équipage de l'explorateur français Jacques Cartier a découvert, lors de l'hiver 1534, que la décoction d'écorces de pin maritime prévenait avec efficacité le scorbut causé par une carence en vitamine C (**Maimoona et al. 2011**).

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES

I.1. Matériels

I.1.1. Lieux d'étude

Pour cette étude, le matériel végétal a été récolté à plusieurs localités et acheminé sur la région de Constantine.

I.1.2. Espèces végétales étudiées

Le matériel végétal, utilisé est constitué des écorces de tronc de *Pinus pinaster*, des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* et des parties aériennes d'*Artémisia herba alba* obtenu à partir de plantes se développant dans leur habitat naturel ou auprès d'herboristes. Leur identification a été réalisée par un taxonomiste confirmé et les vouchers spécimens (N°AB04-xx) déposés dans l'herbier du laboratoire de botanique médicale et de pharmacognosie, du département de pharmacie de la faculté de médecine, Université Constantine 3.

Tableau 1 : Espèces végétales étudiées

Famille	Espèces végétales	Code	Nom commun et vernaculaire	Lieu de récolte	Voucher spécimen N°
Asteraceae	<i>Artemisia herba alba</i> Asso. Partie aérienne	AHA	Armoise blanche "shih"	Commune d'El Djazia – 15 km au nord de Meskiana (Oum el-Bouaghi)	AB04 – 103
Labiataeae	<i>Marrubium vulgare</i> L. Sommité fleurie	MVU	Marrube blanc "merriout"	Forêt de Chataba – 7 km au nord de Ain Smara (Constantine)	AB04 – 112
Pinaceae	<i>Pinus pinaster</i> L. Ecorce	PPI	Pin maritime "d"bagha	Djebel el-Ouahch (Constantine)	AB04 – 115

I.2. Méthodes et techniques

I.2.1. Méthode d'obtention des extraits totaux

I.2.1.1. Préparations des substances végétales

Les plantes séchées ont été pulvérisées tout juste avant l'extraction, en utilisant un broyeur à couteaux. L'extraction des poudres obtenues (30g) s'est faite par macération à froid dans une solution hydroalcoolique à 70% d'éthanol (1:5 ; v/v), agitée sur une plaque magnétique (700 tr/mn, pendant 30mn). Les solutions sont ensuite clarifiées par filtration sur papier Whatman, concentrées par évaporation d'alcool sous vide, puis lyophilisées pour fournir un extrait brut sec à consistance sec plus ou moins pulvérulent. Ces derniers sont conservés jusqu'à l'analyse à basse température (-10°C) (fig.15).

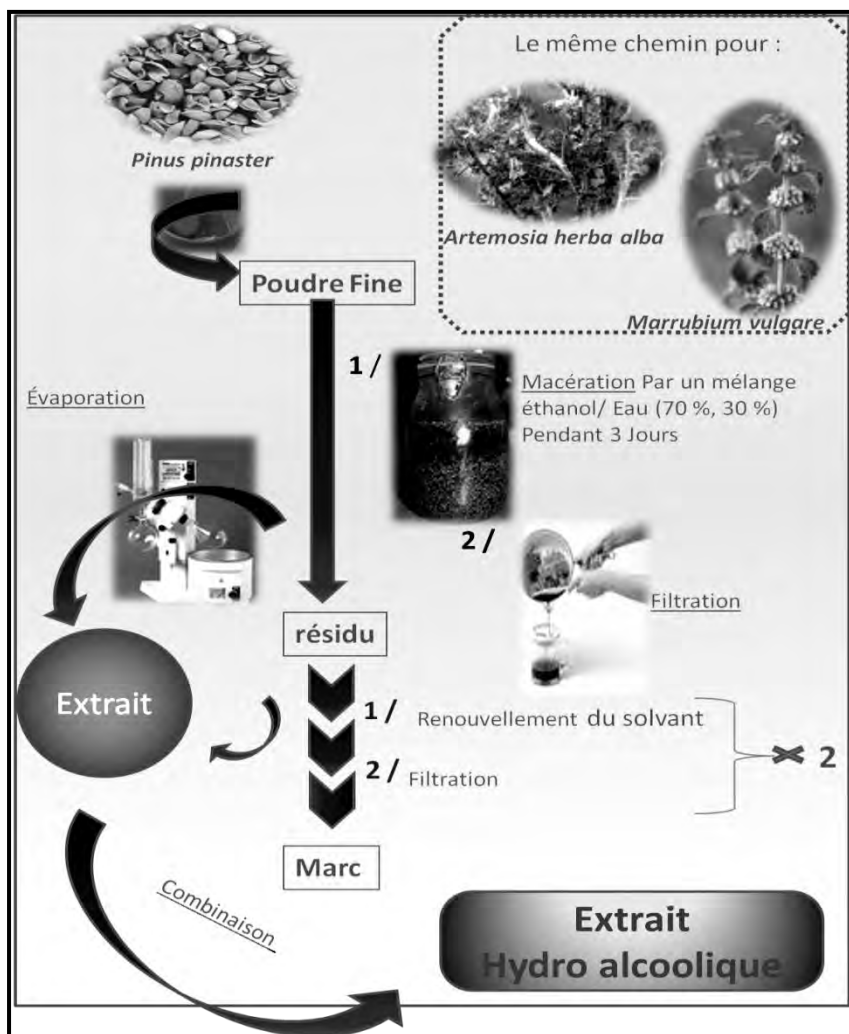


Figure 15 : Extraction des substances végétales

Les études phytochimiques et les activités biologiques des divers organes (partie aérienne de AHA, sommités fleuris de MUV et écorce de PPI) ont été réalisées dans le laboratoire d'obtention de substances thérapeutiques (LOST) de la faculté des sciences exactes, le laboratoire de biochimie micro-moléculaire et phytochimie de la faculté des sciences de la nature et de la vie, université de Constantine1, le laboratoire de microbiologie du CHU de Constantine et le laboratoire de génie microbiologique et applications université Constantine 1

I.3. Etude phytochimique des extraits

I.3.1. Analyse qualitative

Le criblage chimique préliminaire a été réalisé par des réactions chimiques en solution. Les essais de caractérisation en tube permettent une recherche grossière des composants chimiques; les résultats peuvent être difficilement interprétables. La chromatographie sur couche mince (CCM) et La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) confirment les tests en tube. Les métabolites secondaires des végétaux, dépassant actuellement 100 000 substances identifiées, appartiennent à trois classes principales

(Pichersky 2000; Dave Oomah 2003).

- les terpènes (un groupe de lipides),
- les composés phénoliques,
- les alcaloïdes.

On trouve des métabolites secondaires dans toutes les parties des plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles défensifs.

La recherche des groupes chimiques a été réalisée par des réactions en tubes.

Les résultats sont classés selon l'apparition en :

- Réaction positive : +
- Réaction négative : -

Les tests de détection des grands groupes de composés chimiques ont porté sur les extraits hydroalcooliques des parties aériennes de AHA, des sommités fleuris de MUV et de l'écorce de PPI.

I.3.1.1. Recherche des polyphénols

Les polyphénols sont des molécules synthétisées par les végétaux lors du métabolisme secondaire pour se défendre contre les agressions environnementales. Ils sont localisés dans différentes parties des plantes selon l'espèce végétale et le groupe polyphénolique considéré. Ces composés regroupent une multitude de molécules et représentent l'un des groupes les plus importants présents dans le règne végétal. **(Lebham, 2005)**.

► Détection des tannins

Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation **(Hemingway, 1992)**. Les tannoïdes (tannins hydrolysables) et les tannins vrais (tannins non hydrolysables ou condensés) sont des polymères de polyphénols.

Ces derniers ont été mis en évidence par la réaction au chlorure de fer à partir de 1 ml d'extrait placé dans un tube en présence de quelques gouttes de FeCl₃ (1% préparé au méthanol). Après agitation de l'extrait, la couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques **(Karumi et al, 2004)** (fig14).

► Détection des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules très répandues dans le règne végétal. Ils font partie de la classe des polyphénols, principaux métabolites secondaires des plantes.

La présence des flavonoïdes dans un extrait peut être mise en évidence par un test simple et rapide appelé " réaction de Shinoda" **(Lock et al, 2006)**. Le test consiste à ajouter à 2ml de l'extrait, quelques gouttes d'HCl concentré (2N) et environ 0,5g de magnésium métallique. Laisser agir 3 min et regarder le changement de couleur **(Malec et Pamelio 2003)** (fig14).

► Détection des coumarines

Les coumarines sont parmi les composés phénoliques les plus connus, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes **(Igor,2002)**.

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 ajouté à 1ml d'eau chaude.

Après agitation, le volume total est divisé en deux volumes, l'un sert de témoin et l'autre est ajouté à 0.5 ml de NH₄OH (10%) puis examiné sous lampe UV. L'émission de la fluorescence indique la présence des coumarines (Bruneton, 1999) (fig16).

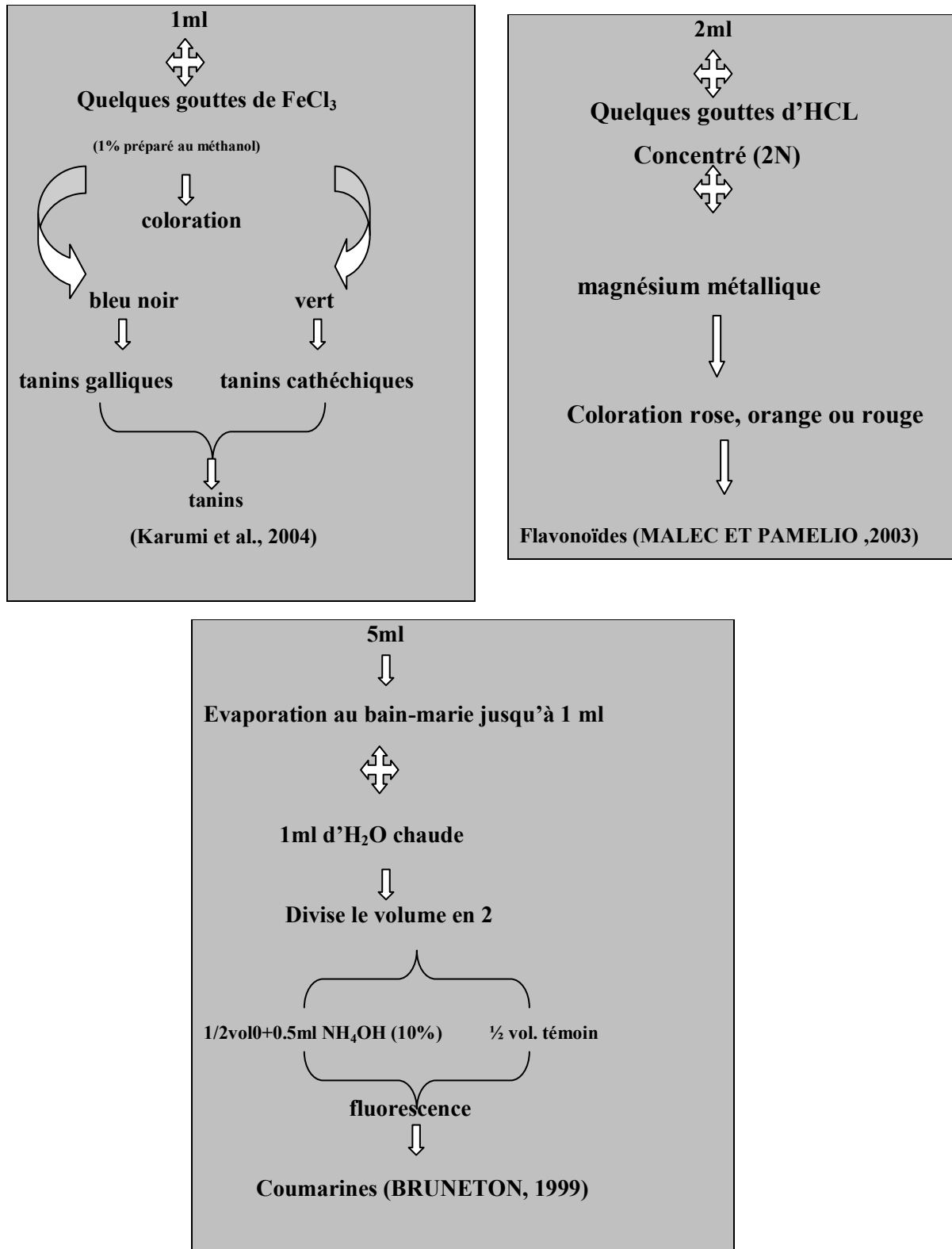


Figure 16 : Schéma des tests phytochimiques pour la détection des polyphénols

I.3.1.2. Détection des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe de composés azotés et faiblement basiques issus principalement des végétaux. Ils présentent des réactions communes de précipitation.

Les alcaloïdes ont été caractérisés à partir des réactifs de Mayer ou Wagner. 10 ml d'extrait sont évaporés jusqu'à l'obtention d'un volume de 0,2ml, sur lequel 1,5 ml de HCl à (2%) sont ajoutés. Après agitation de la solution acide, 1 à 2 gouttes du réactif de Mayer ou Wagner sont ajoutés. L'apparition d'un précipité blanc jaunâtre ou brun indique la présence d'alcaloïdes (Figure 17) (MOJAB *et al.* 2003 ; Gacem, 2011).

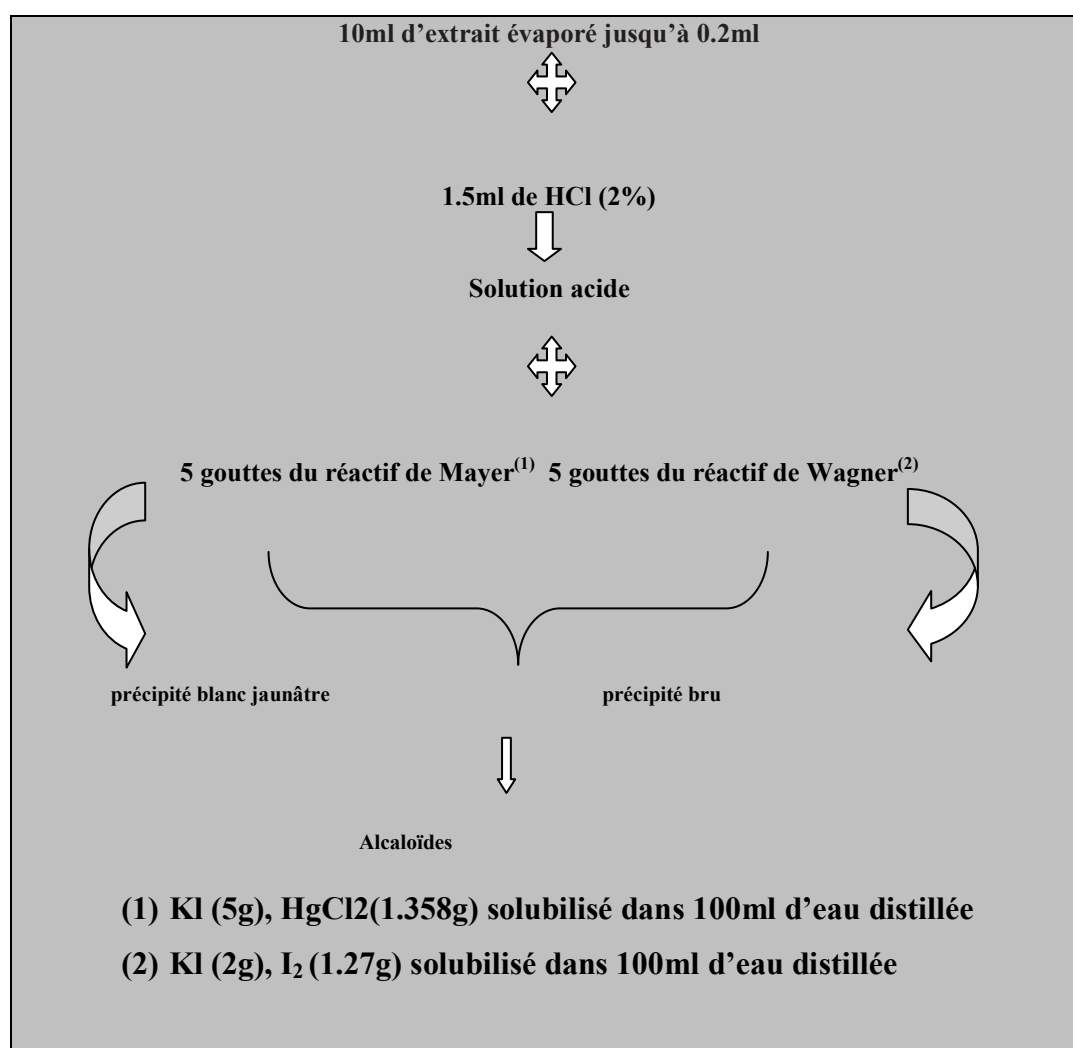


Figure 17 : schéma des tests phytochimiques pour la détection des alcaloïdes

I.3.1.3. Détection des terpènes

Les terpènes sont des molécules très volatiles fréquentes dans la nature, surtout dans les Plantes, ce sont les principaux constituants des huiles essentielles. Les terpènes sont issus du couplage d'au moins 2 sous-unités isopréniques à 5 carbones (**Bottin 2006**).

La mise en évidence des stérols et triterpènes est fondée sur la réaction de Lieberman-Burchard. Les extraits des trois variétés sont additionné chacun de 0.5ml d'anhydride acétique puis de 0.5ml de chloroforme, après dissolution, les solutions sont transférées dans des tubes à essai auxquels sont ajoutés 1ml d'acide sulfurique concentré. La réaction est effectuée à froid.

La formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet, avec coloration de la couche surnageante de vert ou de violet, traduit la présence de stérols et de triterpènes (**Bruneton, 1999**) (fig18)

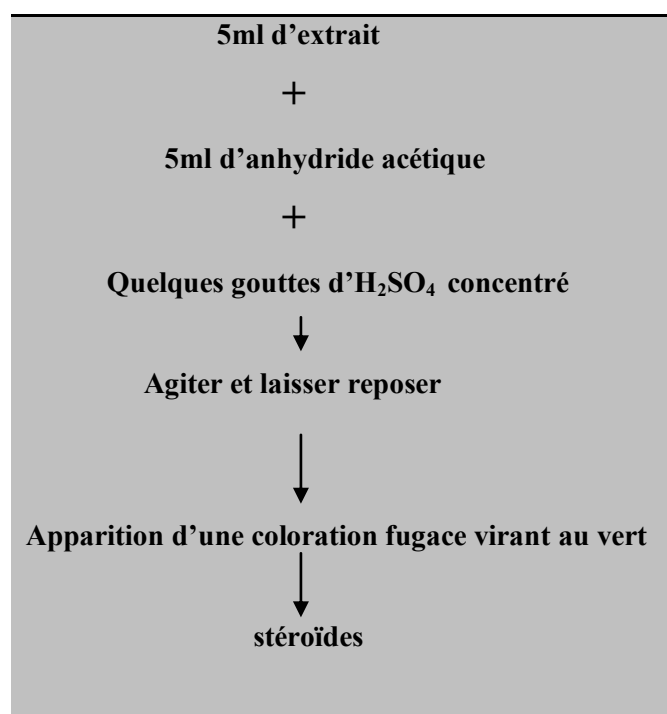


Figure 18 : schéma des tests phytochimiques pour la détection des stéroïdes (**Bruneton, 1999**)

I.3.1.4. Détection des saponines

Les saponines sont des glycosides contenus dans les plantes qui doivent leur nom au fait qu'elles moussent lorsqu'on les mélange avec l'eau (**Hans, 2007**).

Pour la détection des saponines, 10 ml d'extrait placé dans un tube à essais sont agités pendant 15 secondes puis déposés durant 15 minutes. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides (**Koffi et al, 2009**).

I.4. Le fractionnement

La méthode d'extraction utilisée a été faite d'après **Merghem 1995**. Cette méthode permet l'extraction des composés polyphénoliques, en particulier les flavonoïdes. Cette méthode a été utilisée parce que les analyses phytochimiques antérieures avaient montré la présence de ces composés dans les plantes et aussi pour leurs nombreuses propriétés.

Le fractionnement de l'extrait hydroalcoolique a été mené en utilisant successivement des solvants organiques à polarité croissante : l'éther de pétrole, l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle et le 1. Butanol pour en avoir quatre fractions : la fraction éther diéthylique (**ED**), acétate d'éthyle (**AE**), la fraction 1. butanolique (**1.B**) et la fraction aqueuse (**AQ**).

I.4.1. Préparation des extraits pour l'affrontement

A partir de nos extraits à tester, 2g ont été dilués dans 100 ml d'eau distillée dans un bain marie. Cette phase aqueuse contenant les phytoconstituants totaux est laissée au repos pendant une nuit dans une éprouvette graduée (décantation des impuretés et poussières). Cette étape permet de séparer les polyphénols selon leur structure et leur degré de polymérisation; en les affrontant avec plusieurs solvants spécifiques allant du moins polaire au plus polaire.

I.4.2. Extraction par les solvants organiques à polarité croissante

L'extraction est effectuée par épuisement successive du matériel végétal, en utilisant des solvants à polarité croissante méthode décrite par (**Biallo et al. 2004**).

► Etape 1 : extraction à l'éther de pétrole

Dans une ampoule à décanter on introduit 100ml de la solution aqueuse et on ajoute 100ml d'éther de pétrole. On remue énergiquement avec précaution. L'éther de pétrole solubilise tous les constituants lipophiles, la chlorophylle ainsi que les composés indésirables.

La phase éther de pétrole (phase supérieure de l'ampoule à décanter) est éliminée. Cette opération est répétée 2 à 3 fois

La phase eau (phase inférieure de l'ampoule à décanter) est récupérée dans un bécher propre.

Cette phase sera soumise à une extraction sélective par l'éther diéthylique et ensuite par l'acétate d'éthyle, ensuite par le 1-butanol. Ces trois solvants organiques sont spécifiques des composés phénoliques et des flavonoïdes.

► **Etape 2 : extraction à l'éther diéthylique**

Dans une ampoule à décanter 100ml de la phase eau sont mélangé à 100ml d'éther diéthylique, on agite énergiquement avec précaution et on laisse reposer jusqu'à la formation de 2 phases : une supérieure appelée phase éther et une inférieure appelée phase eau (2 répétitions), cette dernière est récupérée dans un bécher et la phase éther est laissée à évaporation à l'air libre sur une source chaude afin d'accélérer l'évaporation. Les molécules sont ensuite récupérées par 3ml de Méthanol dans des tubes en verre.

L'affrontement avec l'éther diéthylique permet pour les extraits éthanoliques d'isoler (de soutirer) les composés phénoliques simples tels que les acides phénols et les flavones lipophiles. Pour les extraits acétoniques, cette phase soutire les tannins monomériques.

► **Etape 3 : extraction à l'acétate d'éthyle**

L'affrontement avec l'acétate d'éthyle entraîne les aglycones, les mono-Oglycosides et partiellement les di-O-glycosides présents dans les extraits éthanoliques. Et les tannins dimériques des extraits acétoniques.

► **Etape 4 : extraction au 1. Butanol**

Cette étape n'est faite que pour les extraits acétoniques, permettant ainsi d'entraîner les tannins trimériques, oligomériques et une partie des polymériques (2 répétitions)

Pour chaque solvant (chaque partition), on refait deux à trois fois cette opération pour un entraînement optimal des groupes polyphénoliques séparés.

Les phases éther de pétrole ne renfermant pas de composés phénoliques sont rejetées. Quant aux autres phases, elles sont évaporées à sec à l'aide de l'évaporateur rotatif et reprises dans du méthanol (4 à 5ml) pour le diagnostic chromatographique. (figure 19)

Les extraits méthanoliques ont été soumis à divers tests phytochimiques (chromatographie sur couche mince, spectrophotométrie UV-Visible et chromatographie en phase liquide à haute performance) en vue de mettre en évidence les métabolites secondaires responsables de la plupart des activités biologiques de chaque espèce végétale. Ces essais ont été menés selon les techniques décrites par (**Farnsworth 1966 ; Harbone 1973 ; Rizk 1982 ; Al-Yahya 1986**).

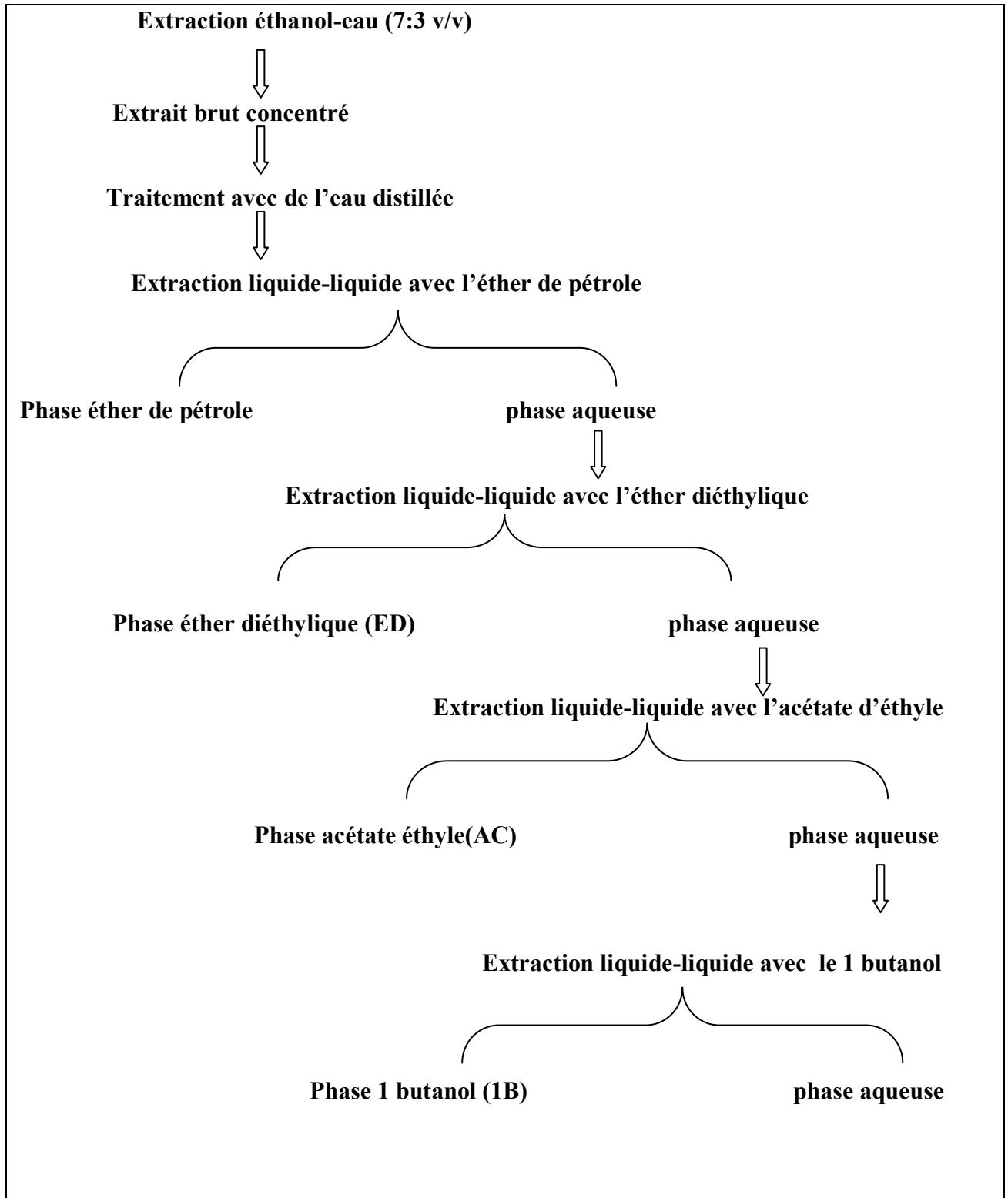


figure 19 : Etapes d'extraction liquide-liquide (Merghem R, 1995)

I.5. La spectrophotométrie UV-Visible

C'est la méthode la plus importante pour l'identification des structures flavonoïques. Elle est basée essentiellement sur l'enregistrement d'un spectre dans un milieu alcoolique (méthanol ou éthanol) qui sera caractérisé par deux bandes d'absorption principales, la bande I et la bande II (**Jurd and Horowitz 1962**).

