

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

*République Algérienne Démocratique Et Populaire*

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche scientifique

- أ محمد

Université M'hamed Bougara Boumerdes



*Faculté des sciences*

*Département de biologie*

Mémoire de fin d'étude présenté en vue

D'obtention du diplôme de *Master en Biochimie Appliqué*

**Thème :**

Optimisation de l'extraction des polyphénols à partir d'une plante locale *Calicotome villosa (Poir.) Link* par une technique innovante et l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

Présenté par :

M<sup>lle</sup> HADDAD Amira

M<sup>lle</sup> REGHMIT Aicha

Soutenu le 03 / 07 / 2017 devant le jury :

M <sup>me</sup> AZZOUNE N.	MAA	(UMBB)	Présidente
M <sup>me</sup> BELKHEIR M.	MAA	(UMBB)	Examinatrice
M <sup>lle</sup> BENYOUNES S.	Ingénieur	SONATRACH	Co-promotrice
M <sup>me</sup> CHEBILI S.	MAB	(ALG1)	Promotrice

2016/2017

## Résumé

Dans cette étude nous avons optimisé l'extraction des polyphénols et l'évaluation de l'activité antimicrobienne des parties aérienne d'une plante locale *Calicotome villosa* de la famille de fabaceae récolté d'une région de la wilaya de Bouira. L'extraction a mis en évidence que les meilleurs rendements polyphénoliques sont obtenus par la technique d'ultrasons pour la partie des feuilles avec le solvant éthanol. Le dosage des polyphénols totaux représente la teneur maximale pour l'extrait éthanolique macéré pendant 30min avec  $51,482 \pm 8,017$  mg EAG/g. L'analyse chromatographique par La CCM sur gel de silice, permet sous UV de montré une variation de molécules polyphénoliques. l'analyse par GC/MS montre la présence de plusieurs substances naturelles dans les extraits polyphénolques .Les extraits polyphénoliques ont montré une activité antimicrobienne importante sur les bactéries Gram+ et un effet moins prononcé sur les bactéries Gram - et aucune activité sur la levure.

**Mots clés :** *Fabaceae*, *Calicotome villosa*, extraction, dosage des polyphénol totaux, analyse chromatographique ,activité antimicrobienne.

## Abstract

In this study we optimized the extraction of polyphenols and the evaluation of the antimicrobial activity of the aerial parts of a local plant *Calicotome villosa* of the fabaceae family harvested from a region of the wilaya of Bouira. The extraction showed that the best polyphenolic yields were obtained by the ultrasound technique for the part of the leaves with the ethanol solvent. The total polyphenol dosage represents the maximum content for the ethanolic extract macerated for 30 min with  $51.482 \pm 8,017$  mg EAG / g. The chromatographic analysis by CCM on silica gel, under UV shows a variation of polyphenolic molecules. The GC / MS showed that the polyphenolic extracts contains more naturel substance . The polyphenolic extracts showed an important antimicrobial activity on Gram + bacteria and a less pronounced effect on Gram - bacteria and no activity on yeast .

**Key words :** *Fabaceae*, *Calicotome villosa*, extraction, total polyphenol dosage, chromatographic analysis, antimicrobial activity

## المخلص

تناولنا في هذه الدراسة تحسين استخلا عديدات الفينولات و تقييم النشاط المضاد للبكتيريا ل جزء الهوائية للنبتة المحلية *Calicotome villosa* التي تنتمي الى عائلة البقوليات المقطوفة من منطقة بولاية البويرة . الاستخلاص بين تم الحصول عليه عن طريق تقنية الموجات فوق الصوتية بالنسبة لجزء الاوراق بواسطة المذيب الايثانول . بينت المعايير لعديدات الفينولات الكلية ان المستخلص الايثانولي المنقع لمدة 30 دقيقة له  $8.017 \pm 51.482$  mgEAG/g. التحاليل الكروماتوغرافية عن طريق كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على جال السليس مكنتنا عن طريق الاشعة فوق بنفسجية ن اظهار مختلف عديدات الفينولات .

هذه مستخلصات عديدات الفينولات GC /SM ي من الجزينات طبيعية. هذه بينت ان لها تاثير كبير على بكتيريا ذات جرام + و اقل تاثيرا على بكتيريا ذات - التأثير خميرة .

**الكلمات المفتاحية** فباسي .كاليكوتوم فيلوزا . استخلاص . معايير عديدات الفينولات الكلية . التحاليل الكروماتوغرافية النشاط المضاد للبكتيريا .

## **Remerciements**

*Avant tout, nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la foi et la volonté afin d'arriver à la finalité de ce travail.*

*Nous adressons nos plus vifs remerciements et notre profond respect à notre chère promotrice **M<sup>me</sup> Chebili S. maitre –assistant B de l'université d'alger 1**, d'avoir acceptée de nous encadrer. pour sa prise en charge, sa disponibilité et sa patience.*

*Nos profonds remerciements vont également à notre chère encadreur **M<sup>lle</sup> Benyounes S du centre de recherche et de developpement SONATRACH de la wilaya de BOUMERDES** de nous avoir accueillie dans son équipe avec gentillesse et bienveillance .*

*On remercie vivement **Monsieur GANA M 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.*

*Nos sincères remerciements s'adressent à **M<sup>me</sup> Azzoune N. maitre maitre –assistant A à l'UMBB**, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury.*

*Nous tenons à exprimer notre gratitude et nos remerciements à **M<sup>me</sup> Belkheir M. maitre – assistant A à l'UMBB** pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner notre travail.*

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

*Nos remerciements vont également au chef de spécialité biochimie Appliqué **M<sup>me</sup> Fazouane F** et aux techniciens du laboratoire du département de Biologie: **Nadia**, **Kamilia**, **Fatima**. Nos remerciements les plus chaleureux vont à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## *Dédicace*

