

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة امحمد بوقرة بومرداس
Université M'hamed Bougara de Boumerdès



Faculté des sciences
Département de Biologie

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme
De Master 2 académique en sciences de la nature et de la vie
Spécialité : Biochimie appliquée

Thème

**Etude phytochimique d'une plante de la famille
des Fabaceae et évaluation de l'activité
antimicrobienne.**

Présenté par :

- M^{elle}. TOUBAL Lilia Ibtissam
- M^{elle}. BELKEBIR Aicha

Soutenu le 08/09/2016 devant le jury composé de :

Mme LECHEHEB F.	MAA	(FSI)	Présidente du jury
Mme BELKHEIR M.	MAA	(UMBB)	Examinatrice
Mme CHEBILI S.	MAB	(ALG1)	Promotrice
Melle Moudjahed N.	Ingénieur	(SONATRACH)	Encadreur

Promotion 2015- 2016

Remerciements

Au nom de Dieu le Très Miséricordieux - le Tout Miséricordieux - Que Dieu bénisse le Prophète Mohammad, Imam des Bienheureux et Sauvegarde des Purifiés – ainsi que sa Noble Famille et ses Satisfaisants compagnons – Amin.

On rend grâce à Allah le Tout puissant de nous avoir donné la santé, le courage et la force de mener ce travail à bout.

A notre chère promotrice Mme Chebili Siham maitre-assistant B de l'université d'Alger 1, qui a bien voulu nous confier ce travail riche d'intérêt et nous a guidés lors de chaque étape de sa réalisation. Nous avons eu le privilège d'apprécier vos qualités et vos valeurs ; votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir nous ont énormément marqués. Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines. Vous nous avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos obligations professionnelles, Vos encouragements infatigables, votre amabilité, votre gentillesse méritent toute admiration.

Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre profonde gratitude tout en vous témoignant notre respect.

Nous exprimons particulièrement notre gratitude à notre chère encadreur Mlle Moudjahed Narimane du centre de recherche et de développement SONATRACH de la wilaya de BOUMERDES de nous avoir accueillie dans son équipe avec gentillesse et bienveillance.

Nous lui exprimons notre immense reconnaissance pour sa confiance de nous avoir laissé un grand degré de liberté dans nos recherches tout en étant attentive et généreuse en bons conseils ,pour ses qualités pédagogiques, les discussions scientifiques, et surtout pour le précieux soutien moral et les encouragements pendant les périodes difficiles. Ce fut une expérience très enrichissante qui nous a donné la possibilité de nous former avec des appareils modernes en nous ouvrant les portes du monde de la recherche en réalisant des tests biologiques très importantes.

Dédicaces

A mes chers parents

Affables, honorables, aimables : vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Vos prières et vos bénédictions m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

A mes chers frères : Abdenour, Yazid, Abderrahmane et Anis.

Et ma chère sœur : Amina

Adorables, protecteurs, et bienveillants : vous avez toujours su être là et me soutenir dans les moments les plus heureux, comme les plus difficiles : vous étiez et vous serez à jamais ma source d'inspiration, de joie, de sécurité et d'affection.

*A notre ange, le rayon de soleil qui a illuminé notre existence **ma chère nièce Anaïs** et à chaque membre de ma famille que j'aurais oublié de mentionner sachez que vous êtes toujours dans ma pensée*

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner tout au long de ma vie, une vie que je vous dois en tout honneur d'ailleurs je vous remercie avec tout mon amour. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur. et puisse la personne que je suis toujours faire votre fierté.

Dans cette dédicace je ne peux passer à côté des merveilleuses rencontres, mes chères amis Hassina , Ahlem , Titi , Bilal , Kimou , meriem slimane , Sara , Tinhinnanne et a toute l'équipe de formation CRD SONATRACH que ces quelques lignes ne pourraient suffire à évoquer ni à remercier.

Tout ce travail ne serait pas grand-chose sans la présence précieuse de mon binôme et son dur travail.

BELKEBIR Aicha

On remercie vivement Monsieur GANA Ml Chef de département corrosion bactérienne, du CRD SONATRACH, pour sa compétence et son professionnalisme exemplaires qui nous ont permis de finaliser notre travail de mémoire dans les différents services de centre.

A Mme BELKHIR Meriem MAA à l'UMBB, d'avoir accepté avec une très grande amabilité d'être la présidente de notre jury de mémoire. Veuillez trouver ici l'expression de notre grand respect et nos vifs remerciements.

A Mme MAAMERI Sarah .MAA à l'UMBB, d'avoir accepté d'être membre du jury pour ce mémoire. Veuillez trouver ici l'expression de notre grand respect et nos vifs remerciements.

A nos chers collègues pour la précieuse aide et pour tout le temps qu'ils nous ont si gentiment consacré, sans eux ce travail n'aurait pas abouti comme il l'est aujourd'hui.

Nous remercions vivement tous les enseignants pour leur patience et leur précieux conseils durant notre cycle de formation et leurs dédions ce travail en gage de notre grand respect et notre profonde reconnaissance.

Dédicaces

A mes chers parents

Affables, honorables, aimables : vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Vos prières et vos bénédictions m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

A mes chers frères : Abdenour, Yazid, Abderrahmane et Anis.

Et ma chère sœur : Amina

Adorables, protecteurs, et bienveillants : vous avez toujours su être là et me soutenir dans les moments les plus heureux, comme les plus difficiles : vous étiez et vous serez à jamais ma source d'inspiration, de joie, de sécurité et d'affection.

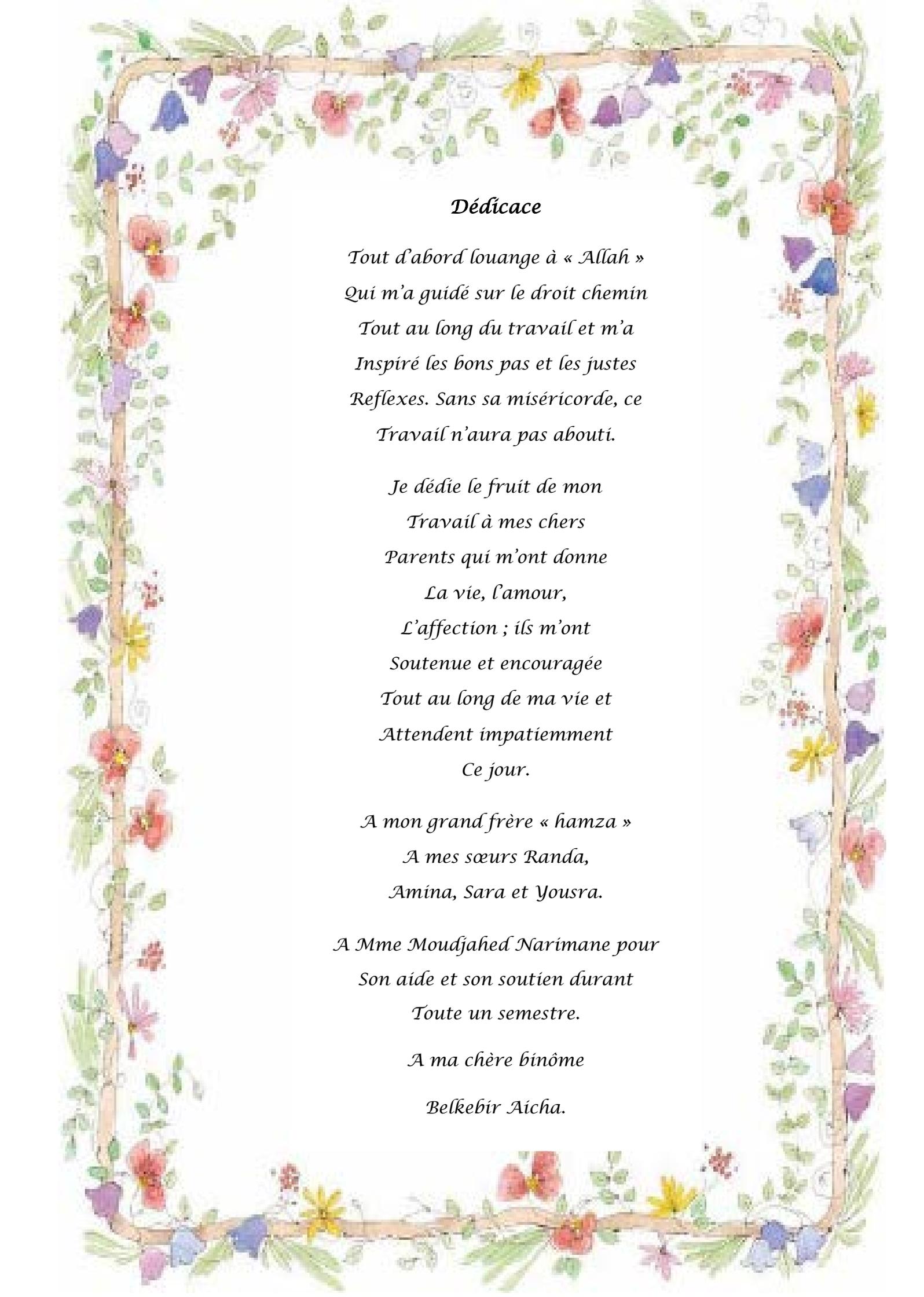
*A notre ange, le rayon de soleil qui a illuminé notre existence **ma chère nièce Anaïs** et à chaque membre de ma famille que j'aurais oublié de mentionner sachez que vous êtes toujours dans ma pensée*

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner tout au long de ma vie, une vie que je vous dois en tout honneur d'ailleurs je vous remercie avec tout mon amour. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur. et puisse la personne que je suis toujours faire votre fierté.

Dans cette dédicace je ne peux passer à côté des merveilleuses rencontres, mes chères amis Hassina , Ahlem , Titi , Bilal , Kimou , meriem slimane , Sara , Tinhinnanne et a toute l'équipe de formation CRD SONATRACH que ces quelques lignes ne pourraient suffire à évoquer ni à remercier.

Tout ce travail ne serait pas grand-chose sans la présence précieuse de mon binôme et son dur travail.

BELKEBIR Aicha



Dédicace

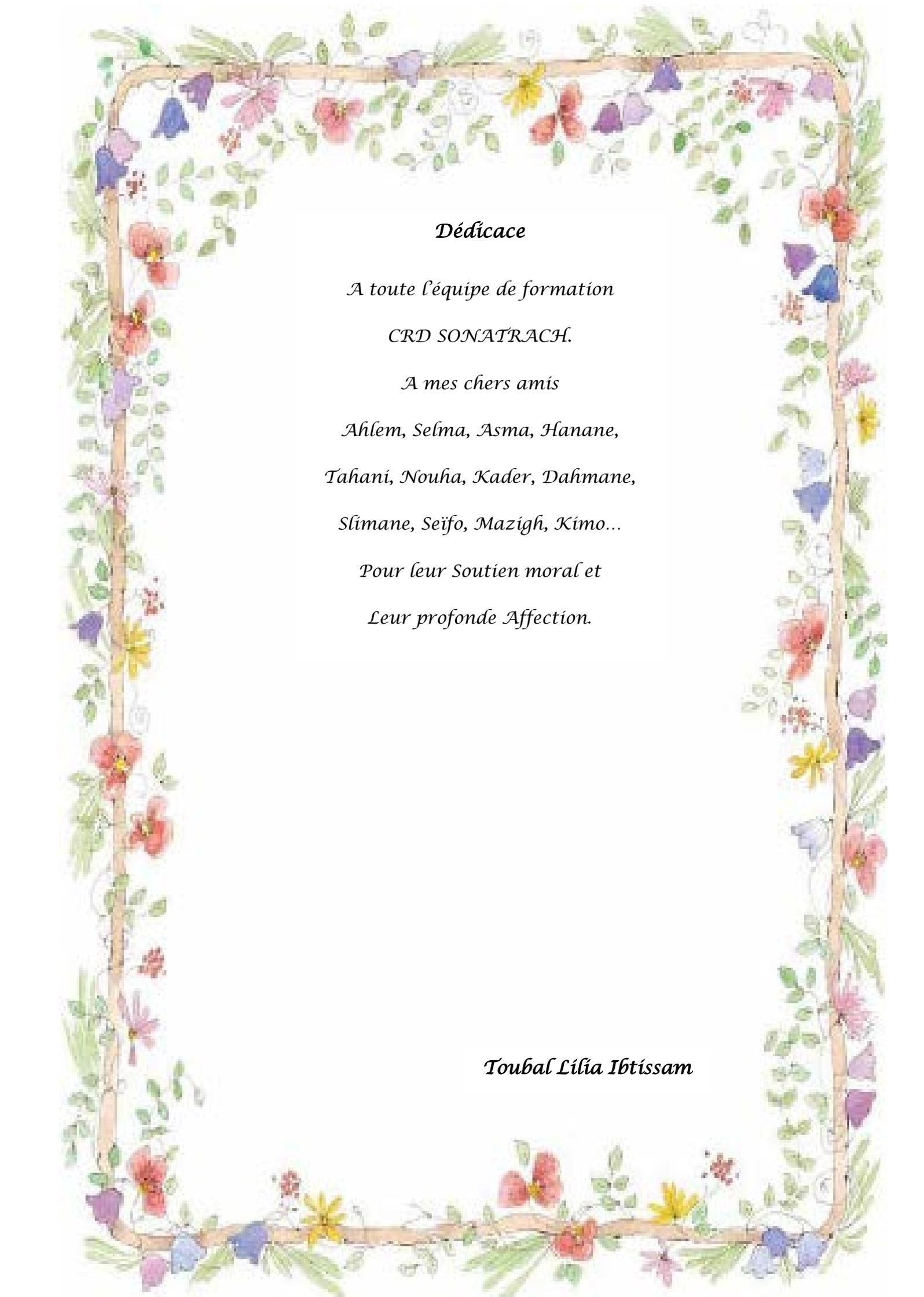
*Tout d'abord louange à « Allah »
Qui m'a guidé sur le droit chemin
Tout au long du travail et m'a
Inspiré les bons pas et les justes
Reflexes. Sans sa miséricorde, ce
Travail n'aura pas abouti.*

*Je dédie le fruit de mon
Travail à mes chers
Parents qui m'ont donné
La vie, l'amour,
L'affection ; ils m'ont
Soutenu et encouragé
Tout au long de ma vie et
Attendent impatiemment
Ce jour.*

*A mon grand frère « hamza »
A mes sœurs Randa,
Amina, Sara et Yousra.*

*A Mme Moudjahed Narimane pour
Son aide et son soutien durant
Toute un semestre.*

*A ma chère binôme
Belkebir Aïcha.*



Dédicace

A toute l'équipe de formation

CRD SONATRACH.

A mes chers amis

*Ahlem, Selma, Asma, Hanane,
Tahani, Nouha, Kader, Dahmane,
Slimane, Seifo, Mazigh, Kimo...*

Pour leur Soutien moral et

Leur profonde Affection.

Touba Lilia Ibtissam

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....01

Partie bibliographique

1^{er} Chapitre : I – ETUDE BOTANIQUE DE LA PLANTE03

I.1. Intérêt des plantes
médicinales.....03

I.2. Taxonomie.....04

I.2.1. L'ordre des Fabales.....04

I.2.2. La Familles des *Fabaceae*
.....04

I.2.2.1. Intérêts économiques et médicaux de la famille.....05

I.2.2.2. Répartition géographique.....05

I.2.2.3. Position systématique
.....06

I.2.3. Présentation de l'espèce.....07

I.2.3.1. Description de *Cytisus arboreus*.....07

I.2.3.2. Nomenclature08

I.2.3.3. Les synonymes.....08

I.2.3.4. Utilisation traditionnelle08

2^{eme} Chapitre II : Substances naturelles bioactives.....09

II.1. Généralité.....09

II.2. Définition et fonctions des métabolites secondaires	10
II.2.1. Classification des métabolites secondaires	10
II.2.1.1. Les composés phénolique.....	10
II.2.1.1.1. Les flavonoïdes	11
II.2.1.1.2. Les tanins.....	11
II.2.1.1.3. Les quinones	11
II.2.1.2. Les alcaloïdes	12
II.2.1.2.1 Classification des alcaloïdes	12
II.2.1.2.2 Biosynthèse.....	13
II.2.1.2.3. Propriétés physicochimiques et pharmacologiques.....	14
3^{eme} Chapitre III - ACTIVITES antimicrobienne	15
III.1. Activités Antimicrobienne.....	15
III.1.1. Principaux technique de détermination de l'activité antimicrobienne	15
III.1.1.1. Aromatogramme	16
III.1.1.2. Méthode du puits ou cylindre	16
III.1.1.3. Méthode de dilution.....	16
III.1.1.4. Méthode micro-atmosphère	16
Partie expérimentale	
1^{er} Chapitre I - Matériel et méthodes	17
I.1. MATERIEL.....	17
I.1.1. Matériel biologiques	17
I.1.1.1. Matériel végétal	17
I.1.1.2. Matériel microbiologique.....	19

I.1.2. Matériel non biologique et équipement	19
I.2. Méthodes d'études	20
I.2.1. Préparation de la matière végétale.....	21
I.2.1.1. Récolte.....	21
I.2.1.2 Séchage	22
I.2.1.3 Broyage	22
I.2.2. Screening phytochimique	23
I.2.2.1. Préparation des solutions à analyser.....	23
I.2.2.2. Identification des tanins totaux.....	24
I.2.2.3. Identification des tanins catéchétique	24
I.2.2.4. Identification des tanins galliques.....	24
I.2.2.5. Identification des quinones libres.....	25
I.2.2.6. Identification des saponosides	25
I.2.2.7. Identification de l'amidon	25
I.2.2.8. Identification des flavonoïdes.....	25
I.2.2.9. Identification des alcaloïdes	26
I.2.2.10. Identification des Sterols-Triterpènes	26
I.2.2.11. Identification des composés réducteurs	27
I.2.2.12. Identification des oses et des holosides	27
I.2.2.13. Identification des mucilages	27
I.2.3. Préparation de l'extrait alcaloïdique.....	28
I.2.4. Préparation des extraits hydroalcoolique et aqueux	30
I.2.5 Caractérisation chimique	31

I.2.5.1 Analyse qualitative par chromatographie sur couche mince.....	31
I.2.5.2 Chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (CPG/SM) ...	34
I.2.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne	35
I.2.6.1 Vérification de la pureté des souches.....	35
I.2.6.2 Conservation des souches	35
I.2.6.3 Milieux de culture.....	35
I.2.6.4 Antibiogramme	36
I.2.6.5 Revivification des souches microbiennes.....	38
I.2.6.6 Préparation de l'inoculum.....	38
I.2.6.7 Ensemencement	39
I.2.6.8 Préparation de l'extraits	39
I.2.6.9 Application des disques d'antibiogramme.....	39
I.2.6.10 Incubation	39
I.2.6.11 Lecture.....	40
I.2.6.12. Analyse statistique (détermination de la moyenne, de l'écart type et l'erreur standard à la moyenne ESM).....	40
2^{eme} chapitre II – Résultats et discussion.....	42
II.1. Screening phytochimique.....	42
II.2. Rendement en extraits alcaloïdiques.....	47
II.3. Chromatographique par CCM.....	49
II.4. Analyse qualitative CPG/SM des extraits alcaloidiques de <i>C.arboreus</i>	52
II.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne des trois extraits	53
II.5.1. Méthode de diffusion sur milieu gélosé	53

II.5.1.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de *Cytisus arboreus* (Desf.) DC.
vis-à-vis les bactéries et les champignons.....53

Conclusion et perspectives.....61

Références bibliographiques

Annexes

Résumés

Listes des figures

Figure 1. Carte de répartition géographique des <i>Fabaceae</i>	(05)
Figure 2. Photo de la plante <i>Cytisus arboreus</i> (<i>Desf.</i>).....	(07)
Figure 3. Interrelation entre les métabolites primaires et les métabolites secondaires	(10)
Figure 4. Origine biosynthétique de différentes classes d'alcaloïdes	(13)
Figure 5. Solasodine	(14)
Figure 6. Bufaline.....	(14)
Figure 7. Photo de la plante <i>Cytisus arboreus</i> (<i>Desf.</i>) <i>DC</i>	(18)
Figure 8. Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'étude.....	(20)
Figure 9. Site de récolte de la plante <i>Cytisus arboreus</i> (<i>Desf.</i>) <i>DC</i>	(21)
Figure 10. Poudre végétales obtenues après broyage des trois parties étudiées de la plante Séchée.....	(22)
Figure 11. Décocté à 10% des poudres végétales des trois parties de la plante <i>Cytisus arboreus</i> (<i>Desf.</i>) <i>DC</i>	(23)
Figure 12. Infusés à 5% des poudres végétales des trois parties étudiées de la plante <i>Cytisus arboreus</i> (<i>Desf.</i>) <i>DC</i>	(24)
Figure 13. Les principales étapes de l'extraction des alcaloïdes.....	(29)
Figure 14. Les extraits alcaloïdiques obtenu après l'extraction.....	(30)
Figure 15. Schéma de CCM	(33)
Figure 16. Schéma de préparation de plaque et dépôt des échantillons.....	(33)
Figure 17. Appareil de la CPG/SM.....	(34)
Figure 18. Etapes de l'étude de l'activité antimicrobienne d'un extrait végétal.....	(37)
Figure 19. Agitateur type VTX500 (vortex).....	(38)

Figure 20. Rendement en extraits alcaloïdiques des trois parties de la plante étudiée.....	(48)
Figure 21. Photos de plaque CCM prise après révélation par reactif de Dragendroff.....	(49)
Figure 22. Histogramme des diamètres d'inhibitions des souches microbiennes testées vis-à-vis des extraits alcaloïdiques des feuilles, tiges et racines de <i>C. arboreus</i> par la méthode de diffusion sur gélose.....	(54)
Figure 23. Activité antimicrobienne des extraits alcaloïdiques totaux des feuilles, tiges et racines de <i>C. arboreus</i> par la méthode de diffusion.....	(55)
Figure 24. Activité antimicrobienne des extraits hydro-alcooliques des feuilles, tiges et racines de <i>C. arboreus</i> par la méthode de diffusion.....	(56)
Figure 25. Histogramme des diamètres d'inhibitions des souches bactériennes testées vis-à-vis de l'extrait alcaloïdique aqueux des feuilles, tiges et racine de <i>C. arboreus</i> par la méthode de diffusion sur gélose.....	(57)
Figure 26. Activité antimicrobienne des extraits aqueux des feuilles, tiges et racines de <i>C. arboreus</i> par la méthode de diffusion.....	(58)

Liste des tableaux

Tableau I. Position systématique des <i>Fabaceae</i> selon différentes approches.....	(06)
Tableau II. Les souches utilisées dans le test antimicrobien.....	(19)
Tableau III. Listes des antibiotiques testés sur les bactéries.....	(36)
Tableau IV. Estimation de la sensibilité des souches.....	(40)
Tableau V. Les résultats de screening phytochimique (métabolites primaires).....	(42)
Tableau VI. Les résultats de screening phytochimiques (métabolites secondaires).....	(44)
Tableau VII. Rendement en alcaloïdes des trois parties de la plante étudiée.....	(47)
Tableau VIII. Identification des trois extraits alcaloïdiques de <i>C. arboreus</i> selon leur R_f	(50)
Tableau IX. Les 7 types d'alcaloïdes obtenus par l'extrait des feuilles.....	(52)
Tableau X. Valeurs des diamètres des zones d'inhibitions (mm) obtenues par les extraits alcaloïdiques des feuilles, tiges et racines de <i>C. arboreus</i> par la méthode de diffusion sur gélose.....	(54)
Tableau XI. Valeurs des diamètres des zones d'inhibitions (mm) obtenues par les extraits aqueux des feuilles, tiges et racines de <i>C. arboreus</i> par la méthode de diffusion sur gélose.....	(57)

Liste des abréviations et symboles

Abs :	Absorbance
CCM :	Chromatographie sur Couches Minces
CH₃OH :	Méthanol
CHCl₃ :	Chloroforme
CPG/SM :	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse
DMSO :	Diméthyl Sulfoxyde
DO :	Densité Optique
ESM :	Erreur standard de la moyenne.
EtOH:	Ethanol
GN :	Gélose nutritive
H1N1 :	Hemagglutinin Type 1 and Neuraminidase Type 1
m/z :	masse/charge d'un ion
MeOH :	Méthanol
MS :	Spectrométrie de masse (Mass Spectrometry)
N :	Normalité
NH₄OH :	Ammoniaque
PDA:	Pomme de terre-Dextrose-Agar
pH :	Potentiel d'Hydrogène
Ps :	poid sec
Rf:	Rapport frontal
UV :	Ultra-violet
v/v /v :	Rapport volume par volume par volume
Vf :	Volume finale
Vi :	Volume initiale

Introduction

Une plante est dite médicinale lorsqu'au moins une partie possède des propriétés curatives ou préventives d'une ou plusieurs maladies (**Claisse-Dauchy, 1996 ; Bruneton, 1999**).

Depuis la plus haute antiquité, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies (**Athamena, 2009**). Dans le monde, près de 80% de la population a recours aux plantes médicinales par manque d'accès aux médicaments prescrits. Mais aussi parce que les plantes ont pu démontrer une réelle efficacité (**Benaissa, 2011**). Une des originalités majeures de plante médicinales réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protéides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire. Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, dont plus de 200000 molécules ont été identifiées. Classés selon leur appartenance chimique. (**Jeun et Annie, 2005**)

Quelles que soient les parties et les formes sous lesquelles elles sont utilisées, les plantes sont extrêmement riches, elles contiennent des structures chimiques complexes. Leur métabolisme contient des milliers de différents constituants dont l'effet thérapeutique n'est évidemment pas lié à tous les composés, de même pour ce qui est d'effet nocif ou toxique (**Wright et al., 2000**).