Ces deux bandes représentent les absorptions dans le proche UV, des chromophores composant le squelette flavonoïque. Ainsi, la bande I présentant un maximum d'absorption entre 300 et 400 nm, est attribuée à l'absorption du système cinnamoyle qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison (C2-C3) et le noyau B, elle donne donc, des renseignements sur les variations structurales du cycle B et l'hétérocycle C (fig20).

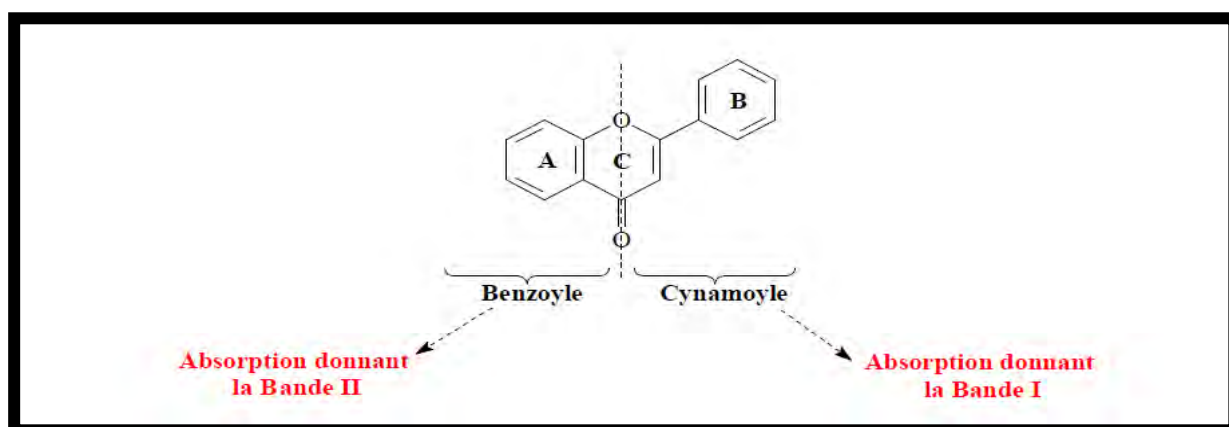


Figure 20 : Conjugaison du groupement carbonyle avec les cycles A et B.

La bande II, présentant un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm, est attribuée à l'absorption du système benzoyle qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A et donne des informations sur les variations structurales du cycle A (**Markham 1982**).

Le maximum d'absorption d'une telle ou telle bande dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles ou méthoxyles sur le squelette flavonoïque.

L'augmentation du nombre de groupements hydroxyles fait déplacer le maximum d'absorption vers des longueurs d'ondes plus élevées, par contre la substitution des groupements hydroxyles par des groupements méthoxyles ou glycosyles fait déplacer ce maximum vers des longueurs d'ondes plus courtes (**Markham and Mabry 1968**).

Le tableau donne l'intervalle du maximum d'absorption des deux bandes en milieu méthanolique pour quelques types de flavonoïdes.

Tableau2 : Les principales caractéristiques des spectres UV-visible des flavonoïdes

Bande II (nm)	Bande I (nm)	Types de flavonoïdes
250-280	304-350	Flavones
250-280	352-385	Flavonols
250-280	328-357	Flavonols substitué en 3
275-295	300-330	Flavanones et dihydroflavanol
270-280		Flavanols
230-270	340-390	Chalcone
230-270	380-430	Aurone
270-280	465-560	Anthocyane
245-275	310-330	Isoflavone

Plusieurs facteurs peuvent affecter le spectre d'absorption des flavonoïdes. L'augmentation du nombre d'hydroxyles sur la partie aglycone provoque un déplacement bathochrome des bandes d'absorption vers de plus grandes valeurs Tableau3.

En absence d'hydroxyle en position 3, cas des flavones, la longueur d'onde de la bande I est plus courte de 20 à 30 nm. La méthylation comme la glycosylation, en particulier sur les hydroxyles en position 3, 5, 7, 4', provoquent un déplacement hypsochrome vers les longueurs d'ondes plus courtes (Figure 20). Toutefois, la nature du sucre n'a généralement pas d'effet.

Tableau 3 : Relation entre l'arrangement des groupements hydroxyles et le maximum d'absorption (Rice-Evans et al. 1996)

Flavonoïdes	Arrangement du OH	Position des bandes
Flavonols		
Kaempferol	3, 5, 7, 4'	367 nm
Quercétine	3, 5, 7, 3', 4'	371 nm
Myricétine	3, 5, 7, 3', 4', 5'	374nm
Flavones		
Chrysin	5, 7	313nm
Apéginine	5, 7, 4'	337nm
Flavanones		
Naringinine	5, 7, 4'	289 (326sh) nm
Taxifolin	3, 5, 7, 3', 4'	29027sh) nm

I.6. Essais de caractérisation par chromatographie sur couche mince (CCM)

Pour les analyses de routine par CCM, nous utilisons généralement des plaques de Silicagel® 60 F254 prêtes à l'emploi à support en aluminium (Merck). Celles-ci sont développées dans des cuves en verre conventionnelles, dont l'atmosphère a été préalablement saturée en vapeurs de phase mobile.

Du fait de ses faibles contraintes techniques, de son emploi simple et de son coût relativement modeste, la CCM est un outil de choix pour l'analyse phytochimique de routine d'extraits bruts, de fractions, ainsi que de produits purs isolés lorsque les conditions opératoires sont bien déterminées (**Bataille 2000**).

Elle permet de suivre l'évolution d'une réaction et de tester la pureté d'un solvant (**Delmeyda 2001**).

I.6.1. Principe de la chromatographie sur couche mince (CCM)

Cette méthode repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile (**Ekoumou 2003, Debete 2005**) qui est en générale un mélange de solvant; adapté au type de séparation recherché (**Ferrari 2002**), et leur affinité vis-à-vis de la phase stationnaire qui peut être un gel de polyamide ou de silice. Elle nous permet d'avoir les empreintes du contenu polyphénolique et flavonoïque de l'extrait.

La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur des plaques pré-étalées de gel de silice et sur des plaques de polyamide (DC6).

► Phase stationnaire

- **Gel de polyamide :**

Plaques en verre de gel de polyamide DC6 préparées dans le laboratoire. Le gel est préparé en mélangeant 10g de poudre de polyamide dans 50ml d'éthanol. Après étalement du gel sur les plaques en verre et séchage, la phase stationnaire devient prête à l'utilisation (**Merghem, 1995**).

- **Plaques de silice**

Les analyses sont effectuées en phase normale, avec des plaques de silice (Silicagel 60 F₂₅₄, de 0,25 mm d'épaisseur) déposées sur feuille d'aluminium. Sur les plaques préparées, on a déposé 10µl de chaque extrait (100 mg/ml) et les plaques sont ensuite introduites dans des cuves conventionnelles en verre préalablement saturée par la phase mobile, qui peut être généralement un mélange binaire ou ternaire de solvants, selon le type de séparation recherchée (**Biallo et al. 2004**).

► Phase mobile : On essaie plusieurs systèmes solvants et on choisit ceux qui donnent les meilleures séparations (migrations).

► Extraits : Phase éther diéthylique, phase acétate d'éthyle et la phase 1-butanol des trois plantes étudiées (les parties aériennes de AHA, les sommités fleuris de MUV et l'écorce de PPI).

I.6.2. Le dépôt

Le dépôt se fait linéairement de façon ponctuelle avec un capillaire (pipette capillaire) à usage unique (un capillaire pour chaque phase). Le capillaire doit être posé perpendiculairement et prudemment sur la plaque pour ne pas gratter le gel. On fait plusieurs dépôts du même échantillon au même endroit pour obtenir les produits séparés en grande quantité (ceci est nécessaire surtout lors de la CCM préparative). Il faut sécher après chaque dépôt (Sine, 2003) (fig21).

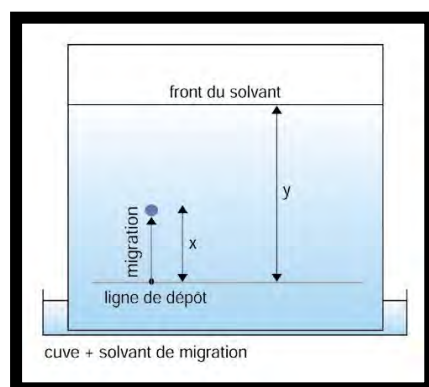


Figure 21 : le dépôt

I.6.3. Développement des plaques

Les différents constituants de l'échantillon déposés migrent avec des vitesses différentes. Dans le cas idéal, on obtient autant de tâches que les constituants sur le trajet de migration du solvant (fig22).

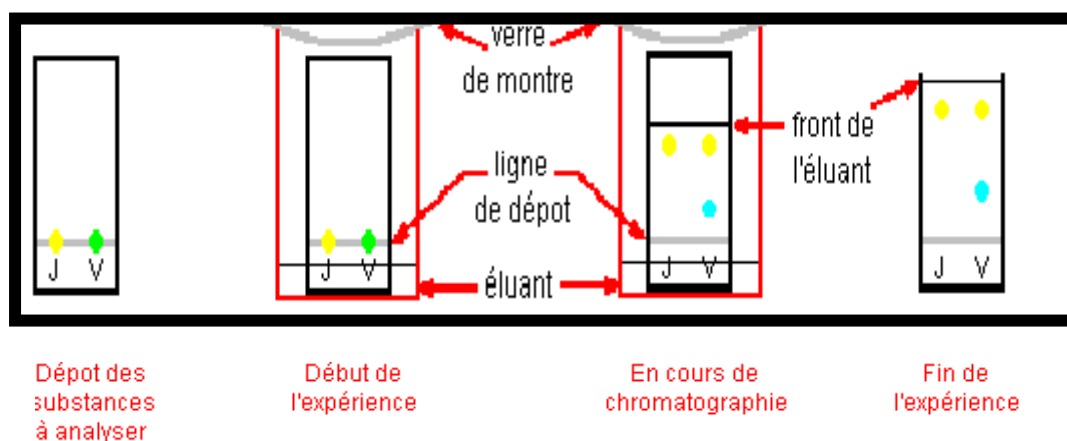


Figure 22 : Développement des plaques

I.6.4. Révélation (Visualisation des tâches)

Après développement et l'évaporation du solvant de migration les tâches sont visualisées : (Merghem 1995).

- A l'œil nu.
- Sous l'UV à 254nm.
- Sous l'UV à 365nm.

I.6.5. Révélation par des méthodes chimiques

Ces méthodes consistent à mettre en contact de la plaque un réactif plus ou moins spécifique qui donne un produit coloré par réaction chimique avec les substances à révéler (**Latifou, 2005**).

I.6.5.1. Identification des flavonoïdes : pulvérisation du Réactif de Neu

Le Réactif de NEU : NP/PEG

Ce réactif est préparé à partir de deux solutions : une solution méthanolique de diphenylboryloxyéthylamine (solution I) et une solution éthanolique de polyéthylène glycol à 5% (solution II). Pour préparer ces deux solutions, on dissout 1,5 g de diphenylboryloxyéthylamine et 2,5 g de polyéthylène glycol, respectivement dans 50 ml de méthanol et 50 ml d'éthanol. Les deux solutions sont conservées à 4°C.

La réaction est positive lorsqu'on observe une fluorescence en UV à 365 nm après pulvérisation des deux réactifs. Cette fluorescence est due à la formation d'un complexe entre le groupement hydroxyl-flavones avec le réactif.

Le test se déroule en plusieurs étapes :

- On chauffe le chromatogramme pendant 10 minutes à 80°C puis on laisse refroidir
- La solution I est ensuite pulvérisée sur le chromatogramme
- Après séchage, on visualise les tâches à la lumière UV (365 nm)
- Après 15 minutes, on pulvérise la solution II

Après pulvérisation des deux solutions, d'intenses fluorescences se produisent immédiatement ou après 15 minutes à la lumière UV (365 nm). La solution II permet d'augmenter l'intensité de la fluorescence.

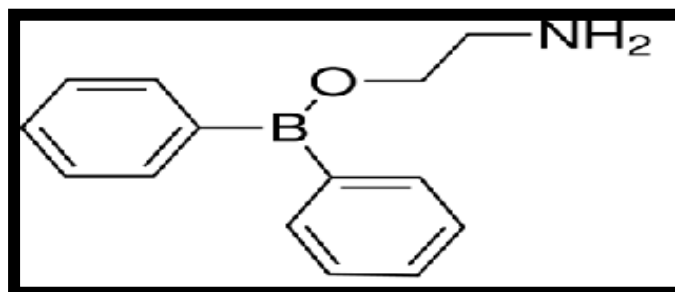


Figure 23: Structure de 2-aminoéthyl diphényl borate (réactif de Neu)

• **Mode opératoire :**

Vaporiser une solution méthanolique du réactif de Neu 1% sur les plaques de CCM. Les flavonoïdes apparaissent sous forme de tâches fluorescentes. Selon la couleur obtenue nous avons identifié le type de flavonoïde (Stahl 1981) :

- Les dérivés d'apéginine présentent une couleur fluorescente sous UV **jaune-verdâtre** et après 24 heures, leurs couleurs à la lumière visible virent au **rouge-brun**.
- Les dérivés de lutéoline présentent une couleur fluorescente sous UV **jaune**.
- Les dérivés de kaempférol présentent une florescente sous UV **jaune verdâtre plus intense** que celles des dérivés d'apéginine.
- Les dérivés de quercétol présentent une couleur fluorescente sous UV **orange intense**.

I.6.5.2. Identification des stérols et triterpènes : pulvérisation du réactif de Liebermann

La réaction de Liebermann-Burchard est une réaction chimique principalement utilisée comme test révélateur du cholestérol et plus généralement des phénols. Elle a été décrite initialement par Carl Liebermann (Liebermann 1885) puis appliquée à la révélation du cholestérol par Burchard (Burchard 1890, Burke 1974).

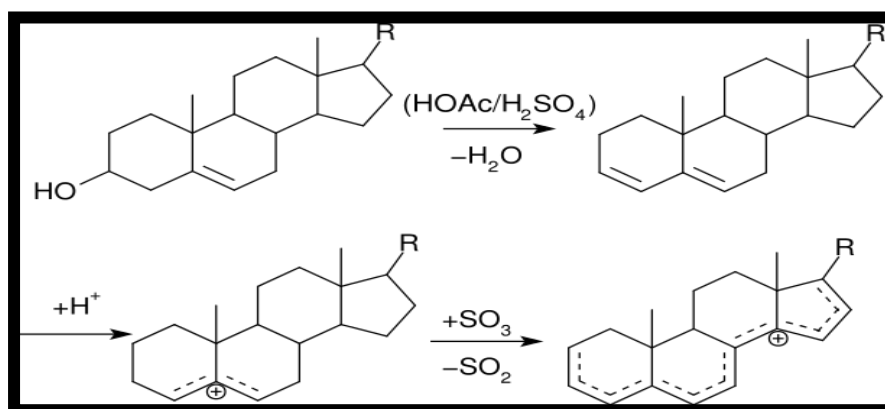


Figure 24 : Réactifs : acide sulfurique + anhydride acétique

On ajoute quelques gouttes d'anhydride acétique à la solution de la substance dans le chloroforme; ensuite on introduit une couche d'acide sulfurique concentré

- La solution dans le chloroforme se colore en rouge intense, puis violet, en bleu et prend finalement une coloration vert foncé.
- Cette coloration évolue rapidement avec le temps ce qui rend plus difficile encore la définition de coloration spécifique.

I.6.5.3. Identification des tanins : pulvérisation du réactif du FeCl₃

Après développement, les plaques CCM sont séchées, observées sous lampe UV à 254 nm et 366 nm, pulvérisées par le réactif FeCl₃, puis séchées à 80°C pendant 5 minutes afin de révéler les spots issus de la séparation.

I.6.6. Applications

Parmi les multiples applications que possède la CCM, on s'intéresse dans cette étude à celles qualitatives.

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par sa fluorescence sous UV et par son R_f (le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile c'est à dire le front du solvant) qui est compris entre 0 et 1.

$$R_f = \frac{\text{Distance entre la ligne de base et la tâche du produit}}{\text{Distance entre la ligne de base et le front de solvant}}$$

► **Relation : structure – Rf :**

Les relations existant entre le Rf (rapport frontal ou facteur de rétention) et la structure des molécules apportaient aussi des renseignements sur la structure des polyphénols séparés par CCM. Le comportement chromatographique en fonction de la composition moléculaire dans un solvant alcoolique ou aqueux permettait de mentionner les premières indications concernant la substitution de la molécule tableau 4.

Tableau4 : Relation entre le Rf et la structure des flavonoïdes

Structure flavonique	Rf
Augmentation des (OH)	Diminution du Rf
Méthylation des groupements (OH)	Augmentation des valeurs de Rf
Acétylation	Augmentation des valeurs de Rf
Glycosylation	Diminution des valeurs de Rf due principalement de l'introduction de nouveaux groupements (OH)

► **Relation : structure – fluorescence**

L'examen sous lumière UV fournit des informations très importantes sur la configuration structurale des molécules isolées. Il apporte des indications particulières concernant les substitutions.

Le tableau5 suivant résume les relations existantes entre la structure d'un composé flavonoïque et sa fluorescence sous UV.

Tableau5 : Relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes

Spot coloré	Types de flavonoïdes
Noir	Flavonols 5, 6, 7, tri OH libres Flavonols 5, 7, 8, tri OH libres
Brun noir	3-OH absent ou 3-OH substitué
Violet	Flavones 5-OH et 4' OH Flavones 3-OR et 5 OH ,4'-OH Flavones 6 ou 8 OH Chalcones Dihydroflavonols Isoflavones Flavanones
Bleu claire (fluorescent)	Flavones sans 5-OH libre Flavonols sans 5-OH libre avec 3 OH Substitué
Jaune terne Jaune Fluorescence orangée	Flavonols 3- OH libre avec ou sans 5-OH Libre
Jaune vert brillant	5 OH libre ou 5 OH substitué
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3OH libres Aurones Chalcone Flavanones
Jaune pâle	Dihydroflavonols

I.7. Essai de caractérisation par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La technique de séparation la plus appréciée en analyse phytochimique est la chromatographie liquide à haute performance, abrégée HPLC (CLHP en français). Les principes de base permettant de séparer des produits d'un mélange sont les mêmes que ceux décrits dans le cas de la CCM. L'immense avantage de la HPLC par rapport à la chromatographie sur couche mince réside dans l'amélioration sensible des paramètres de seuil de détection et de résolution de séparation, ainsi que dans les possibilités d'automatisation du procédé.

Ce type de détection est d'un apport considérable dans la caractérisation des pics sur un chromatogramme HPLC/UV, car il permet de visualiser le spectre UV de chaque constituant. Ainsi, certaines classes de métabolites secondaires de plantes (flavonoïdes, xanthones) ayant un spectre UV caractéristique peuvent être mises en évidence par une simple analyse HPLC/DAD-UV (Braithwaite et Smith 1999).

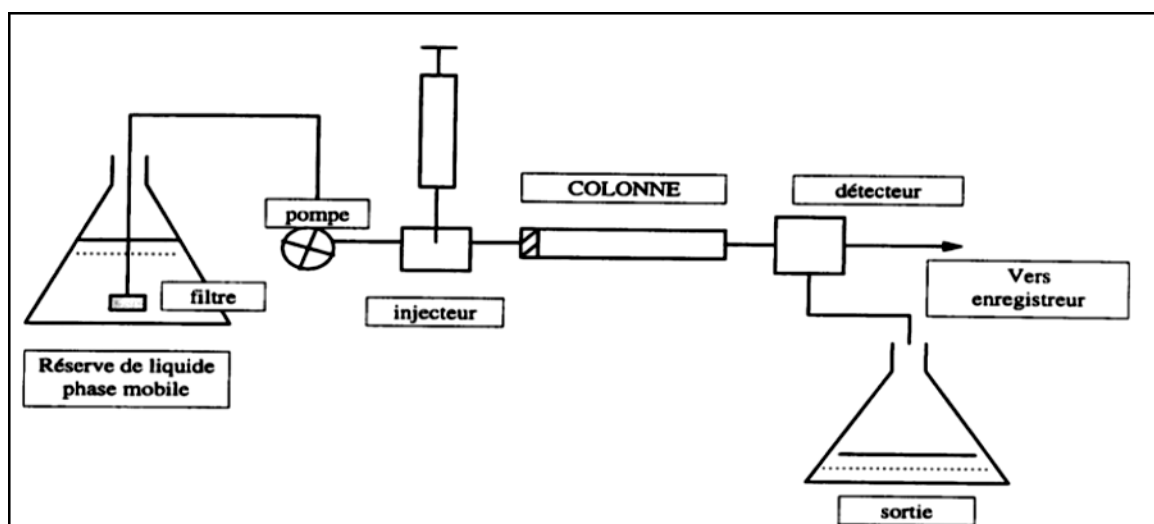


Figure25 : Principe de fonctionnement de l'appareil HPLC

Chapitre II RESULTATS ET DISCUSSION

II.1. Extraction

La préparation des extraits à partir des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* (MUV), de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI) et des parties aériennes d' *Artemisia herba alba* (AHA) été effectuée en deux grandes étapes, la première est une extraction par un mélange hydroalcoolique éthanol/eau (7/3 V/V) pour obtenir initialement l'extrait brut contenant les polyphénols totaux. La deuxième étape de fractionnement a été réalisée par une série de solvants à polarité croissante Acétate d'éthyle, éther diéthylique et le 1 butanol permettant ainsi de séparer les composés de l'extrait brut selon leur degré de solubilité dans les solvants d'extraction et donc selon leur degré de glycosylation (flavonoïdes aglycones, mono, di et tri-glycosylés) (Merghem 1995). De ce fait, quatre différents extraits ont été obtenus successivement: l'extrait brut (Br), l'extrait d'acétate d'éthyle (AE), l'extrait d'éther diéthylique (ED) et l'extrait de 1 butanol (1B). Une partie de ces échantillons est consacrée à la caractérisation, aux épreuves chromatographiques (CCM et HPLC) et à l'étude spectrale. L'autre partie est consacrée aux analyses antibactériennes.

La préparation des échantillons est d'une importance capitale pour toute analyse fiable. De nombreuses méthodes de préparation des échantillons ont été développées pour déterminer les composés phénoliques. Les procédures de préparation des échantillons pour l'analyse des composés phénoliques varient beaucoup en fonction de la nature des composés à analyser. Celles-ci doivent tenir compte de nombreux paramètres parmi lesquels: la polarité, l'acidité des molécules, le nombre de groupements hydroxyles et de noyaux aromatiques. Les méthodes de dosage les plus couramment décrites comprennent plusieurs étapes de préparation d'échantillons. Chacune d'elle a pour but d'augmenter la sensibilité et la sélectivité du dosage. Malheureusement, les différentes étapes peuvent parfois introduire des interférences qui créent des artefacts, ce qui n'est pas sans conséquence sur la reproductibilité du dosage et nécessite de faire la moyenne de plusieurs essais. Il est donc important de contrôler toute la préparation et d'évaluer l'influence de ces effets sur l'analyse des résultats. En général, les échantillons solides sont soumis à un broyage et à un tamisage, souvent précédés par une étape de séchage à l'air libre du matériel végétal à analyser. Les échantillons liquides sont centrifugés et filtrés.

II.2. Caractérisation des principaux constituants chimiques

La phytochimie qualitative basée sur des réactions colorées ou de précipitation par des réactifs chimiques spécifiques réalisée sur les extraits reconstitués à partir de la poudre lyophilisée de chaque échantillon végétal génère pour une première estimation des données préliminaires sur les constituants des extraits. Le résultat de ce criblage phytochimique est résumé dans le Tableau 6. Le signe “+” traduit la présence du groupe de composés chimiques en quantité supérieure au seuil de détection, et le signe “-” une réaction négative. Il révèle la présence ou l’absence d’un groupe de métabolite secondaire.

Notre étude nous a permis d’identifier les différents groupes chimiques présents dans les écorces de PPI, des sommités fleuries de MUV et des parties aériennes de AHA à travers des réactions de caractérisation qui ont été confirmées par la chromatographie sur couche mince,

Effectivement trois groupes de composés bioactifs sont identifiés dans tous les extraits stérols et triterpènes, flavonoïdes et tannins, alors que *Marrubium vulgare* et *Artemisia herba alba* sont dépourvus de coumarines et saponines. En revanche, les alcaloïdes sont révélés uniquement dans l’extrait de *Pinus pinaster*.

Tableau6 : Résultat de la phytochimie qualitative des extraits hydroalcooliques des différentes espèces végétales

	<i>Marrubium vulgare</i>	<i>Pinus pinaster</i>	<i>Artemesia herba alba</i>
Tanins	+	+	+
Sterol et Terpenoides	+	+	+
Coumarines	-	+	+
Flavonoides	+	+	+
alcaloïdes	-	+	-
Saponines	+	+	-

+ : présence - : absence

Bien entendu, les tests de caractérisation présentent des imprécisions car ils sont basés sur l'analyse qualitative. La composition chimique des extraits varie selon les organes et suivant les espèces. Toute fois, ce screening phytochimique ne renseigne point sur la nature des molécules chimiques.

Des études chimiques sur les espèces d'*Artémisia* indiquent que toutes les classes de composés sont présentes dans le genre avec une référence particulière aux terpènes et flavonoïdes selon **Wright 2002**. Nous y avons décelé la non présence de saponines et des alcaloïdes. En revanche **Sellami et al 2010** confirment la présence des alcaloïdes.

Les molécules identifiées dans AHA sont les sesquiterpènes lactones, les coumarines et les hydrocarbures acétyléniques (**Da Silva J. A 2004**).

La non concordance des résultats serait due probablement au choix du solvant et au mode d'extraction.

Les alcaloïdes sont révélés uniquement dans les extraits bruts de *PPI*. **Stermitz et al. 1994** ont déterminé leur présence dans plusieurs espèces de pins. Identification d'une série d'alcaloïdes par **Tawara et al. 1993**.

Les travaux de **Romani et al. 2006** ont permis de retrouver les principaux tanins dans les pins, surtout étudiés à partir du pin maritime (*Pinus maritima* L.), ce sont des oligomères de deux à sept unités de flavan-3-ol. Les plus fréquemment retrouvés sont les procyanidines, c'est-à-dire des oligomères de catéchine ou d'epicatéchine.

Une très grande variété de terpènes a été identifiée dans le genre *Pinus* (**Tsitsimpikou et al. 2001 ; Yu et al. 2004; Hong et al. 2004; Ka et al. 2005**).