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

*Avec toute mon estime et mon amour, je vous dédie ce modeste travail aux deux plus chères personnes de ma vie que j'aime le plus au monde, mes parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et mon amour.*

*Pour cela et pour ce qui ne peut être dit, mes affections sans limite ^ ^*

*A mes très chers grands-parents.*

*A mes très chères sœurs : Rabia et fatma.*

*A mes adorable frères : Mohamed et Abdenacer .*

*A tous mes oncles et tantes , cousins et cousines , et leurs familles .*

*A ma très chère binôme Amira et sa famille .*

*A mes très chères amies, d'être toujours à mes côtés : lamia, feriel,amina,siham,khalissa,Assia,khalida.*

*A tous mes collègues de la spécialité Biochimie .*

*A tous les stagiaires ou j'ai réalisé mon stage mais surtout : Siham, Nesrin, Malia, Mouhamed, Iman ,Yassmine, Ikram, Dhriifa, Meriem .*

*A tous mes amis que je n'ai pas cités.*

*A tous personne m'ayant aidé de près ou de loin, trouve ici l'expression de ma reconnaissance.*

*Reghmit Aicha*

## SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

**Introduction** ..... 1

### Partie bibliographique

#### Chapitre I : SUBSTANCES NATURELLES BIOACTIVES

I.1. Généralité sur les polyphénols.....	3
I.2. Biosynthèse des polyphénols.....	2
I.2.1. Voie de l'acide shikimique.....	2
I.2.2. Voie de l'acétate / malonate.....	2
I.3. Classes des polyphénols.....	3
I.3.1. Acides phénoliques.....	3
I.3.1.1. Acides phénoliques dérivés d'acide benzoïque.....	3
I.3.1.2. Acides phénoliques dérivés d'acide cinnamique.....	3
I.3.2. Flavonoïdes.....	4
I.3.3. Lignane.....	4
I.3.4. Lignine.....	5
I.3.5. Tannins.....	6
I.3.5.1. Tanins hydrolysables.....	6
I.3.5.2. Tanins condensés.....	6
I.3.6. Coumarins.....	7
I.3.7. Stilbènes.....	7
I.3.8. Les xanthones.....	8
I.4. Propriétés biologiques des polyphénols.....	8

## **Chapitre II : ETUDE BOTANIQUE DE LA PLANTE LOCALE *CALICOTOME VILLOSA***

II.1. Données bibliographique sur la plante <i>Calicotome villosa</i> (Poir.) Link.....	11
II.1.1.Famille des Fabacées.....	11
II.1.2.Description de genre <i>Calicotome</i> .....	12
II.1.3.Caractéristique botanique .....	12
II.1.3.1.Classification .....	12
II.1.3.2.Description de la plante <i>Calicotome villosa</i> (Poir.) Link.....	13
II.1.4.Localisation et répartition géographique .....	14
II.1.5.Nomenclature.....	14
II.1.6. Usage thérapeutique de <i>Calicotome villosa</i> (Poir.) Link.....	15

## **Chapitre III : ACTIVITE ANTIBACTERIENNE**

III.1.Généralités .....	15
III.1.1. Techniques de détermination de l'activité antibactérienne.....	15
III.1.1.1 Méthode de diffusion par disques sur milieu gélosé.....	16
III.1.1.2. Méthode des puits ou cylindre .....	17
III.1.1.3. Méthode micro-atmosphère.....	18
III.1.1.4. Méthode de dilution .....	18

## **Partie Expérimentale**

### **Chapitre I : MATERIEL et METHODES**

I.1 Matériel utilisé .....	19
I.1.1.Matériel biologique.....	19
I.1.1.1.Matériel végétal .....	19
I.1.1.2. Matériel microbiologique.....	19

I.1.2. Matériel non biologique.....	19
I.2. Methodes.....	20
I.2.1. Préparation de la matière végétale (Récolte , Séchage , Broyage).....	21
I.2.2. Optimisation de l'extraction des polyphénols totaux.....	23
I.2.2.1. Optimisation de l'extraction des polyphénols totaux par les solvants.....	24
I.2.2.2. Cinétique d'extraction des polyphénols totaux.....	25
I.2.2.3. Extraction par méthode conventionnelle et moderne.....	26
I.2.2.3.1. Extraction par macération sous agitation magnétique.....	26
I.2.2.3.2. Extraction assisté par ultrasons .....	26
I.2.2.4. Calcul de rendement des extraits polyphénols totaux.....	28
I.2.3. Caractérisation biochimique.....	29
I.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT).....	29
I.2.3.2. Analyse chromatographique.....	30
I.2.3.2.1. Analyse qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM) .....	30
I.2.3.2.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG / SM)..	32
I.2.3.3. Activité biologique.....	33
I.2.4.1. L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits polyphénoliques totaux.....	33
I.2.3.3.1.1. méthode de diffusion des disques sur milieu solide .....	33

## **Chapitre II : Résultats et discussion**

II. Résultats.....	35
II.1. Rendement d'extractions des PPT .....	35
II.1.1. Rendements des extractions par macération dans les différents solvants.....	35
II.1.2. Optimisation du temps de macération.....	36

II.1.3. Rendement d'extraction des PPT par une technique conventionnelle et moderne.....	37
II.2. Caractères organoleptiques des extraits polyphénoliques obtenus par macération .....	38
II.3. Analyse biochimique.....	39
II.3.1. Dosage des polyphénols totaux.....	39
II.3.2. Analyse chromatographique.....	41
II.3.2.1. Analyse qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM) .....	41
II.3.2.2. Analyse qualitatives GC/MS des extraits éthanoliques des parties aériennes de la plante C. villosa .....	47
II.4. Résultats de l'activité biologique	48
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	55
<b>Références bibliographiques</b> .....	58
<b>Annexes</b>	
<b>Résumés</b>	