L'Algérie, par sa surprenante richesse en biodiversité (faune et flore) renferme de nombreuses espèces, on y dénombre plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Ces plantes, dont plus de 15 % sont endémiques (**Hanifi, 1991**), ne sont que peu explorées. Ainsi, afin de valoriser cette richesse naturelle et améliorer le patrimoine de médecine traditionnelle algérienne, nous avons choisi d'étudier une plante de la famille des Fabaceae (*Cytisus arboreus (Desf.) DC.*) nommé localement Elguendoul qui porte un intérêt thérapeutique dans la région de Kalous wilaya de Bouïra. Malgré l'abondance de cette espèce, peu de travaux lui ont été consacrés. Le genre (*Cytisus L.*) est connu par sa composition en principes actifs tels que les polyphénols et les alcaloïdes, connus pour leurs vertus thérapeutiques. (**Lapie et Maige, 1997 ; Ait-Kaci, 2001**)

L'objectif de la présente étude est d'évaluer la teneur de la plante médicinale en métabolites primaires et secondaires par la réalisation de screening phytochimique, analyse qualitative et quantitative par CCM et CPG/SM respectivement et enfin valoriser le pouvoir antimicrobien des extraits alcaloïdiques, hydro-alcooliques et aqueux des trois parties feuilles, tiges et racines.

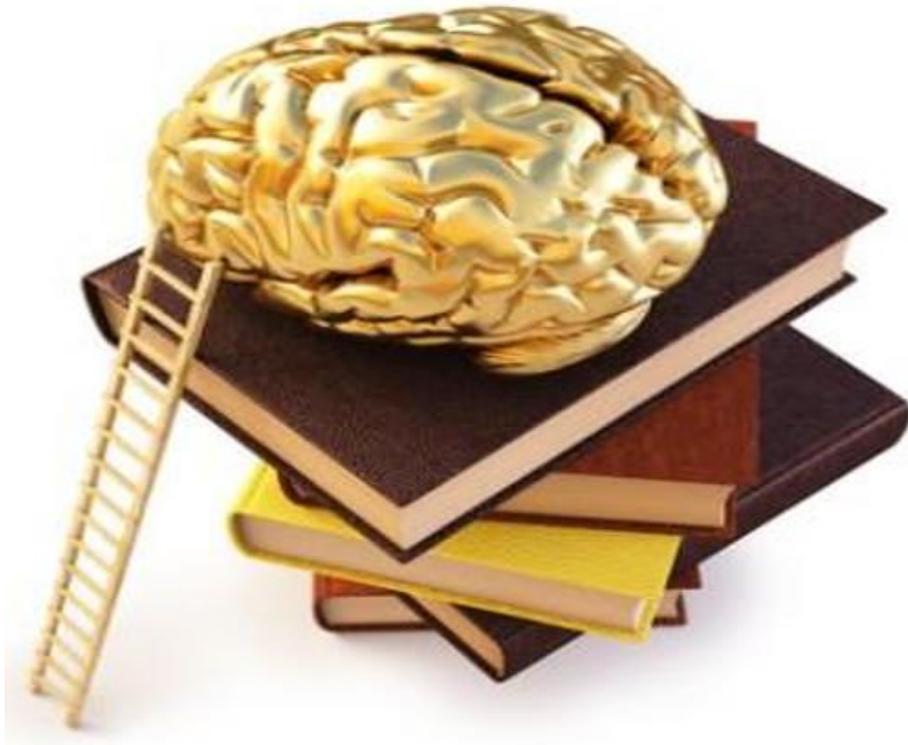
Le présent travail est scindé en deux parties importantes :

La première, renferme une synthèse bibliographique mettant l'accent sur trois chapitres. Le premier chapitre traite l'étude botanique de la plante ; le second présente une généralité sur les alcaloïdes et le troisième chapitre contient un aperçu général sur l'activité antimicrobienne.

La deuxième partie concerne la partie expérimentale, cette dernière contient deux chapitres dont le premier renferme la partie matérielle et méthode le deuxième est réservé aux résultats de screening-phytochimique, CCM, CPG/MS suivie par une évaluation des effets antimicrobiens des extraits alcaloïdiques, hydro-alcooliques et aqueux des trois parties feuilles, tiges et racines.

Notre étude s'achèvera par une conclusion générale regroupant tous les résultats obtenus avec les perspectives éventuelles.

Première partie



Revue bibliographique

CHAPITRE I : ETUDE BOTANIQUE DE LA PLANTE *CYTISUS ARBOREUS*

I.1. Intérêt des plantes médicinales

Au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques les plus modernes n'ont fait que confirmer le bien-fondé des vertus thérapeutiques de la plupart des plantes médicinales utilisées de façon empirique depuis des millénaires. Ce savoir traditionnel ancestral transmis de génération en génération est devenu aujourd'hui une mine d'informations extrêmement précieuse pour tous les chercheurs de l'industrie pharmaceutique (**carillon, 2000 ; Fouché et al., 2000**).

La plupart des espèces végétales contiennent des substances qui peuvent agir à un niveau ou à 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**). Les plantes médicinales sont donc importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments ; non seulement comme agents thérapeutiques mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments, ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs (**Decaux, 2002**).

Plusieurs facteurs ont contribué à l'adoption de plus en plus de remèdes à base de plantes médicinales, d'une part, à cause de nombreux problèmes en médecine moderne comme l'augmentation du coût des soins de santé modernes (**Abayomi, 2010**), le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques disponibles et aussi l'apparition des effets secondaires négatifs engendrés par les remèdes médicamenteux multiples actuels (**Schnaubelt, 1998 ; Nostro et al., 2000**). Et d'autre part, l'abondance de plantes médicinales riches en substances bioactives, telles que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les protéines et les lipides...etc, douées de nouvelles voies d'activités biologiques ou thérapeutiques importantes (**Abayomi, 2010**).

I.2.Taxonomie

L'espèce est classée dans le règne végétal comme suit (**Ildis ,2010**) :

Regne :**Plantae**

Division - **Tracheophyta**

Subdivision - **Spermatophytina**

Classe - **Magnoliopsida**

Super-ordre - **Rosanae**

Ordre : - **Fabales Bromhead**

Famille - **Fabaceae Lindl.**

Tribus - **Genisteae**

Genre - **Cytisus L.**

Espèce - *Cytisus arboreus* (Desf.) DC.

I.2.1. L'ordre des Fabales

L'ordre des Fabales renferme 4 familles et environ 19 000 espèces. Les familles principales sont les Fabaceae, les Polygalaceae, les Surianaceae. Nous traiterons ici la famille des Fabaceae qui renferme l'espèce végétal *Cytisus arboreus* que nous avons étudiée (**Judd W, 2002**).

I.2.2. La famille des *Fabaceae*

Les *Fabaceae*, qui sont communément appelés les légumineuses, représentent la famille la plus importante économiquement parmi les plantes à fleurs. En Algérie, cette famille est présentée par 53 genres et de 339 espèces (**Kaabeche, 2000 ; Anonyme, 2008**).

Cette famille est composée de variétés horticoles et beaucoup d'espèces sont récoltées dans un but alimentaire, tant pour l'alimentation humaine (haricot, pois, fève, soja) qu'animale (trèfle, luzerne, sainfoin), pour leur huile (arachide, soja), leurs fibres, comme combustible, pour leur bois, leur utilisation en médecine (spartéine extraite du genêt à balais, réglisse) ou en chimie (**Wojciechowski et al., 2004**). Certaines d'eux sont même enfouies dans les sols comme engrais vert (par ex. Les trèfles), (**Judd et al., 2002**).

I.2.2.1. Intérêts économiques et médicaux de la famille

De nombreuses *fabaceae* ont joué un rôle important dans l'histoire de l'industrie pharmaceutique. Dans la majeure partie des cas, non pas pour leur utilisation en tant que médicaments, mais comme source de matière première (par ex. lécithines de *Glycine max* Merr.), de molécules actives, de molécules pour l'hémisynthèse de médicaments ou encore d'excipients divers (Bruneton, 1999).

Actuellement plusieurs molécules très utilisées en milieu thérapeutique sont d'origine de diverses espèces de *fabaceae*. Par exemple, la spartéine, un alcaloïde ganglioplégique utilisé en cardiologie et en obstétrique, est isolée de *Cytisus scoparius* (L.) Link ou encore la physostigmine qui est issue de *Physostigma venenosum* Balf. Cette dernière est considérée comme un inhibiteur réversible des cholinestérases, utilisée comme antidote de l'intoxication par les parasympholytiques et testée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (Bruneton, 1999).

I.2.2.2. Répartition géographique

Les *Fabaceae* constituent la troisième famille des angiospermes de par le nombre de ses représentants. Elles ont une distribution quasi cosmopolite et se trouvent dans les zones tropicales, subtropicales ou tempérées (fig.1). Cette famille s'accommode d'une très large gamme d'habitats, et inclut autant de plantes herbacées, aquatiques ou xérophytes, que des arbustes, des arbres ou des plantes grimpantes à lianes volubiles ou à vrille (Heywood, 1996).

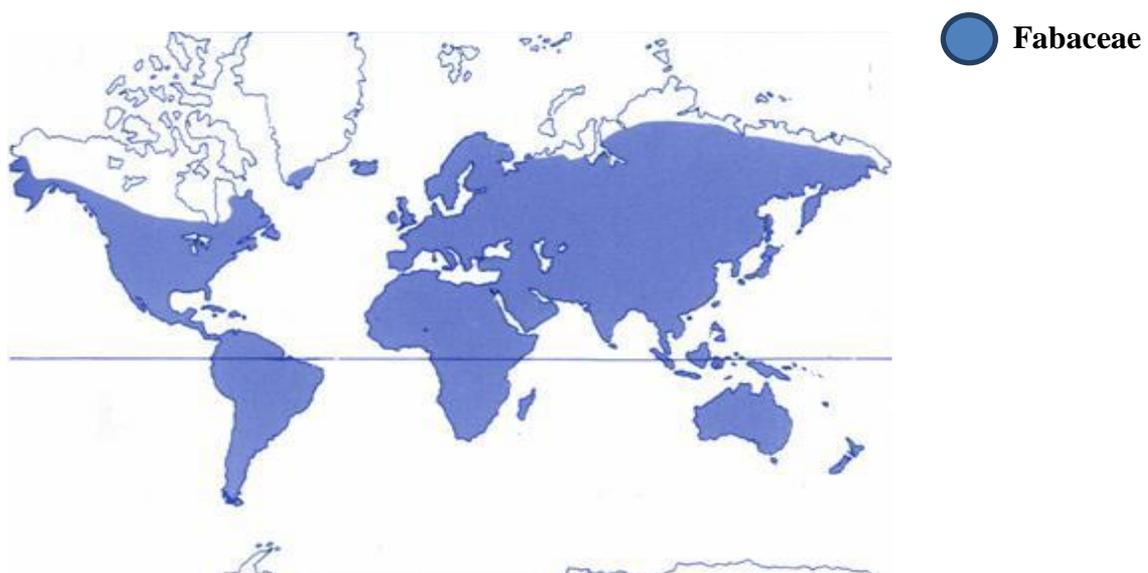


Figure 1 : Carte de répartition géographique des *Fabaceae* d'après (Heywood, 1996).

I.2.2.3. Position systématique

Trois sous-groupes sont généralement reconnus à l'intérieur des Fabaceae :

Les Caesalpinioideae, les Mimosoideae et les Faboideae (= Papilionoideae). Les Faboideae sont cosmopolites, alors que les Mimosoideae et les Caesalpinioideae sont plutôt tropicales. Dans la plupart des classifications (tableau I), ces groupes sont considérés comme des sous familles, mais ils sont parfois traités en familles indépendantes, comme par exemple dans la classification de Cronquist. Le concept « Leguminosae » est lui utilisé soit à un niveau familial (chez Engler), soit à un niveau ordinal (chez Cronquist). Bien que le terme Fabaceae soit actuellement préféré dans la nouvelle classification systématique de l'Angiosperm Phylogeny Group (APG), le terme Leguminosae est encore couramment utilisé par certaines catégories de scientifiques (spécialistes des légumineuses). Ces deux termes sont considérés comme des synonymes par l'International Code of Botanical Nomenclature (ICBN)] (Judd et al., 2002 ; Spichiger et al., 2004).

Tableau I : Position systématique des *Fabaceae* selon différentes approches (Engler et Prantl, 1889; Thorne, 1992; Thorne, 1992b; The Angiosperm Phylogeny Group, 2003).

	Engler (1981)	Cronquist (1988)	Thorne (1992)	APGIII (2009)
Règne	Plantae	Plantae	Plantae	Plantae
Embranchement	Embryophyta	Magnoliophyta	Spermatophytae	Spermatophytae
Sous embranchement	Angiospermae		Angiospermae	Angiospermae
Classe	Dicotyledonae	Magnoliopsida	Magnoliidae	Eudicotyledonae
Sous-classe	Archichlamydeae	Rosidae	Rutanae	Rosidae
Ordre	Rosales	Fabales	Rutales	Eurosidae I (= Fabidées)
Sous-ordre	Leguminosineae		Fabineae	Fabales
Famille	Leguminosae	Fabaceae (=Papilionaceae) Mimosaceae Caesalpinaceae	Fabaceae	Fabaceae (= Leguminosae)
Sous-famille	Faboideae Mimosoideae Caesalpinioideae		Faboideae Mimosoideae Caesalpinioideae Swartzioideae	Faboideae Mimosoideae Caesalpinioideae

Selon la dernière classification, les Fabaceae sont placés dans l'ordre des Fabales. Elles comprennent trois sous-familles : les Mimosoidae avec 80 genres et 3.200 espèces ; les Caesalpinioideae avec 170 genres et 2.000 espèces et les Faboideae (Papilionoideae) avec 470 genres et 14.000 espèces (APG II, 2003 ; Anonyme, 2008). Pour la suite nous allons nous intéresser plus particulièrement à la sous-famille des Faboideae à laquelle appartient notre espèce *C. arboreuse*.

I.2.3. Présentation de l'espèce

I.2.3.1. Description de *Cytisus arboreus*

C'est un arbrisseau de 2 à 4 m de hauteur, dressé, à rameaux allongés, sillonnés, verts et glabres sur les côtes, grisâtres tomenteux dans les sillons. Les feuilles ainsi que les florales sont trifoliolées et pétiolées, les fleurs sont assez grandes, le Calice pubescent, soyeux ; l'étendard à peine émarginé, carène large, droite et non courbée. Le style entièrement glabre, courbé presque en cercle, non élargi sous le stigmate ; La gousse à peine poilue sur les bords, à la fin très glabre, luisante et à gaines noires et mates (**tella botanoca, 2011**).

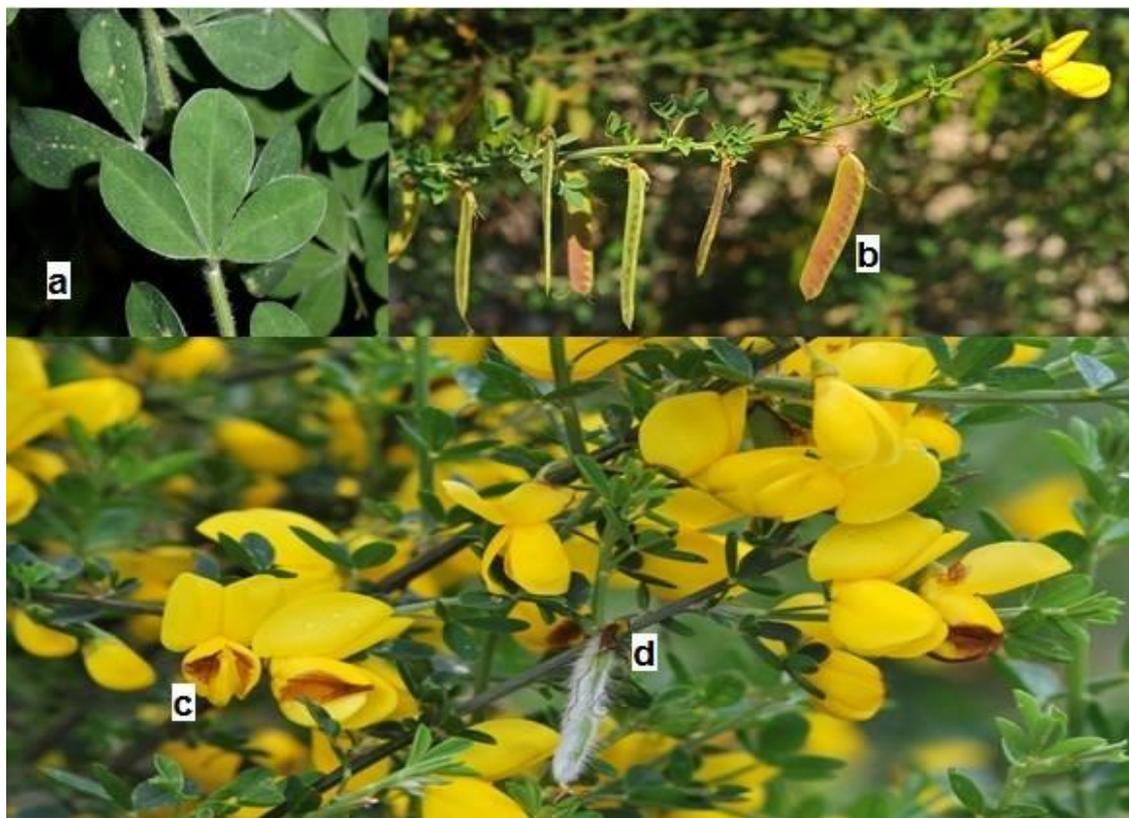


Figure 2 : Photo de la plante *Cytisus arboreus* (Desf.) ; a) feuilles ; b) fruits (gousses) ; c) fleur jaunes ; d) tige.

I.2.3.2. Nomenclature

Le nom *Cytisus* dérive du latin, *Kytisos*, ancien nom *Medicago arborea* ; *Cytisus arboreus* possède plusieurs noms vernaculaires. En Algérie la plante a plusieurs appellations Alguandoul ; Chadjeret en nahal, alwezal ; en kabylie on l'appelle : Hougui ; azazo. En France ; cette plante porte plusieurs noms vernaculaires Cytise de Catalogne ; Genêt de Catalogne (**tella botanica ,2011**) et enfin en Espagne :Escobón (**Ildis,2010**).

I.2.3.3. Synonymes

- *Cytisogenista arborea*
- *Genista arborea* (Desf.)
- *Spartium arboreum* Desf
- *Verzinum arboreum*
- *Sarothamnus arboreus* (**tella botanica ,2011**)

I.2.3.4. Utilisation traditionnelle

D'après les herboristes, Le cytise fit l'objet de quelques recherches en tant que plante médicinale malgré sa toxicité, et il fut découvert récemment que son feuillage était bien plus efficace que d'autres plantes, il réussit à traiter les plaies et les brûlures, en ne laissant pratiquement aucune cicatrice et même celles du troisième degré. Les feuilles et les graines étaient préconisées contre les troubles psychonévrotiques pour stopper les migraines et en traitement des maladies du foie. En usage externe, le jus extrait de ces feuilles soignait les blessures et les plaies, pour ce faire, il suffisait de verser ce jus directement sur la zone blessée.

Un usage bien que peu médical, mais important pour la nervosité qu'il entraîne étaient que les graines du cytise pouvaient être utilisé en substitut du tabac et ainsi calmer le soldat durant la Première Guerre mondiale. En cosmétologie ; les femmes utilisent cette plante pour faire leur sourcil.

CHAPITRE II : SUBSTANCES NATURELLES BIOACTIVES.

II.1. Généralité

Nous connaissons actuellement plus de 250 000 espèces végétales. Celles-ci produisent un large éventail de substances chimiques de structures variées. Parmi elles, on distingue classiquement les métabolites primaires et les métabolites secondaires (**Vu Thi Dao, 2008**).

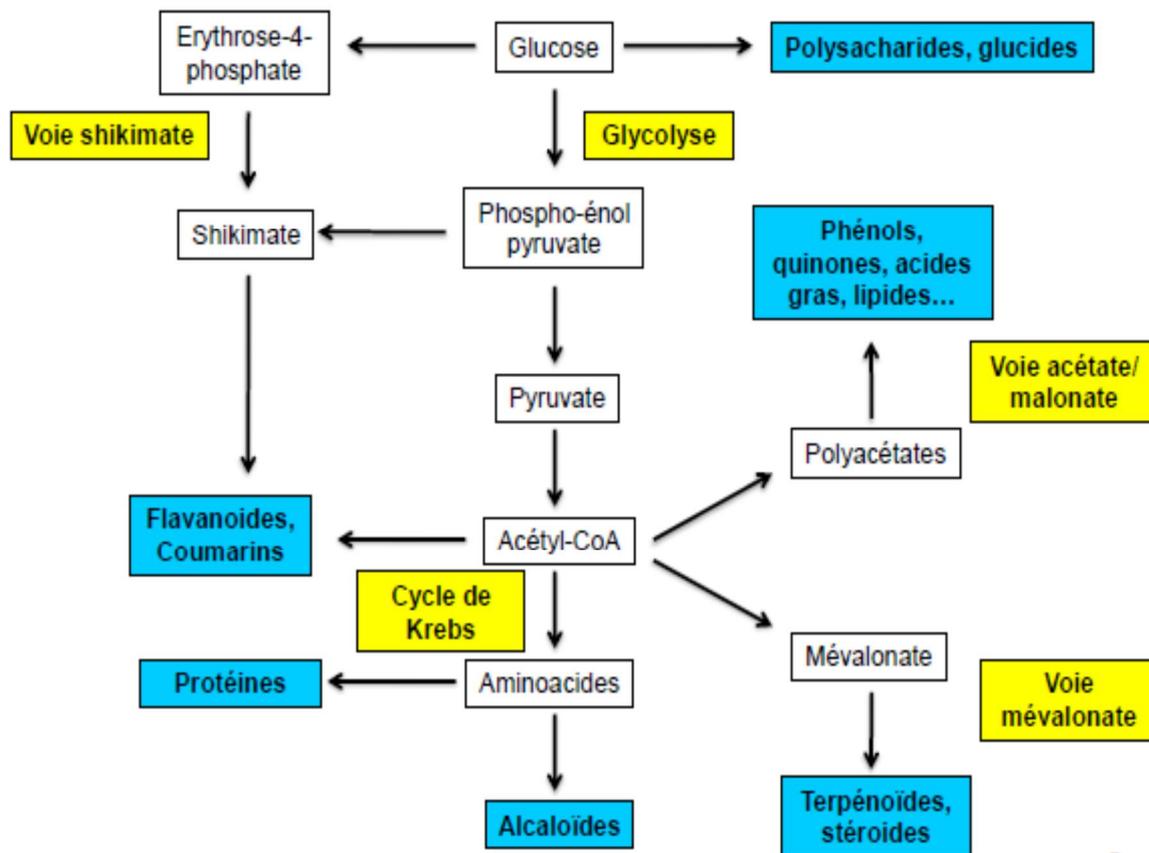
- ❖ **Les métabolites primaires** : ils sont caractérisés par leur propriété nécessaire et vitale à la survie de la cellule ou de l'organisme. Ils sont divisés en trois groupes ; les glucides, les lipides et les acides aminés (**Kone., 2009 ; Badiaga., 2012**).
- ❖ **Les métabolites secondaires** : ils ne sont pas vitaux pour la cellule ou l'organisme, ces molécules sont présentes en très grand nombre et d'une variété structurale extraordinaire. Ces métabolites sont divisés en trois groupes ; les composés phénoliques, les terpénoïdes et stéroïdes et les composés azotés ou les alcaloïdes (**Guignard et al., 1985 ; Badiaga., 2012**).

II.2. Définition et fonctions des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires des végétaux peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes, par opposition aux métabolites primaires (glucides, lipides et protéines) qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal (**Gravot, 2008**).

Ces substances, issues de métabolites primaires (fig.3), interviennent dans la structure des plantes mais également, elles exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement (**Gravot, 2008 ; Kansole, 2009**). Ils participent ainsi, d'une manière très efficace, dans la tolérance des végétaux à des stress variés, par action anti herbivore, inhibition des attaques pathogènes des bactéries et des champignons, prédation d'insectes, défense contre la sécheresse et lumière UV (**Gravot, 2008 ; Thomas, 2009**). Les composés phénoliques, les terpénoïdes et stéroïdes et les composés azotés ou alcaloïdes.

Les voies de métabolisme



5

Figure 3. Interrelation entre les métabolites primaires et les métabolites secondaires (Bruneton, 1993) une légende : Métabolites I et II ; Les voies métaboliques

II.2.1 Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, dont plus de 200000 molécules ont été identifiées. Classés selon leur appartenance chimique en composés phénoliques, alcaloïdes et terpénoïdes (Cuendet, 1999 ; Vermerris, 2006).

II.2.1.1. Les composés phénoliques

Les polyphénols constituent une famille de molécules largement répandues dans le règne végétal. On les trouve, dans les plantes, de puis les racines jusqu'aux fruits. Les polyphénols sont des métabolites secondaires. L'expression de composés phénoliques est utilisée pour toute substance chimique possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs, groupements hydroxyles (Guendouze, 2005).