Les principaux tanins retrouvés dans les pins, surtout étudiés à partir du pin maritime (*Pinus maritima* L.), sont des oligomères de deux à sept unités de flavan-3-ol. Les plus fréquemment retrouvés sont les procyanidines, c'est-à-dire des oligomères de catéchine ou d'epicatéchine (**Romani et al. 2006**).

Les composés phénoliques retrouvés dans les pins sont très variés (**Suga et al, 1993; Willför et al, 2003a; Willför et al, 2003b**).

Nos résultats de l'analyse phytochimique de *marrubium vulgare* sur la présence de flavonoides concordent avec ceux de **Elberry et al 2011**.

Une recherche faite sur l'espèce *Marrubium vulgare* a permis de révéler la présence des diterpènes et les phenyléthanoides glucosidiques (**Ahmad 2010**).

Des études phytochimiques ont indiqué que de nombreux espèces de *Marrubium* incluent la présence des flavonoïdes et phenylethanoides, diterpénoïdes, de composés phénoliques et huile essentielle (Hennebelle *et al.* 2007; Rigano *et al.* 2007).

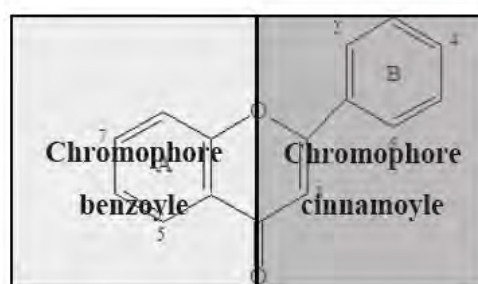
Les polyphénols (phénols totaux, flavonoïdes, tannins condensés et hydrolysables) ont été quantifiés dans différents organes de *Marrubium vulgare* du mont de Tessala (Algérie occidentale) ce qui se rapportent avec nos travaux (Bouterfa 2013).

Les études phytochimiques effectuées sur le genre *Marrubium* ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les iridiodes, les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes (Ashkenazy, D 1983).

Selon Moussaid 2012 que Les tests phytochimiques préliminaires effectués sur *Marrubium vulgare* étaient de type qualitatif. Il a été observé la présence dans les extraits des alcaloïdes, des tanins, des flavonoïdes, des stéroïdes, des saponines triterpènes et composés réducteurs.

II.3. Spectrophotométrie

L'action des flavonoïdes dans les plantes résulte de leur forte absorption dans le domaine UV du spectre. Les spectres UV des flavonoïdes exhibent deux bandes d'absorption principales dans la région 240-400 nm. La bande I (300- 395 nm) est considérée comme étant associée à l'absorption de la partie cinnamoyle (noyau B) du flavonoïde et la bande II (240- 280 nm) à celle de la partie benzoyle comme l'indique le schéma suivant :

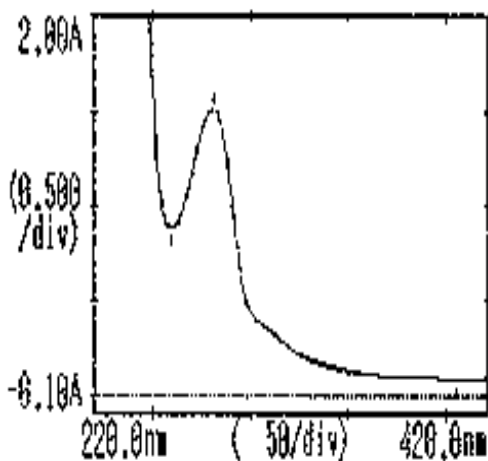


Les intensités de ces bandes dépendent du degré de conjugaison de la structure. En dehors des bandes d'absorption des différents chromophores présents dans les flavonoïdes, ce spectre nous renseigne aussi sur le type de squelette des flavonoïdes et sur la position des groupements hydroxyles.

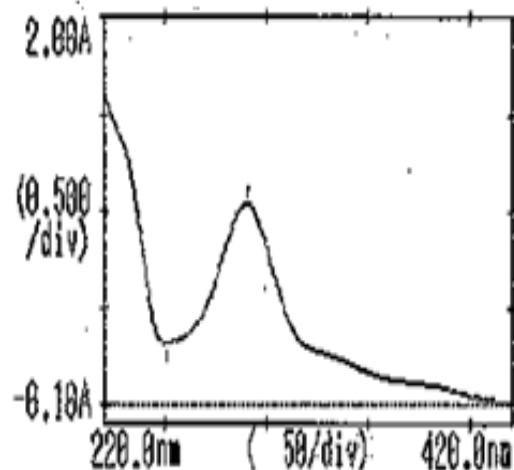
Tableau 7: Différentes bandes d'absorption des phases obtenue des extraits de PPI et AHA réalisés dans le méthanol.

Les espèces Végétales	Nature des phases	Bande I (λ_{\max} en nm)	Bande II (λ_{\max} en nm)
PPI	Ether diéthylique	-	290
	Acétate d'éthyle	-	284
	1-butanol	-	281
	Eau	-	281
AHA	Ether diéthylique	330	277
	Acétate d'éthyle	328	-
	1-butanol	327	-
	Eau	324	287

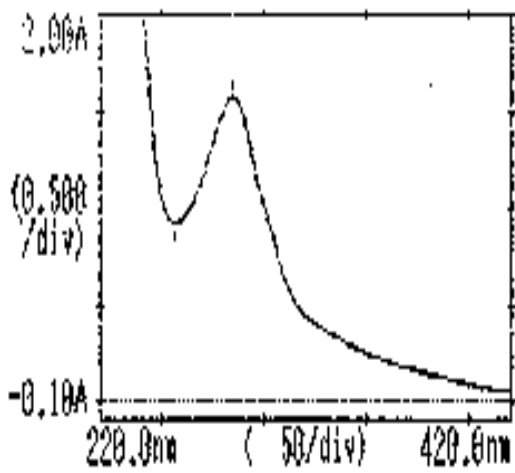
Les spectres UV des quatre phases d'extrait de PPI : Ether diéthylique, Acétate d'éthyle, 1-butanol et Eau, possèdent tous une seule bande d'absorption centrée vers 275-300 nm, sont respectivement 290 nm, 284 nm 281nm 280 nm et 281 nm (Fig26). Il est reconnu que la plupart des flavones et flavonol possèdent deux bandes d'absorption dans la région ultraviolet/visible : la Bande I entre 230 nm et 385 nm représentant la conjugaison entre les cycles B et C, et la Bande II allant de 240 nm jusqu' à 280 nm représentant la conjugaison entre les cycles A et C. Pour les longueurs d'onde d'absorption des quatre phases d'extrait de PPI la présence d'une seule bande d'absorption rend la caractérisation de type des flavonoïdes un peu difficile, donc selon nos donnés on peut avancer la prédominance des flavonoïdes de nature **Flavonol**, **Flavone**, **Flavanone**, **Flavanol** ou **Anthocyane**.



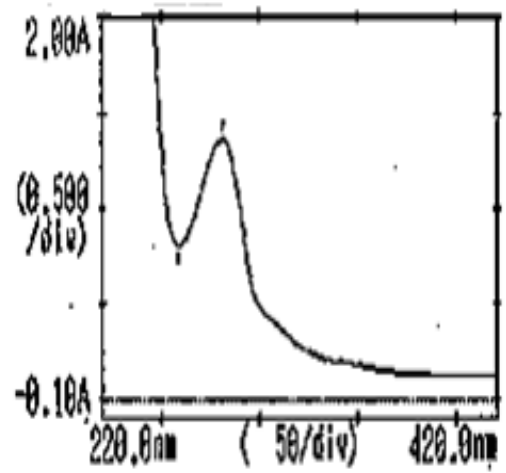
PPI : phase eau



PPI: Ether di éthyle

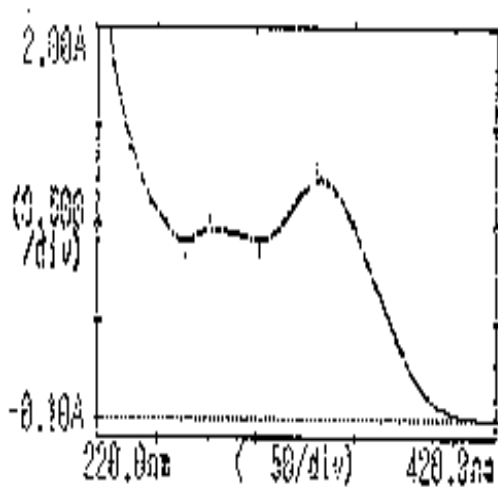


PPI: acétate d'éthyle

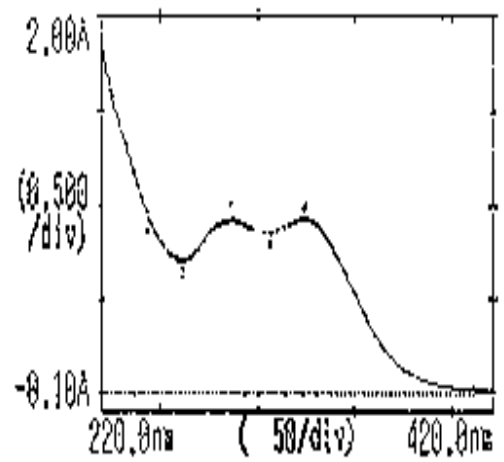


PPI: 1 butanol

Figure 26 : Spectres UV/Visible des phases d'extrait de PPI formés au cours des affrontements



AHA: phase eau



AHA: Ether di éthyle

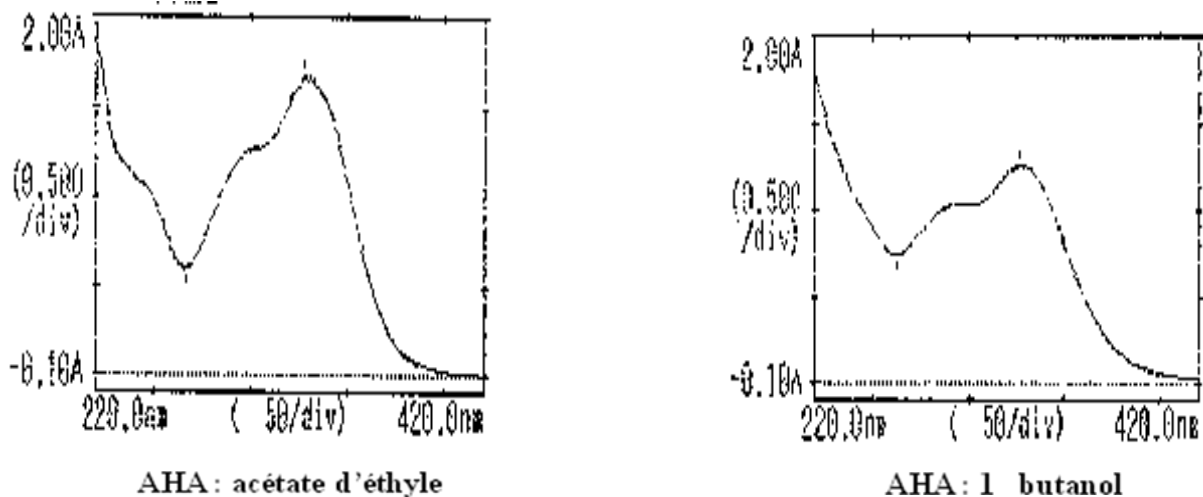


Figure 27 : Spectres UV/Visible des phases d'extrait de AHA formés au cours des affrontements

II.4.Chromatographie analytique sur couche mince

Un screening phytochimique a été mené afin de visualiser les classes de métabolites secondaires présentes et potentiellement antibactériennes des différentes phases (acétate d'éthyle, étherdiéthylique et 1.butanol) des extraits de l'écorce de *Pinus pinaster*, des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* et des parties aériennes d'*Artémisia herba alba*.

Une chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée suivant la méthode de **Biallo et al. 2004**.

Les valeurs des rapports frontaux (Rf) des taches visualisées sur les chromatogrammes des extraits étudiés sont consignées dans les tableaux 8,10 et 12.

Les systèmes solvants utilisés,

- MEC/MEOH/ETOH/EP (40/30/30/10). CCM sur gel de polyamide
- acétate d'éthyle/MEOH/H₂O (40/4/2) sur gel de silice

ont permis d'avoir une bonne séparation et une visibilité acceptable des spots, (**fig 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34**).

Outre l'observation sous rayonnement UV à 254 nm et 366 nm, les plaques ont été révélées à l'aide de réactifs chimiques, dans le but de donner un premier aperçu de la composition des échantillons.

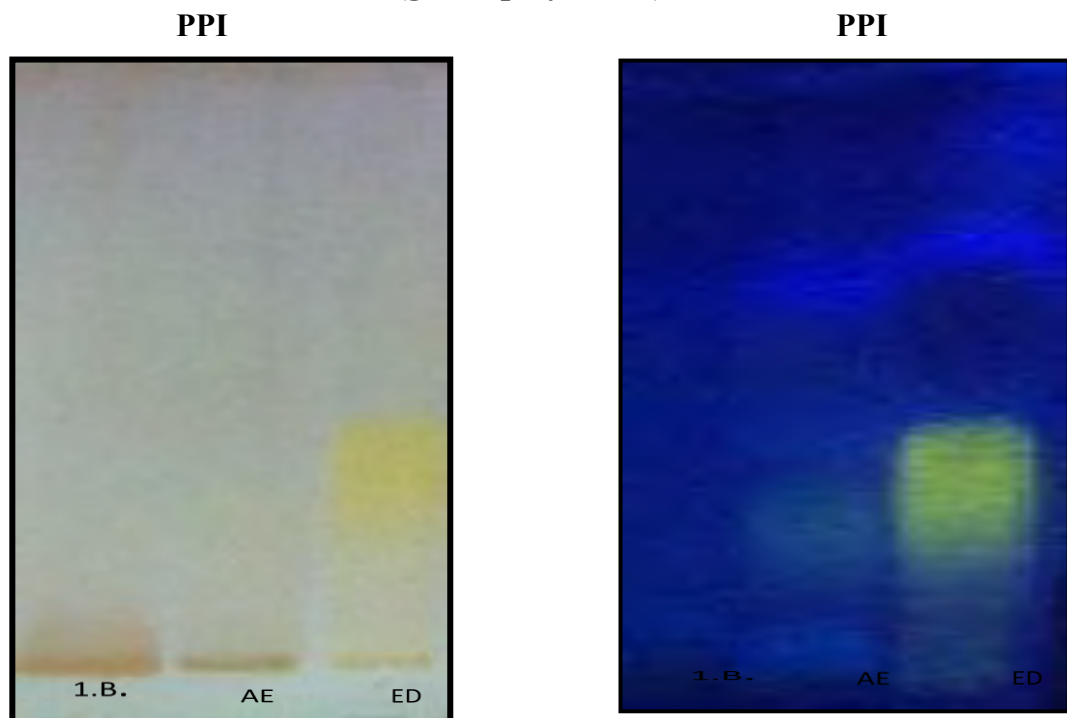
Les spots sont visualisés sous des longueurs d'onde 254nm et 365nm, cette dernière a donné des fluorescences plus claires et distinctes que la première longueur d'onde.

Le criblage chimique sur plaque CCM a permis de mettre en évidence relativement quelques classes de composés. La révélation au chlorure de fer a montré la présence systématique de tanins **Wagner and Bladt, 1996**, les taches ont une coloration brune ou grise.

Le giclage de la CCM avec le réactif de NEU, permet de supposer la présence de flavonoïdes avec des spots de couleur orange, jaune-orange, marron vert-bleu, bleu vert (**Kabran et al. 2011 ; Benamar et al. 2010**).

Les stérols sont révélés par la coloration jaune et jaune-vert et les terpènes sont mis en évidence en rouge et orange par le réactif de Liebermann-Burchard (**Kabran et al. 2011 ; Benamar et al. 2010**).

II.4.1. Révélation au réactif de NEU (gel de polyamide)



Révéléateur : NEU à l'œil nu

Révéléateur : NEU à 365nm

Figure28 : Chromatogramme sur gel de polyamide des extraits ED, AC, 1B de l'écorce *Pinus pinaster* (après révélation au réactif de NEU)

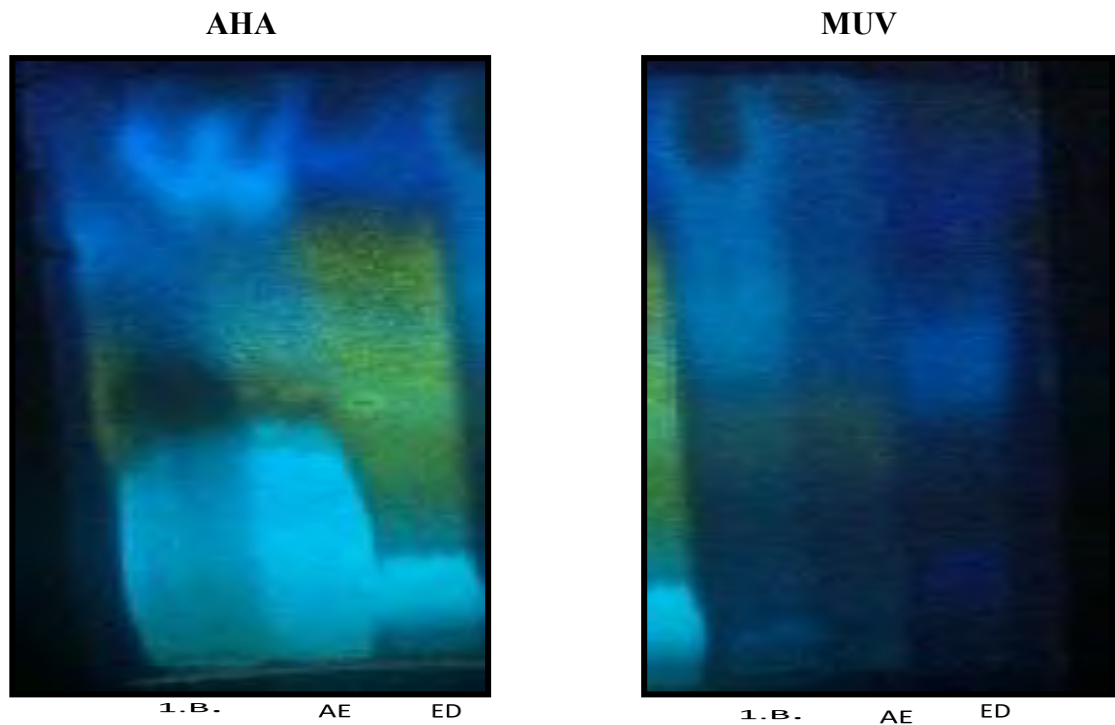


Figure29 : Chromatogramme sur gel de polyamide des extraits ED, AC, 1B des parties aériennes d'*Artémisia herba alba* et les sommités fleuris de *Marrubium vulgare* (après révélation au réactif de NEU)

La chromatographie sur couche mince sur gel de polyamide avec révélation au réactif de NEU , nous a permis de supposer que les plantes (AHA, MUV, PPI) renferment de différents flavonoïdes, leur couleur varient du jaune, brun et orange, ainsi que des acides phénoliques colorés en bleu ou en bleu fluorescent (plaques révélés au réactif de Neu) (figure28, 29).

La présence de ce type de composés n'est pas surprenante, car ils sont fréquemment décrits chez les espèces de ces familles (pinaceae, lamiaceae et asteraceae) (**Bruneton 1999**).

II.4.2. Révélation au réactif de NEU (gel de silice)

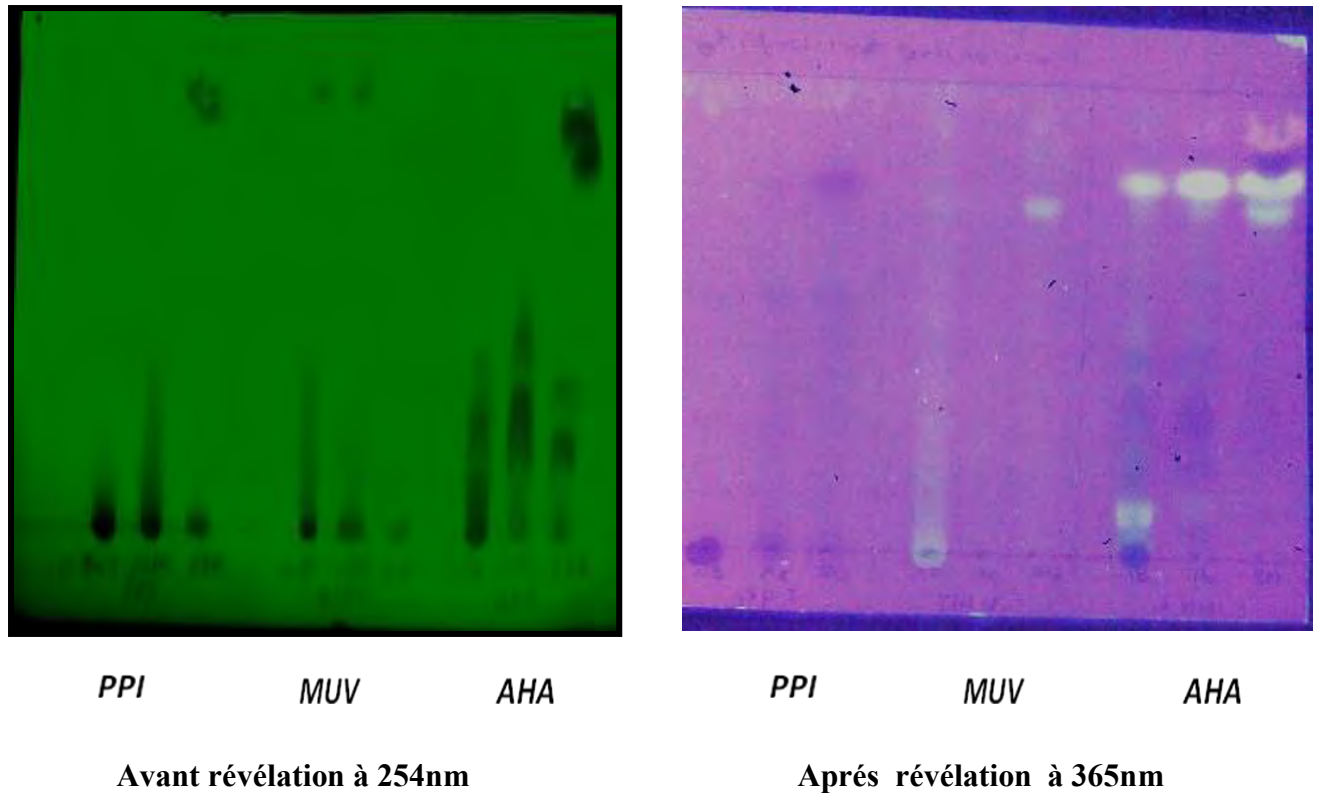


Figure 30 : Chromatogramme sur plaque de silice des extraits ED, AC, 1B de *Artémisia herba alba* (AHA), *Marrubium vulgare* (MUV) et *Pinus pinaster* (PPI) (avant et après révélation)

Front du solvant : 10.5 cm

Support: Plaque de G60F254 en aluminium

Eluant:acétate d'éthyle/MEOH/H2O (40/4/2)

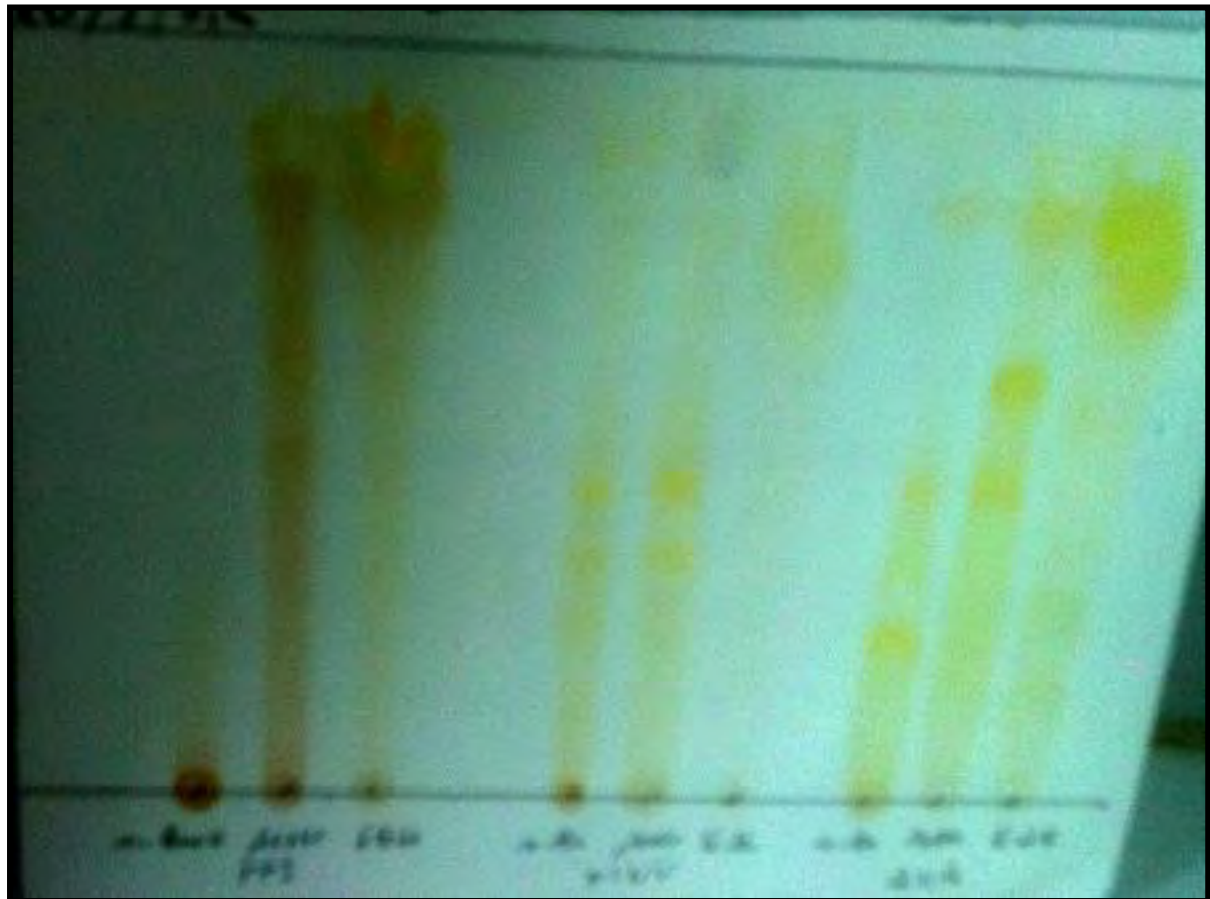
Avant révélation à 254nm

Après révélation à 365nm

ED : phase étherdiéthyle

AE : phase éther éthyle

1B : phase 1 butanol



PPI

MUV

AHA

Figure31 : Chromatogramme sur plaque de silice des extraits ED, AC, 1B de *Artémisia herba alba*, *Marrubium vulgare* et *Pinus pinaster* (révélation NEU) A l'œil nu

Front du solvant : 10.5 cm

Support : plaque de Silice G60F254 en aluminium

Eluant : acétate d'éthyle/MEOH/H₂O (40/4/2)