## LISTES DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Structure des acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques.....	5
<b>Figure 2</b> : Structure de base d'un flavonoïde .....	7
<b>Figure 3</b> : Structure et numération des atomes de carbone du phénylpropane (1) et des lignanes (2) (liaison $\beta$ - $\beta'$ ou 8-8').....	7
<b>Figure 4</b> : Structures chimiques de lignine.....	7
<b>Figure 5</b> : Exemple des tanins hydrolysables (a) tanins condensés (b).....	8
<b>Figure 6</b> : Quelques exemples des structures chimiques des coumarines.....	9
<b>Figure 7</b> : Quelques exemples des structures chimiques des stilbènes.....	9
<b>Figure 8</b> : Photo de la plante <i>C. villosa</i> (Poir.) Link.....	13
<b>Figure 09</b> : Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'étude.....	20
<b>Figure 10</b> : Site de récolt de la plante <i>Callycotome villosa</i> (Pioret.) Link.....	21
<b>Figure 11</b> : Les trois parties étudiées de la plante séchée.....	22
<b>Figure 12</b> : Poudres végétales obtenus après séchages et broyage des trois partie de la plante étudiée .....	22
<b>Figure 13</b> : Shémat récapitulatif d'optimisation d'extraction des polyphénols.....	23
<b>Figure 14</b> : Les étapes d'optimisation du solvant d'extraction des polyphénols.....	24
<b>Figure 15</b> : Les étapes d'optimisation de la durée d'extraction.....	25
<b>Figure 16</b> : Phénomène de cavitation acoustique.....	27
<b>Figure 17</b> : Extraction assisté par ultrasons des feuilles.....	27
<b>Figure 18</b> : Rendements en extraits PPT obtenus à partir des trois parties de la plante dans le méthanol et l'éthanol.....	35
<b>Figure 19</b> : Rendements en extraits de PPT obtenus après une macération de 30, 60 et 120min.....	36

<b>Figure 20</b> : Rendements des extraits éthanoliques des feuilles par deux méthodes...	37
<b>Figure 21</b> : Courbe étalon de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux .....	39
<b>Figure 22</b> : Résultats colorimétrique de dosage des extraits polyphénoliques totaux par folin –ciocalteu.....	39
<b>Figure 23</b> : Chromatogrammes des extraits PPT des feuilles (a) ; fleurs (b) et tiges (c) de <i>C. villosa</i> .....	42
<b>Figure 24</b> : Chromatogramme des extraits éthanoliques des feuilles obtenus par macération (60,30 min) et ultrason de <i>C. villosa</i> .....	43
<b>Figure 25</b> : Chromatogramme de la CPG de l'extraits des PPT dans l'éthanol, a : feuilles ; b : fleurs ; c : tiges. ....	48
<b>Figure 26</b> : Histogramme des diametres d'inhibitions des souche vis-à-vis des extraits PPT de feuilles.....	49
<b>Figure 27</b> : Histogramme des diametres d'inhibitions des souche vis-à-vis des extraits de fleurs de <i>C. villosa</i> .....	50
<b>Figure 28</b> : Histogramme des diametres d'inhibitions des souche vis-à-vis des extraits des PPT des tiges.....	51



## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I :</b> Propriétés biologiques des quelques poly phénols dans l'organisme.....	10
<b>Tableau II :</b> Les souches utilisées dans le test antimicrobien.....	19
<b>Tableau III :</b> Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM de gel de silice.....	31
<b>Tableau IV :</b> caractéristique organoleptique des extraits obtenus par macération de la plante <i>C.Villosa</i> .....	38
<b>Tableau V :</b> Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/g) des différents extraits des feuilles.....	40
<b>Tableau VI :</b> Résultats de CCM des extraits bruts méthanolique ethanolique et glycérolique des feuilles de <i>C.Villosa</i> .....	43
<b>Tableau VII :</b> Résultats de CCM des extraits bruts méthanolique ethanolique et glycérolique des fleurs de <i>C.Villosa</i> .....	44
<b>Tableau VIII :</b> Résultats de CCM des extraits bruts méthanolique ethanolique et glycérolique des tiges de <i>C.Villosa</i> .....	44
<b>Tableau IX :</b> Résultats de CCM des extraits ethanolique des feuilles obtenus par macération (60 et 30 min) et ultrason de <i>C.Villosa</i> .....	45
<b>Tableau X :</b> Valeur des diamètres des zones d'inhibition (mm) obtenus par les extrais des PPT des feuilles de <i>C. villosa</i> par la méthode de diffusion par disques sur gélose.....	49
<b>Tableau XI:</b> Valeur des diamètres des zones d'inhibitions (mm) obtenus vis à vis les souches microbiennes des extrais PPT des Fleurs de <i>C. villosa</i> par la méthode de diffusion sur gélose.....	50
<b>Tableau XII :</b> Diamètres des zones d'inhibitions (mm) obtenus par les extrais des PPT des tiges de <i>C. villosa</i> par la méthode de diffusion sur gélose.....	51

<b>Tableau XIII:</b> Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits des feuilles ,fleurs et tiges de la plante <i>C. villosa</i> . .....	53
--	----

A travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux (**Gurib-Fakim ,2006 ; Svoboda et Svoboda ,2000**) ; afin de traiter et soigner les maladies (**Sanago ,2006**) .

Jusqu'à 2004, on a estimé que près de 75% de la population africaine ont toujours recours aux plantes pour se soigner. De plus ce type de soin est considéré souvent comme faisant partie de la médecine douce ( **Kar ,2007**). Ce recours est expliqué par plusieurs raisons tels que le coût élevé des produits pharmaceutiques, les habitudes socioculturelles des populations, la nécessité de disposer d'options thérapeutiques pour les agents pathogènes résistants et l'existence des maladies pour lesquelles il n'y a pas de traitement efficace (**Duke ,1993 ; Cox et Balick ,1994**).