II.2.1.1.1 Les flavonoïdes

L'expression flavonoïdes a été introduite en 1952 par Geissman et Hinreiner pour désigner les pigments ayant un squelette (C6-C3-C6). Provenant du mot latin flavus qui signifie jaune (**Karaali et al., 2004 ; Bouakaz, 2006**).

Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle centrale de type pyranne, formant une structure C6-C3-C6 (**Ghedira, 2005**). Ils sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phényl chromone (**Milane, 2004**).

II.2.1.1.2. Les Tanins

Toutes les plantes contiennent des tanins à un degré plus ou moins élevé. Ceux-ci donnent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles (**Iserin, 2001**). Ce sont des composés phénoliques hydrosolubles, capables de précipiter les protéines (Enzymes digestive et autres, protéines fongiques et viral) (**Benkiki, 2006**). De masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 Da, ils sont classés selon leur structure en tanins hydrolysables et en tanins condensés (**Ghesten et al., 2001**).

II.2.1.1.3. Les quinones

Ce sont des substances colorées et brillantes, en général rouges, jaunes ou orange et possédant deux fonctions cétones. On trouve les quinones dans les végétaux, les champignons, les bactéries. Les organismes animaux contiennent également des quinones, comme par exemple la vitamine K, qui est impliquée dans la coagulation du sang. Les quinones sont utilisées dans les colorants, dans les médicaments et dans les fongicides. Les quinones sont capables de se complexer de façon irréversible aux protéines des membranes bactériennes ce qui leur donne un potentiel antimicrobien élevé. (**Kansole, 2009**).

II.2.1.2. Les alcaloïdes

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, dont plus de 200000 molécules ont été identifiées. Classés selon leur appartenance chimique en composés phénoliques, terpénoïdes et alcaloïdes (Cuendet, 1999 ; Vermerris, 2006).

Un alcaloïde est une substance organique azotée a caractère alcalin et présentant une structure moléculaire hétérocyclique complexe (Badiaga, 2011). Généralement, les alcaloïdes sont produits dans les tissus en croissance : jeunes feuilles, jeunes racines. Puis, ils gagnent ensuite des lieux différents et, lors de ces transferts, ils peuvent subir des modifications. Chez de nombreuses plantes, les alcaloïdes se localisent dans les pièces florales, les fruits ou les graines, ces substances sont trouvées concentrées dans les vacuoles (Krief, 2003). Ce sont des composés relativement stables qui sont stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques (Omulokoli *et al.*, 1997 ; Wilhem, 1998 ; Judd *et al.*, 2002 ; Mauro, 2006 ; Kansole, 2009). Ils peuvent être présents dans tous organes (Ziegler et Facchini, 2008). Leur teneur est très variable, généralement comprise entre 0.1% et 2 à 3 % du poids sec de la drogue (Roux et Catier, 2007).

Les alcaloïdes existent rarement à l'état libre dans la plante, mais le plus souvent ils sont combinés à des acides organiques ou à des tanins (Ziegler et Facchini, 2008).

II.2.1.2.1. Classification des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont divisés en trois classes :

Les alcaloïdes vrais représentent le plus grand nombre d'alcaloïdes, sont toxiques et disposent d'un large spectre d'activités biologiques. Ils dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique. Ils sont présents dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme de sel, soit comme N-Oxyde (Badiaga, 2011).

Les pseudo-alcaloïdes présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés. Dans la majorité des cas connus, ce sont des dérivés d'isoprénoïdes (alcaloïdes terpéniques) et du métabolisme de l'acétate (Cyril, 2001 ; Badiaga, 2011).

Les proto-alcaloïdes sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un hétérocycle, ils ont un caractère basique et sont élaborés *in vivo* à partir d'acide aminé. Ils sont souvent appelés « amines biologiques » et sont soluble dans l'eau (Badiaga, 2011).

II.2.1.2.2. Biosynthèse

Contrairement à la plupart des autres types de métabolites secondaires, les nombreuses classes d'alcaloïdes ont des origines biosynthétiques unique (fig. 4). Les noyaux de base de ces différents alcaloïdes dérivent des acides aminés du métabolisme, L-ornithine, lysine, tyrosine et phénylalanine, tryptophane, l'acide anthranilique, l'acide nicotinique ainsi que l'histidine. (Mauro, 2006 ; Ziegler et Facchini, 2008 ; Nacoulma, 2012).

L'atome d'azote dans les alcaloïdes provient, en général, d'un acide aminé dont la structure carbonée reste souvent intacte dans la structure finale de l'alcaloïde. Une façon raisonnable est alors de classer les alcaloïdes en groupes, selon leur précurseur biosynthétique. Il existe cependant un grand nombre d'alcaloïdes qui n'ont pas forcément un acide aminé comme précurseur. Dans ces cas-là, l'atome d'azote est incorporé à un stade avancé de la biosynthèse par réactions d'amination sur des intermédiaires aldéhydes ou cétones, exemple Solasodine (fig.5) et Bufaline (fig.6). (Mann J., 1994 ; Bhat, S. V., 2005 ; Mauro, 2006).

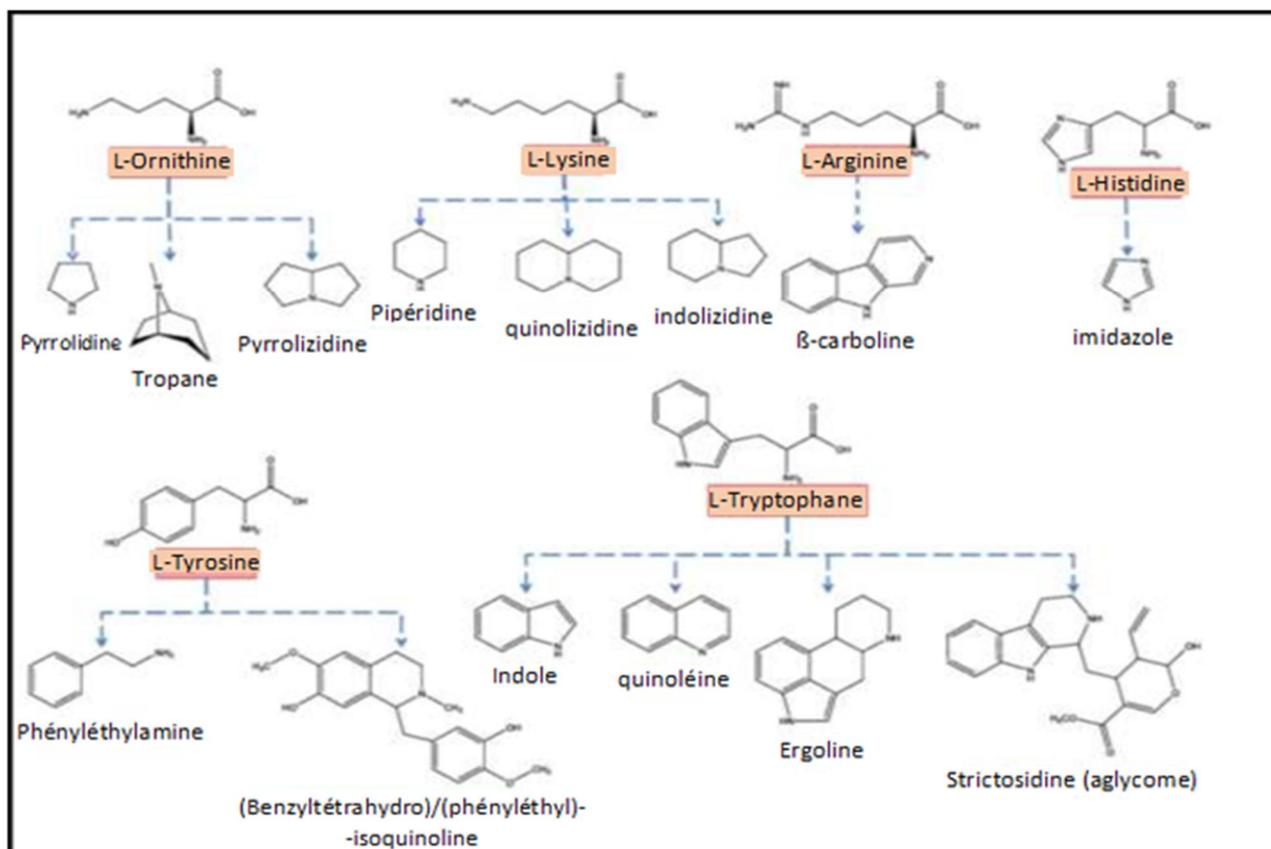


Figure 4. Origine biosynthétique de différentes classes d'alcaloïdes (Nacoulma, 2012).

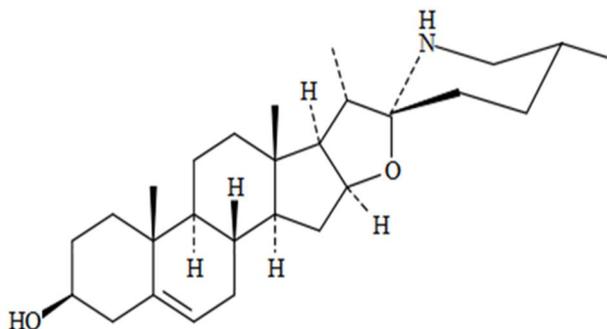


Figure 5. Solasodine

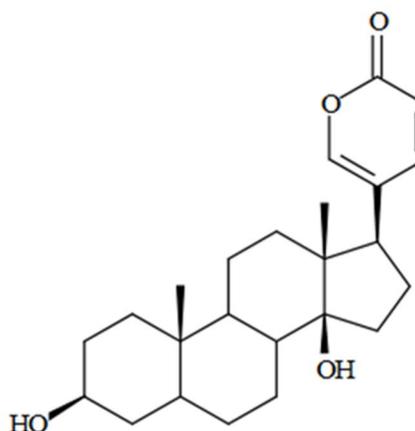


figure 6. Bufaline

II.2.1.2.3. Propriétés physicochimiques et pharmacologiques

Si dans les plantes, les alcaloïdes en tant que composés du métabolisme secondaire jouent un rôle écologique de défense contre des herbivores, chez l'homme ils trouvent cependant plusieurs applications pharmaceutiques (Mccalley, 2002 ; Stöckigt *et al.*, 2002).

- ❖ Les alcaloïdes présentent fréquemment de propriétés pharmacologiques marquées et ont de nombreuses utilisations en thérapeutique, notamment au niveau de système nerveux central, du système nerveux autonome et du système cardiovasculaire (GAZENDEL et ORECCHIONI, 2013).
- ❖ On notera aussi l'existence d'anti-tumoraux, d'antiparasitaires, de curarisants, les alcaloïdes sont utilisés comme anti-cancer, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson). Ces nombreuses activités conduisent à une utilisation importante des drogues à alcaloïdes, soit sous forme de préparations galéniques, soit le plus souvent, pour l'extraction des alcaloïdes qu'elles renferment, ces alcaloïdes étant utilisés eux-mêmes ou servant de matière première d'hémi-synthèse ((iserin *et al.*, 2007 ; Gazengel et Orecchioni, 2013).

III.1. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

Les effets antimicrobiens de différentes espèces des plantes aromatiques sont mis à profit de manière empirique pour augmenter la durée de vie des aliments. Les propriétés antimicrobiennes sont essentiellement dues à la fraction de principe actif contenues dans les plantes (Roques et al., 2002). (Yakhlef., 2010) note que les extraits des plantes et beaucoup d'autres préparations phytochimique possèdent une activité antimicrobienne.

Les alcaloïdes sont des composés qui possèdent une activité antimicrobienne contre les bactéries et les champignons phytopathogènes, elles peuvent inhiber la croissance et le métabolisme des microorganismes. (Nurgun et al., 2007). Divers essais *in vitro* et sur des animaux, menés au cours des années 1970 et 1980, ont démontré que l'alcaloïde de la berbérine avait une activité antibiotique à large spectre contre plusieurs variétés de bactéries et champignons pathogènes. Ceux-ci sont impliqués dans de nombreuses infections courantes chez l'humain (staphylocoques, streptocoques, *E. coli*, chlamydia, diphtérie, salmonelle, choléra, pneumocoque, *Pseudomonas* - otites notamment -, dysenterie, candidose, etc.) (Pizzorno et Murray, 2006).

La stéphanine et la crebanine, deux alcaloïdes isolés de *Stephania dielsiana* montrent une activité contre diverses bactéries pathogènes ainsi contre plusieurs champignons phytopathogènes comme le *fusarium oxysporum* (Deng et al., 2011).

Par ailleurs, l'activité antivirale des alcaloïdes n'est pas négligeable. Elle a été mise en évidence à travers des études *in vitro* et *in vivo* sur plusieurs virus tels que celui de l'influenza H1N1 (Bing et al., 2009).

III. 1. 1. Principaux techniques de détermination de l'activité antimicrobienne

L'examen des données bibliographiques fait apparaître la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des extraits végétaux.

Les différents protocoles peuvent ainsi être classés, selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'extrait végétal ou bien selon la nature du contact de l'extrait végétal avec le germe (Chikloune, 2007).

III. 1. 1. 1. Aromatogramme

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme. Elle permet de déterminer l'activité inhibitrice de la croissance d'agents antimicrobiens, par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque de cellulose imprégné de différents produits à tester. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante (**Fauchere et Avril, 2002**).

III. 1. 1. 2. Méthode du puits ou cylindre

Proposé par **Cooper et Woodman (1946)**, reprise par **Shroder et Messing (1949)**. **Hallal (2011)** note que cette méthode assure une diffusion radiale des extraits à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable. La méthode consiste à découper un trou circulaire dans la gélose et y verser une solution d'extrait de concentration connue. L'extrait diffusé radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne.

III. 1. 1. 3. Méthode de dilution

Les extraits à tester peuvent également être directement mélangés en concentration connue au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide (exige la dispersion homogène par un émulsifiant) (**Hallal, 2011**).

Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes. Après incubation, on remarque la présence ou l'absence de culture. La lecture peut être visuelle à l'aide d'un spectrophotomètre. Le degré d'incubation est en rapport avec la turbidité du milieu (**Hallal, 2011**).

III. 1. 1. 4. Méthode micro-atmosphère

Selon **Pibiri (2006)** cette technique consiste à cultiver les microorganismes à tester dans les boîtes de pétri sur milieu de culture approprié. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné d'extrait qui est déposé au centre du couvercle de la boîte de pétri, renversé après la fixation de l'extrait sur le disque. Celui-ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélosé. L'extrait s'évapore dans l'atmosphère de la boîte. Elle peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés.

Deuxième partie



Etude expérimentale



Matériel & méthodes

Chapitre I. MATERIEL ET METHODES

Notre travail porte sur une étude phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne d'une plante de la famille des *Fabaceae* : *Cytisus arboreus* (Desf.) DC. Á cet effet, plusieurs aspects sont traités dans cette partie. Il s'agit dans la première partie de l'analyse phytochimique de l'espèce citée ci-dessus, elle est suivie par l'extraction de l'extrait alcaloïdique. La troisième partie porte sur l'étude qualitative des extraits organiques par une chromatographie sur couche mince et la CPG/MS. La dernière partie concerne l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait alcaloïdique.

L'ensemble du travail a été réalisé au niveau du laboratoire corrosion bactérienne du centre de recherche et de développement SONATRACH de la wilaya de Boumerdès. L'extraction des alcaloïdes totaux a été réalisée au niveau du laboratoire de recherche Technologie Alimentaire, FSI, UMBB.

I.1. MATERIEL

I.1.1. Matériel biologiques

I.1.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est composé de tiges, feuilles et racines de la plante médicinale récoltée au niveau de la commune de Kalous wilaya de Bouïra.

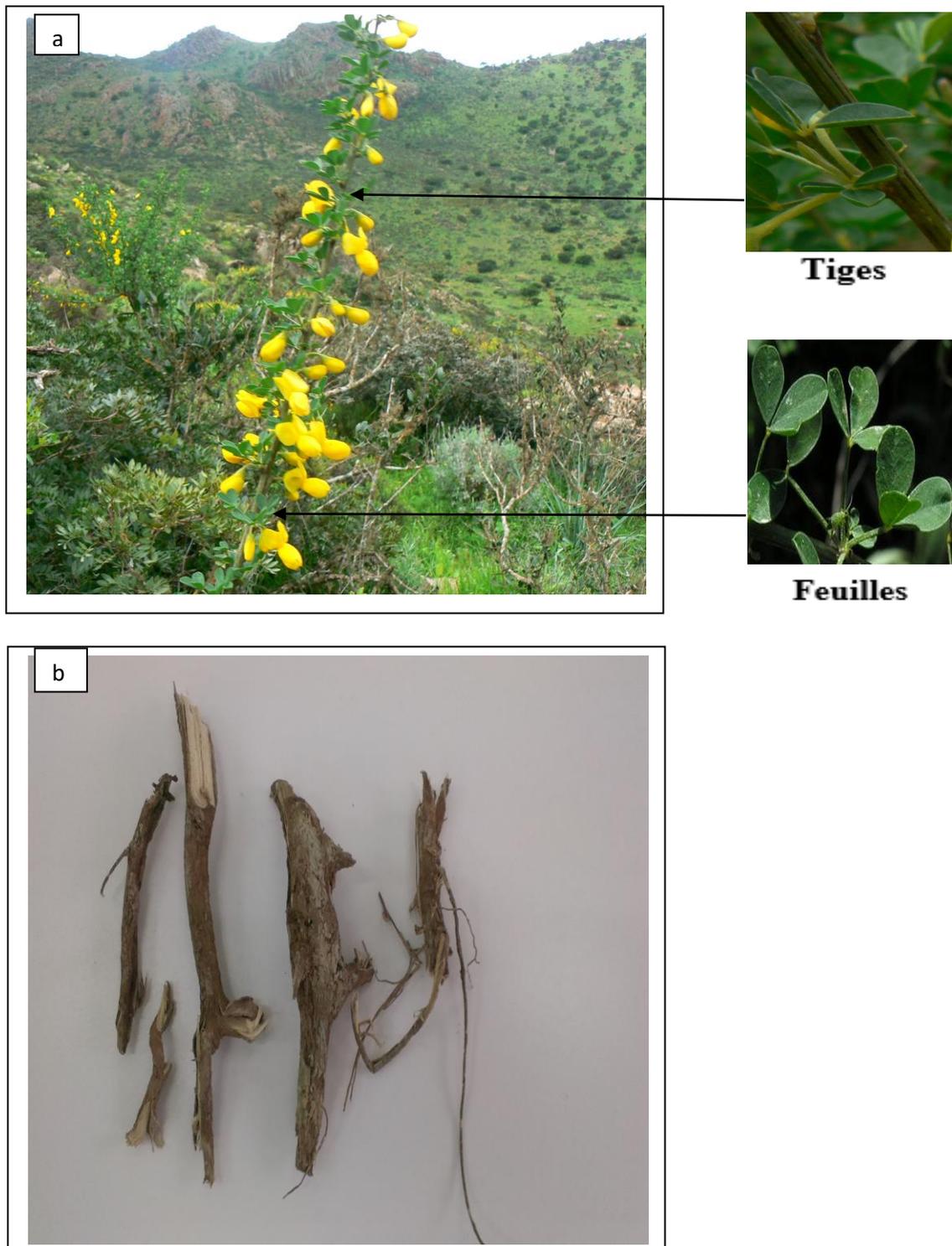


Figure 7. Photo de la plante *Cytisus arboreus* (Desf.) DC. : a) Partie aérienne. b) Les Racines.

La plante *Cytisus arboreus* n'a jamais fait l'objet d'étude phytochimique en Algérie malgré l'abondance de cette espèce, aucun ouvrage traitant de la pharmacopée traditionnelle Algérienne n'évoque cette plante.

I.1.1.2. Matériel microbiologique

Les souches utilisées pour déceler l'activité antibactérienne et antifongique des extraits sont mentionnées dans le tableau II.

Tableau II. Les souches utilisées dans le test antimicrobien.

Souches microbiennes	Gram	Reference	Origine
<i>Esherichia coli</i>	-	ATCC 25922	Institut Pasteur d'Alger
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	ATCC 25923	Institut Pasteur d'Alger
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	ATCC 4352	Institut Pasteur d'Alger
<i>Candida albicans</i>	/	ATCC 2091	Institut Pasteur d'Alger
<i>Aspergillus niger</i>	/	/	Laboratoire de technologie alimentaire/UMBB

I.1.2. Matériel non biologique et équipement

La réalisation de cette étude a nécessité un ensemble d'appareils, de réactifs, de produits chimiques et de verreries qui sont mentionnés dans l'Annexe I et II.

I.2. Méthodes d'études

L'ensemble des étapes de ce travail est représenté dans le schéma suivant :

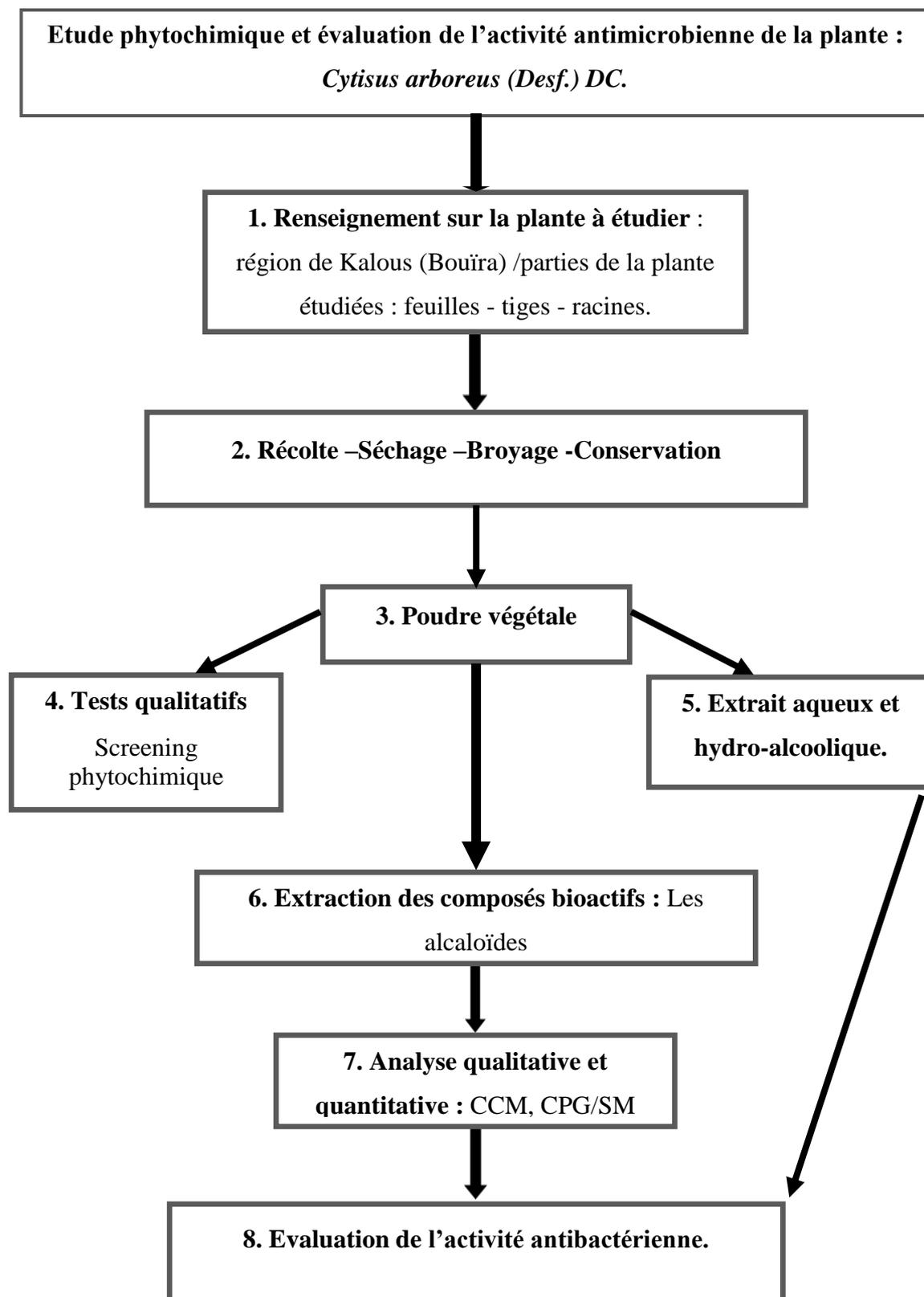
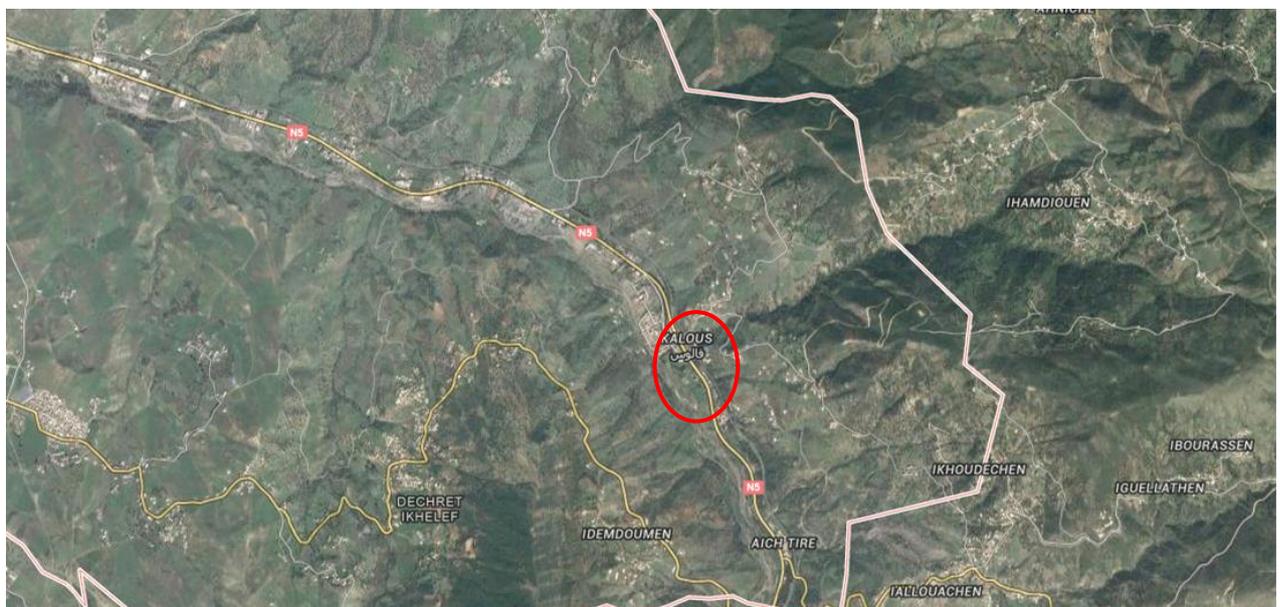


Figure 8. Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'étude.