Révélation au réactif de NEU

ED : phase étherdiéthyle

AE : phase éther éthyle

1B : phase 1 butanol

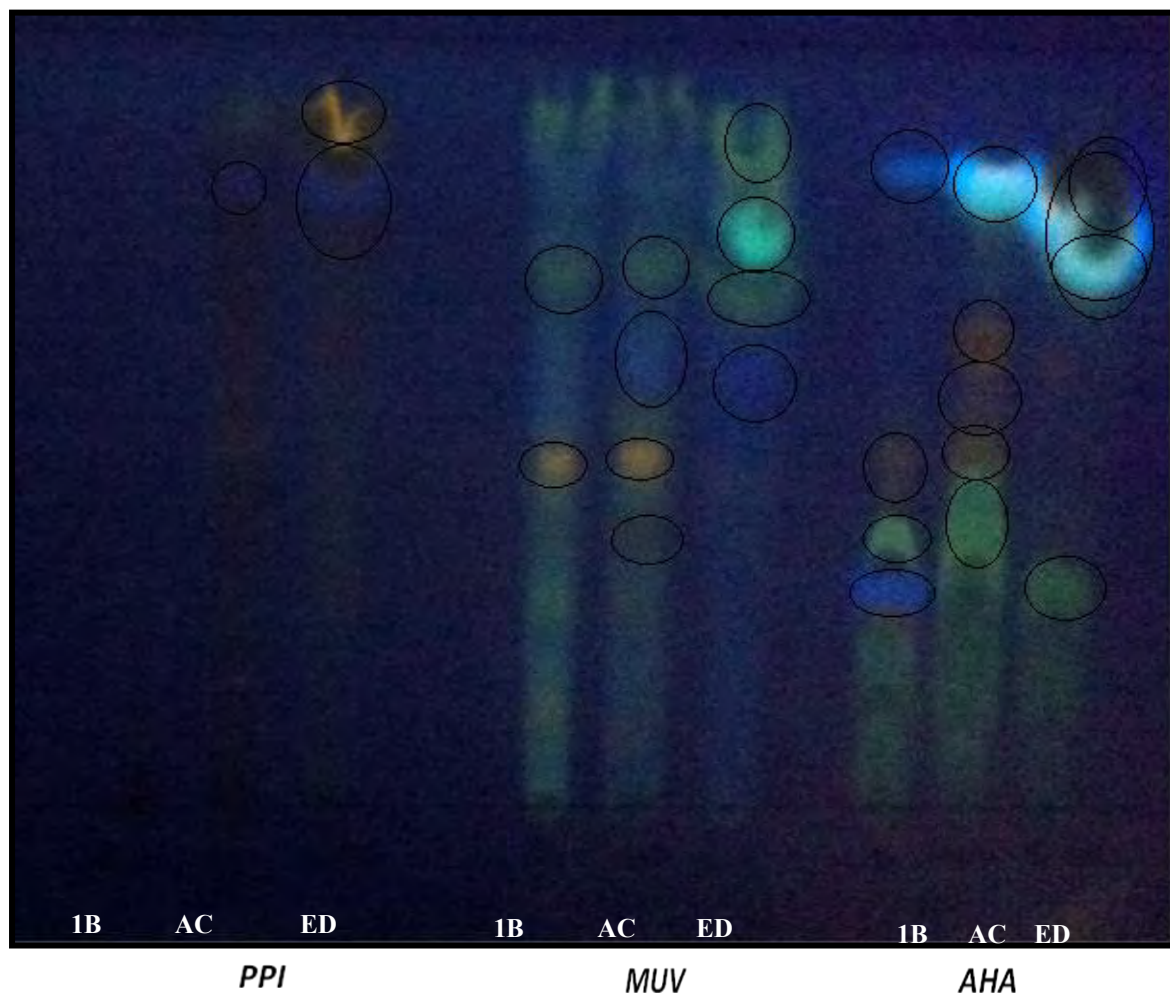


Figure32 : Chromatogramme sur plaque de silice des extraits ED,AC,1B de *Artémisia herba alba*, *Marrubium vulgare* et *Pinus pinaster* (révélation NEU)à 365nm

Front du solvant : 10.5 cm

Support : plaque de Silice G60F254 en aluminium

Eluant : acétate d'éthyle/MEOH/H₂O (40/4/2)

Révélation au réactif de NEU

ED : phase étherd

AE : phase éther éthyl

1B : phase 1 butanol

**Tableau8 : screening phytochimique des extraits de AHA, MUV et PPI
(Révélation au réactif de NEU)**

plantes phases	AHA	MUV	PPI
ED	++	+++	+
AC	+++	+++	+
1B	+++	+	-

**Tableau9 : Résultats de la CCM des extraits ED, AC, 1B de AHA, MUV,PPI
Système de solvant : acétate d'éthyle/MEOH/H2O (40/4/2)
(Révélation au réactif de NEU)**

plantes phases	AHA		MUV		PPI	
	spot	Rf	spot	Rf	spot	Rf
ED	1	0.28	1	0.57	1	0.78
	2	0.71	2	0.66	2	0.85
	3	0.81	3	0.76		
			4	0.85		
AC	1	0.38	1	0.38	1	0.81
	2	0.47	2	0.47		
	3	0.53	3	0.61		
	4	0.62	4	0.76		
	5	0.81				
1B	1	0.28	1	0.43		/
	2	0.36	2	0.70		
	3	0.43				
	4	0.81				

AHA : parties aériennes d'*Artémisia herba alba*

MUV : sommités fleuries de *Marrubium vulgare*

PPI : écorce de *Pinus pinaster*

ED : phase étherdiéthyle

AE : phase éther éthyle

1B : phase 1 butanol

II.4.3. Révélation au réactif Liebermann-Burchard

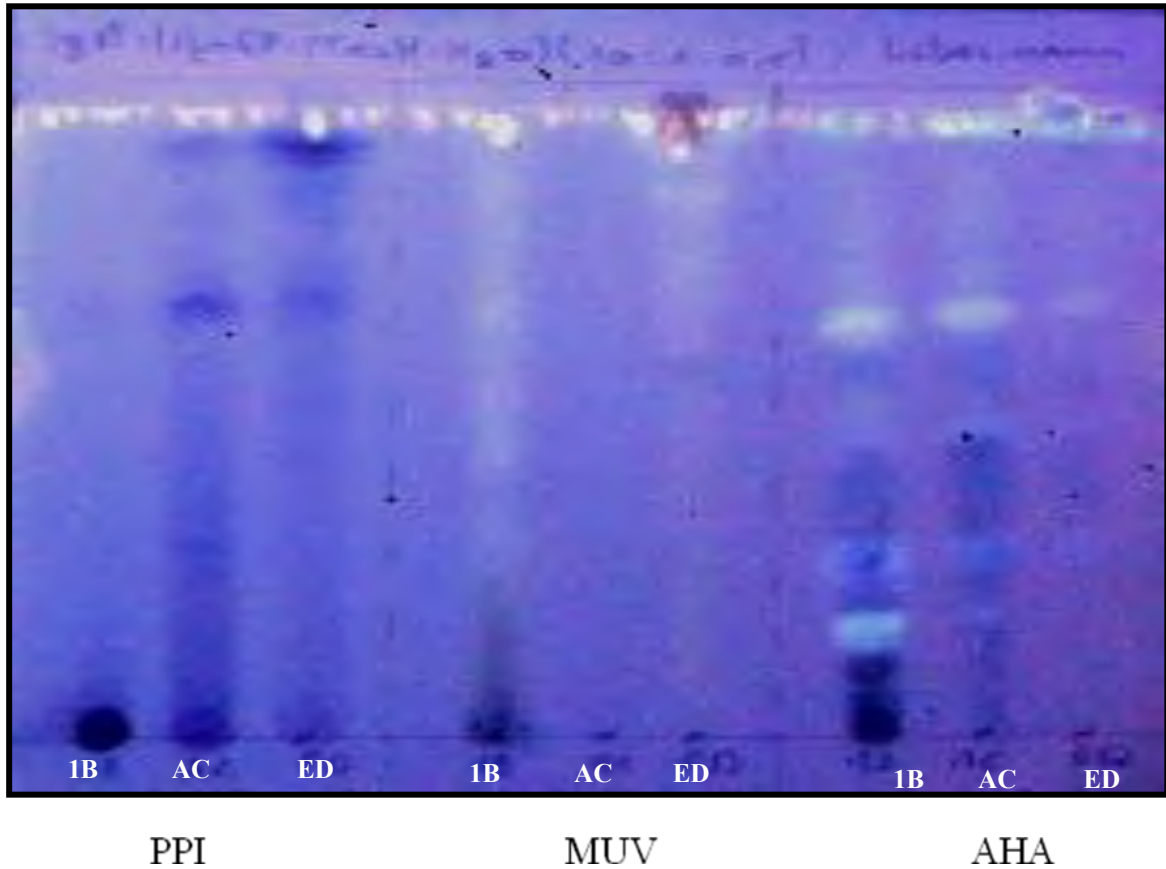


Figure33 : Chromatogramme sur plaque de silice des extraits extraits ED, AC, 1B de *Artémisia herba alba*, *Marrubium vulgare* et *Pinus pinaster* (Révélation au réactif Liebermann-Burchard)

AHA : parties aériennes d'*Artémisia herba alba*

MUV : sommités fleuries de *Marrubium vulgare*

PPI : écorce de *Pinus pinaster*

ED : phase étherdiéthyle

AE : phase éther éthyle

1B : phase 1 butanol

Tableau 10 : screening phytochimique des extraits de AHA, MUV etPPI

plantes phases	AHA	MUV	PPI
ED	++	+	+
AC	+++	-	+
1B	+++	++	-

Tableau11 : Résultats de la CCM des extraitsED, AC, 1B de AHA, MUV, PPI Système de solvant : acétate d'éthyl/MEOH/H2O (40/4/2) (révéléation réactif Liebermann-Burchard)

plantes phases	AHA		MUV		PPI	
	spot	Rf	spot	Rf	spot	Rf
ED	1	0.26	1	0.60	1	0.66
	2	0.40	2	0.82	2	0.90
	3	0.66				
AC	1	0.32	/		1	0.66
	2	0.40			2	0.90
	3	0.49				
	4	0.61				
	5	0.73				
1B	1	0.10	1	0.33	/	
	2	0.17	2	0.46		
	3	0.26	3	0.66		
	4	0.64				

AHA :parties aériennes d'*Artémisia herba alba*

MUV : sommités fleuris de *Marrubium vulgare*

PPI : écorce de *Pinus pinaster*

ED : phase étherdiéthyle

AE : phase éther éthyle

1B : phase 1 butanol

II.4.4. Révélation au FeCl₃

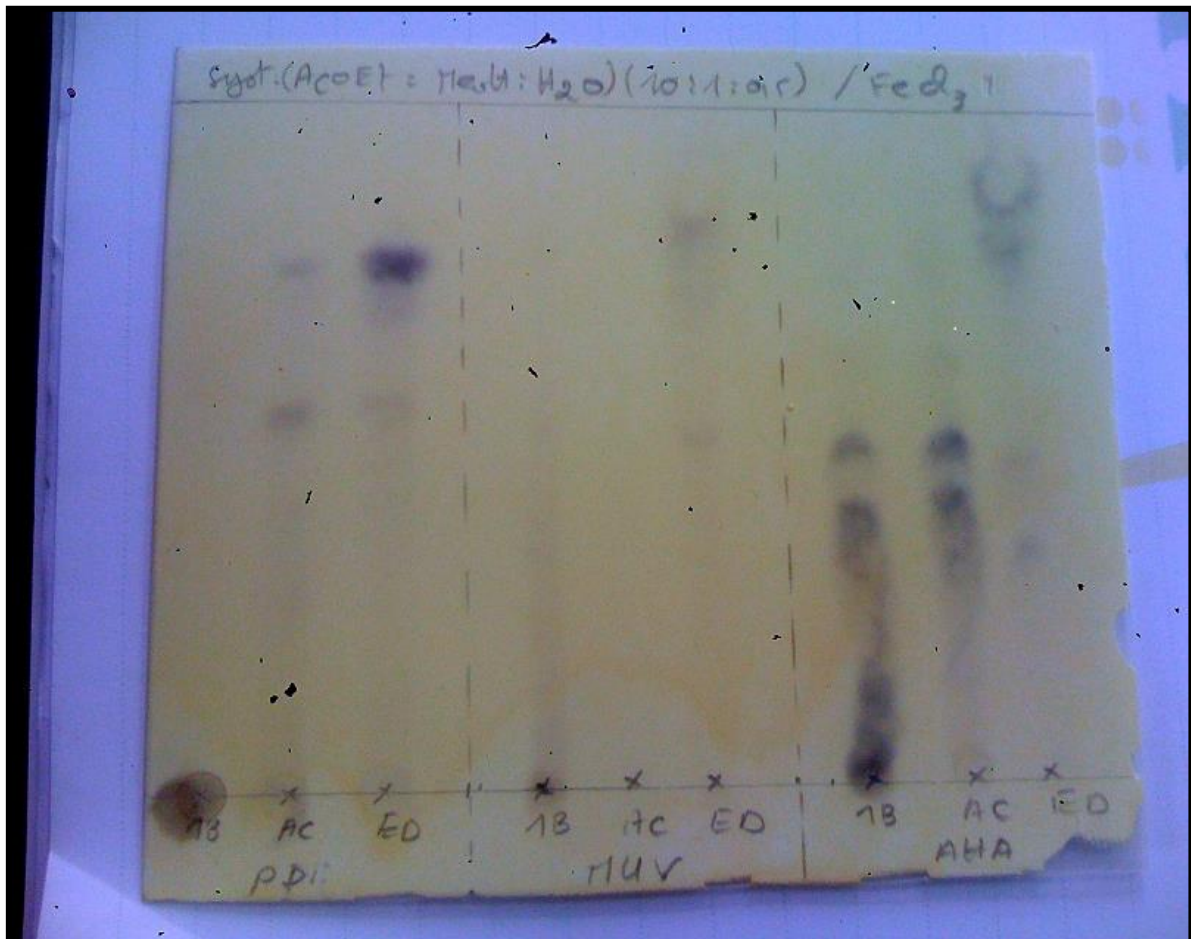


Figure 34 : Chromatogramme sur plaque de silice des extraits ED, AC, 1B de *Artémisia herba alba*, *Marrubium vulgare* et *Pinus pinaster* (Révélation au réactif Fe Cl₃)

AHA : parties aériennes d'*Artémisia herba alba*

MUV : sommités fleuris de *Marrubium vulgare*

PPI : écorce de *Pinus pinaster*

ED : phase éther diéthylique

AE : phase éther éthyle

1B : phase 1 butanol

**Tableau12 : screening phytochimique des extraits de AHA, MUV et PPI
(Révélation au réactif Fe Cl₃)**

plantes phases	AHA	MUV	PPI
ED	+++	++	+
AC	+++	-	+
1B	++	-	-

**Tableau13 : Résultats de la CCM des extraitsED, AC, 1B de AHA, MUV, PPI
Système de solvant : acétate d'éthyl/MEOH/H₂O (40/4/2) (Révélation au réactif
Fe Cl₃)**

plantes phases	AHA		MUV		PPI			
	spot	Rf	Spot	Rf	spot	Rf		
ED	1	0.33	1	0.50	1	0.53		
	2	0.46	2	0.73			2	0.74
	3	0.80	3	0.82				
	4	0.90						
AC	1	0.32	/		1	0.53		
	2	0.40					2	0.74
	3	0.49						
	4	0.61						
	5	0.73						
1B	1	0.13	/			/		
	2	0.33						
	3	0.42						
	4							

AHA : parties aériennes de *Artémisia herba alba*

MUV : sommités fleuries de *Marrubium vulgare*

PPI : écorce de *Pinus pinaster*

ED : phase étherdiéthyle

AE : phase éther éthyle

1B : phase 1 butanol

La CCM après révélation au réactif de Neu et visualisation sous UV, a permis de mettre en évidence de nombreuses fluorescences (en particulier Rf 0,28, 0.38, 0.36 verdâtre ; 0,81, 0.47, 0.53, 0.62 et 0,43 marron ; 0,71, 0.28 et 0.81 bleu. Une fluorescence bleue violette (Rf 0,71, 0.81) est nettement observée pour les parties aériennes d'*Artémisia herba alba*. L'écorce de *Pinus pinaster* contient des spots de couleur bleu (Rf 0.81, 0.78) et orange (Rf 0.85).

Les sommités fleuris de *Marrubium vulgare* présentent des fuorescences bleu (Rf 0.57, 0.61) ; marron (Rf 0.66, 0.85, 0.38) ; orange (Rf 0.47, 0.43) et verdâtre (Rf 0.70, 0.76) (tableau 8, 9) (figure 30, 31, 32).

Les stérols et triterpènes ont été révélés par le réactif de Liebermann -Bürchard sous UV/366 nm, avec des spots de couleur jaune (Rf= 0.66, 0.73, 0.10, 0.64) et jaune vert (Rf= 0.66, 0.90) (tableau 10, 11) (figure 33).

Par ailleurs, les tanins ont été révélés par Fe Cl₃ les spots sont de couleur grise pour tous les Rf (tableau 12, 13) (figure 34).

Nous remarquons, dans cette analyse qualitative, que les phases (ED, AE et 1B) des parties aériennes d'*Artémisia herba alba* sont les plus riches en flavonoïdes totaux, en terpènes et stérols et en tanins suivies des sommités fleuris de *Marrubium vulgare* et enfin de l'écorce de *Pinus pinaster*.

Les Rf différents sont dus à la polarité des composés vis-à-vis du système solvant de migration, et la phase stationnaire. Celle-ci s'installe suite à une différence au niveau du squelette moléculaire, dont les molécules méthylées ont un Rf plus élevé que celles glycosylées.

Les polyphénols (phénols totaux, flavonoïdes, tannins condensés et hydrolysables) ont été quantifiés dans différents organes de *Marrubium vulgare* du mont de Tessala (Algérie occidentale) en période de végétation et de floraison. Quelle que soit la période de prélèvement, les feuilles sèches sont les plus riches en polyphénols, suivies des fleurs alors que de faibles concentrations sont observées pour les feuilles fraîches, les tiges et les racines. Les fleurs accumulent des tannins condensés et peu de phénols totaux et de flavonoïdes (Bouterfas 2013).

Six composés flavonoïdes ont été isolés à partir de *Marrubium vulgare*, ils ont été identifiés par les données spectrales et par comparaison avec les données publiées (**Mabry et al. 1970 ; Agrawal et al. 1989 ; Markham 1989**).

L'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* a été analysé par chromatographie sur couche mince en utilisant un système chromatographique tel que rapporté par (**Wagner et Bladt 1996**). CCM sur gel Si F254 60 plaques, en utilisant CHCl₃-MeOH (95:5) comme système de solvants, pour l'identification des composés de la classe des terpènes, après la pulvérisation avec le réactif Komarowsky. L'extrait a été également chromatographie sur TLC (SI gel 60 F254 plaques) en utilisant AcOEt-HCOOH-CH₃COOH-H₂O (100:11:11:26) comme phase mobile. TLC a été observé sous UV 254 et 366 nm, avant et après la pulvérisation avec des produits naturels réactif NP / PEG pour la détection de composés de la classe des flavonoïdes (**Elberry et al. 2011**). Ces données concordent avec nos résultats sur la CCM des sommités fleuries de *Marrubium vulgare*.

Selon **Paulo Brito et al 2000** les composés phénoliques de l'écorce de pin ont été séparés et identifiés par chromatographie sur couche mince. Ces résultats ont été comparés avec ceux obtenus avec des extraits de tanin disponibles dans le commerce (acacia, quebracho, tara, de châtaigniers et gambir).

Maimoona et al. 2011 rapportent qu'habituellement, la plupart des flavones et de flavonols sont obtenus dans les fractions de dichlorométhane et d'acétate d'éthyle de l'extrait de pin en raison de leur nature polaire.

La présence de flavonoïdes et phénoliques simples comme l'acide phénolique dans différentes espèces de pin a été signalée diversement par **Rohdewald et al. 2002 ; Senthilmohan et al. 2003 ; Yesil-Celiktas et al. 2009**.

Les principaux constituants de l'écorce des extraits de *Pinus pinaster*, *Pinus massoniana* et *Pinus radiata* sont des proanthocyanidines (**Weber et al. 2007**). Toutefois, étant donné la complexité de leur analyse, la composition et les propriétés des extraits ont été analysés selon l'activité de piégeage phénol et radicale totale comme indicateurs de l'effet du changement des variables d'extraction.

Les composés phénoliques des végétaux avec nature peu ou non polaire, ont été rapportés dans différentes plantes (**Oleszek et al. 2001; Ito et al. 2005; Muhtadi et al. 2006; Cui et al. 2008**).

Abou El-Hamd et al. 2010 rapportent que Les flavonoïdes détectés dans *Artemisia herba-alba* montrent une grande variation structurelle, allant de la commune flavones et flavonols glycosides flavonoïdes les plus insolites fortement dénaturé. Dans les études sur les feuilles et les effluves d'*Artemisia herba-alba* recueillies à partir du Sinaï, un total de huit flavonoïdes O-et C-glycosides ont été isolés et identifié.

L'examen des parties aériennes de *Artemisia herba-alba* recueillies auprès de magasins libanais ont conduit à l'isolement de deux flavonoïdes; hispidulin et cirsilineol. Une nouvelle flavone, 5,4 ' dihydroxy-6, 7,3 '-triméthoxyflavone, a été isolé à partir de l'extrait nonglycosidic des parties aériennes de *Artemisia .herba-alba* (**Segal et al. 1973**).

Lactones sesquiterpéniques sont parmi les produits naturels importants trouvés dans des espèces d'*Artemisia* et sont en grande partie responsable de l'importance de ces plantes dans la médecine et la pharmacie. Plusieurs types de structures de lactones sesquiterpéniques ont été trouvés dans les parties aériennes d'*Artemisia herba-alba*. Eudesmanolides suivies germacranolides semblent être les types les plus abondantes de lactones trouvés dans cette espèce.

En cours d'enquête d'*Artemisia. herba-alba* plante poussant en Israël (Néguev et le désert de Judée) cinq chemotypes différents ont été identifiés sur la base de différences dans leur constitution lactone sesquiterpène (**Segal et al. 1977; Hull et al. 1978**).

En Espagne, certaines études phytochimiques ont étudié les lactones sesquiterpéniques de *Artemisia herba-alba*, recueillies dans des zones géographiques différentes **Segal et al. 1977; Hull et al. 1978** De nombreux groupes ont étudié la chimie d'*Artemisia herba-alba* en Egypte. La plupart des études ont concernés les lactones sesquiterpéniques. Toutes les lactones isolées différent de celles trouvées précédemment d'*Artemisia herba-alba* poussant en Israël (**Gordon 1981; Ahmed 1990**). Peu d'étude sur les constituants chimiques des espèces d'*Artemisia herba alba* marocaine (**Marco 1994; Boriky 1996**) et algérienne (**Laid 2008**), qui ont prouvé que ce genre est riche en sesquiterpènes.

Des études chimiques sur les espèces d'*Artemisia* indiquent que toutes les classes de composés sont présentes dans le genre avec une référence particulière à trapénoïdes et flavonoïdes (**Turk 2012**).

Moufid 2012 rapporte que les études phytochimiques ont clairement démontré que les principaux constituants d'*Artemisia herba alba* sont les sesquiterpènes lactones, les acides phénoliques, les flavonoïdes et les huiles essentielles avec une variabilité spécifique de ces constituants en fonction de la zone géographique.

Selon **Akrout et al. 2012**. Le genre *Artemisia* présente une teneur élevée en composés phénoliques ayant une activité antioxydante forte contribution à la forte puissance antioxydante des extraits de plantes.

Lors de l'interprétation des résultats obtenus par réactions chimiques effectuées sur CCM, il faut garder à l'esprit qu'elles ne sont qu'indicatives, et que la présence de résultats faux positifs ou faux négatifs est fréquente.

II.5. Chromatographie liquide à haute performance

L'analyse est réalisée par un HPLC (VP SHIMADZU LIQUID CHROMATOGRAPH) au niveau du laboratoire de biochimie micro-moléculaire et phytochimie de la faculté des sciences de la nature et de la vie, université de Constantine1.

Le besoin de savoir les profils et d'identifier les composés individuels dans les échantillons exige le remplacement des méthodes traditionnelles par des techniques séparatives.

L'HPLC est sans doute la technique analytique la plus utile pour caractériser les composés polyphénoliques (**Gomez-Caravaca et al. 2006**).

20 µl de l'extrait ont été injecté sur une colonne de type phase inverse C18, de dimensions égales à 125 x 4.6 mm. La phase mobile est constituée de deux éluants : l'eau distillée, méthanol (3.5/6.5) (V /V). Le gradient d'élution appliqué est de type isocratique étalé sur 10 min. Le débit est de 0.8 ml / min (**Amarowicz et al. 2005**).

La détection a été effectuée par un détecteur UV-Vis à une longueur d'onde égale 254 nm.

Le profil chromatographique et les spectres UV-Visible de l'extrait éther diéthylique obtenu après épuisement de l'extrait de l'écorce de *Pinus pinaster*, est représenté au niveau de la figure 31 on remarque une bonne résolution et séparation des différents pics.

Ces pics ont été repérés grâce au détecteur à barrettes de diodes qui donne les profils UV de deux pics et permet de les différencier grâce à leur maxima d'absorption.

En effet, le premier pic a une réponse à environ 249nm. Le deuxième pic est détecté à 288nm. Les deux pics décelés dans le profil chromatographique peuvent nous faire supposer qu'on est en présence de flavonoïdes (fig35). (les flavonoïdes ont deux bandes maximales à environ 250 nm et 350 nm).