Le continent africain est un des continents dotés d'une biodiversité la plus riche dans le monde (**Aberkane, 2006**) . En effet sur les 300 000 espèces végétales recensées sur la planète plus de 200 000 espèces vivent dans les pays tropicaux d'Afrique ont des vertus médicinales (**Millogo et al., 2005**). L'Algérie possède une richesse floristique considérable, ce potentiel de plantes médicinales comporte des milliers d'espèces présentant différents intérêts et constituent un axe de recherche scientifique et plus particulièrement dans le domaine des substances naturelles (**Aberkane, 2006**).

En effet, les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches à cause de leurs diverses activités biologiques. Ces dernières années l'attention s'est portée sur l'activité antioxydante en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le cancer, le diabète, l'hypertension et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant (**Meddour et al.,2013**) ; aussi la maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale (**Benbrinis, 2012**). Cela est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculo-protecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti radicalaires du fait qu'ils aient une faible toxicité (**Bahorun, 1997**) .

Afin de valoriser la richesse naturelle locale (faune et flore) et améliorer le patrimoine de médecine traditionnelle, nous avons choisi d'étudier une plante de la famille des fabacées *Calycotome villosa* (Poiret.) Link .

Le genre *Calycotome* est très répandu dans l'ouest d'Algérie, Elle s'appelle localement « Guendoul », a fait l'objet de nombreuses études phytochimiques. Ces travaux ont permis l'isolement de plusieurs métabolites secondaires qui sont essentiellement les alcaloïdes et les composés phénoliques particulièrement les flavonoïdes (**Chikhi, 2013**).

L'objectif de la présente étude est l'optimisation de l'extraction des polyphénols à partir d'une plante locale *Calycotome villosa* (Pioret.) Link.

Le présent travail est scindé en deux parties importantes :

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

La deuxième partie concerne la partie expérimentale, contient deux chapitres dont le premier renferme la partie matériel et méthode, le deuxième est réservé aux résultats de rendements de l'extraction, la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie en phase Gazeuse couplé au spectrométrie de masse (CPG/SM), dosage des polyphénols suivie par une évaluation des effets antimicrobiens des extraits polyphénoliques totaux des trois parties de la plante: feuilles, fleurs, tiges.

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

## Chapitre I : Substances Naturelles Bioactives

### I.1. Généralité sur les polyphénols

Le terme « polyphénols » est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux (**Fleuriet et al .,2005** ). Ces composés regroupent une multitude de molécules et représentent l'un des groupes les plus importants présents dans le règne végétal (**Dangles et al ., 1992 ; Hagerman et al .,1998 ; Sarni-Manchado et Cheynier .,2006** ) .

Les scientifiques en ont identifié plus de 8000, allant de molécules simples à des composés hautement complexes (**Urquiaga ,2000**). Leur accumulation dans les plantes, varie quantitativement et qualitativement non seulement dans les différentes parties de la plante, mais aussi d'une espèce végétale à l'autre (**Harborne ,2000**).

On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits .Ce sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la production (**Fleuriet , 1982 ;Yusuf ,2006**) . Ils sont synthétisés par l'ensemble des végétaux et participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences). Ils contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) (**Visioli et al .,2000**) .

Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : ether, ester, hétéroside (**Bruneton ,1999**).

## I.2. Biosynthèse des polyphénols

Les composés phénoliques sont issus par deux grandes voies métaboliques : la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate/malonate (**Bruneton ,1999**). (Voir annexe 1).

### I.2.1. Voie de l'acide shikimique

La voie de l'acide shikimique (**figure 01**) est la voie la plus importante pour la biosynthèse des composés aromatiques dans les plantes, y compris les acides aminés aromatiques : la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Ce sont des métabolites primaires qui servent de précurseurs pour de nombreux de produits naturels (secondaire) tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les coumarines, les alcaloïdes (**Ghasemzadeh ,2011**) .

### I.2.2. Voie de l'acétate / malonate

La glycolyse et la -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (**Akroum ,2010**).

La diversité structurale des composés phénoliques est due à leur double origine synthétique « la voie de shikimate et de l'acétate / malonate ». Elle augmente souvent avec la participation simultanée de ces deux voies conduisant à l'élaboration de composé mixtes (Flavonoïdes, stilbène, xanthonés...etc.). Plusieurs milliers de polyphénols ont été identifiés dans les plantes et dans les aliments d'origine végétale ( **Habauzit et Horcajada .,2008**) .

## I.3. Classes des polyphénols

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base « allant d'un forme simple C6 à des formes très polymérisées », ensuite par le degré de modification de se squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation ... ect). Enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, protéines, lipides...ect) (**Herber ,1989**).

### I .3.1. Acides phénoliques

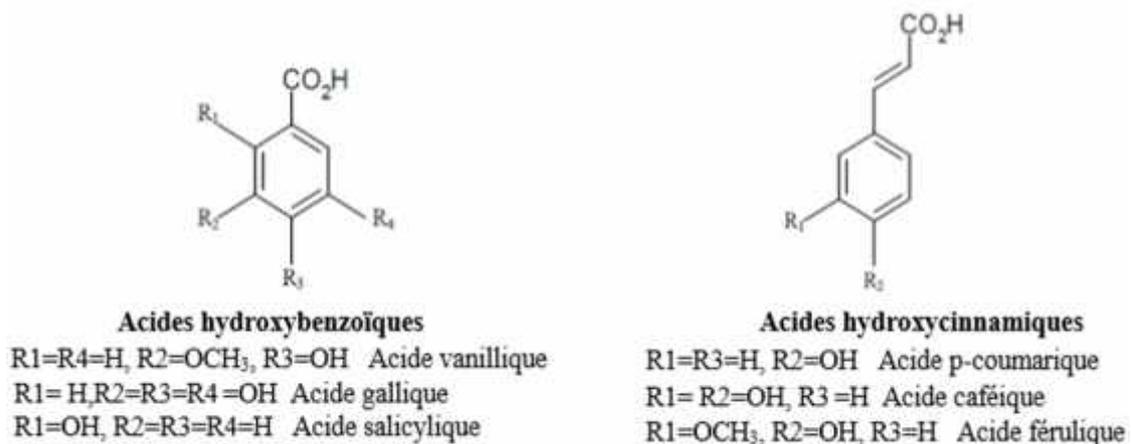
On distingue deux principales classes d'acide phénolique; les dérivés de l'acide benzoïque (Guignard ,1996) et les dérivés de l'acide cinnamique (Malagas ,1992).