I.2.1. Préparation de la matière végétale

I.2.1.1. Récolte

La récolte de la plante médicinale *Cytisus arboreus* (Desf.) DC. a eu lieu au mois d'Avril 2016 dans les montagnes de la commune de Kalous wilaya de Bouïra. Voir (fig. 9).



○ La région de kalous.

Figure 9. Site de récolte de la plante *Cytisus arboreus* (Desf.) DC.

I.2.1.2 Séchage

La plante *Cytisus arboreus* (Desf.) DC. récoltée puis séchée à l'air libre à l'abri de la lumière et de l'humidité, dans le but de diminuer leur teneur en eau. Ce procédé empêche les réactions d'altérations qui peuvent se produire et limite ainsi la prolifération des microorganismes.

I.2.1.3 Broyage

Les feuilles, les tiges et les racines sont broyées séparément à l'aide d'un broyeur et enfin conservées dans des boîtes métalliques.

Le broyat va constituer la matière sèche qui va servir à l'extraction aqueuse, hydro-alcoolique et l'extraction des alcaloïdes (Fig. 10).



a. Feuilles



b. Tiges



c. Racines

Figure 10. Poudres végétales obtenues après broyage des trois parties étudiées de la plante séchée. (Photo originale)

I.2.2. Screening phytochimique

Le screening phytochimique représente l'ensemble des techniques qualitatives permettant la détermination des différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal grâce à des réactions physicochimiques. Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais les principaux sont les polyphénols totaux y compris les flavonoïdes, les anthocyanes, les tannins, les coumarines, les alcaloïdes, les saponosides, les stérols, les terpènes... etc. Le screening phytochimique a été réalisé par des réactions usuelles à l'aide des réactifs de caractérisation classiques (Lendvai et al., 2002 ; Bruneton, 2009).

I.2.2.1. Préparation des solutions à analyser

✓ Préparation du décocté

Le décocté de chaque organe de la plante est préparé par l'addition de 10g de poudre végétale à 100 ml d'eau distillée. L'ensemble a été porté à l'ébullition pendant 15 minutes de temps, le mélange est filtré et le filtrat obtenu est ajusté à 100 ml par l'eau distillée après refroidissement. (Carvalho et al., 2005).

Les filtrats obtenus sont représentés par la (Fig. 11).

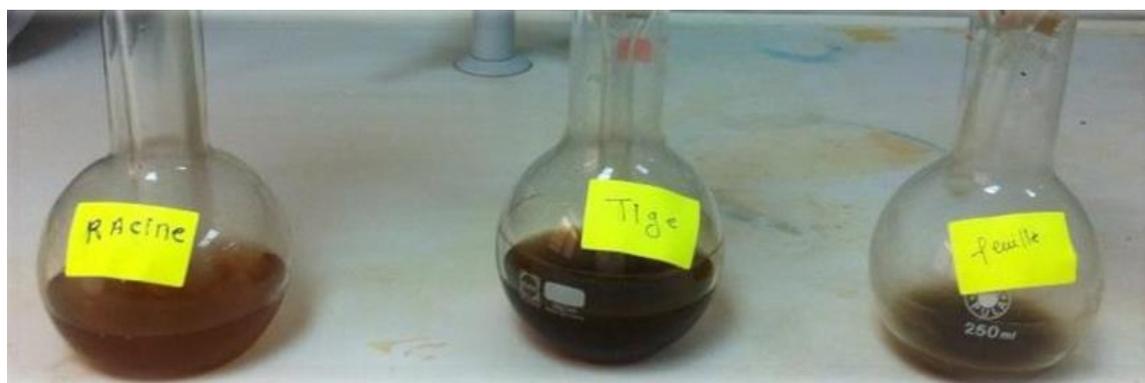


Figure 11. Décocté à 10% des poudres végétales des trois parties de la plante *Cytisus arboreus* (Desf.) DC. (Photo originale)

✓ **Préparation de l'infusé à 5%**

L'infusé à 5% de chaque organe est préparé par l'addition de 5g de poudre végétale à 100 ml d'eau distillée bouillante. Après 15 minutes de temps, le mélange est filtré et le filtrat obtenu est ajusté à 100 ml par l'eau distillée (**Basséne, 2012**).

Les filtrats obtenus sont représentés par la (Fig. 12).



Figure 12. Infusés à 5% des poudres végétales des trois parties étudiées de la plante *Cytisus arboreus* (Desf.) DC. (**Photo originale**)

I.2.2.2. Identification des tanins totaux

La présence des tanins totaux est mise en évidence dans 5ml d'infusé par l'addition de quelques gouttes de chlorure de fer ($FeCl_3$) à 5%. La réaction au $FeCl_3$ provoque l'apparition de coloration bleue noire ou verdâtre. (**Harborne et al., 1998; Raman et al., 2006**).

I.2.2.3. Identification des tanins catéchétique

La présence des tanins catéchétique est mise en évidence dans 15ml d'infusé par l'addition de 7ml de réactif de Stiansy. La réaction provoque l'apparition de coloration rouge. (**Harborne et al., 1998; Raman et al., 2006**).

I.2.2.4. Identification des tanins galliques

La présence des tanins galliques se manifeste par une coloration bleue foncée. La méthode consiste à mélanger 2 g d'acétate de sodium et quelques gouttes de chlorure de fer anhydrique à 5% avec 5 ml d'infusé. (**Harborne et al., 1998; Raman et al., 2006**).

I.2.2.5. Identification des quinones libres

2g de la poudre végétale humecté avec HCl, sont mise en contact avec 20 ml de chloroforme pendant 3h. Agiter le filtrat avec 5ml d'ammoniaque. Une coloration rouge apparait en présence des quinones libres (Paris et Nothis, 1987 ; Dohu et al., 2003 ; Souane, Ben Tahar, 2013).

I.2.2.6. Identification des saponosides

Dans une série de 10 tubes à essai de 160 × 16mm, numérotés de 1 à 10, réparties successivement 1,2,...,10 ml de décocté et ajuster le volume à 10 ml dans chaque tube avec de l'eau distillée. Agiter ensuite chaque tube dans le sens de la longueur pendant 15 secondes en raison de deux agitations par seconde. Laisser reposer pendant 15mn et mesurer la hauteur de la mousse dans chaque tube. (N'Guessan et al., 2009).

Le tube dans lequel la hauteur de mousses est de 1 cm indique la valeur de l'indice de mousse.

Indice de mousse = $1000 / n^{\circ}$ du tube ou la hauteur de mousse est de 1 cm.

I.2.2.7. Identification de l'amidon

A 2g de poudre végétale on met quelque goutte d'iode. La formation d'une coloration bleue violette indique la présence d'Amidon (Benmehdi, 2000).

I.2.2.8. Identification des flavonoïdes

a- A 5 ml d'infusé additionner 5 ml d'acide chlorhydrique 1N, un copeau de magnésium et 1ml d'alcool isoamilique. La réaction donne une coloration rouge orangé en présence des flavonoïdes.

b- A 2 ml d'extrait méthanolique on ajoute quelque gouttes de solution d'hydroxyde de sodium de 20%. La formation d'une couleur jaune intense devient sans couleur à l'addition de l'acide chlorhydrique dilué indique la présence des flavonoïdes.

I.2.2.9. Identification des alcaloïdes**Solution à analyser**

Dans un erlenmeyer 250ml, nous avons introduit 5g de la poudre végétale, et 25ml de l'acide sulfurique dilué à 1/10. La préparation a été agitée puis laissée macérer pendant 24 heures à la température ambiante du laboratoire. Après filtrage sur compresse deux fois et lavage à l'eau de manière à obtenir 25ml de filtrat ce dernier est soumis à une caractérisation

Caractérisation du filtrat

Nous avons introduit 1ml de filtrat dans deux tubes à essai et ajouté les réactifs généraux des alcaloïdes

- Tube n°1 : 5 gouttes de réactif de Mayer
- Tube n°2 : 5 gouttes de réactif de Dragendorff

La présence d'alcaloïdes a été caractérisée par les précipités dans les tubes à essai

I.2.2.10. Identification des Sterols-Triterpènes**Solution à analyser**

Introduire 1g de poudre végétale dans un erlenmeyer puis on ajoute 20ml de l'éther, boucher et agiter, laisser macérer pendant 24 heures au réfrigérateur. Filtrer et compléter à 20 ml avec l'éther.

Caractérisation (Réaction de lieberman-Burchard)

Mettre 10ml de l'extrait étheré dans une capsule et évaporer à sec sous l'hôte. Dissoudre le résidu dans 1ml de l'anhydride acétique et 1ml du chloroforme. Repartir dans deux tubes à essai l'extrait déjà dissout dont l'un servira de référence. À l'aide d'une pipette, placer de l'acide sulfurique concentré (1 à 2 ml) au fond du tube à essai sans agiter. À la zone de contact des deux liquides, il y a formation d'un anneau rouge-brunâtre ou violet, la couche surnageante devenant verte ou violette révèle la présence de stérols et triterpènes.

I.2.2.11. Identification des composés réducteurs

Introduire 5ml de décocté dans une capsule et évaporer à sec au bain-marie. Ajouter au résidu 1 ml de réactif de Fehling. La formation d'un précipité rouge brique indique la présence de composés réducteurs. (Evans et al., 2009).

I.2.2.12. Identification des oses et des holosides

Quelques gouttes d'acide sulfurique concentré ont été ajoutées à la poudre végétale.

La formation d'une coloration rouge révéla la présence d'ose et holosides. (Evans et al., 2009).

I.2.2.13. Identification des mucilages

Introduire 1 ml de décocté dans un tube à essai et ajouter 5 ml d'alcool absolu. L'obtention d'un précipité floconneux par mélange indique la présence de mucilages (Diouf, 2014).

I.2.3. Préparation de l'extrait alcaloïdique

❖ Principe

La méthode d'extraction par solvant est une méthode conventionnelle consistant à placer dans un extracteur un solvant (chloroforme, méthanol...etc.) et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs par des solvants immiscibles l'un avec l'autre, le solvant va se charger en molécules, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique (**Chemat, 2005**).

❖ Méthode d'extraction

Les feuilles, tiges et racines de *Cytisus arboreus Desf* séchées préalablement à l'abri de la lumière sont broyées pour l'obtention d'une poudre, 10 g de cette dernière sont macérées dans 100 ml HCL à 1N sous agitation magnétique pendant 2 heures.

La solution résultante est soumise à une filtration, on obtient un extrait aqueux acide contenant les alcaloïdes sous forme de sel, cette solution est dégraissée par 25 ml d'hexane trois fois.

Ensuite la solution est alcalinisée par l'ammoniaque (30%) jusqu'au pH 10 à 11 pour que les alcaloïdes reprennent la forme organique. Puis l'extrait aqueux basique est soumis à une extraction liquide-liquide par 25 ml de chloroforme trois fois jusqu'à la réaction Mayer négative. (**Mouellet, 2005**)

Teste Valsy-Mayer :

Le marc est repris par un minimum de quantité d'HCL, quelques gouttes de réactif Valsy-Mayer sont ajoutées à l'extrait en cas d'une réaction positive (apparition d'un précipité), l'opération extractive par le chloroforme est reprise.

La solution organique résultante est lavée par l'eau distillée et séchée sur le sulfate de sodium anhydre. L'extrait est ensuite évaporé sous vide à 40°C à l'aide d'un rota vapeur.

Enfin l'extrait est récupéré par un minimum de chloroforme dans un pilulier préalablement pesé et gardé au réfrigérateur après évaporation totale du solvant.

Les étapes principales de l'extraction sont résumées dans la fig. 13.

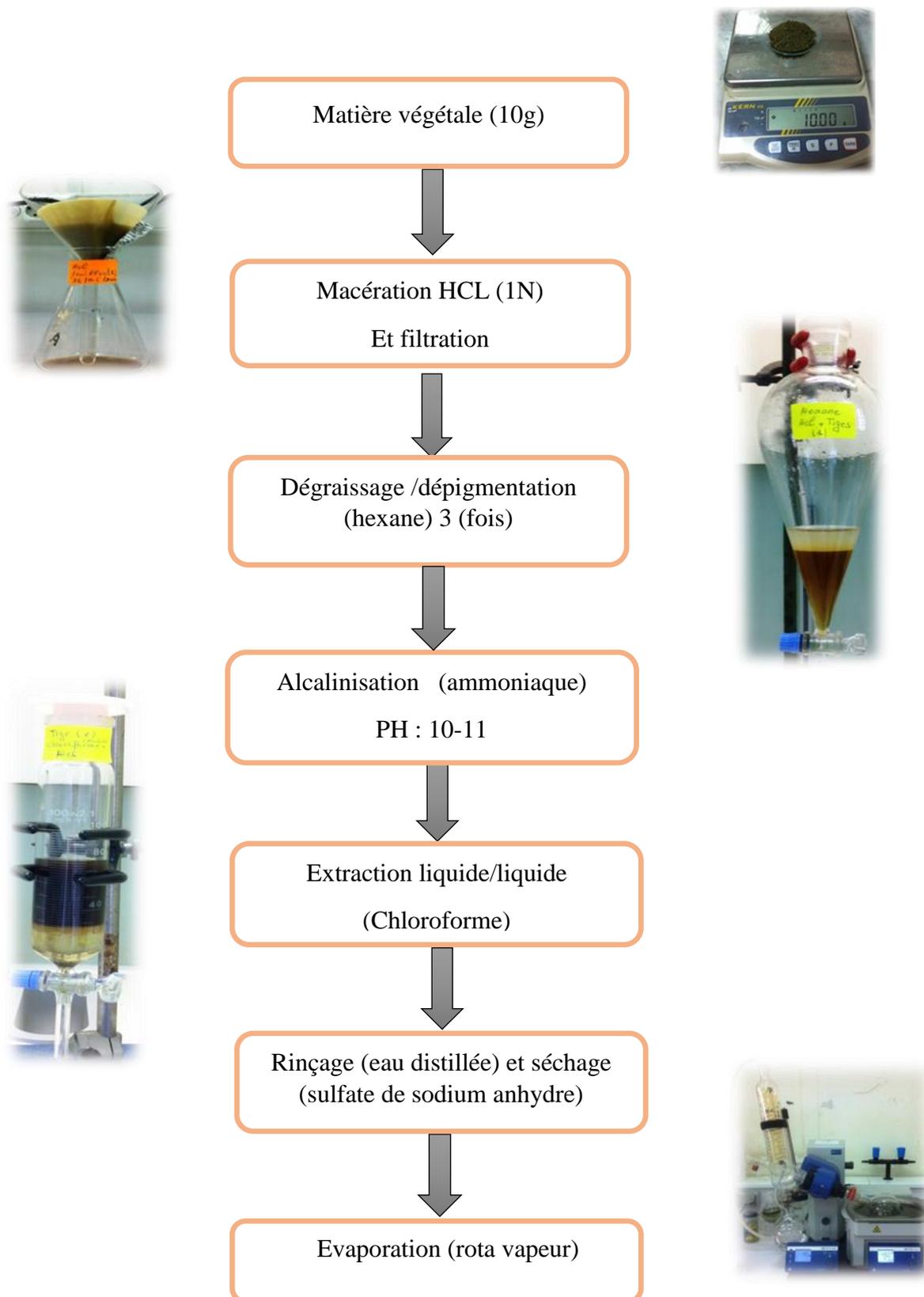


Figure 13. Les principales étapes de l'extraction des alcaloïdes.

❖ **Calcul de rendement de l'extraction**

Le rendement de l'extrait alcaloïdique obtenu est défini comme suit : le rapport entre la masse de l'extrait alcaloïdique brut à l'état sec et celle du matériel végétal (feuilles, tiges, racines) utilisé selon la formule décrite par **Gbohaida (2015)**.

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{masse de l'extrait}}{\text{masse de la poudre végétale utilisée}} \cdot 100$$



Figure 14. Les extraits alcaloïdiques obtenu après l'extraction (**Photo originale**).

I.2.4. Préparation des extraits hydro-alcoolique et aqueux

A/ Préparation de l'extrait hydro-alcoolique :

1. Ajouter 1g de la poudre végétale (tige, feuilles et racines) a 20 ml de la solution hydro-alcoolique à 70% agité pendant une nuit.
2. Evaporation et conservation au frais

B / Extrait aqueux

1. 1g de la poudre végétale dans 20 ml d'eau distillée agitation 24h.
2. Filtration et conservation au frais.

I.2.5 Caractérisation chimique

I.2.5.1 Analyse qualitative par chromatographie sur couche mince

❖ Principe

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse (figure15). Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption (**Kolai et al., 2007**).

Elle se base sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile qui est en générale un mélange de solvant ; adapté au type de séparation recherché et leur affinité vis-à-vis de la phase stationnaire qui peut être gel de polyamide ou gel de silice. Elle nous permet d'avoir les empreintes du contenu alcaloïdiques de l'extrait (**Gauthuret., 1968 ; Ferrari., 2002**).

❖ Mode opératoire

A/ préparation de la phase stationnaire

Les analyse ont été effectuées sur une plaque ; prête à l'emploi ; en gel de silice de type G60 fixée sur une plaque en verre avec les dimensions 20×20cm.

B/ Préparation de la phase mobile

Le solvant de migration (la phase mobile) utilisé dans cette identification est composé d'un mélange de Chloroforme (CHCl₃) – méthanol (CH₃OH) - ammoniacque (NH₄OH) avec les proportions suivantes : (85 :14 :1) V/V/V.

C/ le dépôt

Les échantillons à séparer sont solubilisés dans un minimum de méthanol. Puis ils sont déposés sur la plaque à l'aide d'une micropipette d'une façon perpendiculaire et linéaire sous forme de traits.

D/ Développement de la plaque

La plaque est déposée dans une cuve de chromatographie dont l'atmosphère est saturée préalablement pendant 2 heures par la présence de l'éluant (système solvant). La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant est distant de 1 à 2 cm du bord supérieur des plaques. Celle-ci est séchée à l'aide d'un séchoir après migration.

E/ Révélation

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 (**Lagnika, 2005**). Dans notre cas on a utilisé le réactif de Dragendorff qui donne des taches orangées marquées par leurs rapports frontaux indiquant la présence d'alcaloïdes avec une sensibilité de détection de 0,01-0,1 µg (**Flieger, 2000 ; Wagner et al., 2009**).

F/ Le calcul du rapport frontal

Le rapport frontal (R_f) est déterminé pour chaque constituant par la formule mentionnée par **Denny (1982)** comme suit :

$$R_f = d/D$$

Avec :

d : Distance parcourue par le constituant

D : Distance parcourue par le front de l'éluant

Le R_f est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant déterminé sur un support « phase stationnaire » donné. Il ne dépend pas de la concentration du constituant dans le mélange (**Lagnika., 2005**).

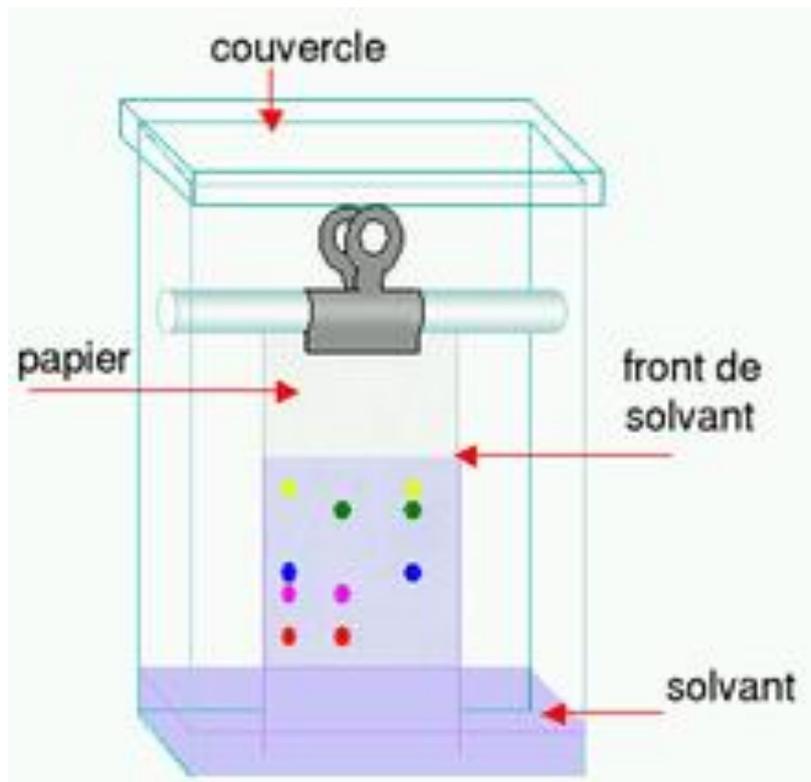


Figure 15. Schéma de CCM (Gobbi et Khebbaz ,2014).

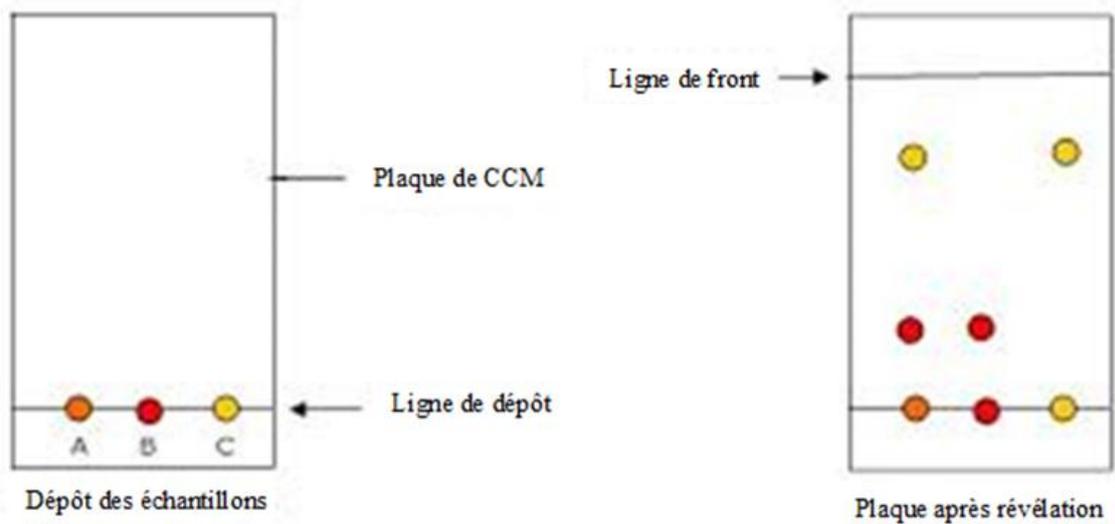


Figure 16. Schéma de préparation de plaque et dépôt des échantillons.

(Gobbi et Khebbaz ,2014).

I.2.5.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

- Principe

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse par séparation. Elle permet ainsi l'analyse de mélanges éventuellement très complexe de nature. A l'instant initial, l'échantillon est introduit en tête de colonne dans une petite chambre située en amont de la colonne sur le circuit des gaz. La chambre est portée à une température appropriée à la volatilité de l'échantillon. Les constituants du mélange injecté seraient entraînés à la même vitesse, celle du gaz porteur, et parviendraient tous ensemble à l'autre extrémité de la colonne, s'ils n'étaient freinés de façons différentes par l'interaction de leurs molécules avec celles de la phase stationnaire. Les arrivées sont enregistrées par un organe essentiel appelé détecteur (Tranchant, 1995).



Figure 17. Appareil de la CPG/SM. (Photo originale).

La spectrométrie de masse (SM) consiste dans une première étape à produire en phase gazeuse des ions de substance à analyser (échantillon vaporisé) par différentes méthodes (par exemple, par impact électrique). Cet ion moléculaire va se fragmenter (**De Hoffmann et Stroobant, 2005**).

La SM utilise le mouvement des ions ainsi obtenus dans les champs électriques et magnétiques afin de les classer et séparer en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Le principe est que les ions en mouvement peuvent être déviés par des champs électriques et magnétiques, puis détectés en proportion de leur nombre.

La combinaison en ligne de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse, ou CPG/SM, offre de multiples possibilités analytiques et que les deux techniques peuvent combiner harmonieusement leurs avantages spécifiques ; pour résumer, toute substance émergeant de l'extrémité d'une colonne de chromatographie est a priori analysable par une méthode de spectrométrie de masse afin de l'identifier.