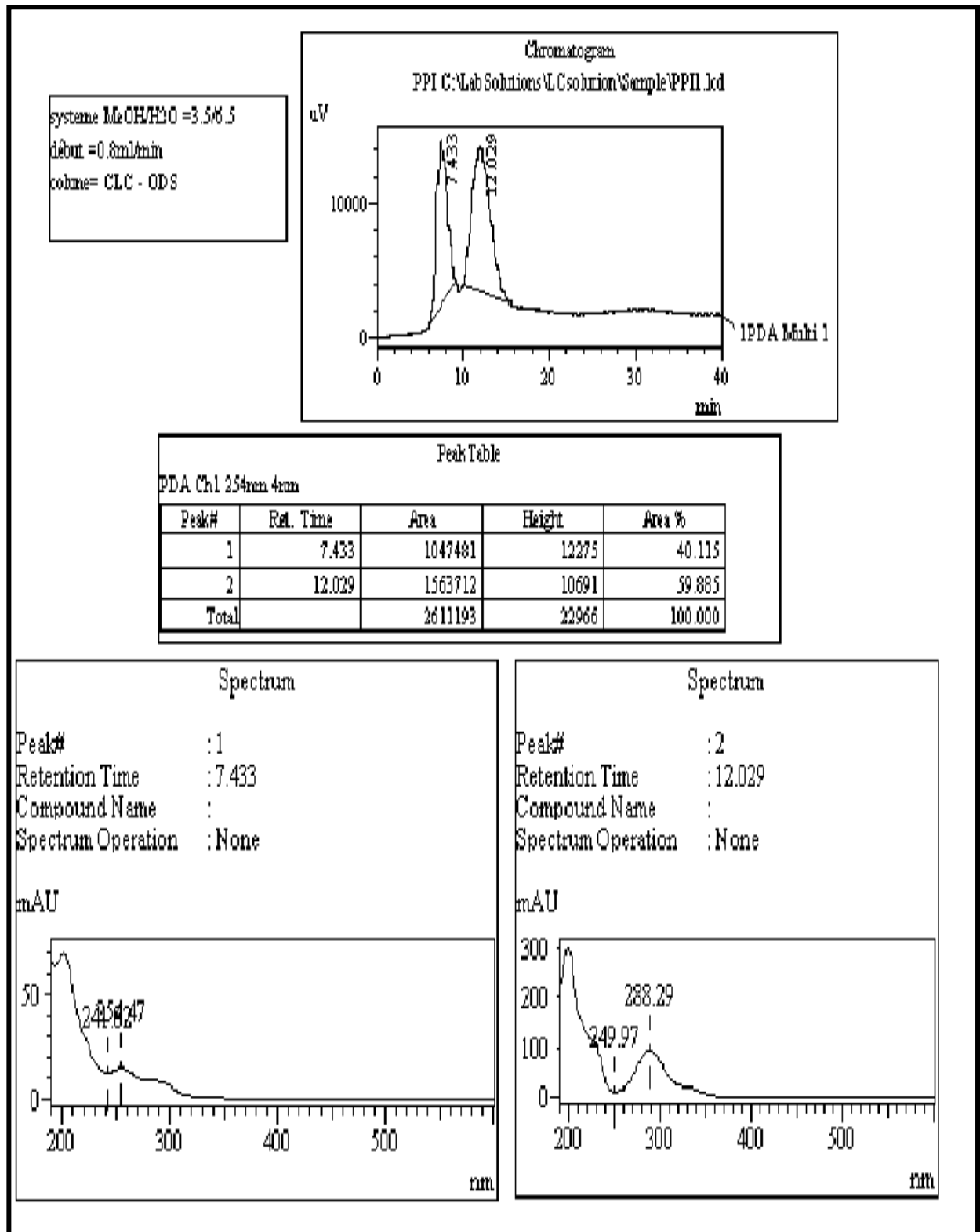


Figure 35 : profil chromatographique de la fraction éther diéthylique de *Pinus pinaster*

Chapitre III : Etude biologique

III.1. Détermination de l'activité antibactérienne

Les infections bactériennes restent des affections graves et leur fréquence a augmenté de façon considérable, au cours des dernières années, en raison de l'usage extensif des agents antibactériens chimiques dans la médication humaine ainsi que dans les élevages des animaux, qui conduit à la sélection de souches microbiennes résistantes. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antibactérienne des extraits totaux des parties aériennes d'*Artémisia herba alba*, l'écorce de *Pinus pinaster*, des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* et des différentes phases obtenues par épuisement successif, en utilisant des solvants à polarité croissante (Acétate d'éthyl, ether diéthyl et 1.butanol).

Pour chaque espèce végétale, la nature des composants phytochimiques est à l'origine des activités biologiques de chaque extrait ou fraction. Ces activités sont aussi en dépendance de la teneur de la substance ou l'ensemble des substances biologiquement actives.

Cette activité a été évaluée sur des souches fournies par le laboratoire de bactériologie du CHU de Constantine (tableau14) et réalisée aux laboratoires de bactériologie du centre hospitalo-universitaire de Constantine et laboratoire de génie microbiologique et applications université Constantine 1.

Tableau 14: Souches bactériennes testées

Familles	Souches	Gram
Micrococcaceae	<i>Staphylococcus aureus</i>	+
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia coli</i>	-
	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-

III.1.1. Activité antibactérienne des extraits totaux

L'activité antibactérienne des différents extraits végétaux est évaluée par deux méthodes :

III.1.1.1. Méthode de diffusion en milieu solide

Telle que décrite par **Bauer et al. 1966**, et reprise par **Ananil et al. 2000**. A partir de colonies jeunes de 18 à 24 h, une suspension bactérienne est réalisée dans l'eau distillée stérile pour chaque souche. La turbidité de cette suspension est ajustée à 0,5 Mc Farland puis diluée au 1/100. On obtient alors un inoculum estimé à 10^6 unités formant colonie par millilitre (Muc/ml). Cet inoculum estensemencé par inondation sur des boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller-Hinton (**NCCLS. 2002**).

Des solutions mères concentrées à 25 mg/ml ont été préparés qui sont ensuite stérilisées à l'autoclave (121°C pendant 15 minutes). Des disques de papier buvard Wattman de 6 mm de diamètre sont imprégnés avec 25 µl de la solution mère.

On prépare des disques imprégnés d'eau distillée stérile et de solvant éthanol (v/v). Cette dernière catégorie de disque servira de contrôle négatif. Des disques d'Ampicilline (10µg) ont été également utilisés comme antibiotique de référence, contrôle positif. Les boîtes de Pétri sont d'abord laissées pendant 1h à la température ambiante pour une pré-diffusion des substances, avant d'être incubées à 37°C à l'étuve pendant 24 h. L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque (**Doughari et al.2007**).

III.1.1.2. Limites de la méthode

Tous les produits peuvent être testés mais ils doivent diffuser parfaitement dans l'agar. En plus de cette conditionnalité plusieurs facteurs peuvent influencer sur les résultats : la composition du milieu gélosé, la densité de l'inoculum, les caractéristiques de croissance des souches, la température d'incubation, le temps d'application des produits à tester et la concentration des produits sur disques (**Leclerc 1975 ; Alcamo 1984 ; Rios et al. 1988**), dans les puits (**Rios et al. 1988**) ou le réservoir.

Bien que cette méthode soit simple, rapide et applicable à tout type de substance et tout organisme. Elle permet aussi d'évaluer un grand nombre d'échantillons à la fois (4 par boîtes) mais les résultats ne sont pas exprimés par une unité standard universelle permettant de quantifier les résultats (**Leclerc 1975 ; Alcamo 1984 ; Rios et al. 1988**).

Son application est aussi limitée par la différence de diffusion dans l'agar des composés chimiques végétaux de polarité variable.

III.1.1.3. Méthode de diffusion en milieu liquide

Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) : Pour chaque extrait de plante, on prépare par la méthode de double dilution, une gamme de concentrations stérile, allant de 25 à 0,024 mg/ml avec l'eau distillée.

On prépare également pour chaque souche bactérienne, un inoculum dont la turbidité est ajustée à 0,5 Mc Farland (soit 10^8 ufc/ml) et ramené à 10^6 ufc/ml dans du bouillon Mueller-Hinton deux fois concentré. Ensuite, on ajoute dans des tubes à hémolyse, 1 ml de chaque concentration et 1 ml d'inoculum bactérien. La gamme de concentration de chaque extrait subit alors une dilution de moitié et s'étale comme suit: 25 ; 12.5 ; 6.25 ; 3.125 ; 1.56 ; 0.78 ; 0.39 ; 0.195 ; 0.097 ; 0.048 ; 0.024 mg/ml.

On prépare également un tube témoin de croissance contenant 1 ml d'eau distillée stérile et 1 ml de solvant. La gamme de concentrationensemencée est incubée à 37 °C pendant 24 heures. Après l'incubation, on examine la croissance bactérienne, dans chaque tube, qui se traduit par une turbidité. La CMI d'un extrait vis-à-vis d'une souche donnée sera la plus petite des concentrations ne montrant aucune croissance visible de germe (**NCCLS.1999**).

III.1.1.4. Limites de la méthode

Bien que la méthode de dilution soit la plus appropriée pour les évaluations quantitatives d'activité (CMI), elle reste toutefois assez fastidieuse et longue avec les procédures de dilutions en série à faire (**Ferron 1976**).

III.1.2. Traitement statistique

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne de trois répétitions avec l'écart type (Moy±SD), ils ont été analysés par le logiciel Origine, version 6.0. En appliquant le test de Student pour comparer les populations.

III.1.3. Activité antibactérienne des phases

L'objectif de ce travail est de déterminer parmi les extraits préparés ceux qui avaient la plus grande activité inhibitrice des bactéries à Gram-positif, des bactéries à Gram-négatif.

L'activité antibactérienne des phases acétate d'éthylque, éther diéthylique et 1.butanol ont été testées *in vitro* par la méthode de diffusion sur gélose (**Bauer et al. 1966 Ananil et al. 2000**).

Cette méthode a exactement le même principe que celui des tests d'antibiogramme. C'est-à-dire, l'application de disques imprégnés de principes actifs sur des milieux de cultureensemencés de microorganismes. L'activité, quand elle est présente, se manifeste alors par des zones d'inhibition autour des disques. Des disques de 6 mm de diamètre ont été découpés sur du papier Wattman n°1 puis autoclavés à 120°C pendant 20 minutes.

Les extraits des phases enrichies secs sont reprises dans 4 à 5 ml de méthanol solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) 1% (**Boloug et al. 2011**).

Les microorganismes apportés sous forme de suspensions ont été normalisés à 10^6 UFC / ml. Ceci en mettant 0,2 ml de chaque suspension apportée dans 20 ml de bouillon. L'incubation s'est faite à 37°C pendant 24 H.

Les microorganismes ont étéensemencés par étalement sur des boîtes de Pétri contenant la gélose Muller-Hinton. Les disques ont été ensuite imprégnés chacun par 20 µl de principe actif (extrait dilué) et déposés sur la surface des gélouses. Comme témoin, nous avons utilisé des disques industriels d'Ampicilline (10µg d'antibiotique par disque) et des disques imprégnés de solvant et DMSO. L'incubation s'est faite à 37°C pendant 18 heures (**Osato 2009**).

Chapitre IV Résultats et discussion de l'activité antibactérienne

IV.1. Des extraits totaux

Pour chaque espèce végétale et au sein de la même espèce, la nature des composants phytochimiques est à l'origine des activités biologiques de chaque extrait ou fraction.

Ces activités sont aussi en dépendance de la teneur de la substance ou l'ensemble des substances biologiquement actives.

Les résultats obtenus ont révélé une activité antibactérienne notable des extraits végétaux de PPI, MUV et AHA contre les bactéries testés.

IV.1.1. Activité antibactérienne des extraits sur *Staphylococcus aureus*.

Tableau 15 : Effet inhibiteur des extraits végétaux sur la culture de *Staphylococcus aureus* (exprimé en diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne +/- écart type).

	<i>Staphylococcus aureus</i>			
	D 1(mm)	D 2(mm)	D 3(mm)	Moy ± SD
PPI [☉]	15	10	12	12.33 ± 2.52 ^{☉☉,A}
MUV [☉]	17	15	18	16.66 ± 1.53 ^{☉☉,A}
AHA [☉]	10	15	16	13.66 ± 3.21 ^{☉☉,A}
CONT	0	0	0	00 ± 0
AMPIC [◆]	32	32	32	32 ± 0

PPI: *Pinus pinaster*, **MUV**: *Marrubium vulgare*, **AHA**: *Artemisia herba alba*. **CONT**: Contrôle Méthanol / Eau (70 %, 30 %), **AMPIC**: Ampicilline, **D 1, 2 et 3**: Diamètre d'inhibition mesuré, **Moy**: Moyenne de trois répétition de diamètre d'inhibition, **SD**: écart type, **CMI**: concentration minimale d'inhibition, [☉]: 200 µg/ml, [◆]: 10 µg/disc, ☉☉(P<0.05) [extraits végétaux vs control], les valeurs portant la lettre A ne sont pas significativement différents.

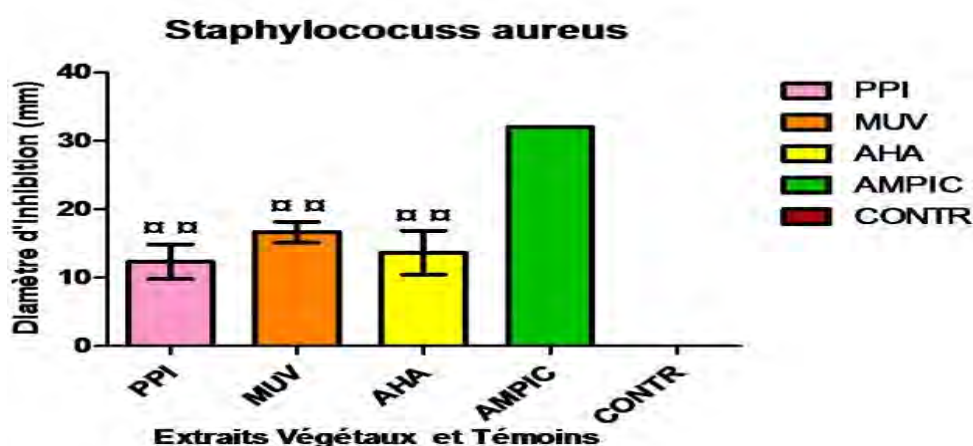


Figure 36 : Activité antimicrobienne des extraits végétaux sur *Staphylococcus aureus*.

A la concentration de 25 mg/ml les extraits végétaux de PPI, MUV, AHA et AMPIC à 10 µg/disc ont un effet significatif sur la souche de *Staphylococcus aureus* testé par rapport au contrôle. En présence des extraits de PPI (P<0.05), MUV (P<0.05) et AHA (P<0.05) *Staphylococcus aureus* a développé des diamètres d'inhibition de 12.33, 16.66 et 13.66 mm respectivement (Figure36). Aucune différence significative entre les extraits de PPI, MUV et AHA

IV.1.2. Activité antibactérienne des extraits sur *Escherichia coli*

Tableau 16 : Effet inhibiteur des extraits végétaux sur la culture d'*Escherichia coli*

	<i>Escherichia coli</i>			Moy ± SD	CMI mg/ml
	D 1(mm)	D 2(mm)	D 3(mm)		
PPI [♣]	18	11	14	14.33 ±3.51 ^{α,α,↑↑}	0.195
MUV [♣]	13	16	17	15.33 ±2.08 ^{α,α,[[}	0.195
AHA [♣]	9	6	7	7.33±1.53 ^{α,α,C}	-
CONT	0	0	0	00± 0	
AMPIC [♦]	25	25	25	25± 0	

PPI: *Pinus pinaster* , MUV : *Marrubium vulgare* , AHA : *Artemisia herba alba*. CONT : Contrôle Méthanol / Eau (70 %, 30 %), AMPIC : Ampicilline, D 1, 2 et 3 : Diamètre d'inhibition mesuré, Moy : Moyenne de trois répétition de diamètre d'inhibition, SD : écart type CMI : concentration minimale d'inhibition, ♣ : 200 µg/ml, ♦ :10 µg/disc α α(P<0.05) [extraits végétaux vs control], ↓↓(P<0.01) [extrait PPI vs AHA], [[(P<0.01) [extrait MUV vs AHA], les valeurs portant la lettre C ne sont pas significativement différents.

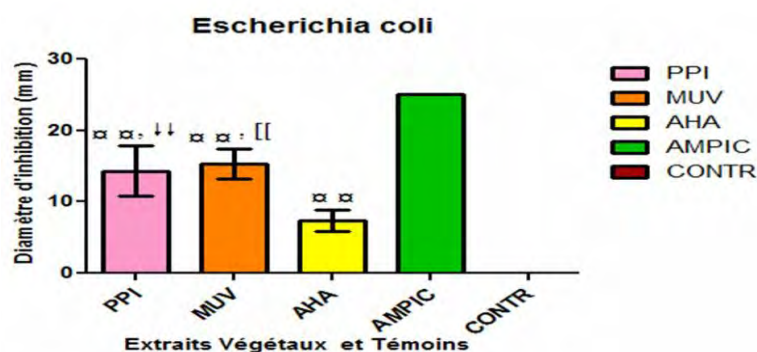


Figure 37: Activité antimicrobienne des extraits végétaux sur *Escherichia coli*

A la concentration de 25 mg/ml les extraits végétaux de PPI, MUV, AHA et AMPIC à 10 µg/disc ont un effet significatif sur la souche d'*Escherichia coli* testé par rapport au contrôle. En présence des extraits de PPI ($P < 0.05$), MUV ($P < 0.05$) et AHA ($P < 0.05$) *Escherichia coli* a développé des diamètres d'inhibition dans les 24 heures de 14.33, 15.33 et 7.33 mm respectivement (Figure 37). Une différence significative de l'extrait PPI ($P < 0.01$) par rapport à l'extrait AHA et une différence significative des extraits MUV ($P < 0.01$) par rapport à l'extrait AHA, par contre aucune différence significative entre les extraits de PPI et MUV.

IV.1.3. Activité antibactérienne des extraits sur *Pseudomonas aeruginosa*

Tableau 17: Effet inhibiteur des extraits végétaux sur la culture de *Pseudomonas aeruginosa* (exprimé en diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne +/- écart type)

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				CMI mg/ml
	D 1(mm)	D 2(mm)	D 3(mm)	Moy ± SD	
PPI [♣]	8	10	7	8.33 ± 1.53 ^{αα,E}	-
MUV [♣]	15	10	9	11.33 ± 3.21 ^{αα,E}	-
AHA [♣]	20	18	19	19 ± 1.00 ^{αα,αα}	0.097
CONT	0	0	0	00 ± 0	
AMPIC [♦]	24	24	24	24 ± 0	

PPI: *Pinus pinaster*, MUV: *Marrubium vulgare*, AHA: *Artemisia herba alba*. CONT: Contrôle Méthanol / Eau (70 %, 30 %), AMPIC: Ampicilline, D 1, 2 et 3: Diamètre d'inhibition mesuré, Moy: Moyenne de trois répétition de diamètre d'inhibition, SD: écart type, CMI: concentration minimale d'inhibition, ♣: 200 µg/ml, ♦: 10 µg/disc αα ($P < 0.05$) [extraits végétaux vs control], ααα ($P < 0.01$) [extrait AHA vs PPI et MUV], les valeurs portant la lettre ne sont pas significativement différents.

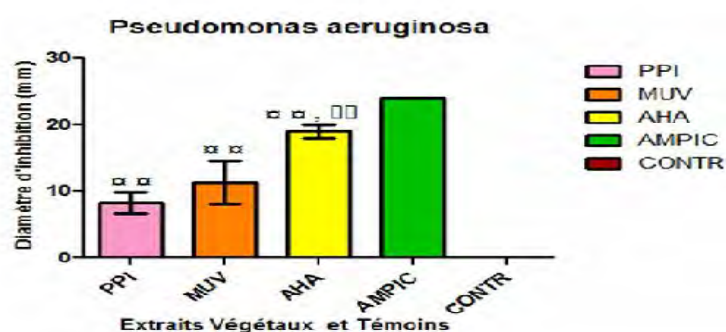


Figure 38 : Activité antimicrobienne des extraits végétaux sur *Pseudomonas aeruginosa*

A la concentration de 25 mg/ml les extraits végétaux de PPI, MUV, AHA et AMPIC à 10 µg/disc ont un effet significatif sur la souche de *Pseudomonas aeruginosa* testé par rapport au contrôle. En présence des extraits de PPI ($P < 0.05$), MUV ($P < 0.05$) et AHA ($P < 0.05$) *Pseudomonas aeruginosa* a développé des diamètres d'inhibition dans les 24 heures de 8.33, 11.33 et 19 mm respectivement (Figure 38). Une différence significative de l'extrait AHA ($P < 0.01$) par rapport aux extraits PPI et MUV, par contre aucune différence significative entre les extraits de PPI et MUV.

IV.1.4. Activité antibactérienne des extraits sur *Proteus vulgaris*

Tableau 18 : Effet inhibiteur des extraits végétaux sur la culture de *Proteus vulgaris* (exprimé en diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne +/- écart type).

	<i>Proteus vulgaris</i>			Moy ± SD	CMI mg/ml
	D 1(mm)	D 2(mm)	D 3(mm)		
PPI [♣]	0	0	0	00 ± 0 ^V	-
MUV [♣]	9	11	10	10 ± 1.00 ^{αα, ♂♂}	0.048
AHA [♣]	0	0	0	00 ± 0 ^V	-
CONT	0	0	0	00 ± 0	
AMPIC [♦]	25	25	25	25 ± 0	

PPI : *Pinus pinaster* , **MUV** : *Marrubium vulgare* , **AHA** : *Artemisia herba alba*. **CONT** : Contrôle Méthanol / Eau (70 %, 30 %), **AMPIC** : Ampicilline, **D 1, 2 et 3** : Diamètre d'inhibition mesuré, **Moy** : Moyenne de trois répétition de diamètre d'inhibition, **SD** : écart type, **CMI** : concentration minimale d'inhibition, [♣] : 200 µg/ml, [♦] : 10 µg/disc ^{αα} ($P < 0.05$) [extraits végétaux vs control], ^{♂♂} ($P < 0.01$) [extrait MUV vs PPI et AHA], les valeurs portant la lettre ne sont pas significativement différents

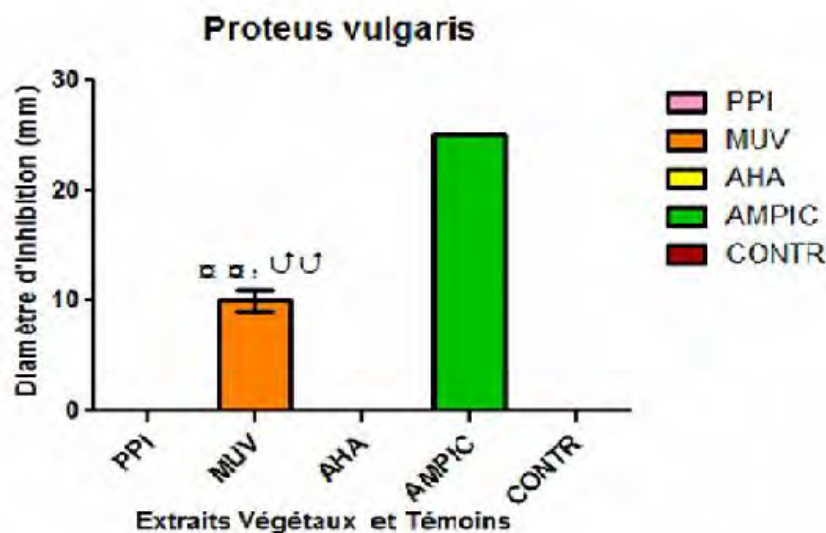


Figure 39 : Activité antimicrobienne des extraits végétaux sur *Proteus vulgaris*.

A la concentration de 25 mg/ml l'extrait végétal de MUV et AMPIC à 10 µg/disc ont un effet significatif sur la souche de *Proteus vulgaris* testé par rapport au contrôle, par contre aucune différence significative entre les extraits de PPI et AHA par rapport au contrôle. En présence de l'extrait de MUV ($P < 0.05$) *Proteus vulgaris* a développé des diamètres d'inhibition dans les 24 h de 10mm (Figure39). Une différence significative de l'extrait MUV ($P < 0.01$) par rapport aux extraits PPI et AHA, par contre aucune différence significative entre les extraits de PPI et AHA.

Tous les extraits ont réagi positivement au moins sur une des souches microbiennes testées. On remarque aussi que la plante MUV est douée de propriétés antibactériennes trèsappréciées sur 2 souches *staphylococcus aureus* et *pseudomonas aeruginosa*. En plus, les 3 plantes ne montrent aucune activité inhibitrice de la croissance bactérienne vis-à-vis de *Protéus vulgaris*.

Au vu des résultats précédents, nous avons fait ressortir que l'extrait de AHA montre un effet important contre *Pseudomonas aeruginosa* et l'extrait MUV contre *Proteus vulgaris*, Les extraits PPI, MUV et AHA ont un effet comparable entre eux concernant les souches de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

L'efficacité de l'extrait AHA contre *Pseudomonas aeruginosa* peut être expliquée par la dominance des lactones sesquiterpéniques (Laid 2008), en effet, les bactéries ont une sensibilité à ce type de métabolites.

Pour l'extrait de MUV contre *Proteus vulgaris* et *Escherichia coli* est probablement due à la présence de terpénoïdes signalée pour cette plante (Schlemper 1996; Meyre-Silva 2005).

L'extrait d'écorce de PPI contre *Escherichia coli* titré en Polyphénols (teneur > 90%) ils possèderaient des propriétés antibactériennes contre les Gram+ et – (Mariana Royer, Ph.D, 2010).

A la suite de ces résultats, il est déduit que les extraits hydroalcooliques de *Marrubium vulgare*, *Pinus pinaster* et *Artemisia herba alba* ont montré une activité antibactérienne significative à une dose de 0.2, 0.1 et 0.05 mg /ml. Selon certains auteurs (Laid 2008. Schlemper1996). L'activité antibactérienne détectée pour *Marrubium vulgare* est probablement due à la présence de terpénoïdes signalée pour cette plante, alors que les phénols sont responsables en grande partie de l'activité antimicrobienne et surtout antioxydante de ces extraits (Meyre-Silva 2005).

Marrubium vulgare avait donné des résultats prometteurs (Al- Bakri et Afifi, 2007), l'extrait éthanolique de *Marrubium. Vulgare* en raison de sa propriété microbicide solide, peut se révéler être un protecteur à base de plantes efficaces contre un large spectre de bactéries et champignons pathogènes.

Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles provenant de *Marrubium vulgare* sont soupçonnées d'être associés, en partie avec leur teneur élevée en composés oxygénés (46,21%). Plusieurs chercheurs (Oyedeji et al. 2005 ; Cakir et al. 2004) signalent également que les principaux composants des huiles essentielles mono-et sesquiterpénoïdes sont de nature phénolique. Il est donc raisonnable de supposer que leur activité antimicrobienne pourrait être liée à l'abondance de composés phénoliques

L'activité antibactérienne de *l'Artemisia herba alba* recueillis près de Sde Boker - (désert du Néguev)- en Israël, a été étudiée. Seule l'huile essentielle a été trouvé actif contre certaines bactéries Gram- positives (*Hemolyticus* de *Streptococcus* et *Staphylococcus aureus*) et des bactéries gram-négatives (*Escherichia coli*, *Shigella sonnei* et *Salmonella typhosa*).

L'activité antibactérienne d'*Artemisia herba alba* effectuée contre *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* n'ont pas montré une activité significative contre ces deux espèces (**Abou El-Hamd 2010**) ce qui correspond à nos résultats.

Des composés phénoliques totaux, des flavonoïdes et de proanthocyanidines ont été quantifiés dans les extraits de pins cembro par (**Cristina Lungu Apetrei 2011**) espèce de la famille des pinaceae ; selon (**Guo 2011 et Maimoona 2011**), les polyphénols, les flavonoïdes et proanthocyanidines ont suscité un intérêt considérable en raison de leur large spectre de la diversité de leurs effets biologiques (antioxydant, anti-inflammatoire, vasorelaxant, antimicrobien, antiviral, anticancéreux, antimutagène).

Les flavonoïdes ont une activité antibactérienne très vaste et très diversifiée. En effet, ils s'attaquent à un grand nombre de bactéries avec une intensité différente selon le microorganisme et l'écosystème dans lequel il se trouve : les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries : *Staphylococcus aureus* (**Babayi et al. 2004**), *Escherichia coli* (**Ulanowska et al. 2006**), *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Heliotropium sinuatum*, *Proteus mirabilis* ... etc. (**Didrak 1999, Modak 2001, Okigbo et al. 2005. Mamatha 2005**).

Comme les autres types de polyphénols, les tannins sont aussi répandus pour leurs nombreuses activités thérapeutiques notamment ; anti-infectieuses (**Latte et Kolodziej 2001, Leitao et al. 2005**).