#### I.3.1.1.Acide phénols dérivés d'acide benzoïque

Sont des hydroxybenzoïques, possèdent une structure générale de base de type (C6-C1) (Harrar ,2012). Ces acides sont très communs aussi bien sous forme libre que sous forme combinée à l'état d'esters ou hétérosides (Thompsen et Mottola .,1984 ; Afanas'ev et al .,1989). Les plus répandus sont: l'acide salicylique et l'acide gallique (Bruneton ,1999).

#### I.3.1.2.Acide phénols dérivés d'acide cinnamique

Sont des hydroxycinnamiques possèdent une structure de type C6-C3. ces acides sont rarement présents à l'état libre et existent généralement sous forme d'ester (avec glucose,l'acide quinique,l'acide tartrique ...ect )ou de glycoside (Lafay et Gil-Izquierdo .,2008 ; Bondia-Pon et al .,2009). Les plus courants sont l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide p-coumarique et l'acide sinaptique (Haslam ,1994 ; Bruneton ,2009).



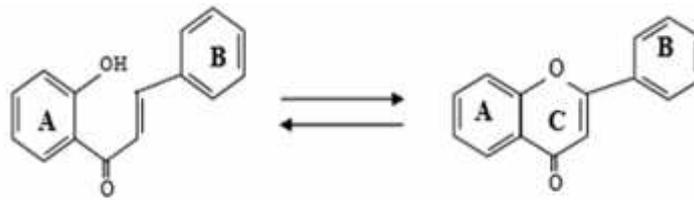
**Figure 1** : Structure des acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques (Macheix et al .,2005)

### I .3.2. Flavonoïdes

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange (Piquemal ,2008) , cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté en latin du flavus « flavus=jaune » (Male ev et Kunti .,2007 ; Wichtl et Anton ,2009) .

Ils constituent le principal groupe de polyphénols, avec plus de 9000 composés différents (**Hernández ,2009**) , et distribués de manière générale, dans toutes les plantes vasculaires . Ils peuvent être considérés parmi les agents responsables des couleurs de plante à côté des chlorophylles et caroténoïdes (**Wichl et Anton ,2009 ; El Gharras ,2009**) .

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base C6-C3-C6, à poids moléculaire faible (**Wichl et Anton ,2009**) , dont le squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué par deux cycles en C6 (A et B) reliés entre eux par une chaîne en C3 qui peut évoluer en un hétérocycle (Cycle C) (**Lobstein ,2010 ; Akroum ,2011**) .



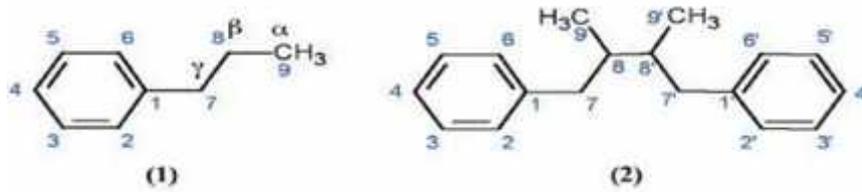
**Figure 2** : Structure de base d'un flavonoïde (**Heller et Forkmann ,1993**).

Ces composés existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, c'est à-dire liée à des oses et autres substances (**Heller et Forkmann ,1993 ; Iwashina ,2000**). Les principales classes des flavonoïdes sont les : Flavonols, Flavones , Flavonones , Isoflavones , Flavan3-ols , Anthocyanidines (**Sadasivam & Thayumanavan ,2003 ; Bruneton ,2009**) .(voir annexe 1)

### I .3.3 . Lignane

Les lignanes constituent une classe importante de substances naturelles du règne végétale, Il s'agit des dimères ramifiés de phénylpropanes (C6-C3)<sub>2</sub> (**Axelsson et al ,1982**) , où deux unités de phénylpropane C6-C3 sont liés par leur carbone 8 (**Sainvitu et al ,2012**) .

Ces derniers sont formés par dimérisation oxydante de deux unités phénoliques de type monolignol comme l'alcool coniférique, p-coumarique ou sinapique (**Muanda ,2010**) .



**Figure 3 :** Structure et numération des atomes de carbone du phénylpropane (1) et des lignanes (2) (liaison  $\beta$ - $\beta'$  ou 8-8') (Moss ,2000) .