I.2.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne

La détection de la sensibilité des bactéries aux extraits est faite conjointement par la méthode de diffusion sur milieu gélose. Cette méthode permet de déterminer l'activité inhibitrice de nos extraits sur la croissance des agents bactériens.

I.2.6.1 Vérification de la pureté des souches

Nous avons vérifié la pureté des souches de référence cibles par observation microscopique.

I.2.6.2 Conservation des souches

Les souches bactériennes identifiées précédemment (Annexe IV) et qui font l'objet de notre étude sont conservées dans des boîtes contenant de la gélose nutritive à 4°C.

I.2.6.3 Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés sont : (Annexe III)

- Gélose Muller-Hinton pour les bactéries
- Gélose Sabouraud pour la levure
- Gélose PDA (Potato Dextrose Agar) pour le champignon

I.2.6.4 Antibiogramme :

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques.

Nous avons utilisé des disques de 6mm de diamètre imprégnés des antibiotiques à différentes concentrations conditionnées par le fabricant.

L'effet antimicrobien a été testé par différents antibiotiques couramment utilisés sur les souches pathogènes, ceci afin de comparer l'efficacité thérapeutique des extraits.

Tableau III. Listes des antibiotiques testés sur les bactéries

Antibiotique	Charge
Ampicilline 1%	50 μ l
Vancomycine 1%	50 μ l

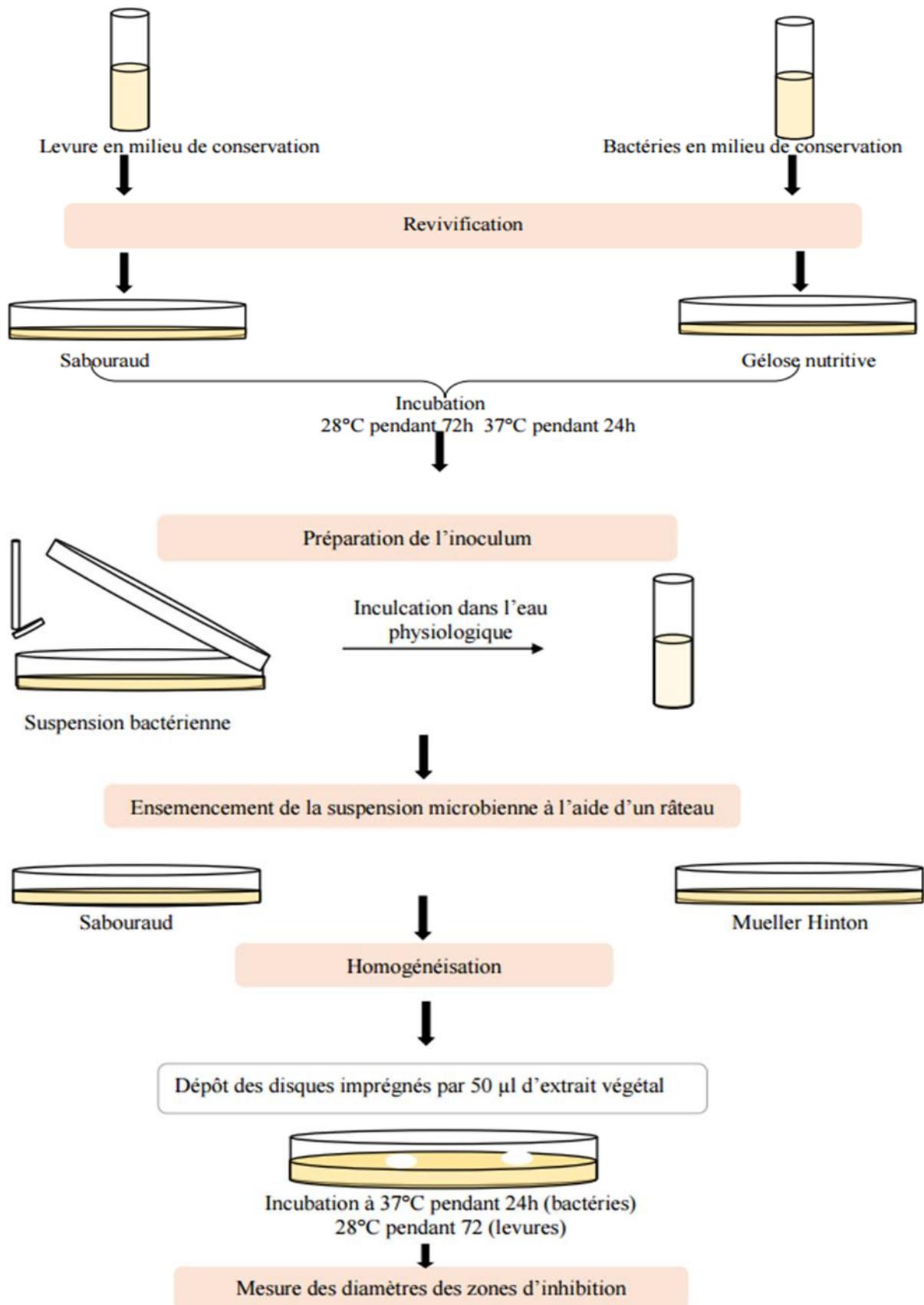


Figure 18. Étapes de l'étude de l'activité antimicrobienne d'un extrait végétal.

I.2.6.5 Revivification des souches microbiennes

La revivification des souches bactériennes a pour objectif l'obtention d'une culture pure et jeune. Elle est réalisée par la méthode des stries. Les souches sont alors revivifiées à partir des boîtes de conservation sur milieu GN, Saboureaux pour les levures et PDA pour le champignon. Les cultures sont incubées à l'étuve à 37°C pendant 24h dans le cas des bactéries, à 28°C pendant 3 jours pour la levure et à 28°C pendant 7 jours pour le champignon.

I.2.6.6 Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

- ✓ Décharger l'anse dans 10ml d'eau physiologique stérile à 0,9 %
- ✓ Bien homogénéiser la suspension bactérienne à l'aide d'un vortex (Photo 19), son opacité doit être équivalente à une DO de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm.
- ✓ L'inoculum peut être ajouté en ajoutant soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.
- ✓ L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la réparation de l'inoculum (**Rahal et al, 2011**).



Figure 19. Agitateur type VTX500 (vortex). (Photo originale).

I.2.6.7 Ensemencement

L'ensemencement se fait par la méthode d'écouvillonnage :

- ✓ Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.
- ✓ L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- ✓ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- ✓ Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois (**Rahal et al, 2011**).

I.2.6.8 Préparation des l'extraits alcaloïduques, hydro-alcooliques et aqueux

Après l'extraction sélective, les extraits secs(alcaloïduques) sont récupérés dans le DMSO à raison de 2 mg par disque. Pour les extraits hydro-alcooliques et aqueux à raison de 50 µl par disque.

Les solvants de solubilisation ont été testés sur les souches utilisées.

I.2.6.9 Application des disques d'antibiogramme

Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques sur une boîte de 90 mm de diamètre. Les disques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre.

Presser chaque disque à l'aide d'une pince bactériologique stérile pour s'assurer de son application. Une fois appliqué, le disque ne doit pas être déplacé (**Rahal et al., 2011**).

Les disques imprégnés stérilisés avec l'extrait sont séchés près d'un bec bunsen

Les boîtes doivent être mises dans le réfrigérateur pendant 2 heures afin de laisser l'extrait diffuser.

I.2.6.10 Incubation

Les boîtes sont incubées pendant 24 h à 37°C pour les bactéries et 48 h à 28°C pour la levure.

I.2.6.11. Lecture

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse ou à l'aide d'un double décimètre. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis de l'extrait végétal (**Ponce et al., 2003**).

On compare les résultats aux valeurs critiques

Selon le diamètre d'inhibition, on classe la bactérie dans l'une des catégories sensible, intermédiaire, ou résistance.

Tableau IV. Estimation de la sensibilité des souches (**Moreira et al. 2005**).

Diamètre de la zone d'inhibition (nm)	Sensibilité des souches
d < 7	Non sensible / résistante (-)
d [7 – 14]	Sensible (+)
d [15 – 19]	Très sensible (++)
d > 20	Extremement sensible (+++)

I.2.6.12. Analyse statistique (détermination de la moyenne, de l'écart type et l'erreur standard à la moyenne ESM).

Afin de se rapprocher le plus possible de la valeur réelle du diamètre de la zone d'inhibition et de déterminer avec certitude l'effet de l'extrait végétal sur les souches testées, nous avons eu recours à un indice statistique permettant de mesurer l'erreur standard à la moyenne (ESM). Le calcul de cet indice nécessite préalablement le calcul de la moyenne X et de l'écart-type (S). Les formules permettant d'obtenir les valeurs des paramètres cités sont les suivantes :

$$\text{➤ } S = \frac{\sqrt{(x-x)^2}}{n-1}$$

$$\text{➤ } X = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} nxi}{n}$$

$$\text{➤ } ESM = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Avec

X : moyenne arithmétique

x : valeur individuelle

n : effectif

S : écart-type



*Résultats &
discussion*

Dans cette partie du travail, nous allons exposer les résultats du screening phytochimique, de la caractérisation qualitative et quantitative des alcaloïdes de la plante médicinale étudiée « *Cytisus arboreus (Desf.) DC.* », et de son activité antimicrobienne.

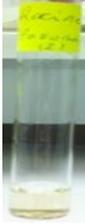
II.1. Screening phytochimique

Les résultats des tests de caractérisations phytochimiques réalisés sur les infusés, les décoctés et les poudres végétales de feuilles, tiges et racines de la plante médicinale sont résumés dans les tableaux V et VI

Tableau V. Les résultats de screening phytochimique (métabolites primaires).

Métabolites I aires		Nom de test	Résultat positif	<i>Cytisus arboreus Desf</i>		
				Feuilles	Tiges	Racines
Les sucres	Sucres réducteurs	Test de Fehling	Précipité rouge brique			
				+	+	+
	Oses et holosides	/	Couleur rouge			
				+	+	+
	Amidon	Iode	Couleur bleue violette			
				-	-	-

Tableau VI. Les résultats de screening phytochimique (métabolites secondaires).

Métabolites II aire	Nom de test	Résultat positif	<i>Cytisus arboreus Desf</i>			
			Feuilles	Tiges	Racines	
Flavonoïdes	a	Couleur rouge Orangé				
	b	Jaune intense				
			+++	+	++	
Les tanins	Tanins Totaux	/	Couleur bleue noire			
				+++	+++	+
	Tanins catéchétiques	Réactif de Stiansy	Couleur rouge			
				-	-	-
	Tanins gallique	/	couleur bleue foncé			
				+++	+++	+

Suite du tableau VI : Les résultats de screening phytochimique (métabolites secondaires).

Métabolites II aire	Nom de test	Résultat positif	<i>Cytisus arboreus</i> Desf		
			Feuilles	Tiges	Racines
Quinones libres	/	Couleur rouge			
			-	-	-
Saponosides	Test de mousse	Apparition de mousse			
			+	+	+++
Stérols et tri terpène	Reaction de Liebermann-Burchard	Anneau rouge brunâtre ou violet			
			+	+	+
Alcaloïdes	Mayer	Précipitation			
	Dragendorff	Précipitation			
			+++	+++	++

Avec :

(-) : Absence de substance ;

(+) : Présence de traces ;

(++) : Moyenne teneur en substance ;

(+++): Forte teneur en substance.

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites primaires et secondaires au niveau des tissus végétaux des trois parties (feuilles, tiges et racines) de la plante. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette (**Kanoun, 2011**).

D'après les résultats obtenus de screening phytochimiques, on constate que la plante médicinale étudiée présente une diversité moléculaire quant aux métabolites primaires et secondaires.

L'examen des tableaux fait ressortir que la plante *Cytisus arboreus*, en général, présente une quantité importante de tanins galliques, flavonoïdes, saponosides, composés réducteurs et alcaloïdes, et en quantité moins importante en stérols et triterpènes. Cependant, nous observons l'absence d'amidon, tanins catéchétiques, coumarine et les quinones libres.

Pour les deux parties aériennes (feuilles et tiges) elles présentent une très forte teneur en alcaloïdes et tanins galliques par rapport à celle présente dans les racines. Cependant les flavonoïdes sont présents en forte teneur dans les feuilles, en moyenne teneur dans les racines et en faible teneur dans les tiges. De plus on note une absence totale des stérols et triterpènes dans les racines et une présence moyenne dans les feuilles et les tiges.

Dans tous les tubes, concernant la partie racine on note l'apparition de mousses, ainsi que la mousse de 1 cm de hauteur présenté dans le tube numéro 4 nous confirme la présence de saponoside .Donc l'indice de mousse à partir de la formule précédente donne $I = 250$. Ce résultat indique que notre plante est riche en saponosides.

Le potentiel d'une plante médicinale est attribué à l'action de ses constituants phytochimiques. Ils sont produits comme métabolites secondaires, en réponse au stress

environnemental ou pour assurer un mécanisme de défense aux agressions provoquant des maladies chez les végétaux (**Mohammedi, 2013**).

En effet les flavonoïdes jouent un rôle dans la coloration des végétaux (**Ribéreaugayon et Reynaud, 1968**), aussi ils possèdent des rôles très importants dans les plantes, en les protégeant contre le stress hydrique et génèrent une tolérance des plantes aux métaux lourds présents dans les sols. Hors la plante, les flavonoïdes possèdent plusieurs effets pharmacologiques (**Makhloufi, 2010**). Les flavonoïdes protègent les aliments d'origine végétale de l'oxydation, ce sont des antioxydants réputés pour leur action anti-radicalaire (**Makhloufi, 2010**).

En parallèle, on note la présence de tanins, ce composé qui donne un goût amer à l'écorce ou aux feuilles et les rendent impropres à la consommation pour les insectes ou le bétail (**Eberhard et al., 2005**). Les plantes peuvent produire des substances phénoliques (tannoïdes) en réponse à un stress environnemental, suscité par différents facteurs : déficience en éléments nutritifs, sécheresse, sur-chauffage (températures élevées) et l'intensité lumineuse (**Rira, 2006**).

La présence des alcaloïdes peut expliquer des activités biologiques diverses (**Milcent et Chau, 2003**). Ils jouent, à faibles doses, le rôle d'anesthésiques locaux, d'analgésique, d'antibiotiques, d'antiparasitaires, d'antipaludique, d'antitumoraux et d'amoebicides (**Chenni, 2010**).

La plante est très riche en saponosides, Les saponosides possèdent des propriétés anti-inflammatoires et antioedémateuses, ils sont particulièrement toxiques pour les poissons et autre animaux aquatiques (**Bouhadjera, 2005**). Aussi ces molécules ont des propriétés analgésiques (**Roux et Catier, 2007**).

II.2. Rendement en extraits alcaloïdiques

Les résultats récupérés après évaporation ont été pesés pour déterminer le poids résultant, cet extrait renferme les alcaloïdes. Le rendement a été déterminé par rapport à 10g de matière végétale sèche rendue en poudre, l'opération a été refaite deux fois pour chaque partie de la plante afin de déterminer l'erreur standard à la moyenne (ESM). Les résultats ont été exprimés en pourcentages. Les tableaux ci-dessous et la figure 20 regroupent le rendement et la quantité en grammes de chaque extrait alcaloïdique.

Tableau VII. Rendement en alcaloïdes des trois parties de la plante étudiée.

<i>Parties de la plante utilisées</i>	<i>Masse de l'extrait (g)</i>	<i>Rendement (%)</i>	<i>Rendement Moyen ± ESM</i>
<i>Feuilles (1)</i>	0,0349	0,349	0,328 ± 0,020
<i>Feuilles (2)</i>	0,0307	0,307	
<i>Tiges (1)</i>	0,0262	0,262	0,272 ± 0,077
<i>Tiges (2)</i>	0,0282	0,282	
<i>Racine (1)</i>	0.0103	0,103	0,1235 ± 0,019
<i>Racines (2)</i>	0.0144	0,144	

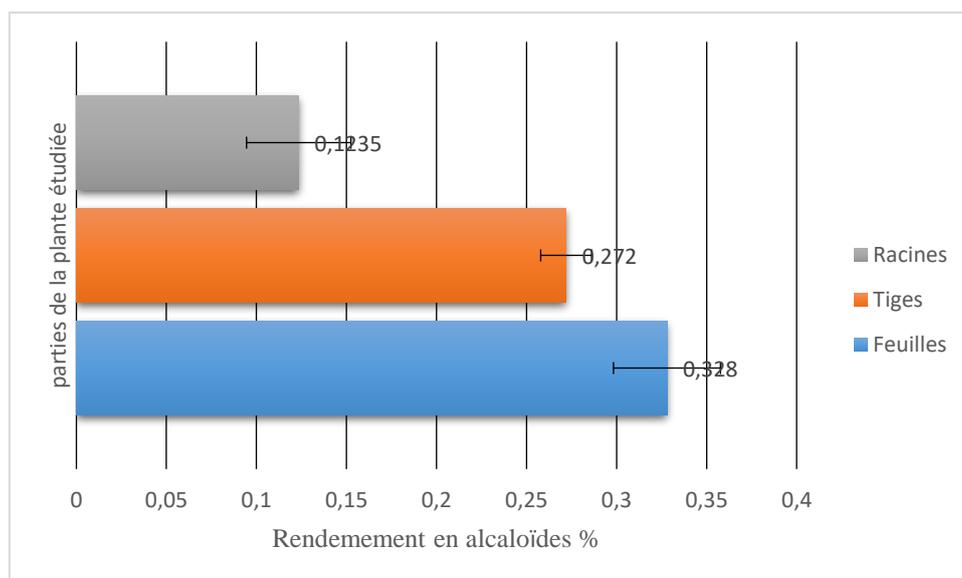


Figure 20. Rendement en extraits alcaloïdiques des trois parties de la plante étudiée.

Selon la figure 20 il s'avère que le rendement en alcaloïdes diffère d'une partie à une autre de la plante étudiée notamment entre les parties aériennes et la partie sous terrainne. Le taux le plus élevé est obtenu avec les feuilles 0,328 % ($\pm 0,02$). Le rendement d'extraction des alcaloïdes obtenu par les tiges est inférieur de 17% à celui des feuilles, tandis que le rendement d'extraction obtenu par les racines est inférieur de 62%, ce qui confirme les résultats de screening ; les feuilles et les tiges contiennent plus d'alcaloïdes par rapport aux racines.

D'après ces résultats, nous pouvons considérer *C. arboreus* comme une plante à alcaloïdes puisqu'elle renferme une teneur plus de 0,01% (Vapoorte, 2005).

Il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie car le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. Nous avons appliqué une méthode conventionnelle qui se base sur la protonation et la déprotonation des alcaloïdes afin de les transformer de la forme base à la forme sels et vice versa, en jouant sur leur solubilité dans les solvants (Vapoorte, 2005).

Les teneurs en alcaloïdes sont dans les normes par rapport aux résultats rapportés par la littérature pour les feuilles de *Cytisus scoparius* L., entre 0,3 et 1,5%, obtenues par la méthode conventionnelle (Wagner et al., 2009).

Cependant il y a plusieurs autres méthodes non conventionnelles telles que l'extraction assistée par ultrasons à l'aide d'une sonde à ultrasons (sonication directe) et l'extraction

assistée par ultrasons à l'aide d'un bain à ultrasons (sonication indirecte) (Djilani et Legseir, 2004). Toutefois Chebili, S., (2012) a appliqué ces deux dernières méthodes pour l'extraction des alcaloïdes quinolizidiniques de *Cytisus triflorus*, le rendement obtenu a été de 1,83% pour la sonication directe et de 1,10% pour la sonication indirecte. Donc on constate qu'il y a d'autres méthodes bien plus efficaces que la méthode conventionnelle.

Les Caractères organoleptiques des alcaloïdes totaux montrent que les extraits ont un aspect aqueux d'une couleur brune foncée et portent la même odeur que celle de la plante.

II.3. Chromatographique par CCM

L'analyse chromatographique des alcaloïdes totaux a été réalisée avec le système solvant (chloroforme-méthanol-ammoniaque ; 85 :14 :1), (v/v/v) qui nous a donné une bonne séparation des composants de notre extrait alcaloïdique et révèle la présence de nombreux tâches fluorescentes observées sous la lampe UV, les résultats de chromatogramme sont regroupés dans la photo 21.

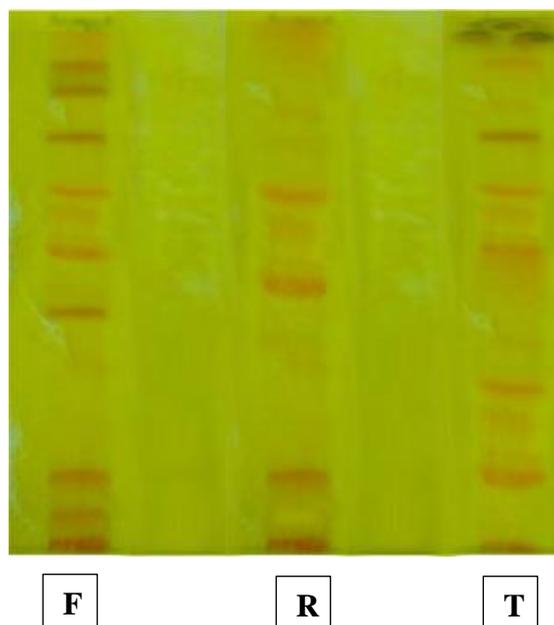


Figure 21. Photo de plaque CCM prise après révélation par reactif de Dragendroff. (F : feuille. R : Racine. T : tige). (Photo originale)

La chromatographie sur couche mince a permis de séparer les composants des trois extraits des alcaloïdes totaux de la plante comme indiqué dans les chromatogrammes ci-dessus. Pour la révélation des alcaloïdes contenus dans les différents extraits, c'est le réactif de Dragendorff qui a été pulvérisé sur la plaque. Il s'agit d'iodobismuthate de potassium qui donne en présence d'alcaloïdes des tâches jaune-orange ; dont l'extrait des feuilles montre un nombre plus élevé de taches (10) par rapport aux deux autres extraits tiges (07) et des racines (04). Donc on a pu conclure que l'extrait feuille est le plus riche qualitativement en alcaloïdes.

On remarque aussi que les taches apparaissent sous deux formes d'un trait fin et des taches de forme elliptiques large.

D'après les données de la littérature (**Wink, 1993**) tableau 9 nous avons fait correspondre à chaque tâche du chromatogramme de CCM réalisée dans le même système solvant (S1 : Chloroforme-méthanol-ammoniaque), un nom d'alcaloïdes du même R_f qu'elle pourrait identifier nos composés.

Tableau VIII. Identification des trois extraits alcaloïdiques de *C. arboreus* selon leur R_f

Rf. / Organe	Feuilles	Tiges	Racines	Type d'alcaloïde proposé selon (Wink, 1993)
1	0	0	0	-
2	0.02	0.02	-	11,12-Dehydrospartéine
3	0.07	-	-	Spartéine
4	0.13	0.13	0.13	-
5	0.42	0.42	0.42	Cytisine
6	0.52	0.52	-	Matrine
7	0.63	-	0.63	Angustifoline
8	0.75	0.75	-	-
9	0.80	-	-	Aphylline/17-Oxospartéine/17-oxolupanine
10	0.90	0.90	-	-
Nombre des taches	10	7	4	

D'après les résultats du tableau il ressort que nos extraits sont riches en alcaloïdes qui appartiennent à la famille des quinolizidiniques. En comparant nos résultats avec les travaux de **Wink 1993**, nous avons pu détecter quelques alcaloïdes dans nos différents extraits selon leurs Rf en utilisant le réactif de Dragendorff qui a été pulvérisé sur les plaques, d'autres taches n'ont pas été identifiées, cela est peut-être dû à l'absence de ces composés d'alcaloïdiques dans les espèces étudiées par cet auteur. Bien que la CCM soit une méthode fiable et facile à appliquer pour la détection des alcaloïdes, le manque de matériel de références comme les molécules standards, limite l'utilisation de cette méthode.

Le chromatogramme montre la présence de plusieurs taches fluorescentes, l'un des taches est de fluorescence jaune dans l'extrait feuille avec un Rf de 0.25, cette tache pourrait représenter berberine, un alcaloïde très abondant qui présente une fluorescence jaune d'après la littérature (**Makkar et al, 2007**).

Les alcaloïdes identifiés par certains chercheurs sont représentés par la famille des isoquinolines : acanthine, bargustanine, berbamine, berberrubine, berlambine, columbamine, jatrorrhizine, lambertine, magnoflorine, palmatine et berberine (**Imanshahidi et Hosseinzadeh, 2008**).

D'après (**Bruneton, 1999 ; Hoffmann, 2003**) Les alcaloïdes quinolizidiniques se trouvent dans la sous-famille des *Faboideae*, produites essentiellement par les genres *Cytisus* L. et *Lupinus* L. Les quinolizidines bi-, tri- ou tétra-cyclique caractérisent la famille des Fabaceae, dans laquelle, on compte près de 200 espèces alcaloïdiques, dans plus de 40 genres dont certains d'eux sont responsables de leur activité et / ou toxicité.

II.4. Analyse qualitative CPG/SM des extraits alcaloïdiques de *C. arboreus*

Vu que Les analyses par CPG/SM sont très couteuses nous avons pu tester que deux extraits alcaloïdiques de feuilles et racines de *C.arboreus*, elle a permis de détecter quelques types d'alcaloïdes. Les chromatogrammes sont présentés dans l'Annexe V.