En d'autres termes, les composés phénoliques de faibles poids moléculaires agissent pratiquement avec la même intensité que ceux ayant un poids moléculaire important. La structure et le degré de polymérisation n'ont donc pas une grande influence sur cette action, comme le signale (**Sivakumaran 2004**). Ceci explique le fait que (**Moreno 2006**) travaillant avec des acides phénols, (**Babayi 2004**) travaillant avec des flavonoïdes (aglycones et glycosides) et des tannins, (**Didrak 1999**) travaillant avec des tannins affirment tous que leurs composés respectifs ont une action antibactérienne évidente.

L'activité antimicrobienne et donc anti-infectieuse des flavonoïdes a été démontrée par de nombreuses études. Cette activité est due principalement à la capacité de ces molécules à inhiber l'expression de l'ADN et la synthèse de certaines enzymes et protéines membranaires des microorganismes (**Ulanowska et al. 2006**).

Les tannins ont une action antibactérienne puissante leur permettant d'inhiber la croissance des bactéries ruminales (dont certaines sont sporogènes) comme *Clostridium aminophilum*, *Butyvirio fibrisolvens*, *C.proteoclasterium* (Leitao 2005, Chatterjee et al. 2004), ainsi que les bactéries responsables de différentes infections chez l'homme : *Escherichia coli*, *S.aureus*, *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis*. L'inhibition bactérienne par les tannins est dépendante de la structure et du degré de polymérisation de ces derniers, mais ceci n'est pas toujours le cas (Sivakumaran 2004). L'activité d'une substance végétale dépend de plusieurs facteurs dont le mode d'extraction et la concentration en principes actifs (Wagner 1993; Thangara 2000). La plupart des travaux soutiennent que le principal site d'action des substances phénoliques est la membrane plasmique bactérienne (shunying et al. 2005) qu'ils sont en mesure de désintégrer (ultee et al. 1999). Cette membrane se déstructure devenant plus perméable aux ions (lambert et al. 2001). La lésion de la membrane cellulaire peut également favoriser la diminution du potentiel membranaire (ultee et al. 1999).

Ceci confirme les conclusions de (Cushnie 2003) qui affirme que chaque composé agit différemment sur les microorganismes. C'est-à-dire, qu'un composé peut avoir une action très importante sur un germe et une action moindre, voire même nulle sur un autre.

L'antibiogramme par disque est une méthode simple qui donne de bons résultats mais il est difficile d'utiliser cette méthode avec des quantités importantes d'échantillon car le disque est petit et le papier filtre utilisé ne permet pas d'imprégner une très grande quantité au risque de déborder l'échantillon à étudier (la quantité maximale est de 25µl).

Le test de diffusion en milieu solide n'est qu'un criblage des activités antimicrobiennes des extraits végétaux, il nous permet de sélectionner pour chaque souche l'extrait qui présente le plus une activité parmi l'ensemble des extraits naturels. C'est aussi un test préliminaire pour un autre essai microbiologique complémentaire, qui est la dilution en milieu liquide pour déterminer la CMI qui a pu être déterminé ou justifier à 0.097 et 0.195 pour les souches les plus sensibles *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Aussi, faut-il rappeler que nos extraits les sommités fleuries de *Marrubium vulgare*, l'écorce de *pinus pinaster* et les parties aériennes d' *Artemisia herba alba* contiennent des flavonoïdes, des saponines, de coumarines, des terpènes, des alcaloïdes et des tanins.

Ces composés ayant des propriétés antibactériennes connues, leur présence pourrait donc expliquer les propriétés antimicrobiennes observées (**Scalbert 1991 ; Bruneton 1993 ; Cowan, 1999**). Dans tous les cas, les substances végétales des extraits de MUV, PPI et AHA pourraient être de bons agents antimicrobiens.

Les résultats du test de sensibilité antibactérienne aux extraits (antibioaromatogrammes) sont regroupés dans les tableaux 15, 16, 17 et 18. Les valeurs indiquées sont les moyennes de trois mesures.

L'action bactériostatique se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné d'extrait brut étudié. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. Comme cela a été rapporté dans la littérature, nous avons considéré qu'un extrait a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 12 mm (**Sağdaç 2003**).

L'activité antibactérienne des extraits de plantes est due aux différents agents chimiques présents dans ces extraits, les flavonoïde et les triterpénoïdes ainsi que d'autres composés de nature phénolique qui sont classifiés comme composés antibiotiques très actifs (**Rojas et al. 1992 ; Marjorie 1999**).

Parmi les principaux métabolites secondaires, on peut citer les flavonoïdes qui sont des composés qui possèdent de fortes propriétés anti-oxydantes (**Rice-Evans, 1995**). Ils sont synthétisés par les plantes lors de l'invasion microbienne (**Dixon et al, 1983**), il est par conséquent logique, qu'ils agissent comme substances antimicrobiennes efficaces in vitro contre les microorganismes (**Cowan, 1999 ; Recio et al, 1989**).

Nos extraits ont été tous trouvés contenir une quantité de flavonoïde plus ou moins importante, donc on peut dire que l'activité antibactérienne de ces extraits est due, au moins partiellement, à la présence de ce type de composés chimiques actifs dans leur composition.

Par ailleurs, nos résultats montrent donc une grande variabilité des qualités bactériostatiques des extraits vis-à-vis des différentes souches. Les deux souches de *Staphylococcus aureus* à gram positif sont plus sensibles que les autres souches bactériennes testées à gram négatif.

La résistance de ces dernières n'est pas surprenante, en fait, ces bactéries possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides qui est en relation avec la nature de leurs membranes externes composées de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes. En présence d'agents perméabilisants de la membrane externe, des substances inactives contre ces bactéries deviennent actives.

IV.2. Activité antibactérienne des phases

Afin de mener une étude détaillée il serait donc intéressant d'évaluer l'activité antibactérienne in vitro sur les fractions des extraits des trois plantes en vue d'identifier la fraction ou les métabolites secondaires responsables de cette activité.

Les 3 phases (ED, AE et 1.B) des extraits ont été testées vis-à-vis de quatre souches suivant la méthode de diffusion en milieu solide, méthode décrite dans le chapitre III étude biologique.

Pour cela, les bactéries provenant du laboratoire de bactériologie du CHU de Constantine, sont mis en contact avec les extraits dans le milieu de Müller Hinton. Les extraits ont été dissous dans du DMSO et été testés à 20 µg/ml avec des concentrations déterminé par un dosage au spectrophotomètre, la lecture est faite à 420 nm (flavonoïdes) tableau 19. Pour le blanc 2ml de méthanol et 20µl de DMSO

Cette analyse permettra de savoir si ces molécules sont actives en synergie ou peuvent agir isolement. Les résultats de cette activité sont consignés dans les tableaux, 20, 21, 22 et 23.

Tableau19 : concentrations des extraits par dosage spectrophotométrique

Phases plantes	AE	ED	1. B
AHA	0.446	0.203	0.654
PPI	0.397	0.386	0.387
MUV	0.679	0.470	0.382

AHA : *Artémisia herba alba*

AE: acétate d'éthyle

MUV: *Marrubium vulgare*

ED: éther diéthyle

PPI: *pinus pinaster*

1B: 1butanol

IV.2.1. Activité antibactérienne des extraits sur *Pseudomonas aeruginosa*

Tableau 20 : Screening antibactérien des extraits vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*

	ED	AE	1B
PPI	-	+	+
MUV	+	-	+
AHA	+	+	+

IV.2.2. Activité antibactérienne des extraits sur *Escherichia coli*

Tableau 21 : Screening antibactérien des extraits vis-à-vis de *Escherichia coli*

	ED	AE	1B
PPI	-	-	-
MUV	-	+	-
AHA	-	-	-

IV.2.3. Activité antibactérienne des extraits sur *Staphylococcus aureus*

Tableau 22 : Screening antibactérien des extraits vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

	ED	AE	1B
PPI	+	+	+
MUV	-	-	-
AHA	+	+	-

IV.2.4. Activité antibactérienne des extraits sur *Protéus vulgaris*

Tableau 23 Screening antibactérien des extraits vis-à-vis de *Protéus vulgaris*

	ED	AE	1B
PPI	-	-	-
MUV	-	-	-
AHA	-	-	-

PPI : *Pinus pinaster*

+ : peu d'activité

MUV : *Marrubium vulgare*

- : pas d'activité

AHA : *Artemisia herba alba*

ED : éther diéthylique

AE : acétate d'éthyle

1B : 1 butanol

On remarque la présence d'une faible activité pour la plupart de nos échantillons sur la plupart des souches bactériennes utilisées (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Protéus vulgaris* (diamètre d'inhibition < 12 mm).

Marrubium vulgare révèle une activité sur *Escherichia Coli* sur la phase acétate d'éthyle et sur les phases éther diéthylique et 1 butanol vis-à-vis de *pseudomonas aeruginosa*. Par contre les trois phases des trois extraits ne présentent aucune activité vis-à-vis de *Protéus vulgaris*

Artemisia herba alba Asso est largement utilisé dans la médecine populaire algérienne.

Les composés phénoliques présents dans cette plante pourraient être des candidats pour certaines de ses activités biologiques et donc pour son utilisation thérapeutique.

Selon **Seddik et al. 2010** Flavonoïdes teneurs élevées (apigénine et lutéoline) sont présents dans la phase d'acétate d'éthyle en plus des acides phénoliques (acide protocatechique, l'acide caféique, l'acide gallique et de dérivés de l'acide férulique).

La phase aqueuse contient de petites quantités d'acides phénoliques et la phase chloroforme contient des acides phénoliques et des flavonoïdes d'aglycone.

L'activité antibactérienne d'extraits d'*Artemisia* et des composés phénoliques a également été estimée contre certaines souches bactériennes. Cet extrait contient une grande quantité de composés phénolique.

Ce qui concorde avec nos résultats pour les phases acétate d'éthyle, éther diéthylique et 1 butanol de *Artemisia herba alba* contre *Pseudomonas aeruginosa* et les phases éther diéthylique vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Les travaux de **Aljebouri 2005** ont montré que les extraits de *Artemisia herba alba* évalués pour leur activité antibactérienne contre les bactéries Gram-négatives telles que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et Gram- bactéries positives *Staphylococcus aureus* utilisant quatre solvants méthanol, l'eau, le chloroforme, et l'acétone.

L'étude a révélé que l'*Artemisia* méthanolique est le plus efficace contre les bactéries Gram négatives telles que *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, suivi par l'extrait chloroformique, acétonique et en dernier l'extrait aqueux.

Ce résultat est en accord avec **Seddik et al. , 2010** qui ont démontré que les extraits aqueux d'*Artemisia herba alba* avaient une faible activité antibactérienne contre *Escherichia coli*.

Jouda Mohamed Mahmoud 2013 rapporte que les extraits éthanoliques ont montré une activité antimicrobienne et une synergique avec antibiotiques mieux que les extraits méthanoliques et aqueux.

Les activités antibactériennes de l'acétate d'éthyle, le méthanol, chloroforme et l'acétone extraits de plante entière d'*Artemisia absinthium* ont été étudiées. L'acétate d'éthyle et extraits de chloroforme ont montré une activité contre certains des bactéries d'essai (**Erdogru 2002**). Ceci nous pousse à constater pas ou peu d'effet sur les souches testées. Il y aurait donc une synergie d'action au niveau des principes chimiques présents dans les extraits.

Ces résultats montrent que l'isolement de molécules à partir d'un extrait total ne doit pas toujours être un objectif surtout qu'il demeure une opération très onéreuse sans pour autant aboutir à un produit plus efficace.

Selon **Iserin et al. 2001** Le fractionnement donne des extraits moins efficaces qui n'ont aucune activité, montre qu'il existerait une synergie d'action au niveau des molécules présentes dans l'extrait hydroéthanolique.

L'extrait hydroalcoolique est le plus efficace de ces extraits. Le fait que son fractionnement donne des extraits moins efficaces qui, fractionnés à leur tour donne des sous fractions qui n'ont aucune activité, montre qu'il existerait une synergie d'action au niveau des molécules présentes dans l'extrait hydroéthanolique.

Les plantes ne révélant que trop peu ou pas d'activité *in vitro*, incluent des plantes utilisées en médecine traditionnelle avec des résultats probants, nous pensons notamment au cas de *Pinus pinaster*, de *Marrubium vulgare* et d'*Artemisia herba alba* dont, contre toute attente, les extraits ne se sont pas révélés actifs ou peu actifs lors de ce screening. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées quant à cette absence de réponse lors des tests *in vitro*.

- La médecine traditionnelle utilise le jus des feuilles, dont la composition chimique est impossible à reproduire expérimentalement par solvant ainsi que les éventuelles associations et synergies de composés qui peuvent s'opérer naturellement.
- La plante est utilisée fraîche en médecine traditionnelle. Lors de cette étude, pour des raisons de conservation, nous avons pris le parti de sécher les plantes. Cette étape préliminaire de séchage peut engendrer des altérations chimiques des composés et provoquer la perte de l'activité.
- Les concentrations testées sont insuffisantes pour visualiser une activité. Nous avons pris le parti de sélectionner les extraits les plus actifs et la concentration maximale testée n'est pas suffisante pour cet extrait.
- Les principes actifs apolaires ne sont que partiellement solubles dans ce test en milieu liquide. Il n'est pas exclu que la concentration nécessaire à l'activité d'un composé relativement apolaire ait été suffisante. Il s'agit d'une des limites de ce test.

En conclusion, bien souvent critiquée pour son manque de rationalité (doses non définies selon les calibres standardisés « modernes », potentielle toxicité, manque de cohérence, manque de concordance d'un lieu à un autre...) la médecine traditionnelle n'est guère valorisée dans le cadre de la recherche. Cette absence de validation *in vitro* des usages traditionnels est intéressante à souligner et permet, de garder également un œil critique vis-à-vis de la validation scientifique, certes essentielle à l'aboutissement de projet tel que celui-ci mais qui en démontre aussi ses limites.

En effet, l'absence d'activité *in vitro* n'est pas synonyme d'absence d'activité réelle chez le patient et *a contrario*, l'activité *in vitro* n'est pas garante d'une activité ultérieure chez le patient.

Il est totalement impossible de reproduire dans leur intégralité les facteurs impliqués dans une interaction peau/bactérie/antibactérien ; nous ne pouvons que nous en approcher en élaborant des modèles (solvants et tests pharmacologiques) et il convient de toujours garder un œil critique vis-à-vis de nos résultats. Un résultat positif devra par conséquent toujours être validé par la suite sur le patient par la mise en place de tests cliniques. De plus, au cours de tests *in vitro*, d'une façon générale, dans un extrait brut, des interactions peuvent se produire et des phénomènes notamment de précipitation ou d'émulsion, peuvent interférer dans le résultat (faux positifs/négatifs).

Des études (expériences, essais cliniques) ont montré l'existence d'une synergie entre les constituants d'une plante. La synergie est le résultat de l'interaction entre plusieurs composés, de sorte que les effets biologiques d'une plante ou d'une partie de plante sont supérieurs à la somme des effets de ses constituants étudiés isolément.

Les scientifiques n'ont pas réussi à déterminer le mécanisme exact de la synergie, mais les hypothèses retenues sont.

- La présence d'antioxydants permettant la conservation des principes actifs.
- La présence de principes actifs complémentaires (flavonoïdes) potentialisant l'action du principe actif ayant montré une activité biologique.
- La présence d'un principe actif non encore isolé.

Selon le docteur Tetau : « La plante totale a une action plus nette, plus complète que l'un ou plusieurs de ses principes actifs isolés. Elle constitue un ensemble synergique naturel d'une activité thérapeutique plus souple, plus maniable que celle d'un alcaloïde ou d'un hétéroside. Elle permet pour un même résultat de prescrire une dose moindre et, de ce fait, de rester en deçà d'un seuil de toxicité ».

Dans une drogue végétale il y a de nombreux constituants et ce n'est pas parce qu'on en a isolé un ou plusieurs qu'il n'en existe pas encore une multitude d'autres qui peuvent par leur synergie d'action conférer à la plante son effet thérapeutique. Par exemple l'opium (latex de *Papaver somniferum*) contient plus de 40 alcaloïdes dont les plus importants sont la morphine, la narcotine, la codéine et la papavérine (Hivin 2008).

Conclusion

La majorité des médicaments actuels sont des copies concentrées de remèdes végétaux. Notre pays est doté d'une biodiversité végétale immense, qui reste à découvrir et une grande partie de cette flore est constitué par des espèces médicinales. Ce document a porté dans un premier temps à l'identification des groupes phytochimiques, dans un deuxième temps à la recherche de l'activité biologique et les potentialités que peuvent avoir ces extraits *in vitro* à savoir la capacité antibactérienne.

Sur le plan phytochimique, les résultats de la caractérisation montrent une composition riche et variée en métabolites secondaires, où les flavonoïdes, les tannins et les terpènes et stérols, les coumarines et les saponines ont caractérisé tous les extraits bruts, alors que les alcaloïdes particularisent le *pinus pinaster*.

Ce résultat a été confirmé par une chromatographie analytique sur couche mince sur quelques métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les tanins et les terpènes et stérols des trois phases obtenus après épuisement des trois extraits de plantes par des solvants organiques à polarité croissante. La chromatographie sur couche mince sur gel de polyamide avec révélation au réactif de NEU, nous a permis de supposer que les plantes (AHA, MUV, PPI) renferment de différents flavonoïdes.

L'analyse chromatographique sur plaque de silice nous a permis de mettre en évidence plusieurs fluorescences avec le réactif de NEU, réactif de Liebermann-Burchard et FeCl_3 qui nous laisse supposer la présence des flavonoïdes, des terpènes et stérols et des tanins.

L'analyse spectrale des extraits méthanoliques avance la prédominance des flavonoïdes de nature Flavonol, Flavone, Flavanone, Flavanol ou Anthocyanes.

Les potentialités antibactériennes de différents extraits sont évaluées par la méthode de diffusion en milieu solide et en milieu liquide et leurs fractions acétate d'éthyle, éther diéthylique et 1-butanolique sur *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Au vu de ces résultats des extraits totaux nous avons fait ressortir que l'extrait de AHA montre un effet important contre *Pseudomonas aeruginosa*, Les extraits PPI, MUV et AHA ont un effet comparable entre eux concernant les souches de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

L'activité antibactérienne des différentes fractions sur milieu gélosé solide montre peu ou pas d'effet. Il y aurait donc une synergie d'action au niveau des principes chimiques présents dans les extraits.

Ce travail va nous ouvrir des horizons de recherche ciblés dans le domaine des plantes utilisées en médecine traditionnelle, notamment en termes de mise en évidence des principes actifs et évaluation de leurs activités biologiques.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par des recherches plus approfondies. A cet effet, il est important de :

- ▶ Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pouvant répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif de médicaments synthétiques.
- ▶ Développer des médicaments antibactériens à base des plantes.
- ▶ Orienter les recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires qui seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence.

Listes des figures

Figure 1: structure des différents terpènes.	10
Figure 2 : Structure de base : coumarine	12
Figure 3 : Structure générale du noyau des flavonoïdes	13
Figure 4 : Définition des différents types de flavonoïdes à partir du squelette flavane	14
Figure 5 : Structure des tannins hydrolysables (Bruneton, 1999)	16
Figure 6 : Structure des tannins condensés (Li, 2004)	17
Figure 7 : Aspect morphologique des micro-organismes étudiés	23
Figure 8 : Mécanisme d'action des antibiotiques	26
Figure 9 : la plante dans son milieu naturel au début de la saison de floraison	30
Figure 10 : la plante dans son milieu naturel à la fin de la saison de floraison	30
Figure 11 : sommités fleuris du <i>Marrubium vulgare</i>	34
Figure 12 : <i>Le marrubium vulgare</i>	34
Figure 13 : Photographie de pin maritime et ses feuilles réduites ou aiguilles	38
Figure 74 : Photographie de pin maritime son fruit ou cône et son écorce.	39
Figure 15 : Extraction des substances végétales	42
figure 16 : Schéma des tests phytochimiques pour la détection des polyphénols	46
Figure 17 : schéma des tests phytochimiques pour la détection des alcaloïdes	47
Figure 18 : schéma des tests phytochimiques pour la détection des stéroïdes	48
figure 19 : Etapes d'extraction liquide-liquide	52
Figure 20 : Conjugaison du groupement carbonyle avec les cycles A et B.	53
Figure 21 : le dépôt	57
Figure 22 : Développement des plaques	57
Figure 23: Structure de 2-aminoéthyl diphenyl borate (réactif de Neu)	59
Figure 24 : Réactifs : acide sulfurique + anhydride acétique	59
Figure25 : Principe de fonctionnement de l'appareil HPLC	62
	68
Figure 26 : Spectres UV/Visible des phases d'extrait de PPI formés au cours des affrontements	
Figure27 : Spectres UV/Visible des phases d'extrait de AHA formés au cours des affrontements	69
Figure28 : Chromatogramme sur gel de polyamide des extraits ED, AC, 1B de l'écorce <i>Pinus pinaster</i> (après révélation au réactif de NEU)	70

Figure29: Chromatogramme sur gel de polyamide des extraits ED, AC, 1B des parties aériennes d' <i>Artémisia herba alba</i> et les sommités fleuris de <i>Marrubium vulgare</i> (après révélation au réactif de NEU)	71
Figure 30: Chromatogramme sur plaque de silice des extraits ED, AC, 1B de <i>Artémisia herba alba</i> (AHA), <i>Marrubium vulgare</i> (MUV) et <i>Pinus pinaster</i> (PPI) (avant révélation et après révélation)	72
Figure31 : Chromatogramme sur plaque de silice des extraits ED, AC, 1B de <i>Artémisia herba alba</i> , <i>Marrubium vulgare</i> et <i>Pinus pinaster</i> (révélation NEU) A l'œil nu	73
Figure32 : Chromatogramme sur plaque de silice des extraits EDAC,1B de <i>Artémisia herba alba</i> , <i>Marrubium vulgare</i> et <i>Pinus pinaster</i> (révélation NEU)à 365nm	74
Figure33 : Chromatogramme sur plaque de silice des extraits extraits ED, AC, 1B de <i>Artémisia herba alba</i> , <i>Marrubium vulgare</i> et <i>Pinus pinaster</i> (Révélation au réactif Liebermann-Burchard)	76
Figure 34 : Chromatogramme sur plaque de silice des extraits ED, AC, 1B de <i>Artémisia herba alba</i> , <i>Marrubium vulgare</i> et <i>Pinus pinaster</i> (Révélation au réactif Fe Cl3)	78
Figure 35 : profil chromatographique de la fraction à l'éther diéthylique	85
Figure 36 : Activité antimicrobienne des extraits végétaux sur <i>Staphylococcus aureus</i> .	91
Figure 37: Activité antimicrobienne des extraits végétaux sur <i>Escherichia coli</i>	93
Figure 38 : Activité antimicrobienne des extraits végétaux sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	95
Figure 39 : Activité antimicrobienne des extraits végétaux sur <i>Proteus vulgaris</i> .	97

Liste de tableaux

Tableau 1 : Espèces végétales étudiées	41
Tableau 1 : Les principales caractéristiques des spectres UV-visible des flavonoïdes	54
Tableau3: Relation entre l'arrangement des groupements hydroxyles et le maximum d'absorption (Rice-Evans et al. 1996)	55
Tableau4 : Relation entre le Rf et la structure des flavonoïdes	
Tableau 5: Relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes	61
Tableau6 : Résultat de la phytochimie qualitative des extraits hydroalcooliques des différentes espèces végétales	64
Tableau 7: Différentes bandes d'absorption des phases obtenue des extraits de PPI et AHA réalisés dans le méthanol.	67
Tableau8 : screening phytochimique des extraits de AHA, MUV et PPI (Révélation au réactif de NEU)	75
Tableau9 Résultats de la CCM des extraits ED, AC, 1B de AHA, MUV, PPI Système de solvant : acétate d'éthyle/MEOH/H ₂ O (40/4/2) (Révélation au réactif de NEU)	75
Tableau 10 : screening phytochimique des extraits de AHA, MUV et PPI	77
Tableau11 : Résultats de la CCM des extraits ED, AC, 1B de AHA, MUV, PPI Système de solvant : acétate d'éthyl/MEOH/H ₂ O (40/4/2) (révélation réactif Liebermann-Burchard)	77
Tableau12 : screening phytochimique des extraits de AHA, MUV et PPI (Révélation au réactif Fe Cl ₃)	79
Tableau13 : Résultats de la CCM des extraits ED, AC, 1B de AHA, MUV, PPI Système de solvant : acétate d'éthyl/MEOH/H ₂ O (40/4/2)	79
Tableau 14: Souches bactériennes testées	86
Tableau 15 : Effet inhibiteur des extraits végétaux sur la culture de <i>Staphylococcus aureus</i> (exprimé en diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne +/- écart type).	90
Tableau 16 : Effet inhibiteur des extraits végétaux sur la culture de <i>Escherichia coli</i>	92
Tableau 17: Effet inhibiteur des extraits végétaux sur la culture de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (exprimé en diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne +/- écart	94

type)

Tableau 18 : Effet inhibiteur des extraits végétaux sur la culture de <i>Proteus vulgaris</i> (exprimé en diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne +/- écart type).	96
Tableau19 : concentrations des extraits par dosage spectrophotométrique	103
Tableau 20 : Screening antibactérien des extraits vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	103
Tableau 21 : Screening antibactérien des extraits vis-à-vis de <i>Escherichia coli</i>	104
Tableau 22 : Screening antibactérien des extraits vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i>	104
Tableau 23 Screening antibactérien des extraits vis-à-vis de <i>Protéus vulgaris</i>	104

Abréviations

Abs	Absorbance
AC	acétate d'éthyle
ACN	Acétonitril
ADN	Acide désoxyribonucléique
AHA	<i>Artemisia herba alba</i>
AMP	Ampicilline
ARN	Acide ribonucléique
ARN _t	Acide ribonucléique de transfert
ARN _m	Acide ribonucléique messager
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CH ₃ COOH	Acide acétique
CMI	Concentration minimale d'inhibition
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
DCM	Dichlorométhane
DMSO	Diméthylsulfoxyde
<i>E.coli</i>	<i>Eschérichia coli</i>
ED	Ether diéthylique
EP	Ether de pétrole
EtOAc	Acétate d'éthyle
EtOH	Ethanol
FeCl ₃	Chlorure de fer III
HCOOH	Acide formique
HCl	Acide chloridrique
H ₂ O	Eau distillée
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
MUV	<i>Marrubium vulgare</i>
Me OH	Méthanol
MEC	Méthyle éthyle cétone
Moy	Moyenne
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
Neu	Ethyl aminoester de l'acide diphenyl borique
nm	Nanomètre
P	Facteur statistique de comparaison de populations
PPI	<i>Pinus pinaster</i>
<i>Pseudo aéruginosa</i>	<i>Peudomonas aéruginosa</i>
Rf	Rapport frontal
SD	+/- écart type
<i>Staph. auréus</i>	<i>Staphylococcus auréus</i>
TLC	Thin Layer Chromatography
UV	Ultraviolet
δ	Déplacement chimique
λ max	Longueur d'onde maximale d'absorption
ν max	Fréquences d'absorption
1B	1 butanol

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- **Abou El-Hamd H. Mohamed1***, **Magdi. A. El-Sayed2**, **Mohamed E. Hegazy3**, **Soleiman E. Helaly1**, **Abeer M. Esmail1** and **Naglaa S. Mohamed1 (2010)** Chemical Constituents and Biological Activities of *Artemisia herba-alba* *Rec. Nat. Prod.* 4:1 1-25.
- **Abu-Zarga, M., Qauasmeh, R., Sabri, S., Munsoor, M. and Abdella, (1971).** *S. Planta Medica* , 61, 242-245.
- **Agrawal. P. K , . 1989.** Carbon-13 NMR of flavonoids, Elsevier Sci. Publishing Co. Pp 581.
- **Ahmed, A., A., Abou-El-Ela, M., Jakupovic, J., Seif-El-Din, A. A. and Sabri, N(1990)** *Phytochemistry*, 29(11), 3661-3663.
- **Ahmad B, Masoodi MH, Siddique AH, Khan S. A 2010** New Monoterpene Activity. *Natural Product Research*, 24(18), 1671-1680.
- **Aidoud A. (1989).** Les écosystèmes Armoise blanche (*Artemisia herba-alba* Asso). II: Phytomasse et productivité primaire. *Biocénoses* , 1-2 : 70-90.
- **Akrouf Ahmed 1, Hedi Mighri1***, **Mabrouka Krid2, Fatma Thabet2, Hamida Turki2, Hajer El-Jani 1 and Mohammed Neffati1 Mar. 2012** *International Journal of Life Science and Medical Science*, Vol. 2 Iss. 1, PP. 1- 4.
- **Alkurd A., Hamed T. R., Al-Sayyed H., 2008.**Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 4: 265 – 274.
- **Al-Bakri AG, Afifi FU. 2007.** Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *J Microbiol Methods*. Jan;68(1):19-25.
- **Alcama E. I. 1984.** *Fundamentals of Microbiology*. London : Addison-Wesley publishing company : 310-341 ; 617-699.
- **Ali-Shtayeh, MS., Yaghmour, RM-R., Faidi, YR., Salem, K., Al-Nuri, MA. 1998.** Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of ethnopharmacology*, 60,265-271.
- **Aljebouri Huda S. , Thamer M. Jasim, Nadya I. Al-madany 2005** Antibacterial activity of extracts from *Artemisia herba alba* College of Pharmacy , Tikrit University , Tikrit , Iraq *Tikrit Journal of Phamaceuticsl Sciences* 2005, 1(l):71-74
- **Alshamaony, L., Alkhazraji, S., and Twaij, H., J. Ethnopharmacology (1994),** 43(3), 167-171. Jakupovic, J., Chen, Z. L. and Bohlmann, F. *Phytochemistry*, 26(10), 2777-2779.
- **Al-Yahya M.A., 1986,** Phytochemical studies of the plants used in traditional medicine of Saudi Arabia. *Fitoterapia* 57(3), 179-182.
- **Amarowicz, R., Troszynska, A., Shahidi, F. (2005)** Antioxidant activity of almond seed

extract and its fractions. *J food lipids*. **12**: 344-358.