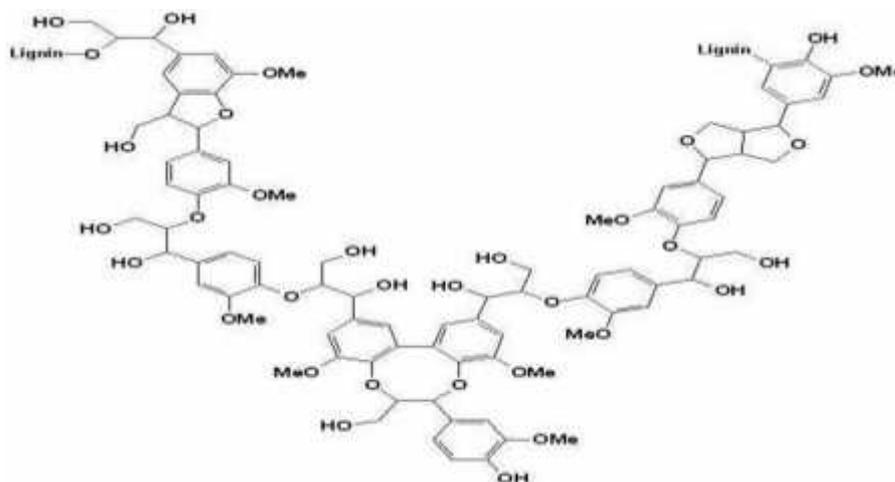
Les lignanes sont des composés phénoliques bioactifs, non-nutritifs, non caloriques. On les trouve en plus forte concentration dans le lin et les graines de sésame et en faibles concentrations dans les fruits et les légumes (Peterson et al .,2010) .

### I.3.4. Lignine

La lignine est un polymère fortement ramifié, localisée dans les parois cellulaires, et plus spécialement dans les parois secondaires des éléments conducteurs, insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques (Hopkins .,2003) .

Ils constituent une classe importante de produits naturels dans le règne végétal, et seraient formés par polymérisation oxydative de monolignols (monomères) qui sont les alcools p-coumarique, coniferique et sinapique (Jutiviboonsuk et al .,2005) .

Une structure précise pour la lignine n'est pas encore connue, mais surement elle est très complexe (Buchanan et al .,2000) .leurs principales fonctions sont d'apporter de la rigidité (Martone et al .,2009) .



**Figure 4 :** Structures chimiques de lignine (Scalbert et Williamson ,2000) .

### I.3.5. Tannins

Le terme tanin dérive de la capacité de tannage de la peau animale en la transformant en cuir par le dit composé. Ils peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments et peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux. Ils sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire (Alkurd et al., 2008), de 500 -3000 Da (Kamra et al., 2006).

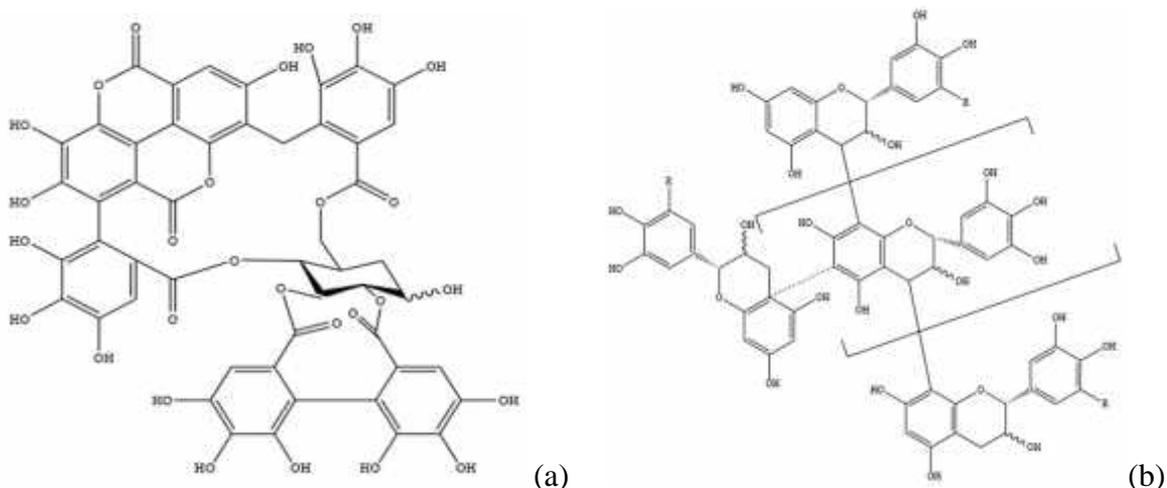
Les tanins sont des molécules fortement hydroxylés (Khenaka, 2011), caractérisés par une saveur astringente ; et sont retrouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (Yao et al., 2004 ; Yao et al., 2010). On distingue: les tanins hydrolysables et condensés (Edwin Haslam, 1996).

#### I.3.5.1. Tanins hydrolysable

Ils sont constitués par une molécule de sucre (le glucose souvent) estérifiée par l'acide gallique ou un de ces dérivés (acide ellagique, chébulique ou valonique). Ils sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique.

#### I.3.5.2. Tanins condensés

Ce sont des produits de la polymérisation de flavan-3-ols (catéchines) et flavan-3,4diols (leucoanthocyanidines). Ils sont aussi désignés aussi sous le nom de « tanins catéchiques » et ne sont hydrolysables que dans des conditions fortement acides.

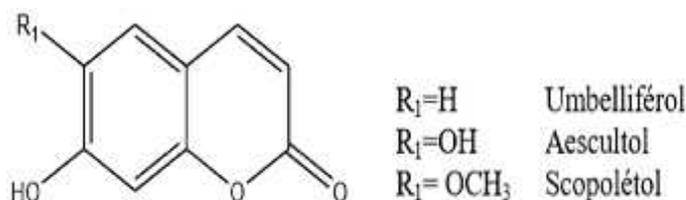


**Figure 5 :** Exemple des tanins hydrolysables (a) tanins condensés (b). (Boubekri, 2014)

### I.3.6. Coumarins

Les coumarines sont des molécules largement répandues dans tout le règne végétal (**Benayache ,2005**), sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone (**Iwueke et Nwobo ,2008**). Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarouna odorata* (**Lacy & O’Kennedy ,2004**). Aujourd’hui, près de 1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les microorganismes (**Sakagami et al ., 2005**) . Elles sont produites en grandes quantités en réponse a une attaque biotique et abiotique, et semble constitue un moyen de défense de type phytoalexine (**Vivas de Gaulejac ,2001**).