1. Extrait alcaloïdiques des feuilles

D'après la base de données électronique (NIST MS search 2.2), nous avons pu identifier 7 types d'alcaloïdes de l'extrait des feuilles, signalés dans le chromatogramme présenté dans l'annexe V. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau IX : Les 7 types d'alcaloïdes obtenus par l'extrait des feuilles

Type d'alcaloïde	Formule	tR (min)	Masse molaires (g/mol)
Maytansine	C ₃₄ H ₄₆ CINO ₁₀	10,87	691,5
N-methyltomatidine	C ₂₈ H ₄₇ NO ₂	6,22	429
N-methylsolasodine	C ₂₈ H ₄₅ NO ₂	12,36	427
3-butylindolizidine	C ₁₂ H ₂₃ N	13,26	181
Fluoratropine	C ₁₇ H ₂₂ FNO ₃	14,86	307
P-bromoatropine	C ₁₇ H ₂₂ BrNO ₃	16,36	367,9
Neronine	C ₁₈ H ₂₁ NO ₆	18,07	347

2. Extrait alcaloïdiques des racines

D'après la base de donnée électronique (NIST MS search 2.2), nous avons pu identifier à tR=14,36 min, une molécule de masse molaire M= 347g/mol. Cette molécule correspondrait à la neronine 4β.5-dihydro- (C₁₈H₂₁NO₆) dans la fraction testée avec un pourcentage massique de 22.162 %.

D'après les résultats il ressort que les feuilles contient plus d'alcaloïdes que les autres organes car ils sont synthétisés dans les chloroplastes, puis sont transportés vers tous les organes de la plante via le phloème (**Wink et Hartmann, 1982 ; Wink et Witte, 1984**). Ceci explique la présence de ces alcaloïdes dans les tiges et les racines. Notant que le genre *Cytisus* L. est riche en alcaloïdes avec un pourcentage de 85% - 90% (**Wagner, 2009**).

II.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne des trois extraits

II.5.1. Méthode de diffusion sur milieu gélosé

Les extraits sont testés sur des souches microbiennes, la toxicité du solvant peut également être critique car même en traces, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique. Selon **Yrjonen (2004)**, l'attention devrait également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissous pendant que le solvant peut réagir avec certaines composées pour produire des complexes ou pour causer la décomposition, la déshydratation, ou l'isomérisation de ces composés.

Pour cela, nous avons réalisé un test préliminaire avec le méthanol, dans le but d'évaluer l'effet de DMSO et de méthanol sur la croissance des souches microbiennes. Les valeurs de la zone d'inhibition (d) des composés alcaloïdiques des trois parties de la plante testée sur les six souches microbiennes isolées, sont exposées dans les tableaux X et XI.

Aucun résultat n'a été détecté sur l'effet antimicrobien de méthanol et DMSO sur les souches microbiennes testées.

II.5.1.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de *Cytisus arboreus* (Desf.) DC. vis-à-vis les bactéries et les champignons

Afin de prédire la sensibilité des souches microbiennes à nos extraits alcaloïdiques totaux, hydro-alcooliques et aqueux obtenus des feuilles, tiges et racines sèches de *C. arboreus*, nous avons appliqué la méthode de diffusion sur milieu solide sur deux bactéries à Gram- (*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*) et une autre à Gram+ (*Staphylococcus aureus*) qui ont montré des résistances aux différentes catégories d'antibiotiques.

A- Les résultats du screening antibactérien des extraits alcaloïdiques totaux

Les résultats du screening antibactérien des extraits alcaloïdiques totaux sont reportés dans le tableau X.

Tableau X. Valeurs des diamètres des zones d'inhibitions (mm) obtenues par les extraits alcaloïdiques des feuilles, tiges et racines de *C. arboreus* par la méthode de diffusion sur gélose.

Bactéries		Extrait alcaloïdi- -que	Diamètre (mm)			Moyenne ± Ecart type (mm)	Sensibilité des souches
Gram -	<i>Escherichia coli</i>	Feuilles	10,5	11,2	10,8	10,83 ± 0,35	Sensible
		Tiges	9.2	10,2	9,8	9,73 ± 0,50	Sensible
		Racines	-	-	-	/	Résistante
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Feuilles	-	-	-	/	Résistante
		Tiges	-	-	-	/	Résistante
		Racines	-	-	-	/	Résistante
Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	Feuilles	12,1	11,6	12,3	12 ± 0,36	Sensible
		Tiges	10.6	11,2	11	10,93 ± 0,130	Sensible
		Racines	2.1	1.8	1.6	1,83 ± 0,25	Résistante
levure	<i>Candida albicans</i>	Feuilles	20,2	19,8	19,4	19,8 ± 0,40	Très sensible
		Tiges	20	19,2	19,4	19,53 ± 0,41	Très sensible
		Racines	10.8	10,4	11,4	10,86 ± 0,50	Sensible
Cham.	<i>Aspergillus niger</i>	Feuilles	-	-	-	/	Résistante
		Tiges	-	-	-	/	Résistante
		Racines	-	-	-	/	Résistante

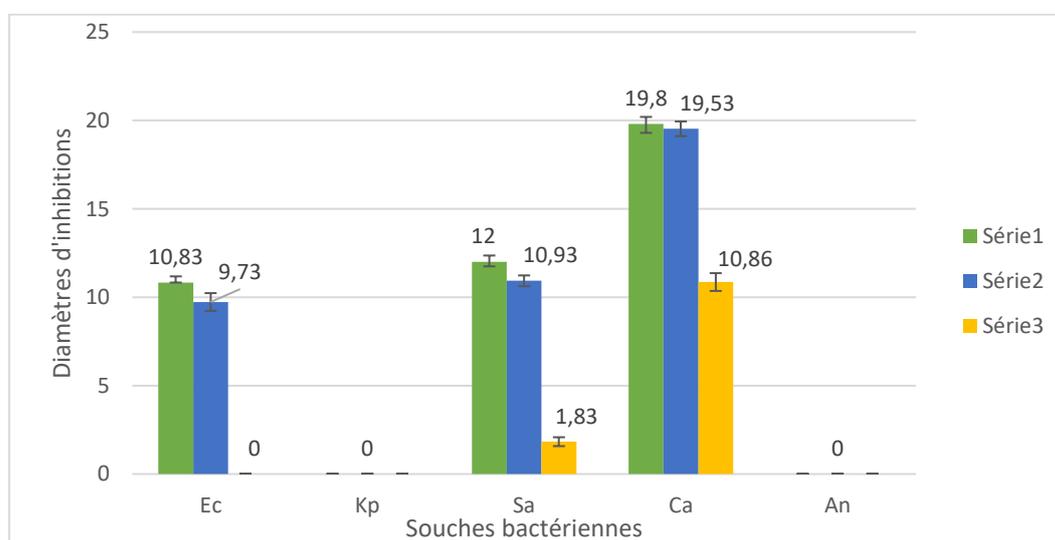
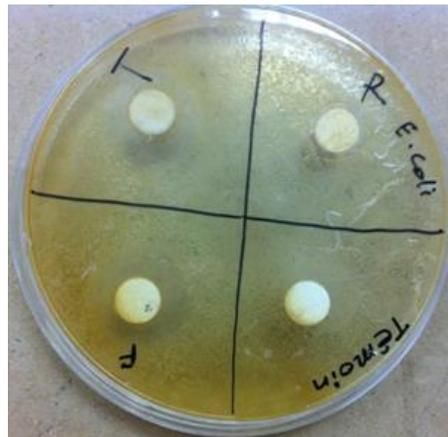
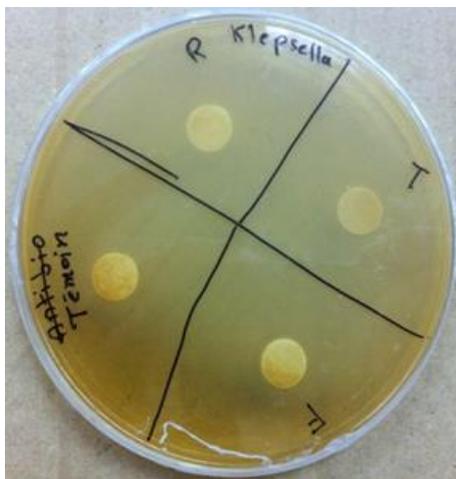


Figure 22. Histogramme des diamètres d'inhibitions des souches microbiennes testées vis-à-vis des extraits alcaloïdiques des feuilles, tiges et racines de *C. arboreus* par la méthode de diffusion sur gélose.

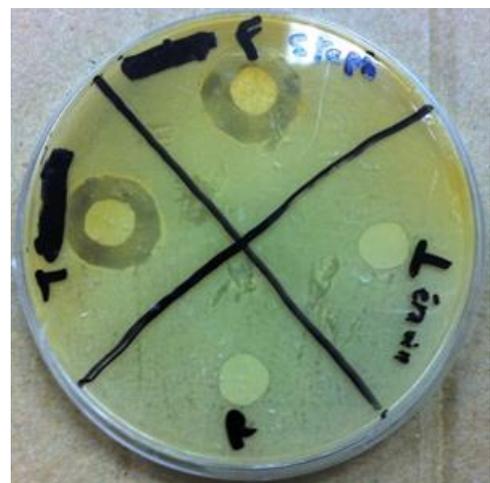
(Ec) : *Escherichia coli* ; (Kp) : *Klebsiella pneumoniae* ; (Sa) : *Staphylococcus aureus* ; (Ca) *Candida albicans* ; (An) : *Aspergillus niger*.



Escherichia coli



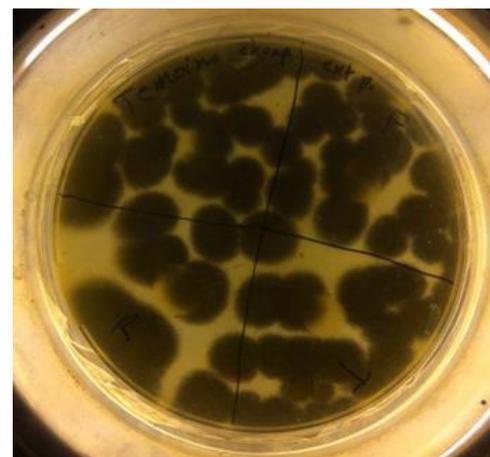
Klebsiella pneumoniae



Staphylococcus aureus



Candida albicans



Aspergillus niger

Figure 23. Activité antimicrobienne des extraits alcaloïdiques des feuilles, tiges et racines de *C. arboreus* par la méthode de diffusion. (Photo originale)

B- Les résultats du screening antibactérien des extraits hydro-alcooliques

Les résultats du screening antimicrobien des extraits hydro-alcooliques démontrent que :

- *Staphylococcus aureus* ($3,03 \pm 0,08$ mm) pour l'extrait hydro-alcoolique des feuilles ; ($3 \pm 0,04$ mm) pour l'extrait hydro-alcoolique des tiges ; absence de diamètre d'inhibition pour l'extrait des racines, donc la bactérie est résistante (non sensible).
- *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Aspergillus niger* absence des diamètres d'inhibitions dans les trois extraits hydro-alcooliques de feuilles, tiges et racines. Les bactéries sont résistantes (non sensibles).

Les antibiogrammes correspondants sont figurés ci-dessous :

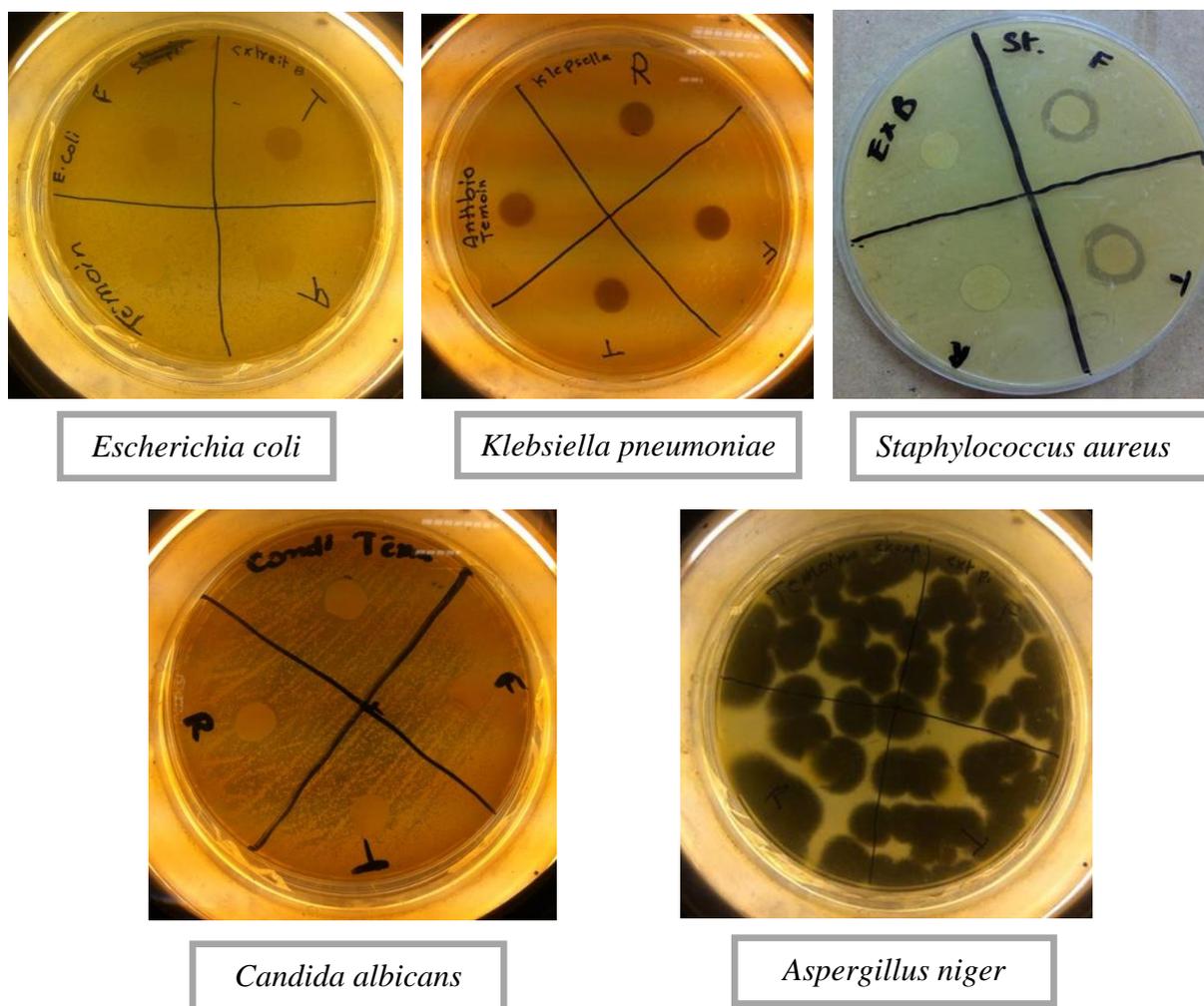


Figure 24. Activité antimicrobienne des extraits hydro-alcooliques des feuilles, tiges et racines de *C. arboreus* par la méthode de diffusion. **(Photo originale)**

C- Les résultats du screening antimicrobien des extraits aqueux

Les résultats du screening antimicrobien des extraits aqueux des feuilles tiges et racines de *C. arboreus* sont reportés dans le tableau XI.

Tableau XI. Valeurs des diamètres des zones d’inhibitions (mm) obtenues par les extraits aqueux des feuilles, tiges et racines de *C. arboreus* par la méthode de diffusion sur gélose.

Bactéries		Extrait aqueux	Diamètre (mm)			Moyenne ± Ecart type (mm)	Sensibilité des souches
Gram-	<i>Escherichia coli</i>	Feuilles	8,9	9,2	9,1	9,06 ± 0,15	Sensible
		Tiges	7,9	8,4	8,2	8,16 ± 0,25	Sensible
		Racines	1	1,2	1	1,06 ± 0,11	Résistante
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Feuilles	-	-	-	/	Résistante
		Tiges	-	-	-	/	Résistante
		Racines	-	-	-	/	Résistante
Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	Feuilles	10,5	10,8	11,2	10,83 ± 0,35	Sensible
		Tiges	11,5	10,6	10,8	10,96 ± 0,47	Sensible
		Racines	5,4	4,9	5,3	5,2 ± 0,26	Résistante
levure	<i>Candida albicans</i>	Feuilles	15,5	14,8	15,2	15,16 ± 0,35	Très sensible
		Tiges	18,1	17,7	18	17,93 ± 0,20	Très sensible
		Racines	10,4	10	10,8	10,4 ± 0,40	Sensible
Cham.	<i>Aspergillus niger</i>	Feuilles	-	-	-	/	Résistante
		Tiges	-	-	-	/	Résistante
		Racines	-	-	-	/	Résistante

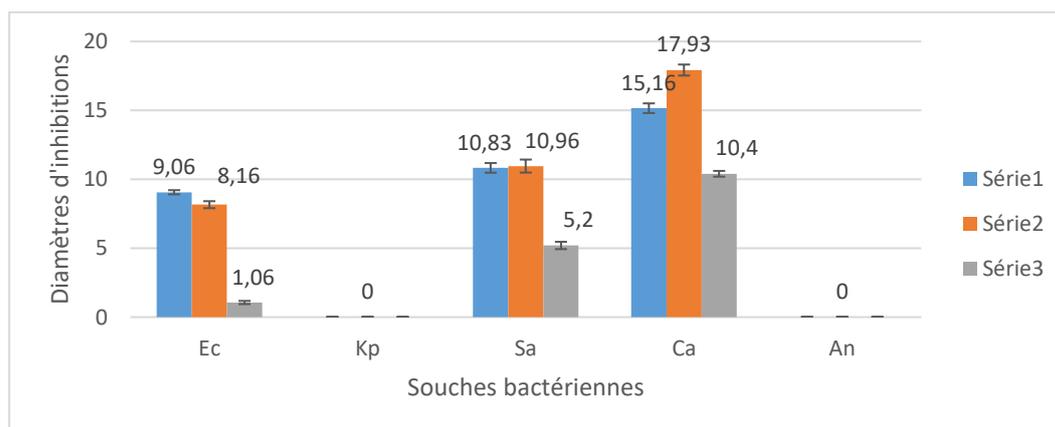
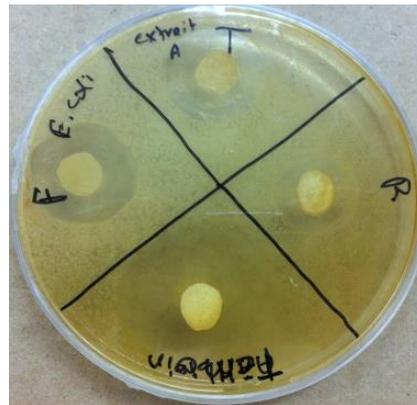


Figure 25. Histogramme des diamètres d’inhibitions des souches bactériennes testées vis-à-vis de l’extrait aqueux des feuilles, tiges et racine de *C. arboreus* par la méthode de diffusion sur gélose.

(Ec) : *Escherichia coli* ; (Kp) : *Klebsiella pneumoniae* ; (Sa) : *Staphylococcus aureus* ; (Ca) : *Candida albicans* ; (An) : *Aspergillus niger*.



Escherichia coli



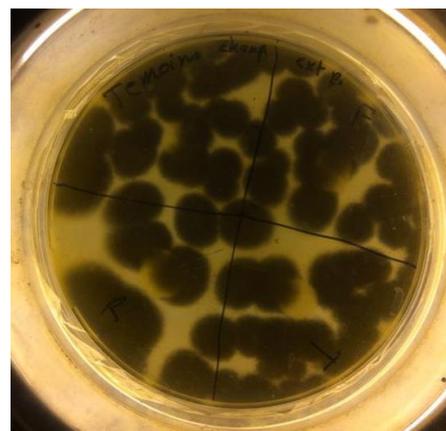
Klebsiella pneumoniae



Staphylococcus aureus



Candida albicans



Aspergillus niger

Figure 26. Activité antimicrobienne des extraits aqueux des feuilles, tiges et racines de *C. arboreus* par la méthode de diffusion. (Photo originale)

Selon la bibliographie disponible, il n'existe pas de travaux déjà réalisés sur l'activité antimicrobienne de l'extrait de *C. arboreus* pour cela, les résultats de cette étude ont été comparés à ceux obtenus pour les autres espèces de la même famille.

Les alcaloïdes sont des composés organiques azotés plus ou moins basiques, ils se trouvent généralement à l'état naturel sous forme de sel. Ils ont la propriété de précipiter en présence des sels de métaux lourds tels que le mercuritetraiodure de potassium (réactif de Mayer) ou le tetraiodobismuthate de potassium (réactif de Dragendorff). Dans le présent travail, sur milieu solide, les tests de sensibilités ont donné des diamètres variant de 5 à 20 mm. Les plus grands diamètres ont été enregistrés avec *Staphylococcus aureus* à Gram positif. Un effet moins prononcé pour les bactéries à Gram – (*E. coli* et *K. pneumoniae*). Nos résultats viennent confirmer les travaux antérieurs sur l'activité antibactérienne des alcaloïdes de **Wink 1984 ; El-Shazely et al., 2001 ; Erdemoglu et al., 2007** ; qui ont trouvé l'efficacité de ces substances actives sur les bactéries à Gram + plus que l'autre type bactérien. Cela sans doute est dû à la nature de la paroi plasmique des bactéries à Gram – doublé et riche en lipopolysaccharides, ce qui donne une imperméabilité au principe actif (**Yvon, 2009**).

(**Cosentino et Tuberoso, 1999, De-Billerbeck, 2002**) ont montré que les bactéries à Gram– sont plus résistant aux extraits végétaux que les bactéries à Gram+ .

Tyski et al., (1988) a rapporté que les alcaloïdes quinolizidiniques purs isolés de *Lupinus angustifolius* var. montrent des effets bactériostatiques contre *S. aureus* et *E. coli*.

Les extraits alcaloïdiques obtenus ont montré une activité importante vis-à-vis *Candida albicans* avec des diamètres d'inhibition qui varient entre 10 et 19 mm. Tandis que l'activité obtenue vis-à-vis du champignon filamentueux *Aspergillus niger* est nulle. **Erdemoglu et al., (2007)** et **Küçükboyacı et al., (2012)** ont trouvé une activité modéré pour la levure *C. albicans*. En outre les travaux d'**El-Shazely et al., (2001)** ont montré une valeur de 10 mm pour *Cytisus albicans* vis-à-vis des alcaloïdes quinolizidiniques de *Lupinus densiflorus*.

Dans l'étude de **Wink (1984)**, la spartéine qui représente l'alcaloïde majoritaire dans le genre *Cytisus L.* a montré une activité antimicrobienne contre les bactéries et les champignons phytopathogènes (**Wagner, 2009**). Par ailleurs, **Wippich et Wink (1985)** ont déclaré que quelques alcaloïdes quinolizidinique ont également inhibé la germination des conidies d'*Erysiphe germinis f. sp. Hordei*.

L'ampicilline n'a agi que sur les bactéries à Gram positif, les bactéries à Gram négatifs se sont révélées résistantes. Cet antibiotique agit comme un inhibiteur irréversible de la transpeptidase, une enzyme indispensable aux bactéries pour la synthèse de leurs parois cellulaires. Elle inhibe la troisième étape de la synthèse de la paroi bactérienne et conduit à la lyse cellulaire.

La vancomycine est un antibiotique qui inhibe la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Mais, du fait de son poids élevé, elle ne peut emprunter les porines de la membrane externe des Gram négatifs. Son spectre d'action touche donc uniquement les Gram positifs.

Mohammdi, (2006) indique que la plupart des souches bactériennes ont montré une résistance vis-à-vis les ATB.

La comparaison quantitative et qualitative des résultats de l'extrait et des antibiotiques est difficile, car la nature de l'activité et la composition des molécules ne sont pas comparables (**Billerbeck G, 2002**).

D'après les résultats de l'extrait hydro alcoolique et aqueux on peut conclure que :

- L'activité antibactérienne des extraits de plantes est due aux différents agents chimiques présent dans ces extraits, y compris les huiles essentielles, les flavonoïdes, les tannins et les triterpénoides ainsi que d'autres composés de nature phénolique ou groupes hydroxyle libre, qui sont classifiés comme composés antibiotiques très actifs (**Rojas et al.1992 ; Marjori, 1999**). La variation de la composition chimique explique donc les variations observées dans l'activité antibactérienne des extraits d'une même plante ou de plantes différentes.
- L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différentes composées de l'origine de cet extrait (**Essawi et Srour, 2000**).

*Conclusion &
perspectives*

Les plantes médicinales restent toujours une source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés biologiques notamment l'activité antimicrobienne qui est d'actualité en raison de propagation des maladies phytopathogènes.

Notre travail qui est une contribution à l'étude comparative des activités biologiques et la phytochimie des différentes parties de la poudre (feuilles, tiges et racines) de la plante « *Cytisus arboreus (Desf.) DC.* », nous a permis de comprendre que le domaine des plantes demeure encore un domaine valable de la recherche scientifique.

Les tests phytochimiques réalisés sur la poudre, l'infusé à 5% et le décocté à 10%, ont permis de mettre en évidence les principales familles de métabolites secondaires. Ils montrent la grande richesse en alcaloïdes, flavonoïdes, tanins galliques, saponosides, Stéroïdes et triterpène, sucre réducteur.

L'indice de mousse est de 250, ce résultat dévoile que les racines de la plante est riche en saponosides.

L'extraction à partir de 10 g de poudre végétale des trois parties de la plante a permis de donner un rendement en composés alcaloïdiques qui varie entre 0,328 % (feuilles), 0,272 % (tiges) et 0.1235 % (racines).