• **Ananil K. , Hudson J. B. de Souzal c., Akpaganal K. , Towe g. H.N. , Amason J. T. and Gbeassor. (2000)**. Investigation of medicinal plants of TOGO for antiviral and antimicrobial activities. *Phannaceutical Biology* **38** (1): 40-45.

• **Baba Aissa F., 2000-** Encyclopedie des plantes utiles. Ed. Librairie moderne, Rouiba, 368 p.

• **Babayi H, Kolo I, Okogum JI. 2004**. The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. *Biochemistri*, 16 (2): 102-5.

• **Bandyukova V. A. . et Shinkareako A. L. 1973**. The thin layer chromatography of flavonoids. *Chemistry of natural compounds.*, **9** (1) : 17-21.

• **Barnes J., Anderson L.A. et Phillipson J.D.; 2007**; Herbal Medicines, Ed 3: Pharmaceutical Press; p: 3- 233.

• **Basile A, Giordano S, Lopez Saez JA, Cobianchi BC. 1999**. Antibacterial activity of pure flavonoïds isolated from mosses. *Phytochem* : 2 (8) : 1419-82.

• **Bataille X. 2000**. LIVRE interactif de chimie.

• **Bauer AW., Kirby Wmm, Sherries JC and Tuck M. (1966)**. Antibiotic susceptibility testing by standardized disc diffusion method. *Am. J. Clin. Pathol.* **45**: 493-496.

• **Bellakhdar. J. 1997**. Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires La pharmacopée marocaine traditionnelle, Ibs Press, 341.

• **Benamar H. et al 2010** ; journal of biological sciences pp1-9

• **Berche P, Gaillard J-L, Simonet M (1989)** Bactériologie: bactéries des infections humaines. Médecine-Sciences Flammarion.

• **Berrougui H, Isabelle M, et al. 2006 Dec**. Marrubium vulgare extract inhibits human-LDL oxidation and enhances HDL-mediated cholesterol efflux in THP-1 macrophage. *Life Sci.* 14;80(2):105-12. Epub 2006 Sep 23.

• **Bérubé-Gagnon, J. (2006)** Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables. Quebec.

• **Bettayeb Abderrahmane Azzaoui Mohamed Essalah 2010**. Etude comparative entre les propriétés physiques de base du bois de pin d'Alep et de pin maritime Université Ibn Khaldoun Tiaret (Algérie) - ingénieur d'état en agronomie .

• **Biallo D., Sanogo R., Yasambou H. et autre (2004)** Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae). *C. R. Chimie.* **7** : 1073-1080.

- **Bolou g.E.K, Attioua B., N'guessan A.C., Coulibaly A.1, N'guessan J.D.1 et Djaman A. J. 2011** Évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium* Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 80, p. 772 – 790.
- **Boriky, D., Berrada, M., Talbi, M., Keravis, G. and Rouessac, F. (1996).** Phytochemistry, 43(1), 309-311.
- **Bottin Lorraine 2006,** Déterminants de la variation moléculaire et phénotypique d'une espèce forestière en milieu insulaire : cas de *Santalum austrocaledonicum* en Nouvelle-Calédonie, Montpellier,Thèse.
- **Boukef M-K. 1986** Médecine Traditionnelle et Pharmacopée L e s plantes de la médecine traditionnelle tunisienne, Agence de Coopération Culturelle et Technique, **163-164**, Paris, France.
- **Boulanger, P., Polonovski, J., Tayeau, F., Mandl,P., Biserte,G. 1966.** Biochimie médicinale-les constituants des organismes vivants, Masson et Cie, Paris 100.
- **BOUTERFA Karim, Zoheir MehdadI, Ali Latreche, Zouaoui Hazem et Nadia Bouredja 2013.** Quantification of some polyphenols of *Marrubium vulgare* L. of Tessala mount (western Algeria) at the vegetative and the flowering periods LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE - Volume 8, N°3.
- **Braithwaite A., Smith F.J. (1999).** Chromatographic Methods. 5ème Ed Kluwer Academic Publishers. London. 548 p.
- **Bruneton J. 1993.** Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales. Paris, éd Technique et Documentation Lavoisier. 915 p.
- **Bruneton, J. (1999),** Pharmacognosie, 3e édition, Tec et Doc, Paris, 310, 316, 619, 620.
- **Bruneton J., (2009).** Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales, 4^e éd., revue et augmentée, Éditions médicales internationales, Tec & Doc, Paris, France.
- **Burchard H.1890** « Beitragezur Kenntnis des Cholesterins », dans *Chem. Zentralbl.*, vol. 61, p. 26.
- **Burke R. W., B. I. Diamondstone, R. A. Velapoldi et O. Menis, 1974,** « Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol », dans *Clin. Chem.*,vol. 20, n° 7, p. 794-801
- **Brzozowska J., Hanower P., 1976.** Recherches sur les composes phénoliques des végétaux et leur rapport avec un déficit hydrique chez des cotonniers. *Annales de l'université d'Abijan, série C (Science)*, tome XII: 65 - 80.

- **Cakir A, Kordali S, Zengin H, Izumi S, Hirata, 2004.** Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. *Flavour Frag J*, 19:62-68
- **Chandler RF, Freeman L, Hooper SN (1979).** Herbal Remedies of the Maritime Indians. *Journal of Ethnopharmacology* 1 (1):49-68.
- **Chatterjee A. 2004.** Inhibition of *Helicobacter pylori* ; in-vitro by various berry extracts with enhanced susceptibility of clarithromycin. *Mol. Cell. Biochem.*, 265(1-2) : 19 – 26.
- **Chung K-t et Wei C-I. (2001).** Are tannins a double edged sword in biology and health., *Trends in Food Science et Technology*, 9:168-175.
- **Clark, A.M. (1996).** *Pharmacol. Res*, 13.
- **Conrad J; Vogler B.; Klaiber I; Roos G., Walter U.; Kraus W.,1998.** Two triterpene esters from *Terminalia macroptera* bark. *Phytochemistry* 48: 647 - 650.
- **Courtios, J.E., Perlés, R. 1971.** Précis de chimie biologique, 2^{ème} édition, Masson et Cie, Paris, 424-437.
- **Cowan M. J. 1999** Plants products as microbial agents. *Clin microbiol rev*, , 12: 564-582.
- **Cristina Lungu Apetrei 1, Cristina Tuchilus 2, Ana Clara Aprotosoai 3, Adrian Oprea 4, Karl Egil Malterud 5 and Anca Miron, 2011.** Chemical, Antioxidant and Antimicrobial Investigations of *Pinus cembra* L. Bark and Needles *Molecules*, 16, 7773 7788;doi:10.3390/molecules16097773
- **Cui XQ, Wang HQ, Liu C, Chen RY (2008).** Study of antioxidant phenolic compounds from stem barks of *Morus yunnanensis* (in Chinese). *Zhonggno Zhong Yao Za Zhi*, 33: 1569-1572
- **Cushnie TP, Hamilthoh VES, Lamb AJ. 2003.** Assesment of the antimicrobial activity of selected flavonoïds and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol Res* :158(4):281-9
- **Da Silva J. A., December 2004.** Mining the essential oils of the Anthemideae. *African Journal of Biotechnology* Vol. 3 (12), 706-720 p.
- **Dacosta, E. (2003).** Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed). Paris, 317p.
- **Dave Oomah B., 2003.** Bulletin IBP, numéro 1, Canada, 2003.
- **Debete Judith M. 2005.** Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpinaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad. Thèse de doctorat de l'université de Bamako.
- **Decaux I. (2002).** *Phytothérapie : Mode d'emploi*. Ed : Le bien public. Pp 6

- **Delmeyda W. 2001.** Méthodes analytiques en chimie instrumentale (site).chromatographie sur couche mince.
- **De Rijke E., Out P., Niessen W M A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U A T., 2006.** Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1112: 31 - 63.
- **Diallo D. (2000).** Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them : *Glinus oppositifolius (Aizoaceae)*, *Diospyros* Thèse de doctorat, Lausanne, 148-176.
- **Didrak M. 1999.** antimicrobial activities of the extracts of various plants (Valex, Mimosa bark, Gallnut pownders, Salvia sp, and Phlomis sp). *Journal of biology.* 23: 241-248.
- **Dixon, R.A; Dey, P. M; Lamb, C. J. (1983).** Phytoalexins: Enzymology and molecular biology, *Adv. Enzymol* ,55 : 1-136.
- **Dohou N ., Yani K ., Thahrouch S ., Idrissi Hassani L-M ., Badoc A ., G mira N.(2003).** Screening phytochimique d'une endémique ibéro- Marocaine; *Thynelaea lythroides* Bull..Soc.Pharm.Bordeaux.142:61-78.
- **Doughari et al., (2007).** Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 80, 2011, p. 772 – 790778.
- **Duval J.; Soussy C.Y. (1985).** Abrégé Antibiothérapie. 3ème édition Masson M, Paris. P 180.
- **Dykes L., Rooney LW. 2006.**Sorghum and millet phenols and antioxidants. *Journal of cereal Sciences* 44: 236 - 241.
- **Ekoumou C. 2003.** . Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite Thèse de doctorat de l'université de Bamako.
- **Elberry Ahmed A. , Fathalla M. Harraz , Salah A. Ghareib , Salah A. Gabr , Ayman A. Nagy , Essam Abdel-Sattar, 2011.** Methanolic extract of *Marrubium vulgare* ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats *International Journal of Diabetes Mellitus* (2011).
- **Erdogrul, O.T. 2002.** Antibacterial activities of some plant extracts used in folk medicine. *Pharmaceutical Biology*, 40(4): 269-273.
- **Epifano F., Genovese S., Menghini L. and Curini M. 2007.** Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*; 68: 939-953.
- **Faizi, S., R.A. Khan, S. Azher, S.A. Khan, S. Tauseef and A. Ahmad, 2003.** New antimicrobial alkaloids from the roots of *Polyalthia longifoliavar. pendula*. *Planta Medica*, 69: 350-355.
- **Farjon A (1984).** Pines: Drawings And Descriptions Of The Genus *Pinus*. 2ème edn. *E.J. Brill*, Leiden, Pays-Bas, p 235.

- **Farnsworth R.N. 1966.** Review on Biological and phytochemical screening of plants. *J. pharm Sci*, **55**(3), 225-276.
- **Fattorusso W. ; Ritter. O. (2001).** Vademecum cliniques, Du diagnostique au traitement. 16ème édition Masson m, Italie. P 1915.
- **Feinbrun-Dothan Naomi. 1978.** Flora Palaestina. Part Three: Text - Ericaceae to Compositae / Jerusalem : Israel Academy of Sciences and Humanities,. — 481 p.
- **Ferrari, J. (2002).** Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles: *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. Thèse de doctorat. Lausanne.
- **Feuerstein, D. Mueller, K. Hobert, A. Danin and R. Segal (1986).** Constitution of essential oils from *Artemisia herba-alba* populations of Israel and Sinai. *Phytochemistry*, **25**, 2343-2347.
- **Ferron, A. 1976.** Bactériologie médical à l'usage des étudiants en médecine. 8ème édition. Ed. Groun et Roques, France.
- **Finar, I 1994.** Organic chemistry-stereochemistry and the chemistry of natural products, 5ème edition, Great Britain, 518.
- **Fleuriet A., Jay-Allemand C., Macheix J.J., 2005.** Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes* pp 121-216.
- **Francis Joannès, 2001.** Dictionnaire de la civilisation mésopotamienne. Ed Robert Laffont, ISBN 2221092074.
- **Gàbor M, Cody V, Middleton E J, Harborne J B, Beretz A, Liss A R, 1988.** Plants Flavonoids in biology and Medecine II; Biochemical, Cellular and Medecinal properties. New York, 1-15 p.
- **Gacem Mohamed Amine 2011. Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogène des extraits méthanolique et aqueux des graines de Citrullus colocynthis sur la croissance de quelque moisissure d'altération de blé tendre stocké.** Thèse Université Kasdi Merbah-Ouargla Faculte des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers *département des sciences de la nature et de la vie*
- **Gharabi Z Sand RL (2008).** *Artemisia herba alba* Asso. *A Guide to Medicinal Plants in North Africa* : 49 - 49.
- **Grassé, P. P., Lavcolette, P., Holland, A., Nigon, V., Wolf, E. 1969.** Biologie général, Paris, 193.
- **Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2006).** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **41**: 1220-1234.

- **Gordon, M. M. D. V. Derveer and L. H. Zalkow (1981).** New germacranolides from *Artemisia herba-alba*. XRAY crystal structures of 3,8-dihydroxy-6H,7H,11H-germacran-4(14), 9(10)-dien-6,12-olide and the corresponding 3-oxo-olide. *J. Nat. Prod.*, **44(4)**, 432-440.
- **Grosmond, G. (2001).** La phytothérapie Bulletin des GTV, HS : Elevage et agriculture biologique, 143-145 Métabolites des plantes.
- **Grünz G., Daniel H. and Spanier B., 2010.** *In vivo* visualization of flavonoids in *C. elegans* using 2-aminoethyl diphenyl borate. *The worm breeder's gazette* **18** : 1
- **Guignard J.L., 1996.** Abrégé de biochimie végétale, Ed. Masson, Paris, 160 p.
- **Guo, T.; Wei, L.; Sun, J.; Hou, C.; Fan, L. 2011.** Antioxidant activities of extract and fractions from *Tuber indicum* Cooke & Masee. *Food Chem*, *127*, 1634-1640.
- **Hans W. K. 2007.** 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition. p6-7.
- **Hamza T (1993).** Introduction à la biologie moderne. Berti Editions.
- **Harborne J.B. 1973.** Phytochemical method. Chapman and Hall, Ltd, London.
- **Hartmann, T., (2007).** From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism, Review. *Phytochemistry* *68* 2831–2846.
- **Hellen K. Stulzer , Monika P. Tagliari , Julio A. Zampirolo ,Valdir Cechinel-Filho , Valfredo Schlemper, (2006).** Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*, *Journal of Ethnopharmacology* ,*108* 379–384.
- **Hemingway, R.W. (1992).** Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: *Lpant polyphenols: synthesis, proprieties, significande*. Laks P.E, Hemingway R.W New York.
- **Hennebelle, T., S. Sahpaz, A.L. Skaltsounis and F. Bailleul, 2007.** Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum*. *Biochem. Syst. Ecol.*, *35*: 624–626.
- **Herrera-Arellano, A. A. L. Aguilar-Santamaria, B. Garcia-Hernandez,P. Nicasio-Torresa, J. Tortoriello, (2004) .** Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics, *Phytomedicine*, *11* 561–566.
- **Hill, R.S., Making,H.L.Jm Kirk,D.N.M:urphy,G.M. 1991.** Dictionary of steroids-chemical data-structures and bibliographies, London,Chapman&Hall.
- **Hivin Bénédicte, 2008.** *Phytothérapie et aromathérapie en élevage biologique bovin enquête auprès de 271 éleveurs de France* thèse présentée à l'université Claude-Bernard - Lyon I (Médecine – Pharmacie).

- **Hnatyszyn, O. A.L.Bandoni, R.V.D.Rondina, and J.D.Coussio, (1994).** "Screening of Argentine Plants for Aliphatic Nitro Compounds. Glycosides from Some Butterflies and Their Larval Food Plants', *Phytochemistry*, 37, 997-999
- **Hong, E. J.; Na, K. J.; Choi, I. G.; Choi, K. C; Jeung, E. B.; 2004.** Anticacterial and Antifungal Effects of Essentials Oils from Coniferous Trees. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*: 27 (6), p. 863-866.
- **Hostettmann K., Hostettmann M., Marston A., Saponins, 1991.** [In] *Methods in Plant Biochemistry, Terpenoids, Vol. 7*, B.V. Charlwood, D.V. Banthorpe Editor. London: Academic Press., p. 435-471
- **Hsiou-Y.Ding, Yang-ch. Wu, and Hang-Ch.Lin, 2000.** *Journal of the Chinese chemical society*. Vol 47,561-566
- **Hu, J. F., Bai, S. P. and Jia, Z. J. (1996).** *Phytochemistry*, 43(4), 815-817.
- **Hu, J. F., Zhu, Q., Bai, S. P. and Jia, Z. J. (1996).** *Planta Medica* 62, 477-478.
- **Hull S. E. and O. Kennard (1978).** 9_ -Acetoxy-6(_ H),11(_ H)germacra-1_ ,10_ - epoxy,4(5)trans-ene-6,12- olide, C17H24O5. *Crystal Structure Communications*, 7(1), 85-90.
- **Igor Passi, L.B. (2002).** Etude des activités biologique de *Fagara zanthoxyloïdes, lam* (Rutaceae). Thèse de pharmacie, Bamako, p 133.
- **Ilic SB, Konstrantinovic SS, Todorovic ZB. 2004.** Antimicrobial activity of bioactive component from flower of *Linum capitatum* Kit. *Physics, chemistry and technology* : 3(1), page : 73-77.
- **Iserin, P, 2001.** Larousse Encyclopédie des plantes médicinales. Ed Larousse, pp10,335.
- **Issan çalis, Mohamed Hosny,Taha Khalifa, Peter Rüedi, (1992).** Phenylpropanoïd glycosides from *Marrubium alysson*, *Phytochemistry*, Vol. 31, 10 ,3624 -3626.
- **Ito T, Ali Z, Furusawa M, Iliya I, Tanaka T, Nakaya K, Murata J, Darnaedi D, Oyama M, Iinuma M (2005).** New resvertrrol tetramers from the stem bark of *Upuna borneensis*. *Chem. Biodivers*, 12: 1673-1684.
- **Jakupovic, J., Chen, Z. L. and Bohlmann, F. (1987).** *Phytochemistry*, 26(10), 2777-2779.
- **Jouda Mohamed Mahmoud 2013.** The Antibacterial Effect of Some Medicinal Plant Extract and their Synergistic Effect with Antibiotic and Non-antibiotic Drugs By Islamic University-Gaza Deanship of Graduate Studies Faculty of Science Biological Sciences Master Program p.102
- **Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A. et Stevens P.; 2002.** *Botanique Systématique: une perspective phylogénétique*; Ed 1: DEBOECK; p: 84-336.
- **Jung, M. J.; Chung, H. Y.; Choi, J. H.; Choi, J. S.; 2003.** Antioxidant Principles from the Needles of Red Pine, *Pinus densiflora*. *Phytotherapy Research*: 17, p. 1064-1068.

- **Jurd, L. and Horowitz, R. (1962).** Spectral properties of flavonoid compounds, pergamon press, Oxford, 107-2055.
- **Ka, M. H.; Choi, E. H.; Chun, H. S.; Lee, K.-G.; 2005.** Antioxydante Activity of Volatiles Extracts Isolated from *Angelica tenuissimae* Roots, Peppermint Leaves, Pine Needles, and Sweet Flag Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 53, p. 4124-4129.
- **Kabran Gay Roger et al 2011.** European Journal of scientific rescearh, vol.63 n°4 pp592-603
- **Kartal, M., Mitaine-Offer, A.C., Abu-Asaker, M., Miyamoto, T., Calis, I., Wagner, H., Lacaille-Dubois, M.A; 2005.** Two new triterpene saponins from *Eryngium campestre*; Chem. Pharm. Bull; 318–1320; 53.
- **KARUMI, Y., ONYEYILI, P.A. & OGUGBUAJA, V.O., 2004.** Identification of active principals of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *J Med Sci* 4, 179-182.
- **Khafagy, S., M. Gharbo, S., A. And Sarg, T., M., (1971).** *Planta Medica*, 20,90.
- **Kirby, G.C. (1996).** *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90 605-609.
- **Klaas, C. A., Wagner, G., Laufer, S., Sosa, S., Loggia, R. D., Bomme, U., Pahl, H. L. and Merfort, I. (2002).** Studies on the anti-Inflammatory Activity of Phytopharmaceuticals prepared from *Arnica* flowers, *Planta Med.*, 68, 385-391.
- **KOFFI, N., BEUGRÉ, K., GUÉDÉ, N., ZIRIHI, D. & LAURENT, A., 2009.** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature* 6 (1), 1-15.
- **Kwak, J. H., Jang, W. Y., Zee, O. P. And Lee, L. R. Planta Medica (1997).** (63), 474-476.
- **Laid, M. M-E. F. Hegazy and A. A. Ahmed. (2008).** Sesquiterpene lactones from Algerian *Artemisia herbaalba*. *Phytochemistry lett.*, 1, 85-88.
- **LaFever, R. E.; Vogel, B. S.; Croteau, R.; 1994.** Diterpenoid Resin Acid biosynthesis in Conifers: Enzymatic Cyclization of Geranylgeranyl Pyrophosphate to Abietadiene, the Precursor of Abietic Acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*: 313 (1), p. 139-149.
- **Lahouel M. 2005.** Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine.
- **Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE (2001).** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Appl. Microbiol.* 91: 453-462.
- **Latifou L. 2005.** Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Thèse de doctorat de l'université Louis Pasteur de Strasbourg.

- **Latte LP, Kolodziej H. 2000.** Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi and yeasts. *Naturforsch*, 5 (5-6): 467-72.
- **Lebham, (2005).** Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer. (IVEM). Université de Bretagne Occidentale (UBO).
- **Lechat P.; Lagiers G.; Rouveix B. ; Vincens M.; Weber S. (1992).** Abrégé de pharmacologie médicale. 4ème édition Masson M, Paris. P 764.
- **Leclerc H, Gaillard J-L, Simonet M (1995).** Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Doin Editeurs, Paris.
- **Leitao DP, Polizello AC, Ito IY, Spadaro AC. 2005.** Antibacterial screening of anthocyanic and proanthocyanic fractions from cranberry juice. *J. Med. Food*, 8 (1): 36-40.
- **Liebermann, N. C.** « Über das Oxychinoterpen », dans *Ber.*, vol. 18, 1885, p. 1803.
- **Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y. (2007).** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*. **102**: 771-776.
- **Lock O., Cabello I, Doroteo V. H. (2006).** Analysis of flavonoids in plants. *Current Medicinal Chemistry*. **20** : 6-11.
- **Louis S., 2004.** Diversité structural et d'activité biologique des Albumines entomotoxiques de type 1b des légumineuses. Thèse de doctorat. Lyon, 259p.
- **Mabry T.J., K.R Markham,. And M.B Thomas, 1970.** The systematic identification of flavonoids. Springer-verlag, Berlin
- **Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. [Eds] 1997.** Biology of Microorganisms, 8th ed. Prentice Hall Upper Saddle River Press, London, 986 pp.
- **Maimoona A, Naeem I, Saddiqe Z, Jameel K (2011).** A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. *Journal of Ethnopharmacology* 133 (2):261-277.
- **Malec, L.S. & Pamilio, A.B., 2003.** Herbivory effects on the chemical constituents of *Bromus pictus*. *Molecular Medicinal Chemistry* **1**, 30-38.
- **Mamatha B. 2005.** Screening of medicinal plants used in Rural Indian Folk medicine for treatment of diarrhea
- **Manach C., Scalbert A., Morand C., Jiménez L., 2004.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79:727 - 747.

- **Mann, J., Davidson, R.S., Hobbs, J.B., Banthorpe, D.V., Harborne, J.B. 1994.** Natural products: Their chemistry and biological significance, 1ère édition, Longman, England, 331-343,
- **Marc T.; Gerard W.; Denis L (2001).** Classification des anti-inflammatoires *in* Guide pharmacologie. Etudiants et professionnels paramédicaux. 4ème Edition. P 426.
- **Marco, J., A. (1989)** Phytochemistry, 28(11), 3121-3126.
- **Marco J. A., J. F. Sanz-Cervera and G. Ocete (1994).** New germacranolides and Eudesmanolides from north African *Artemisia herba-alba*. *J. Nat. Prod.*, **57(7)**, 939-946.
- **Mariana Royer, Ph.D. Robert Houde, M.Sci Tatjana Stevanovic, ing., Ph.D. 2010.** Département des sciences du bois et de la forêt, CRB, Université Laval Potentiel de Développement lié aux extractibles : État des connaissances et revue des marchés
- **Marjorie M. C. (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 564-582.
- **Markham, K. R. (1982).** Technique of flavonoids identification, Academic press, London.
- **Markham, K.R. and Mabry, T.J. (1968).** Phytochemistry, 7, pp. 1197.
- **Markham.K.R. . 1989.** Methods in plant biochemistry. Acad. Press Ltd
- **Martini A, Katerere DR, Eloff JN. 2004.** Seven flavonoïds with antibacterial activity isolated from *Combretum erythrophyllum*. *J Ethnopharmacol*:93 (2-3): 207-12
- **Matkowski A, Piotrowska M. 2006.** Antioxydant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia*.; 77(5):346-53. Epub 2006 May 19.
- **Merghem R., Jay M., Viricel Viricel M.R., Bayet C., et Voirin B. 1995.** Five 8-C-benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiataea). *Phytochemistry*, **38** : 637-640.
- **Merikli, A., H. Cubuken, B., Jakupovic, J. and Özhatay, N. (1988).** *Planta Medica*, 463-464.
- **Meyre-Silva .C, Yunes RA, Schlemper. V, campos-Buzzi .F and Cechinel- Filho .V.(2005).** Analgesic potential of Marrubiin derivatives, abioactive diterpen present in *Marrubium vulgare* (lamiaceae). *Il Farmaco*. **60**: 321-326.
- **Millogo-Koné H., Asimi S., Guissou IP., Nacoulma OG. 2008.** Etude de l'activité antimicrobienne d'extraits de *parkia biglobosa* (jacq.) benth. sur des souches de *staphylococcus aureus*. *Pharmacopée et Médecine traditionnelle Africaines*, 15 : 1 – 5
- **Modak B. 2001.** Actividad antibacteriana de flavonoïdes aïslados des exudado resinosa de *Heliotropium sinuatum*. Efecto del tipo de estructura. *Bol Soc Quim*: 47(1): 366-421.