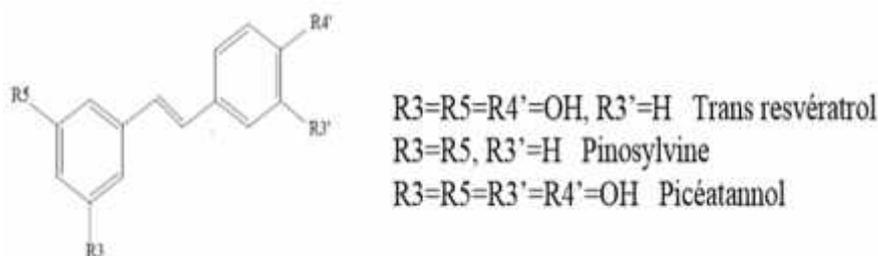
Les coumarines sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (**Anderson et al .,1996 ; Igor ,2002** ).



**Figure 6** : Quelques exemples des structures chimiques des coumarines. (**Boubekri ,2014**).

### I.3.7. Stilbènes

Ces dérivés hydroxylés sont des composés formés de deux noyaux aromatiques liés par un groupe éthylénique (C6-C2-C6) (**Lobstein ,2010**) .Le resvératrol un des stilbènes les plus connus se trouve dans le raisin ainsi que le vin , et qui a été largement étudié pour ses propriétés anticancéreuses mises en évidence lors de l’étude des activités biologiques de plantes médicinales(**Kundu ,2008**).



**Figure 7** : Quelques exemples des structures chimiques des stilbènes (**Boubekri ,2014**).

### I.3.8. Les xanthones

Ils constituent une famille de composés polyphénoliques généralement isolés dans les plantes supérieures, elles sont à base caractéristique tricyclique, elle comprend deux cycles benzéniques aromatiques qui entourent un hétérocycle oxygéné répondant à une structure de base C6-C1-C6 (Muanda ,2010), dont sont formés par cyclisation des benzophénones résultant de l'addition d'unités bicarbonées sur l'acide benzoïque issu de l'acide cinnamique. (Hay ,2003).

### I.4. Propriétés biologiques des polyphénols

**Tableau I :** Propriétés biologiques des quelques poly phénols dans l'organisme (Muanda ,2010)

Polyphénols	Activités biologique
Acides phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes, anti-ulcéreuses, antiparasitaires antifongiques, antioxydantes,
Coumarines	Protectrices vasculaires, anti-inflammatoires, anti parasites analgésiques et anti œdémateuses
Flavonoides	Antitumorales, antiparasitaires, vasodilatatoires, antibactériennes, anticarcinogènes, anti-inflammatoires, analgésiques, hypotenseurs, antivirales, diurétiques, ostéogène, antioxydantes, anti-atherogéniques, antithrombotique, anti allergique
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydantes
Lignanes Stilbènes	Anti-inflammatoires, analgésiques pouvoir anticancéreux

## CHAPITRE II : ETUDE BOTANIQUE DE LA PLANTE LOCALE

### *CALYCOTOME VILLOSA (Poir.) Link*

#### II.1. Données bibliographique sur la plante *Calycotome villosa (Poir.) Link*

Le nom Calycotome, du grec calyx et temno qui signifient calice et je coupe, fait allusion au calice qui se rompt circulairement et paraît coupé après la floraison (**Guide illustré de la flore algérienne ,2011**).

Le genre *Calycotome* appartient à la famille des Fabacées (ex Légumineuses). Ces dernières constituent la troisième famille la plus importante du règne végétal après les Astéracées et les Orchidacées (**Quèzel et Santa ,1963**). Qui comprennent 19 500 espèces répandues dans le monde (**Guide de reconnaissance ,2016**).

##### II.1.1.Famille des Fabacées

Cette famille s'accommode d'une très large gamme d'habitats, et inclue autant des plantes herbacées, aquatiques ou xérophytes, que des arbustes, des arborescents ou des plantes grimpantes à lianes volubiles ou à vrilles (**Heywood ,1996 ; Spichiger et al ., 2004**). Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées (**Guignard et Dupont ,2005 ; Dupont et al .,2007**).

Les tiges sont recouvertes de poils dont la longueur est variable et les feuilles sont généralement alternes, composées pennées (ou bipennées) à composés palmés, trifoliolés, ou unifoliolés. Elles sont entières à parfois dentées-serrées, à nervation pennée. Les folioles sont parfois transformées en vrilles. Ces plantes sont constituées de renflements moteurs à la base de la feuille et des folioles bien développées produisant généralement des mouvements de veille et de sommeil. Les stipules sont présentes, minuscules à foliacées, parfois transformées en épines. Les fleurs sont généralement hermaphrodites, actinomorphes à zygomorphes, à hypanthium court, généralement cupuliforme. Le fruit est généralement une gousse parfois une samare, un fruit lomentacé, une gousse indéhiscence, un akène, une drupe ou une baie.

Les plantes fabacées possèdent un métabolisme azoté élevé et renferment des acides aminés non protéogéniques. Ces plantes sont souvent constituées de nodules racinaires contenant des bactéries fixatrices d'azote (*Rhizobium*) (**Spichiger et al ., 2002**).

Cette famille peut être subdivisée en 4 sous-familles principales « les Bauhinoïdées, les Faboïdées, Césalpinoidées, Mimosoïdées » (**Guide de reconnaissance ,2016**).

### II.1.2. Description de genre *Calycotome*

*Calycotome villosa* est un buisson épineux, l'extrémité des tiges étant transformées en épine, les jeunes tiges sont couvertes de poils courts donnant une teinte grisâtre. Les feuilles ont 3 folioles ovales et d'environ 1 cm de longueur. Les fleurs sont jaunes de 12 à 18 mm de long, en grappes. Au moment de la floraison la partie supérieure du calice se détache, ne laissant que la moitié inférieure. La gousse est allongée (25 à 40 mm), plus ou moins quadrangulaire, ailée et plus ou moins velue (**anonyme 1**).