La teneur en alcaloïdes, comme celles de tous les métabolites secondaires originaires des plantes varient selon l'organe de la plante. Nos résultats montrent que les feuilles de la plante sont plus riches en alcaloïdes que les tiges puis les racines. Le rendement d'extraction est plus important pour les organes aériens que celui dans les organes souterrains.

La chromatographie sur couches mince sur gel de silice, nous a permis d'obtenir après La révélation avec le réactif de Dragendorff la présence d'alcaloïdes et d'avoir un aperçu sur la composition des extraits alcaloïdiques selon les rapports frontaux rapportés dans la littérature qui montre une variation de molécules alcaloïdiques de type quinolizidiniques.

Par ailleurs L'analyse par CPG/SM ressort que les feuilles contiennent plus d'alcaloïdes que les autres organes à savoir tiges et racines.

Enfin, L'activité antimicrobienne des extraits alcaloïdiques a été évaluée *in vitro* sur les souches bactériennes *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, une levure *Candida albicans* et un champignon *Aspergillus niger* par la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Les résultats de cette étude ont montré que les extraits alcaloïdiques ont une

activité importante sur les bactéries à gram+ et un effet moins prononcé sur les bactéries à gram- et les champignons.

De ce qui précède, on déduit que cette plante présentera un rôle important dans la pharmacopée humaine.

Par le biais de ce travail, nous espérons avoir apporté notre contribution à la valorisation de la médecine traditionnelle pour parvenir à mettre à la disposition de la population des médicaments à base de plantes médicinales efficaces et accessibles.

A cet effet nous pouvons suggérer les perspectives suivantes :

- ✓ Poursuivre l'étude phytochimique afin d'isoler d'autres métabolites secondaires contenus dans les extraits.
- ✓ Caractériser les constituants de ces plantes par des méthodes analytiques plus performantes comme : l'HPLC, UV et le RMN.
- ✓ Explorer d'autres activités biologiques notamment l'activité antioxydante et anticoagulante.
- ✓ L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antioxydante et antimicrobienne de cette plante.
- ✓ Elargir la gamme des microorganismes et d'étudier leur comportement vis-à-vis des extraits *in vitro* ainsi qu'*in vivo*.



*Références
bibliographiques*

1. **Abayomi S.** (2010). Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Ed. Karthala, Paris. activité antioxydante (Doctoral dissertation, Metz).
2. **Ait-Kaci K.** (2001). Contribution à l'étude chimique, chimiotaxonomique et biologique d'une légumineuse d'Azazga *Cytisus triflorus* L'Herit. Mémoire de magister, école nationale supérieure, Kouba.
3. **Ali-Shtayeh MS, Yaghmour R, Faidi, Y, Salem K and Al-Nuri M.** (1998). Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the palestinian area. *J Ethnopharmacol*, 60 : 265-271.
4. **Anonyme** (2008). The illustrated encyclopedia of trees and shrubs: An essential guide to trees and shrubs of the world. Ed. Mobile Reference, United Kingdom.
5. **APG II** (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot. J. Linnean Soc.* 141, 399-436.
6. **Athamena S.,** 2009. Etude quantitative des flavonoides des graines de *cuminum cyminum* et les feuilles de *rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique, mémoire magister, université el-hadj lakhdar-batna.
7. **Audigie, Cl., Figurearella, J., Zonszain, F.** (1978) Manipulations d'analyses biochimiques. Doin (Ed). Paris, 274 p.
8. **Benaissa O.,** 2011. Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. Activité Biologique, Thèse Doctorat, université Mentouri Constantine. 63p.
9. **Bouakaz, I.** (2006). Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister. Batna.
10. **Bouhadjera K.** (2005). Contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* R.Br. et *Aristida pungens* L. Thèse de Doctorat en chimie organique appliqué. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. Algérie. 143 p.
11. **Bruneton, J.** (1999). Pharmacognosie phytochimie, plantes médicinales. 3ème Ed. Tec & Doc, Paris.
12. **Badiaga M.** (2012). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de docteur d'université, Mali.
13. **Bassene E.** (2012). Initiation à la Recherche sur les Substances Naturelles Extraction, Analyse et Essais Biologiques. Presse Universitaire de Dakar : Dakar 141p150p.

14. **Benkiki N.** , 2006-Etude phytochimique des plantes médicinales Algérienne : Ruta Montana, Matricaria pubescens et hyperium perforliatum. Thèse de doctorat, université El-Hadj Lakhdar, Batna.
15. **Benmehdi H.** Valorisation de certaines plantes médicinales à activité hypoglycémiantes comme la coloquinte. Mémoire en chimie (Magistère) Telemcen. (2000).
16. **Bhat, S. V.;** Nagasampagi, B. A.; Sivakumar, M. (2005) *Chemistry of Natural Products*.
17. **Billerbeck G.** (2002). Les contaminations biologiques des biens culturels : Essai d'utilisation d'huile essentielle en traitement de l'aire. Ed : Elsevier. 357-365 biotiques et abiotiques (Doctoral dissertation, Vandoeuvre-les-Nancy, INPL).
18. **Bing F.H., Liu J., Li Z., Zhang G.B., Yi-Fan L., Jing L. Dong C. D.** (2009). Anti-influenza-virus activity of total alkaloids from *Commelina communis* L. *Arch. Virol.*, **154**, 1837-1840.
19. **Bruneton J.** (1993). pharmacognosie phytochimie, plantes médicinales, Paris, France: Lavoisier. 278 à 279p.
20. Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3e éd. France : Tec & Doc Lavoisier =1999.
21. **Bruneton, J.** (1999). Pharmacognosie phytochimie, plantes médicinales. 3ème Ed. Tec & Doc, Paris.
22. **Bruneton, J.** (2009). Pharmacognosie- phytochimie, plantes médicinales, 4^e éd, revue et augmentée, Paris, Tec & Doc-Éditions médicales internationales. P128.
23. **Carillon E.** (2000). La phytothérapie face à l'évolution médicale, Ed : phyto., 10-15.
24. **Carvalho, Jr. R.N., Moura, L.S., Rosa, P.T.V., Meireles, M.A.A.** (2005). Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) : Kinetic data, extract global yield, composition, and antioxidant activity, *J. of Supercritical Fluids* 35(2005), 197-204.
25. **Chenni M.** (2010). Contribution à l'étude chimique et biologique de la racine d'une plante médicinale : *Bryonia dioica* Jacq. Thèse de Magister. Université d'Oran-Senia, Oran. Algérie. 138 p
26. **Harborne J.B.** Plant phenolics. Méthode in plant Biochemistry, Vol 1 , Academic Press, London, 1989, 552p.
27. **Chambers H. F.,** (1997) Methicillin resistance in staphylococci : molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 10 : 781-791.

28. **Chebili, S.** (2012). Extraction et caractérisation des alcaloïdes quinolizidiniques de *Cytisus triflorus* L'Hérit et l'étude de leurs activités antimicrobienne et antioxydante (Doctoral dissertation).
29. **Chemat, S.** (2005). Contribution à l'étude de l'extraction de la carvone et du limonène à partir des graines de carvi selon des procédés conventionnels, ultrasons et chauffage micro-ondes (Doctoral dissertation).
30. **Chikloune A.** (2007). Huile essentielles de thym et d'origan : étude de la composition chimique et de l'activité antioxydant et antimicrobienne. Mémoire de Magister. Institut National Agronomique. El-Harrach ó Alger.
31. **Cosentino S. et Tuberoso C. I. G.** (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Let Appl Microbial*, 29(2):130- 135.
32. **Cuendet M.** (1999). Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : « *Fagraea blumei* » (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude : « *Bartsia alpina* » (Scrophulariaceae), « *Loiseleuria procumbens* » (Ericaceae) et Camp, Thèse de doctorat, p 24.
33. **Cyril, T.** (2001). étude des métabolismes primaires et secondaires de racines transformées de *Catharanthus Roseusen*, vue du développement d'un modèle cinétique, université de Montréal. 28p.
34. **Djilani A., Legseir B.** (2004). Extraction of atropine by ultrasounds in different solvent systems. *Fitoterapia*, 76,148 - 152.
35. **De Hoffmann E. et Stroobant V.** (2005). Spectrométrie de masse. 3ème Ed. DUNOD, Paris.
36. **Decaux L.** (2002) Phytothérapie: mode d'emploi, Ed : Le Bien Public, 6-7.
37. **Deng, Y., Yu, Y., Luo, H., Zhang, M., Qin, X., & Li, L.** (2011). Antimicrobial activity of extract and two alkaloids from traditional Chinese medicinal plant *Stephania dielsiana*. *Food Chemistry*, 124(4), 1556-1560.
38. **Denny R.C.** (1982). A dictionary of chromatography ,2nd edn, Macmillan,London p161. **Laginika L.** (2005) óEtude photochimique et activité biologique de substances naturelle isolée de béninoise thèse de doctorat en science pharmaceutique. Université Lonis Pasteur Strasbourg, 267p.
39. **DIOUF Fallou.** Caractérisation des souches de *Colletotrichum musae* (Berk et Curt) Arx associées aux symptômes de l'antracnose de la banane et contrôle de la maladie

- par l'utilisation d'extraits de plantes médicinales. Mémoire de Master II. Université CHEIKH ANTA DIOP de DAKAR.(2014).dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II).
40. **Eberhard T., Robert A., Annelise L.** (2005). Plantes aromatiques, épice aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec et Doc, Paris. France. 521p.
 41. **El-Shazly A., Ateya A. M. M et Wink M.** (2001). Quinolizidine alkaloids profiles of *Lupinus varius orientalis*, *L. albus albus*, *L. hartwegii*, and *L. densiflorus*. *Z. Naturforsch*, **56c**, 21-30.
 42. **Engler A. et Prantl K.** (1889). Die natürlichen Pflanzenfamilien. 1ère Ed : Wilhelm Engelmann, Leipzig
 43. **Erdemoglu N., Semiha Ozkan S. et Tosun F.** (2007). Alkaloid profile and antimicrobial activity of *Lupinus angustifolius* L. alkaloid extract. *Phytochem Rev*, **6**, 1976201.
 44. **ESSAWI T., SROUR M.** (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharm.* 70: 343-349.
 45. **Evans W.C., Evans D., et Trease G. E.** (2009) *Trease and Evans pharmacognosy* .Edinburgh -New York : Saunders /Elsevier.
 46. **Fauchere J. L., et Avril J. L.** (2002). Bactériologie générale et médicale. Ed. Ellipses Paris, 365p.
 47. **Ferrari, J.** (2002) Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'œne d'elles : *Gnidia involucrata* Steud . ex A. Rich. Thèse de doctorat, Lausanne.
 48. **Flioger J.** (2000). Alkaloids: Thin Layer (Planar) Chromatography. Academic Press, Lublin, Poland.
 49. **Fouché J.G., A. Marquet et Hambuckers A.** (2000). Les plantes médicinales de la plante au médicament. Exposition temporaire du 19.09. au 30.06.2000.
 50. **Fuerst F.** (1976) *Microbiologie Clinique* . ED HR W Québec.507p.
 51. **Gauthuret R-J.** (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Université de Bordeaux.P7-
 52. **Gazengel JM., Orecchioni AM.** (2013)- Le préparateur en pharmacie ó Guide théorique et pratique. 2ème ed. Ed. Tec et Doc, Paris. France. 1443 p.
 53. **Gbohaida V, Médoatinsa S E, Nonviho G, Bogninou-Agbidinokoun G S R, Agbangnan D C P , and Sohounhloué C K D.** (2015) Etude chimique et évaluation de l'influence de la granulométrie sur la cinétique d'extraction des polyphénols

- naturels de *Pterocarpus erinaceus* acclimaté au Bénin . *International Journal of Innovation and Applied Studies* 12: 325-333.
54. **Ghedira K.** 2005. Les flavonoides : structures , propriété biologiques, roles prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*.04 :162-169.
55. **Ghesten A. Seguin E., Paris M. et Orechioni A.** 2001 Le préparateur en pharmacie, dossier 2 : Botanique-pharmacognosie-pychothérapie-homéopathie. Ed. Technique et documentation, Paris, 275p.
56. **Gobbi R ,Khebbaz W** .Traçabilité de l'identification des métabolites secondaires végétaux. Université D'OUARGLA.(2014).
57. **Gravot A.** (2008). Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1 ó L2.
58. **Guendouze N.** 2005- Etudes des interactions protéines-polyphénol Mémoire de Magister en biochimie appliquée, Université Abderrahmane Mira, Bejaia, 65p.
59. **Guignard J. L., Cosson L., Henry M.** (1985). Abrégé de phyto-chimie. *Masson*, Paris,pp.
60. **Hallal Zohra.,** (2011) ó contribution à l'étude des propriétés antimicrobiennes et antioxydants de certaines huiles essentielles extraites des citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Thèse de Magister en biologie. Tizi ouzou, 16-17p.
61. **Hanifi N.**(1991).Importance des ressources phytogénétiques et leur utilisation en Algérie. In conservation des ressources végétales. Publication des Actes éditions, p.47-49.
62. **Heywood, V.H.** (1996). *Flowering Plants of the World*. 3th edition, Oxford University Press, Oxford, pp. 141-145, 149-152 identification d'alcaloïdes-caractérisation, quantification de polyphénols.
63. **Hoffmann D.** (2003). *Medical herbalism: the science and practice of herbal medicine*. Ed. Inner Traditions / Bear & Co, United States.
64. **Ildis World Database of Legumes.** (2010). (copyright © ILDIS).
65. **Imanshahidi M et Hosseinzadeh H.** (2008) . Pharmacological and Therapeutic Effects of *Berberis vulgaris* and its Active Constituent, Berberine. *Phytother. Res.*22 : 999-1012.
66. **Iserin P., Masson M ., Restellini J P.** (2007)- *Larousse des plantes médicinales*. Identification, préparation, Soins .Ed. Larousse, Paris. France. 335 p.
67. **Iserin Paul.** (2001). *Encyclopédie des plantes médicinales*, Ed. Larousse-Bordas Paris,14

68. **Jeun, J. M., Annie. F., Chrystian. J. L.** (2005). Les composés phénoliques des végétaux, p203- 204.
69. **Judd C ;Kellogg S.** (2002). Boutanique systématique une prespective phylogénétique, 1ére éddition, Boeck, Paris.
70. **Judd W. S., Campbell C. S., Kellogg E. A. Stevens P.** (2002). Botanique systématique. Une perspective phyllogénétique. Paris, Bruxelles, De Boek Université, 282.
71. **Kaabeche M.** (2000). Plantes médicinales dAlgérie : les plantes à alcaloïdes (Biologie, Taxonomie et Répartition), Communication presented in the 1st African congress about medicinal plants, Sétif
72. **Karaali A.,Boyacioalu D.,Gunez G. et Ozcelik B.** 2004. Flavonoids in fruit and vegetables : their impact on food qualiy , nutrition and health óSTREP or CA. European commisionø the 6th framework programme for research .Istanbul technical university.Turkey.
73. **Kanoun K.** (2011). Contribution à l étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). Thèse de Magister en Biologie. Université aboubekr belkaid -Tlemcen. Algérie.110 p.
74. **Kansole M.** (2009). Etude ethnobotanique, phytocuimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia oppossta* vahl et *Orthosiphon pallidus* royle ex benth. Mémoire pour obtenir un diplôme Diplôme dEtudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.
75. **Kolai.N , Berkani.A , Lotmani.B.** Analyse chromatographique (CCM) des flavonoides des feuilles des *Citrus* en relation avec le taux de contamination de *Phyllocnistis citrella* Saint (lepidoptera =Gracillariidae). Université de Mostaganem.(2007).Pp195.
76. **Koné, D.** (2009). Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes: extraction,
77. **König, G. M., Wright, A. D., & Franzblau, S. G.** (2000). Assessment of antimycobacterial activity of a series of mainly marine derived natural products. *Planta Medica*, 66(04), 337-342.
78. **Krief, S.** (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, thèse doctorat, muséum national dhistoire naturelle. 32p.

79. **Küçükboyac, N., Özkan S. et Tosun F.** (2012). Gas chromatographic determination of quinolizidine alkaloids in *Genista sandrasica* and their antimicrobial activity. *Rec. Nat. Prod.* **6** (1), 71-74.
80. **Laginika L.** (2005) ó Etude photochimique et activité biologique de substances naturelle isolée de béninoise thèse de doctorat en science pharmaceutique. Université Lonis Pasteur Strasbourg, 267p
81. **Lapie G. et Maige A.** (1997). Flore Forestière de LøAlgérie. Ed. E. Orlhac, Paris.
82. **Lendvai,B. Zelles,T., Rozsa,B., Vizi,ES.**(2002). Vinca alkaloid exchanges morphological dynamics of dentric neocortical layer 2/3 pyramidal cells. *Brain Research Bulletin*,59 (4):257-260.
83. **Makhloufi.** (2010). Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de Bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre. Thèse de doctorat d'état en biologie, université aboubaker belkaid, Tlemcen. Algérie. 136 p.
84. **Makkar H, Siddhuraju P, Becker K.** Plant secondary metabolites. New Jersey : Humana Press ; 2007.
85. **Mann, J. ; Davidson, R. S. ; Hobbs, J. B.; Banthorpe, D. V. ; Harborne, J. B.** (1994). *Natural*
86. **Marjori.** (2009). Etude de l'activité antibactérienne de molécule d'origines végétales. Mémoire de fin d'étude.UHB.chlef.
87. **MAURO, N. M.** (2006). Synthèse d'alkaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine, thèse doctorat,løuniversité Joseph Fourier Grenoble,p13,16-28.
88. **Mccalley D.V.** (2002). Analysis of the Cinchona alkaloids by high performance liquid chromatography and other separation techniques, Review. *Journal of Chromatography A*. Vol (967): 1619.
89. **Merghem R., Jay M.,Viricel M.R., Bayet C., et Voirin B.**(1995). Five 8-C-benzylated flavonoids from thymus hirtus (Labiatea).*Phytochemistry.*,38 :637-640.
90. **Milane ,H.,** 2004 la quercétine et ses dérivés : molécules a caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ;études et applications thérapeutiques.Thèse de doctorat.Strasbourg.

91. **Milcent R., Chau F.** (2003). Chimie organique hétérocyclique : Structure fondamentale, chimie et biochimie des principaux composés naturels. Ed. Francois chau EDP. Paris. France. 846p.
92. **Mohammedi Z.** (2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de Magistère, Département de biologie, Faculté des sciences, UABB de Tlemcen
93. **Mohammedi.** (2013). Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l Algérie. Thèse de Doctorat en Biologie. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. Algérie. 169 p.
94. **Moreira, M. R., Ponce, A. G., Del Valle, C. E., & Roura, S. I.** (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT-Food Science and Technology*, 38(5), 565-570.
95. **Mouellet M.** (2005). - Screening phytochimique de deux espèces de plantes : *Crotalaria retusa* L (Papilionaceae) et *Hallea ciliata* Aubrev & Pellegr. (Rubiaceae) récoltées au Gabon - thèse de doctorat. Université de BAMAKO. MALI.
96. **Guessan K, Kadja B, Zirihi G, Traoré D, Aké-Assi L.** (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte d'Ivoire). *Sci Nat.* 6 (1) : 1 ó 15.
97. **Nacoulma AP.** (2012). Reprogrammation métabolique induite dans les tissus hyperplasiques formés chez le tabac infecté par *Rhodococcus fascians*: aspects fondamentaux et applications potentielles. Thèse de Doctorat en Sciences Pharmaceutiques. Université Libre de Bruxelles Europe. Belgique. 92p. Narosa, New Delhi, India., Ch. 4, 237. *Products.* Longman. Ch. 7, 389. *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali (Doctoral).
98. **Nostro A., Germano M. P., D'Angelo V., Marino A. et Cannatelli M. A.** (2000). Extraction methods and autobiography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lettres en microbiologie appliqué*, 30 (5), 379.
99. **Nurgun Erdemoglu, Semiha Ozkan, Fatma Tosun.** (2007). Alkaloid profile and antimicrobial activity of *Lupinus angustifolius* L. alkaloid extract
100. **Omulokoli E; Khan B; Chhabra S.C.** (1997). Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology.* 56 p 133-137
101. **Palleroni,** (2008). *Pseudomonas*: Volume 6: Molecular Microbiology, infection and Biodiversity.

102. **Paris, R et Nothis, 1987 et Dohu et al. (2003) In : Souane F, Ben Tahar EF.** Caractérisation physico-chimique et phytochimique de la graine de *Zizphus lotus* L. et évaluation des activités biologiques de polyphénols. Mémoire de Master. Université de Boumerdes. (2013).
103. **Patrick, B., Jean, L., Michel, S.** (1988). Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1ère Ed Medicine-Sciences Flammarion. Paris. : 100-108-274.
104. **Pibiri M. C.** (2006). Assainissement microbiologique de l'air et du système de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de Doctorat, Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, 177p.
105. **Pieri F., Kirkiacharian S.** (1992). Pharmacologie et Thérapeutique, 2ème édition Marketing. Paris. 443p.
106. **Pizzorno J. J. et Murray M. T.** (2006). Berberis bark and Hydrastis root. *In: Textbook of Natural Medicine.* 3ème Ed. Churchill Livingstone, États-Unis.
107. **Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. I.** (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36(7), 679-684.
108. Projet de numérisation de la flore de L'Abbé Coste par le réseau **Tela botanica** ó 2011.
109. **Rahal, K.** (2011). Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle National Selon les recommandations de l'OMS =Alger, ALGERIE ,p116 (nkourigi la datte fel word ki tredena l prof correction de materiel et méthodes).
110. **Ribereau-gayon J., Reynaud E.** (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Édition Dunod, Paris. France. 254 p.
111. **Rira M.** (2006). Effet des polyphénols et des tanins sur l'activité métabolique du microbiote ruminal d'ovins. Thèse de Magister en biochimie et microbiologie appliquées, Université Mentouri Constantine, Algérie. 94 p.
112. **Rojas, Ali-Shtayeh MS, Yaghmour R, Faidi, Y, Salem K and Al-Nuri M.** (1992). Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the palestinian area. *J Ethnopharmacol*, 60 : 265-271.
113. **Roques C., V. G. de Bllerbeck., vaniere P. et Marquier P.** (2002). Activité antimicrobienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. Laboratoire de bactériologie, virologie et microbiologie industrielle-faculté de pharmacie. Toulouse, 248p.

114. **Roux D., Catier O.** (2007). Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. 3ème édition. Ed. Wolters Kluwer, Dalian. China. 141 p.
115. **Schaechter, M.** (2009). *Escherichia Coli*, Encyclopedia of Microbiology (Third Edition), 125-132.
116. **Schnaubelt K.** (1998). Advanced aromatherapy. Healing arts press, Vermont. secondaires chez *Datura innoxia* Mill. cultivé en conditions hors sol; impact des facteurs.
117. **Sine J.P.** 2003. Séparation et analyse des biomolécules : méthodes physicochimiques cours et exercices. Ellipses éditions marketing S A. p99-101.
118. **Spichiger, R.E., Savolainen, V.V., Figeat, M. Jeanmonod, D.** (2004). Botanique systématique des plantes à fleurs: Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. 3ème édition, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, pp. 202-211
119. **Stöckigt J., Sheludko Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H., -Stöckigt D.** (2002). High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic electro spray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups Review. Journal of Chromatography A. Vol (967): 856113.
120. **Thomas ; O.P.** (2009). Métabolisme secondaire et Biosynthèse. Master 2 VEM. Université Nice Sophia Antipolis.
121. **Thorne R.F.** (1992). An updated phylogenetic classification of the flowering plants. *Aliso* 13, 365-389.
122. **Tranchant J.** (1995). Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. 4ème Ed. MASSON, Paris
123. **Tyski S., Markiewicz M., Gulewicz K. et Twardowski T.** (1988). The effect of lupin alkaloids and ethanol extracts from seeds of *Lupinus angustifolius* on selected bacterial strains. *J. Plant Physiol.* **133**, 240-242.
124. **Varpoorte R.** (2005). Alkaloids: Encyclopedia of Analytical Science.
125. **Vermerris W.** (2006). Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht. ISBN-10 1-4020-5163-8 (HB).
126. **Vu, T. D.** (2008). Effet de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolites
127. **Wagner H., Bladt S. et Rickl V.** (2009). Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. Ed. Springer, United Kingdom.

128. **Wagner H., Blatt S. et Rickl V.** (2009). *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Ed. Springer, United Kingdom.
129. **Wilhem N.** (1998). *Botanique générale*, 10^{ème} édition, Boek Paris.
130. **Wink M.** (1993). Quinolizidine alkaloids. *In: Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 8. Academic Press Limited, London.
131. **Wink, M., Hartmann, T.** (1982). Localisation of the enzymes of quinolizidine alkaloid biosynthesis in leaf chloroplasts of *Lupinus polyphyllus*. *Plant Physio* 70, 74-77.
132. **Wink, M., Witte, L.** (1984). Turnover and transport of quinolizidine alkaloids. Diurnal fluctuations of lupanine in the phloem sap, leaves and fruits of *Lupinus albus* L. *Planta* 161, 519-524.
133. **Wippich C. et Wink M.** (1985). Biological properties of alkaloids: Influence of quinolizidine alkaloids and gramine on the germination and development of powdery mildew, *Erysiphe graminis f.sp. hordei*. *Experientia*, **41**, 1477-1479.
134. **Wojciechowski, M. F., Lavin, M., & Sanderson, M. J.** (2004). A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*, 91(11), 1846-1862.
135. **Yakhlef Ghania.** (2010). Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* L. et *Laurus nobilis* L.- Thèse de magister ó Université de Batna 16-22p.
136. **Yrjönen T.** (2004). techniques d'extraction et de séparation chromatographique plane dans l'analyse des produits naturels. Ed. Université d'Helsinki, Helsinki, 64p. 175-191.87-1234-133.
137. **Yvon M. B. (2009).** Une histoire de la résistance aux antibiotiques : à propos de six bactéries. Ed. L'Harmattan, France.
138. **Ziegler J., Facchini P.J.** (2008). Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. *Annu Rev Plant Biol.* Vol (59): 735 ó 769.