- **Mojab, F., Kamalinejab, M., Ghaderi, N. & Vahidipour, H.R., 2003.** Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 77-82.
- **Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Nojnov R. 2006.** Antioxydant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Rad Res*: 40(2): 223-31.
- **Moufid Abderrahmane and Mohamed Eddouks, 2012.** Faculty of Sciences and Techniques Errachidia, B.P., 21, Errachidia, 52000, Morocco Pakistan Journal of Biological Sciences 15(24);1152-115.
- **Moussaid Mina, Abdel aziz Elamrani, Chadi Berhal, Hassane Moussaid, Nouredine Bourhim, Mouhamed Benaissa. 2012.** Comparative evaluation of phytochemical and antimicrobial activity between two plants from the *Lamiaceae* family: *Marrubium vulgare (L.)* and *Origanum majorana (L.)* International Journal of Natural Products Research 1 (1): 11-13
- **Muhtadi, Hakim EH, Juliawaty LD, Syah YM, Ahmad SA, Latip J, Ghisalberti EL (2006).** Cytotoxic resveratrol oligomers from the tree bark of *Dipterocarpus hasseltii*. *Fitoterapia*, 77: 550-555.
- **Nabli M. A., 1989.** Essai de synthèse sur la végétation et la phyto-écologie tunisiennes, tome I. Ed. MAB (Faculté des sciences de Tunis) ; 186-188 p.
- **Naghibi F, Mosaddegh M, Mohammadi Motamed S & Ghorbani A. 2005.** Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. *Iran. J. Pharm. Res.* 2: 63-79.
- **Newman, D.J. ; Cragg, G.M. et Snader, K.M., (2000).** *Natural Prod. Rep.* 17 175-285.
- **Novak, I. ; Buzas, G. ; Minker, E. ; Kolfai, M. et Szendrei, K. 1966.** *Planta med.*, 14, p: 57.
- **Okigbo RN, Mbajinka CS, Njoku CO. 2005.** Antimicrobial potentials of (UDA) *Xylopiya aethiopica* and *Occinum gratissimum L.* some pathogenous of man. *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci.*, 1 (4): 392-7.
- **Oleszek W, Sitek M, Stochmal A, Piacente S, Pizza C, Cheeke P(2001).** Resveratrol and other phenolics from the bark of *Yucca schidigera* Roezi. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 747-752.
- **Osato M. 2009.** Comparison of the Etest and the NCCLS-approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 17 (1): 39-44.
- **Oyedeji O, Afolayan A 2005.** Comparative study of the essential oil composition and antimicrobial activity of *Leonotis leonurus* and *L. ocyimifolia* in the Eastern Cape. *African J Bot*, 71:114-116.
- **Ozenda P. 1977.** Flore du Sahara, Ed. CNRS, Paris, France, 250-259,
- **Packer L, Rimbach G, Virgili F (1999).** Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radic Biol Med* 27 (5-6):704-724.

- **Paris , R ; et Moyses, H. (1969).** Précis de matière médicale. Paris : Masson.
- **Paulo Brito\ Una pepin01, Fernando Caldeira Jorge2, Rui Pereira da Costa2, M. Helena Gil1& António português October 2000.** Characterization of Condensed Tannin Extracts from Pinus pinaster Bark The second International Conference on Biopolymer Technology 25-27, Ischia, Italy BIOPOLYMER-NC
- **Phillips, M. A.; Croteau R. B.; 1999.** Resin-based defenses in conifers. *Trends in plant science, reviews:* 4 (5), p. 184-190.
- **Pichard E.; Beytout J.; Delmon J.; Marchou B. (2002)** Malintrop afrique (Manuel de Maladie infectieuse pour l'Afrique, Edition John Libbey Eurobest 127, Montrouge. P 589.
- **Pichersky, D E. R.Gang, , 2000.** *TIPS*, Vol. 5, 439-445.
- **Pocidalo J-J (1989)** Des infections d'origine microbiennes ou virale. In: Brisset C et Stoufflet J (Directeurs) Santé et médecine, l'état des connaissances et des recherches. Editions LaDécouverte / INSERM / ORSTOM.
- **Prasad, M.M., Seenayya, G. (2004).** Effect of spices on the growth of red halophilic cocci isolated from salt cured fish and solar salt. *Food Research International.* **33**: 793-798.
Proestos, C., Sereli, D., Komaitis, M. (2006) Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chem.* **95**: 44-52.
- **Price RA, Liston A, Strauss SH (1998).** Phylogeny and systematic of *Pinus*. In: Richardson DM (ed) *Ecology and biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge, Royaume-Uni, pp 49-68.
- **Proksch P (1992).** *Orthosiphon aristatus* – Der Katzenbart. Pflanzeninhaltsstoffe und ihre potentielle diuretische Wirkung. *Z Phytotherapie* 13: 63- 69
- **Pullaiah T (2006).** Encyclopedia of World Medicinal plants, vol 3. Regency publication, Engelwood, Etats-Unis, p 2442.
- **Quezel. F et Santa. S. 1962-1963.** Nouvelle Flore de L'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Vol. 1-2, **801-802**, Ed.CNRS, Paris France,.
- **Rahal, S. 2004.** Chimie des Produits Naturels et des Etres Vivants, 39-44 ;
- **Recio,M.C; Rios, J. L;Villar, A. (1989).** A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988, *Phototherapy. Res.*, 3, 117-125
- **Rice – Evans CA, Miller NJ, Pagang G (1996).** Structure- antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 20: 933-956.
- **Rice-Evans, C.A; Miller, N. J; Bolwer, P.G; Bramley, P.M. and Ridham, J.B. (1995).** The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Rad. Res.*, 22: 375-383

- **Rigano D, Formisano C, et al.** Antibacterial activity of flavonoids and phenylpropanoids from *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum*. *Phytother Res.* 2006 Dec 21; [Epub ahead of print]. *Res.*, 21: 395–397.
- **Rios J. L., Recio M. C., Villar A. 1988.** Screening methods for natural products with antimicrobial activity : a review of literature. *J ethnopharmacol.* ; 23 : 127-149.
- **Rizk A.M., 1982.** Constituents of plants growing in Qatar: A chemical survey of sixty plants. *Fitoterapia*, 52(2), 35-44. 275-283.
- **Robbers et al, Robbers, J.E., Speedie, M.K., Tyler, V.E., 1996.** Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology. Williams & Wilkins, Baltimore.
- **Rohdewald P (2002).** A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medicine with a diverse clinical pharmacology. *Int. J. Clin. Pharmacol. Therap.*, 40: 158-168.
- **Rojas A., Hernandez L., Pereda-Miranda R., Mata R. (1992).** Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacology*. 35 : 275-283
- **Romani, A.; Ieri F.; Turchetti, B.; Mulinacci, N.; Vincieri, F. F.; Buzzini, P.; 2006.** Analysis of condensed and hydrolysable tannins from commercial plant extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomédical Analysis*: 41, p. 415-420.
- **Rowe J. W.; 1989.** Natural Products of Woody Plants vol. 1 et 2. Springer Verlag, Berlin, p. 371; b) 384; c)p. 513; d) p. 785.
- **Sagdiç O. (2003).** Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 36: 467-473.
- **Sahpaz S, Hennebelle T, Bailleul F. 2002.** Marruboside, a new phenylethanoid glycoside from *Marrubium vulgare* L. *Nat Prod Lett* ;16(3):195-9.
- **Sakagami H., Hashimoto K., Suzuki F., Ogiwara T., Satoh K., Ito H., Hatano T., Takashi Y., Fujisawa S., 2005.** Molecular requirements of lignin–carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry* 66: 2108 - 2120.
- **Saleh N., El-Nougoumy S., Abd-Allah M., Abou-Zaid M., Dellmonica G. ,Chopin J., (1985).** *Phytochemistry* 24(01): 201- 203.
- **Saleh, N. A. M. S. I. El-Negoumy and M. M. Abou-Zaid (1987).** Flavonoids of *Artemisia judaica*, *A. monosperma* and *A. herba-alba*. *Phytochemistry*. 26 (11), 3059-3064.
- **Scalbert A.1991.** Antimicrobial properties of tanins. *Phytochemistry*, 30 : 3875-3883.
- **Schlemper V, Ribas A, Nicolau M, Cechinel-Filho V. (1996).** Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract of *Marrubium vulgare* on isolated tissues. *Phytomedicine*. 3: 211-216.

- **Seddik, K., I. Nadjet, B. Abderrahmane, H. Daoud and A. Lekhmici. 2010.** Antioxidant and antibacterial activities of extracts from *Artemisia herba alba* Asso., leaves and some phenolic compounds. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(13): 1273-280.
- **Segal, R. D. Cohen, S. Sokoloff and D. V. Zaitschek (1973).** New flavone from *Artemisia herba-alba*. *Lloydia*, 36(1), 103-5.
- **Segal, R. S. Sokoloff, B. Haran, D. V. Zaitschek and Lichtenberg (1977).** New sesquiterpene lactones from *Artemisia herba-alba*, *Phytochemistry*, 16, 1237-1241.
- **Sellami S., Mezrket A. et T. Dahmane (2010).** activité nématicide de quelques huiles essentielles 6+contre meloidogyne incognita *Nematol. medit.*, 38: 195-201 195
- **Senthilmohan ST, Zhang J, Stanley RA (2003).** Effects of flavonoid extract with vitamin C on protein oxidation and DNA damage in older human subjects. *Nutr. Res.*, 23: 1199-1210.
- **Sharma, S., K. And Ali, M., J. (1991).** *Nat. Prod.*, 59, 181-184.
- **Shunying Z., Yang Y., Huaidong Y., et al. (2005).** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *J. Ethnopharmacol.* 96 : 151-158.
- **Sine J. P. 2003.** Séparation et analyse des biomolécules : méthodes physicochimiques cours et exercices. Ellipses éditions marketing S A. p 99-101.
- **Sivakumaran S, Molan AL, Meagher LP, Kolb B. 2004.** Variation in antimicrobial action of pranthocyanidins from *Dorycrum rectum* against rumen bacteria. *Phys Chem*: 5(3):106-111.
- **Slavica B, Ilic SSK, B. Zoran BT. 2004.** Flavonoids from flower of *Linum capitatum* kit. *Phys. Chem. Technol.* 2004, 3: 67-71.
- **Sofowora A., 2010.** Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Edition Karthala p.22
- **Soldermann, N. juin 2002.** « Etude et développement du processus Tandem réaction de Diels Alder/réarrangement de Ireland-Claisen : Application à la synthèse de la Juvabione », These de Doctorat. Université de Neuchâtel,.
- **Spichiger R. E., Vincent V., Figeat S. M. et Jeanmonod D., 2004.** Botanique systématique des plantes à fleurs : une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales. 3eme édition. Lausanne : Presses polytechniques et universitaires romandes, Français, 413p.
- **Stahl, E., Schild, W. (1981).** *Pharmazeutische Biologie – 4. Drogenanalyse II : Inhaltsstoffe und Isolierungen.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, p. 307.
- **Stermitz, F.R., O.Hnatyszyn, A.L.Bandoni, R.V.D.Rondina, and J.D.Coussio, (1994).** "Screening of Argentine Plants for Aliphatic Nitro Compounds. Glycosides from Some Butterflies and Their Larval Food Plants", *Phytochemistry*, 37, 997-999

- **Stöckigt J., Sheludko Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H., Stöckigt D., 2002.** High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic-electrospray ionization mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of chromatography A* 967: 85-113.
- **Suga, T.; Ohta, S.; Munesada, K.; Ide, N.; Kurokawa, M.; Shimizu, M.; Ohta, E.; 1993.** Endogenous Pine Wood Nematicidal substances in Pines, *Pinus Massoniana*, *P. strobus* and *P. Palustris*. *Phytochemistry*: 33 (6), p. 1395-1401.
- **Tallent, W. H.; Stromberg, V. L.; Horning, E. C; 1955,** *Pinus* Alkaloids. The Alkaloids of *P. sabiniana* Dougl. And related Species. *Journal of American Chemical Society*: 11, p. 6361-6364.
- **Tapias R, Climent J, Pardos JA, Gil L (2004).** Life histories of Mediterranean pines. *Plant Ecology* 171 (1-2):53-68.
- **Tawara, J. N.; Blokhin, A.; Foderaro, T. A.; Stermitz, F. R.; 1993.** Toxic Piperidine Alkaloids form Pine (*Pinus*) and Spruce (*Picea*) Trees. New Structures and a biosynthetic Hypothesis. *Journal of Organic Chemistry*: 58, p. 4813-4818.
- **Thangara J. H. S., Adjei O., Allen B. W., and Portaels F., (2000).** *In-vitro* activity of ciprofloxacin, sparfloxacin, ofloxacin, amikacin and rifampicin against Ghanaian isolates of *Mycobacterium ulcerans*. *Journal Antimicrobial Agents Chemoter*, 45 (2), , 231-233.
- **Tsitsimpikou, C; Petrakis, P. V.; Ortiz, A.; Harvala, C; Roussis, V.; 2001.** Volatile Needle Terpenoids of Six *Pinus* Species. *J. Essent. Oil Res.*: 13, p. 174-178.
- **Turk J Biol 36 (2012). 75-84 c Tubitak doi:10.3906/biy-0912-27**
Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L. species from western Anatolia
- **Ulanowska K .2006.** Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbial.* 184 (5): 271-8.
- **Ultee A., Slump R. A., Steging G. Smid E. J. (2000).** Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *J. of Food Protection.* 620-624.
- **VanderJagt, T.J. R. Ghattas, D.J VanderJagt, M. Crossey, R.H Glew, (2002).** Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico, *Life Sciences*, 70 1035–1040.
- **Veličković, A.S., Ristić, M.S., Veličković , D.T., Ilić, S.N., and Mitić, N.D.J. 2003.** .Serb. Chem. Soc. Vol 68 (6), 435-445.
- **Wagner, H. and Bladt, S., 1996.** *Plant drug analysis*, Springer, Berlin.

- **Wagner H.**, Pharmazeutische Biologie. Drogen und ihre Inhaltsstoffe, Gustav Fischer Verlag. Stuttgart-New-York, 50 p.
- **Weber, H.A., A.E. Hodges, J.R. Guthrie, B.M.O'Brien, D. Robaugh, A.P. Clark, R.K. Harris, J.W. Algaier, and C.S. Smith. 2007.** . Comparison of proanthocyanidins in commercial antioxidants: Grape seed and pine bark extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:148-156.
- **Willfor S. M.; Ahotupa, M. O.; Hemming, J. E.; Reunanen, M. H. T.; Eklund, P. C; Sjöholm, R. E.; Eckerman, C. S. E.; Pohjamo, S. P.; Holmbom, B. R.; 2003a.** Antioxidant activity of Knotwood Extractives and Phenolic Compounds of Selected Tree Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 51, p. 7600-7606.
- **Willfor, S.; Hemming, J.; Reunanen, M.; Holmbom, B.; 2003b.** Phenolic and Lipophilic Extractives in Scots Pine Knots and Stemwood. *Holzforschung*: 57, p. 359-372.
- **Wollgast J., Anklam E., 2000.** . Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* 33: 423 - 447.
- **Wright CW. 2002.** *Artemisia*. Taylor & Francis. New York.
- **Yano, Y., Satomi, M., Oikawa, H.(2006).** Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International J Food Microbiology*. **111**: 6-11.
- **Yashphe, J. I. Feuerstein, S. Barel and R. Segal (1987).** The antibacterial and antispasmodic activity of *Artemisia herba-alba* Asso. II. Examination of essential oils from various chemotypes. *Int. J. Crude-Drug- Res.* **25 (2)**, 89-96.
- **Yesil CO, Otto F, Parar H (2009).** A comparative study of flavonoid contents and antioxidant activities of supercritical CO₂ extracted pine barks grown in different regions of Turkey and Germany. *Eur. Food Res. Technol.*, 229: 671-677.
- **Youngken HW (1924.)** The drugs of north American Indian II. *AM J Pharmacol* 97:257-271.
- **Yu, E. J.; Kim, T. H.; Kim, K. H.; Lee, H. J.; 2004.** Aroma-active compounds of *Pinus densiflora* (red pine) needles. *Flavour and Fragrance Journal*: 19, p. 532-537.
- **Zenk, M.H., Juenger, M. (2007).** Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry Review* 68, 2757 – 2772.
- **Zhang, Wen Jing, b Lars Olof Björn (2009)** The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants *Fitoterapia* FITOTE-01795; No of Pages 12
- **Zheng, W., F. Tan, R., X., Yang, L. and Liu, Z., L. (1996).** *Planta Medica*, 62, 160-162.

- **Zinkel, D. F.; Russel, J.; 1989.** Naval Stores: Production, Chemistry, Utilization. Pulp Chemicals Association, New-York, a) p. 227-229; b) p. 262-270.(a)
- **IPNI.** The International Plant Name Index.
- **CIRAD (2012b)** Tropix 7 - Pin Maritime. *Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement*, Paris, France.
- **NCCLS., (2002).** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. 12th informational supplement. **NCCLS** document, (2002) ; M100-S12. National Committee for clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- **NCCLS. (1999).** Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved guideline, M26-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

Evaluation chimique et activité antibactérienne de quelques plantes médicinales d'Algérie

Résumé

Les plantes médicinales constituent une source immense de molécules bioactives, dotées de nombreuses activités. L'objectif de notre travail est de réaliser une étude phytochimique et biologique des extraits hydroalcooliques et des phases acétate d'éthyle (AE), étherdiéthyle (ED) et 1 butanol (1B) de l'écorce de *Pinus pinaster* (PPI), des sommités fleuris de *Marrubium vulgare* (MUV) et des parties aériennes d'*Artemisia herba alba* (AHA). Ces trois espèces de plantes algériennes sont utilisées en médecine traditionnelle.

Le criblage phytochimique a montré que les trois plantes contiennent des flavonoïdes, des stérols et terpènes, des tanins et des coumarines. En revanche seul PPI renferme des alcaloïdes.

L'analyse spectrale des extraits méthanoliques met en évidence la présence de flavonoïdes de nature Flavonol, Flavone, Flavanone, Flavanol ou Anthocyane.

Des travaux ont été effectués dans le but de mettre en évidence *in vitro* les propriétés antibactériennes des extraits hydroalcooliques et les phases AE, ED et 1B des écorces de *pinus pinaster*, des sommités fleuries de *marubium vulgare* et de la partie aérienne d'*Artemesia herba alba* obtenus après épuisement par des solvants organiques à polarité croissante. Toutes les plantes se sont révélées actives sur une ou plusieurs bactéries à 25 mg/ml, les effets des extraits ont été comparés à celle de l'ampicilline, un contrôle positif. Par la méthode de diffusion en milieu solide (disque), et la méthode de diffusion en milieu liquide (CMI), les deux extraits PPI et MUV ont montré une activité antibactérienne plus élevée sur *Escherichia coli* que l'extrait AHA, les zones d'inhibition ont été de 14.33 ± 3.51 et 15.33 ± 2.08 mm respectivement. Cette importante activité a été manifestée sur *Escherichia coli* avec une CMI de 0.195mg/ml. L'extrait hydroalcoolique de AHA a révélé une activité significative par rapport au contrôle positif (AMPIC) égale à 19 ± 1.00 avec une CMI de 0.097 mg/ml sur *Pseudomonas aeruginosa*. Un diamètre d'inhibition de 10 ± 1.00 mm a été observé avec l'extrait hydroalcoolique de MUV contre *Proteus vulgaris* pour une CMI égale à 0.048mg/ml. Les extraits MUV, AHA et PPI se sont révélés actifs avec des diamètres d'inhibition de 16.66 ± 1.53 , 13.66 ± 3.21 et 12.33 ± 2.52 respectivement contre *pseudomonas aeruginosa*. Nos résultats indiquent aussi que les phases des extraits de plante sont peu ou pas actives ce qui montre l'existence d'une synergie d'action au niveau des molécules présentes dans l'extrait hydroéthanolique.

L'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) des trois extraits de la plante a montré leur richesse en composés flavoniques, terpéniques et tanniques suggérant ainsi la présence d'une corrélation entre l'activité antibactérienne et le contenu de la plante.

Mots-clés: Etude phytochimique, activité antibactérienne; plantes médicinales; diffusion en milieu solide; diffusion en milieu liquide

Kahlouche- Riachi F.

N° ../.

Chemical Evaluation and antibacterial activity of some medicinal plants from Algeria

Summary

Medicinal plants are an immense source of bioactive molecules, with many activities. The objective of our work is to achieve a phytochemical and biological study of alcoholic extracts and acetate ethyl phases (AE) diethyl ether (DE) and 1 -butanol (1B) of the bark of *Pinus pinaster* (PPI), flower buds of *Marrubium vulgare* (MUV) and aerial parts of *Artemisia herba alba* (AHA) . These three Algerian plants species are used in traditional medicine. The phytochemical screening showed that three plants contain flavonoids, sterols and terpenes, tannins and coumarins. However, only PPI contains alkaloids. Spectral analysis of the methanol extracts reveals the presence of flavonoids such Flavonol, Flavone, Flavanone, Flavanol or anthocyanin.

Studies have been carried out in order to demonstrate the *in vitro* antibacterial properties of alcoholic extracts and AE, ED and 1B phases of *Pinus pinaster* bark, flowering tops of *Marubium vulgare* and the aerial part of *Artemesia herba alba* obtained after exhaustion with organic solvents of increasing polarity. All the plants proved to be active on one or more bacteria in 25 mg / ml, the effects of the extracts were compared to that of ampicillin, a positive control. By the method of diffusion in solid media (disk), and the diffusion method in liquid medium (MIC), both PPI and MUV extracts showed higher antibacterial activity on *Escherichia coli* than AHA, the areas of inhibition were 14.33 ± 3.51 and 15.33 ± 2.08 mm respectively . This important activity has been demonstrated in *Escherichia coli* with an MIC of 0.195mg/ml. The hydroalcoholic extract of AHA showed significant activity compared to positive control (AMPIC) equal to 19 ± 1.00 with an MIC of 0.097 mg / ml against *Pseudomonas aeruginosa*. An inhibition diameter of 10 ± 1.00 mm was observed with the hydroalcoholic extract of MUV against *Proteus vulgaris* with an MIC equal to 0.048mg/ml. The MUV, AHA and PPI extracts were active with inhibition diameters of 16.66 ± 1.53 , 13.66 ± 3.21 and 12.33 ± 2.52 respectively against *Pseudomonas aeruginosa*. Our results also indicate that the phases of plant extracts are little or no active which shows the existence of a synergistic action at the level of molecules present in hydro ethanolic extract. Analysis by thin layer chromatography (TLC) of the three plant extracts showed their high flavonoid, terpene and tannin compounds suggesting the presence of a correlation between the antibacterial activity and the content of the plant.

Keywords: Phytochemical study, antibacterial activity, medicinal plants, diffusion in solid medium, diffusion in liquid medium.

Kahlouche- Riachi F.

التقري يلمكي ميئي طارش اطل ماضل بلديك تي ريرا مربعضل لبكات طبي قسي ل مخاير

النسبات لطبية هي صدر هائل من لجزيئات نشطه وولوجي، مع العيود من أنشطه. الهدف من علمنا هوت تحقيق دراسة من (B و ابيوتنول) 1 (ED) étherdiéthyلة (AE) النسيطة وولوجية قنظطات الكحلية ومراحل خلات إلتحليل وألجزاء الهولبية من شريح ميا أها (MUV) هبولغاري Marrubium من براعم زهرة (PPI) pinaster ح اعصن وير. وتستخدم هذه الأنواع الثلاثة من النسبات لجفاري قسي الطب لقايدي (AHA).

النسيطة التي تحتوي على مرلبات هسانون بيثاثة صناع، لجامدة وتريون والفصس ولكوم اوين. ولكن criblabe أظهرت التحليل الطبي ل قنظطات اليشن ووليئش ف عن وجود مرلبات هسانون بيثاثة هسانون، ي تحتوي على لبيدات PPI فقط. أو ألتشويري ل Flavanol هسانون فالتلون،

ED 1B، و مراحل AE قنظطات هسانون العمل بها من أجل إظهار خصائص ضارة للجزيئي قسي الهمبر قنظطات الكحلية و الجزء الجوي اله ارت هسي ميا أها الم الحمول marubium الفصاح من قمم الزهرة هبولغاري pinaster صن وير علي هبعدها لنتفاه مع المرلبات الحضوية زي ادق بطبية. نثبتت جميع النسبات أن تكون نشطة على واحد أو أكثر الهلتي ريفي 52 ملغ / مل، وتمت قنظطات لكاره لكاره مرلتي هسانون لتلك اله ألتحليلين مع حكم بي جلية. من خلال طويقة نشر هفي وريل، وأظهرت كل من مؤشر لسعر الهمجين و (CMI) العلام الصلبة) لقرص، و طويقة اليتشارفي الوسط السائل، م اليتشبي طكنت $13.11 \pm AHA$ أعلى نشاط ضرا للجزيئي نش وولوجية الفولوية على لنتخارج MUV قنظطات 1.21 و 5.2 ± 12.11 م على الكوالي. قنظط على ذا النساط الهانفي الفولوية مع هية التصنيع الهكري من يس اوي (AMPIC) نشاط ملحوظا قنظطات السريطرة اليجلية AHA أظهرت خلاصة هاية كحلية من 1.2 mg/ml . 1 ± 1 مع هية التصنيع الهكري من $0 \dots \text{ملغ}$ / مل ضد الزفة الزنجريه. قد لوحظت شي طر ها من 1 ± 1 . كانت قنظطات $32 \dots \text{mg/ml}$ يس اوي MIC ضد الهاية اليجلية ل MUV $1 \dots$ مل مع خلاصة هاية كحلية من نش طبق طاريتشي ط 11.11 ± 1.21 ، 11.11 ± 1.51 و 15.11 ± 5.25 على الكوالي ضد PPI و AHA، MUV الزفة الزنجريه بشري رنتش جها لى أن مراحل المرلتي هسانون النسيطة مع ضريه أو معدوم نشطة ميا يدل على وجود العمل الفعاوني غي مرتوى الجزيئات الموجه ودهي لنتخارج اليشنول

من المرلتي هسانون النيتاي قشاة هسانون يود على عتريون والتالين (TLC) وأظهر التحليل من قبل طيقة رقيه اللونية مرلباتها ميا يثور إلى وجود علاق قبين النساط الضرا ليلتي ريرا ومجوى النيات

العلمات الوهية: دراسة النيتايه والنساط الضرا ليلتي ريرا والنيتات الطبيه: نشر هفي ل هوس طه ل هاية: نشر هفي ال هوس طه السائ