Annexes

Annexe I

« Matériels techniques »

1. La verrerie

Ampoule à décanter	Pipettes graduées	Mortier et pilon	Flacon opaques
Tube à essai	Verre à pied	Micro tube	spatule
Ballon à fond rond	Entonnoirs en plastique	Pissettes	flacon en verre
Boîtes pétrie en plastiques stériles	Verre a montre	Fiole jaugée	Entonnoirs
Seringues	Burette de 1L	Eprouvette graduée	Pipette pasteur en verre
Micropipettes	Becher gradué	erlenmeyer	Micro seringue

2. Matériels divers

Disques	Coton	Masque	Pince
Portoirs de tube à essai	para film	Compresse	Etiquette
Cuve de CCM en verre	Gants	Coton tige	Boites métallique
Plaque CCM	Papier filtre wattman	Papier Ph	Milieu de culture
Barreau magnétique	Lunettes	Papier aluminium	Antibiotiques
Pissette	Embouts	Cuve de spectrophotomètre	Marqueur

3. Appareillage

Balance analytique de précision marque :.....	Bain marie	Vortex
Spectrophotomètre UV	Hotte	Broyeur électrique
Rota vapeur	Bec bunsen	Support a ampoule
Etuve	Agitateur magnétique	Autoclave
Ph mettre	Plaque chauffante	réfrigérateur

4. Réactifs chimiques

Nom	Formule chimiques
Réactif de stiansy	
Réactif de Fehling	/
Chlorure de fer anhydre	FeCl ₃
Alcool iso amylique	C ₅ H ₁₁ OH
Chlorure de mercure	HgCl ₂
Acide acétique anhydre	CH ₃ COOH
Iode	I ₂
Zinc métallique	Zn
Magnesium métallique	Mg
Acétate dme sodium	C ₂ H ₃ NaO ₂
Alccol saturé avec de thymol	
Nitrate de bismuth	Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O
Acide acétique glaciale	
Hydroxyde de sodium	NaOH
Acide chlorhydrique 1N	HCL
Ether	
Sulfate de sodium anhydre	
Ether di éthylique	
Méthanol	CH ₃ OH
Ammoniaque	NH ₃
Chloroforme	CHCL ₃
Ethanol	C ₂ H ₆ O
Eau physiologique	
Eau distillée	
Iodure de potassium	KI
Formol	CH ₂ O
Héxane	
Chlorure de mercure	Hgcl ₂
Acide sulfurique	H ₂ SO ₄
Hydroxyde de potacium	KoH
Reactif de dragendroff	K [Bi I ₄]
Réactif de valsy -mayer	K ₂ [Hg I ₄]

Annexe II

« Préparations analytiques »

Solution /réactifs	Mode opératoire	Auteur
Réactif de stiansy	2 Vol de formol a 40% + 1 Vol HCL concentré. Ou 10 ml de formol a 40% + 5ml HCL concentré	DAAS AMIROU, (2009)
Réactif de valsy-mayer	Dissoudre 1.36g d'HgCl ₂ dans 60 ml d'eau distillée puis 5g de KI dans 10 ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100ml	Majob , (2003)
Reactif de dragendroff	Solution a : Dissoudre 0.85g sous-nitrate de Bismuth dans un mélange composé de 100ml d'acide acétique glacial et de 40ml d'eau distillée. Solution b : dissoudre 8g d'iodure de potassium dans 20ml d'eau distillée . -immédiatement avant l'emploi, mélanger 15ml de la solution a et 15ml de la solution b. Puis ajouté 20ml d'acide acétique glacial, et compléter le volume ensuite à 100ml avec l'eau distillée.(le flacon de réactif de Dragendroff doit être conservé au frais, à l'abri de la lumière).	
Eau d'iode	Broyer 1g d'iode et 2g d'iodure de potassium les écraser et ajuster le volume a 100ml	
Chlorure de fer anhydre a 5 %	5g de poudre FeCl ₃ dans 100 ml d'eau distillée.	
HCL à 0.1 N	1. on calcule la concentration de la solution commerciale (solution mère) du HCl : La masse volumique de la solution mère est donnée par la relation : $d = u_{\text{mere}} / u_{\text{eau}}$. $u_{\text{mere}} = d \cdot u_{\text{eau}} = 1.18 \cdot 1000 = 1180 \text{g/l}$. un litre de solution mère a une masse de 1180g. comme le pourcentage massique en acide HCl est de 35% , on peut dire que : 1L de solution mère contient $m = 1180 \cdot (35 \cdot 100) = 413 \text{g d'HCl}$ 2. la masse molaire d'HCl :	CRD SONATRACH

$M(\text{HCl}) = 1 + 35,5 = 36,5 \text{ g/mol}$

1L de la solution mère contient $n = m/M = 413/36,5 = 11,31 \text{ mole d'acide}$

La concentration molaire volumique de la solution mère est donc :

$C_{\text{mère}} = n/v = 11,31 / 1 = 11,31 \text{ mole/l}$

3. préparation d'une solution diluée (filie) :

$n_{\text{filie}} = n_{\text{mère}} / C_{\text{filie}} \cdot V_{\text{filie}} = C_{\text{mère}} \cdot V_{\text{mère}} ?$

$0,1 \cdot 0,25 = 11,31 \cdot V_{\text{mère}} \text{ prélevé}$

Donc : V préparer une solution de 0,1N de 250ml.

Annexes III

« Compositions des différents milieux de culture »

Le milieu PDA est un milieu de repiquage et d'identification , favorise la sporulation et la production de pigments . (**Dufresne Guy St-Germain,2014**).

Le milieu	Mode opératoire	Auteur
PDA Agar dextrose Potatoes	<p>Composition :</p> <ul style="list-style-type: none">• Pomme de terre 200g• Glucose 20g• Agar-Agar 20g• Eau distillée 1000g• PH final : 5.6 <p>Préparation :</p> <ul style="list-style-type: none">➤ Pour la préparation de l'extrait, laver et couper en petits cubes 200g de pommes de terre non pelée, vieilles de préférence.➤ Les mettre dans 1 litre d'eau et porter à l'ébullition pendant 1 heure, écraser filtrer et compléter à 1 litre.➤ Dissoudre l'agar à chaud dans l'extrait puis ajouter le glucose. Compléter à 1 litre. stériliser à 110°C pendant 30 minutes.➤ En cas de dépôt, agiter le milieu avant le répartir.	<p>(LARPENT ,1997)</p> <p>(BOTTON ET al,1990)</p>

Le milieu	Mode opératoire	Auteur
Milieu muller hinton	<p>Composition :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Extrait de viande 2.0g • Peptone tryptique de caseine 17.5g • Amidon 1.5g • Agar 15.0 g • Eau distillée 1000ml 	CRD SONATRACH
Milieu Sabouraud	<p>Composition :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Peptone de gélatine 10g • Glucose 20g • Agar 17g • Eau distillée 1000ml 	CRD SONATRACH

Annexes IV

« Les souches étudiées »

Définition

Escherichia coli :

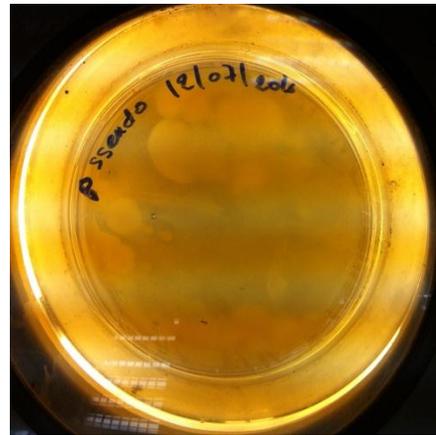
les bactéries appartenant à l'espèce *Escherichia coli* constitue la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme .certaines souches d'*Escherichia coli* sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néonatales.il s'agit d'un bacille Gram négatif, le plus souvent mobile (péritriche) et gazogène lorsqu'il fermente un sucre *Escherichia coli* croit après 24h d'incubation à 37°C donnant des colonies de 2 à 3 mm de diamètre, ronde ,blanchâtres et translucides. Ils fermentent le lactose, le mannitol et le sorbitol, oxydase négative, poussent rapidement sur milieux ordinaires (Schaechter,2009).



Original

Pseudomonas aeruginosa :

les espèces *P. aeruginosa* sont des bacilles à gram négatif, de 1.5 à 3 um de long et 0.5 à 0.8 um de large, non sporulés, généralement mobiles grâce à ne ou plusieurs flagelles polaires. *P.aeruginosa* est une espèce aérobie à métabolisme strictement respiratoire et chimio-organotrophes (Palleroni,2008)



Original

levure candida albicans :

Les levures sont typiquement unicellulaires, quoique très souvent les cellules restent collées les unes aux autres après la division cellulaire (Fuerst, 1976).

Candida albicans est la seule levure prise dans notre étude. elle est principalement à l'origine de la candidose disséminée. C'est un champignon fréquemment retrouvé au niveau de la bouche et du tractus gastro-intestinal de plusieurs personnes normales. parmi les conditions favorisant une infection à *candida* , notons le diabète , la grossesses, les antibiotiques, les corticostéroïdes et toute maladie pouvant affecter l'état général d'un individu. La nystatine (Mycostatin) est très efficace dans le contrôle des infections muco-cutanées(Pieri et kirkiacharian,1992).



Original

Klebsiella pneumoniae

Les *Klebsiella* sont des bacilles à Gram négatif de 0.5 µm sur 3 µm environ, à extrémités arrondies, se présentant de manière isolée, groupés en diplobacilles ou en courtes chaînettes souvent enrobés dans la même capsule. Cette bactérie se distingue par son immobilité constante, elle est asporogène, capsulée mais cette dernière peut être absente chez 5% des souches. **Le Minor L and Véron M. (1989)**

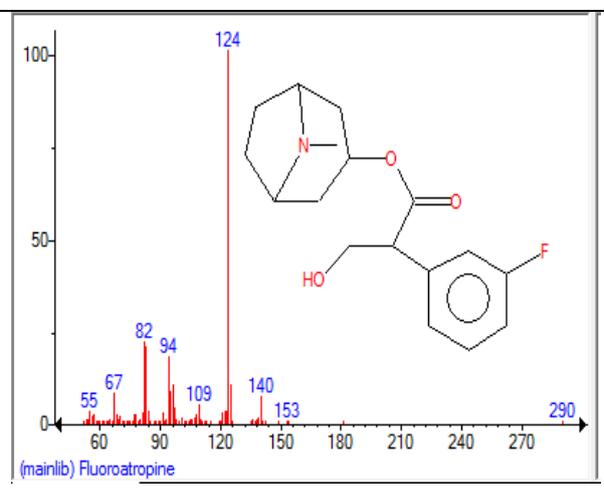
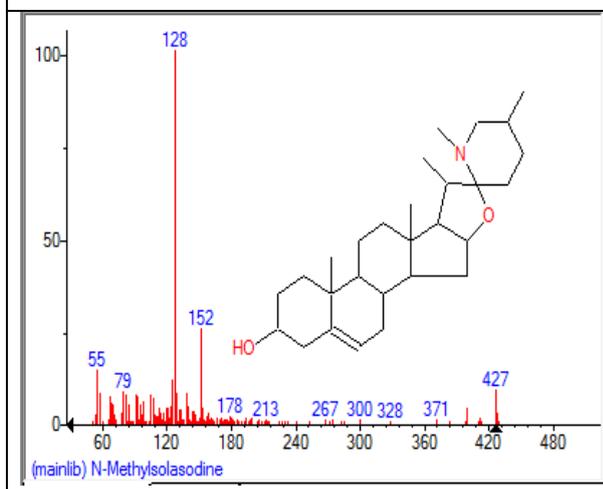
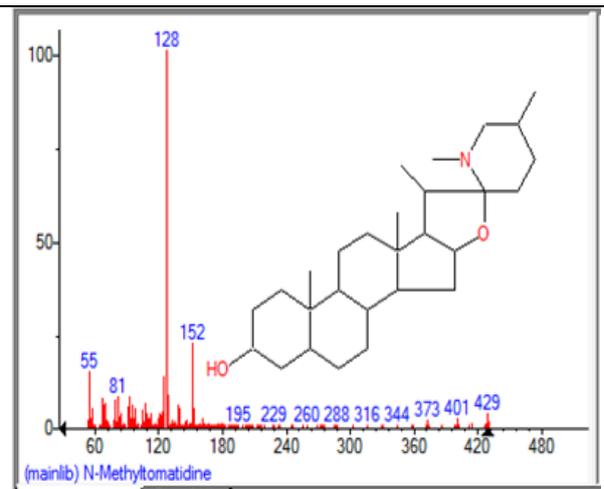
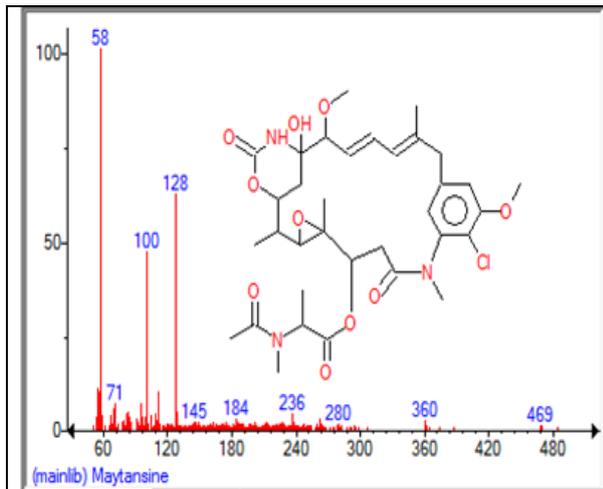
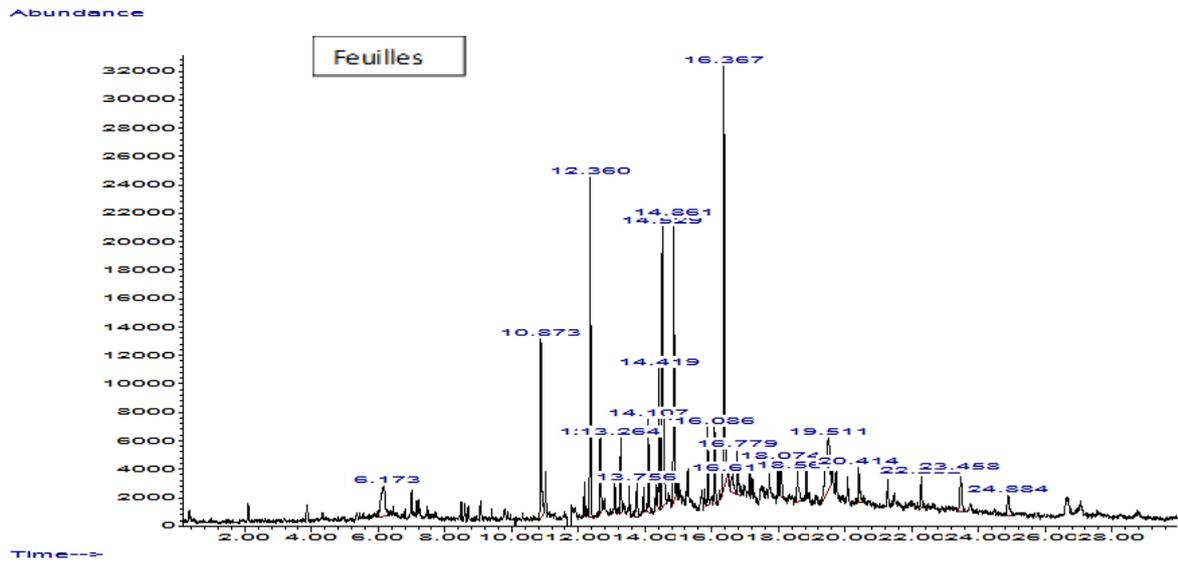
K. pneumoniae est une espèce isolée dans l'environnement à partir d'échantillons de sol, d'eaux de surface, d'eaux usées, de végétaux (**kumar et al.,2011**), et de muqueuses des mammifères, en particulier de la flore fécale (**Bagley, S. T. 1985 ; Brisse, S .2005**).

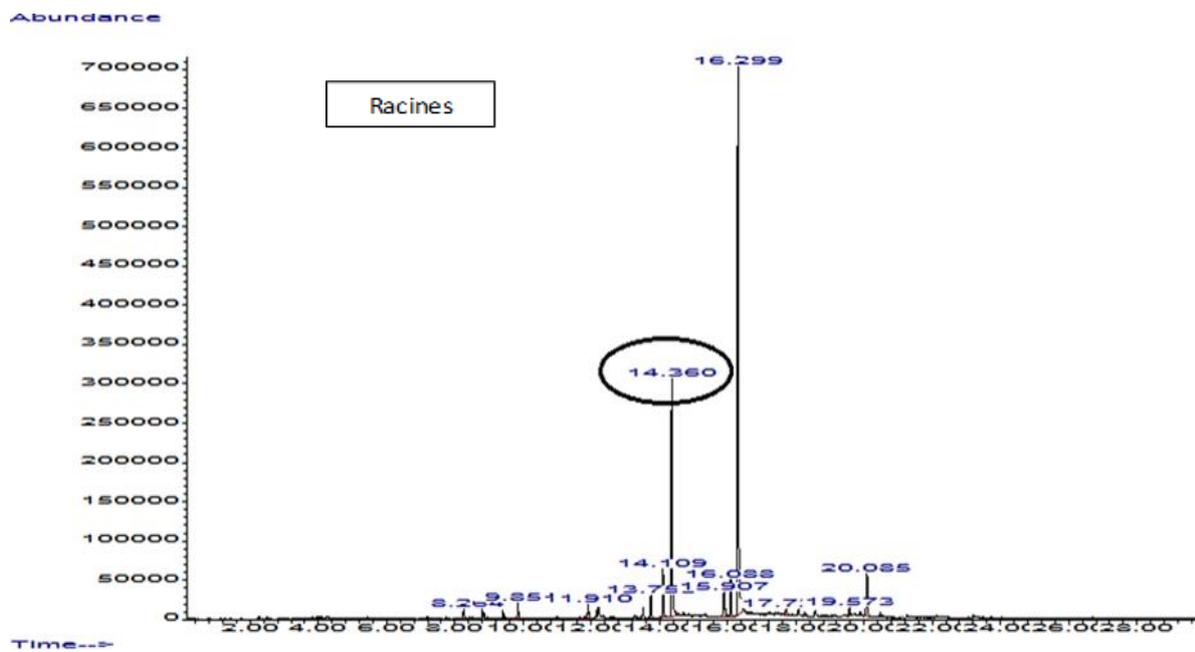
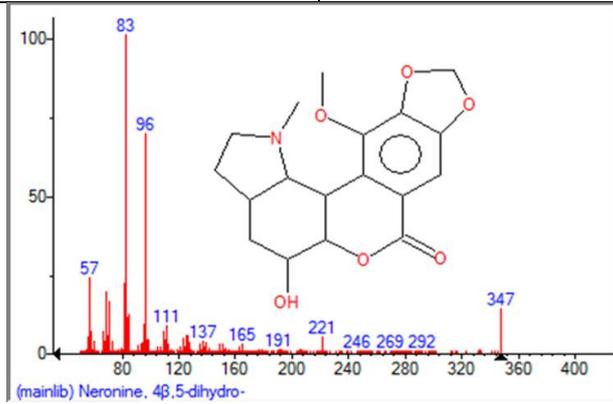
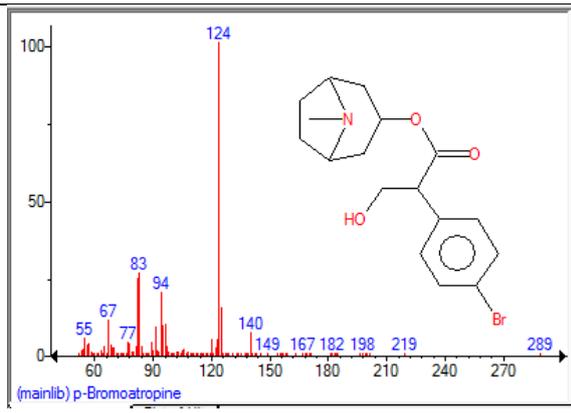
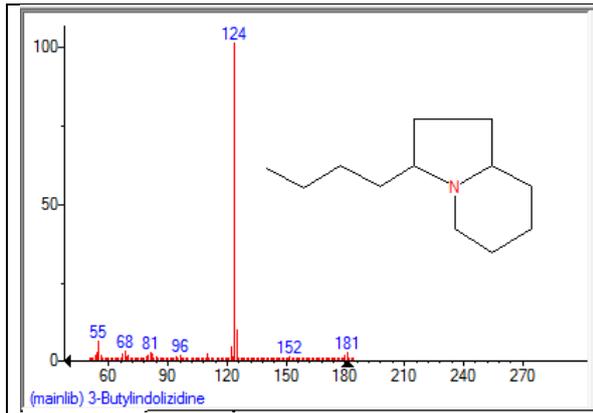


Original

Annexe V :

Les chromatogrammes de la CPG/SM des extraits feuilles et racines





Résumé

Dans le cadre de la valorisation du patrimoine botanique national surtout les plantes médicinales dont une grande partie reste encore vierge et nécessite des études approfondies, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique des trois parties (feuilles, tiges et racines) d'une plante de la famille des *Fabaceae* (*Cytisus arboreus* (Desf.) DC, en essayant de chercher quelques propriétés pharmacologiques de cette plante. Le screening chimique a mis en évidence la présence d'alcaloïdes, flavonoïdes, tanins galliques, saponosides, Stérols et tri-terpène, sucre réducteur dans la plante étudié. les extraits alcaloïdiques obtenus par la méthode d'extraction liquide-liquide a permis de donner un rendement qui varie entre 0,328 % (feuilles), 0,272 % (tiges) et 0.1235 % (racines). La CCM sur gel de silice, nous a permis sous UV et par la révélation avec le réactif de Dragendroff de montrer une variation de molécules alcaloïdiques de type quinolizidiniques. La CPG/MS a montré que les feuilles contiennent plus d'alcaloïdes que les autres organes. Les résultats de l'activité antimicrobienne ont montrés que les extraits alcaloïdiques ont une activité importante sur les bactéries à gram+ et un effet moins prononcé sur les bactéries à gram- et les champignons.

Mot clés : *Fabaceae*, *Cytisus arboreus* (Desf.) DC, étude phytochimique, activité antimicrobienne.

Abstract

Within the framework of the valorization of the national botanical heritage especially the medicinal herbs including one great part remains still virgin and requires in-depth studies, we are interested parties under investigation phytochimic of the three parts (sheets, stems and roots) of a plant of the family of *Fabaceae* (*Cytisus arboreus* (Desf.) cd., one trying to seek some pharmacological properties of this plant. Chemical screening highlighted the presence of alkaloids, flavonoïdes, tannins gallic, saponosides, Sterols and tri-terpene, studied reducing sugar in the plant. the extracts alcaloidic obtained by the method of solvent extraction made it possible to give an output which varies between 0,328% (sheets), 0,272% (stems) and 0.1235% (roots). Thin layer chromatography on silica gel, allowed us under UV and by the revelation with the reagent deDragendroff to show a variation of alcaloidic molecules the typequinolizidiniques ones. The CPG/MS showed which sheets contains more alkaloids than the other bodies. The results of the antimicrobic activity showed that the extracts alcaloidic have an important activity on the bacteria with Gram-plus and an effect less pronounced on the bacteria with gram- and mushrooms.

Key words : *Fabaceae*, *Cytisus arboreus* (Desf.) cd., phytochimic study , antimicrobic activity.

الملخص

في إطار تقييم الموروث النباتي الوطني خاصة النباتات الطبية التي لا يزال قسم كبير منها يتطلب دراسات معمقة قمنا بدراسة كيميائية لأوراق, سيقان, جذور للنبته *Cytisus arboreus* (Desf.) DC التي تنتمي الي عائلة البقوليات. أظهر الكشف الكيميائي عن وجود كل من القلويدات , الفلافونويدات, التانينات, الصابونوزيدات الستيرولات, التريটারبانات, و المركبات المرجعة في النبتة المدروسة. المستخلصات القلويدية المستخلصة عن طريق المحاليل نسبة مردودها مقدرة بـ % 0.328 (الأوراق) , % 0,272 (السيقان), % 0,1235 (الجذور). دراسة المستخلصات عبر كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة علي جال السيليس مكننتنا عن طريق الأشعة فوق البنفسجية من اظهار مختلف الجزيئات القلويدية و التي هي من عائلة quinozilidinique. CPG/MS كشف لنا أن الأوراق تحتوي علي نسبة كبيرة من القلويدات مقارنة مع باقي الأعضاء الأخرى. بينت نتائج إختبار المضاد للبكتيريا أن المتخلص القلويدي له تأثير كبير و مهم على بكتيريا دات غرام + بالمقارنة مع بكتيريا دات غرام - و الفطريات.

الكلمات الدلالية : فاباسي, سينيوزوس أربوروز, فحص فيتوكيميائي, نشاط مضاد للبكتيريا.