### II.1.3. Caractéristique botanique

#### II.1.3.1. Classification (**anonyme 2**).

**Règne:** Plantae.

**Sous règne :** Tracheobionta ou Plantes vasculaires

**Embranchement:** Magnoliophyta

**Sous Embranchement:** Angiospermes

**Classe:** Magnoliopsida ou Dicotylédones.

**Sous classe :** Rosidae

**Ordre:** Fabales (Légumineuses)

**Famille:** Fabacées (= Papilionacées)

**Sous Famille :** Faboideae

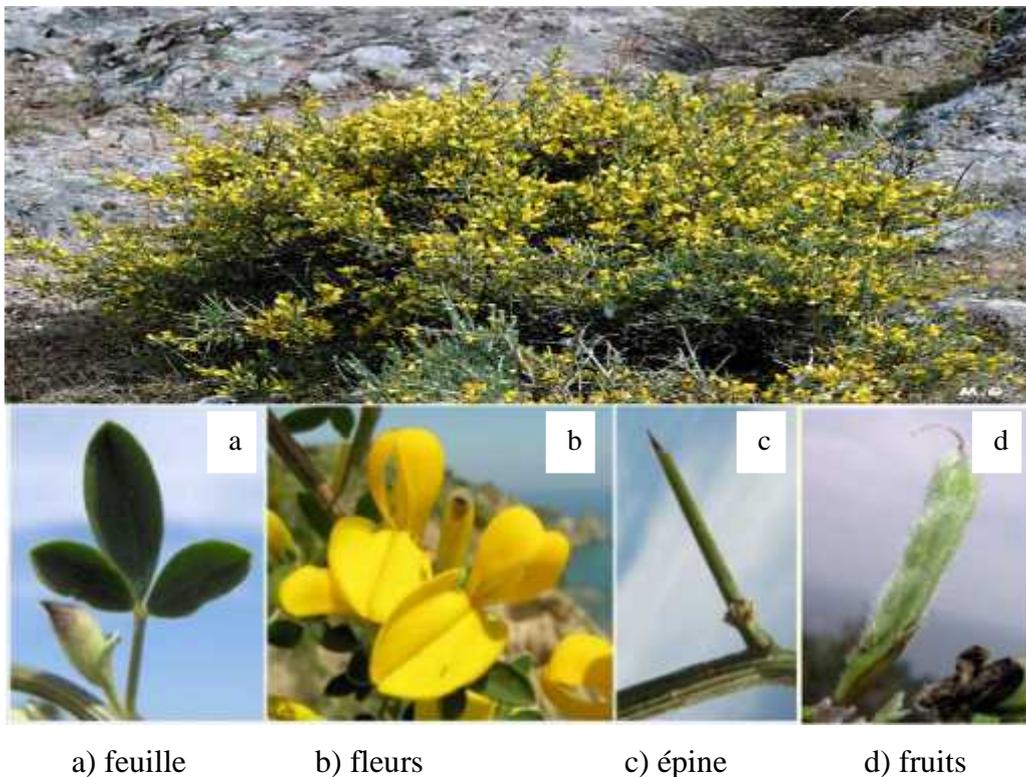
**Genre:** Calycotome

**Espèce:** villosa (Poir.) Link = Cytisus laniger DC.

### II.1.3.2. Description de la plante *Calycotome villosa* (Poir.) Link

Arbrisseau d'environ 1 mètre, dressé, à rameaux épineux, divariqués, striés-sillonnés, légèrement gris tomenteux. Les feuilles noirissant peu par la dessiccation, à folioles obovales - obtuses, velues, soyeuses en dessous. Les fleurs sont jaunes de 12 à 18mm de long nombreuses, fasciculées par 6-15 au sommet des rameaux. Pédicelles une fois plus longs que le calice, munis d'une bractée presque entière ordinairement aussi longue que large, Carène large presque obtuse. Les fruits sont généralement des gousses subquadrangulaires, de 25 à 30 mm de long sur 7 mm de large, très velue, roussâtre à la maturité, à sutures toutes ailées, la supérieure à aile large et ondulée, contenant 6 à 10 graines (**Guide de reconnaissance ,2016**) (**anonyme 3**). Au moment de la floraison la partie supérieure du calice se détache, ne laissant que la moitié inférieure (**anonyme 1**).

La Floraison de mars à juin. La pollinisation se fait à l'intermédiaire des insectes (espèce entomogame). Les graines sont transportées par les animaux (espèce zoochore). Les calicotomes sont des végétaux autotrophes par photosynthèse chlorophyllienne. L'assimilation chlorophyllienne se fait surtout par les rameaux (**anonyme 2**).



**Figure 8:** Photo de la plante *C. villosa* (Poir.) Link. *site* (**annonyme 4**).

### II.1.4. Localisation et répartition géographique

Le calycotome développe dans des endroits frais, est très répandu dans la région méditerranéenne (Aouicha et al .,2014 ) , Surtout dans le nord de l'Afrique et de l'Espagne (Aouicha et al .,2014) (Ali et al .,2004).

Ecologiquement Le Calycotome préfère les sols siliceux se trouve dans les forêts de pin maritime, dans les subéraies et le maquis qu'il contribue à rendre difficilement pénétrable (Chikhi ,2013) .

### II.1.5. Nomenclature (Hatem et Ahmed ,2014).

La plante *Calycotome villosa* (Poiret) Link connue par plusieurs noms communs :

**Nom arabe :** , ;

**Nom anglais :** spiny broom, thorny broom;

**Nom français :** *Calycotome velu*.

### II.1.6. Usage thérapeutique de *Calycotome villosa* (Poir.) Link

Les calycotomes sont des espèces végétales riches en métabolites secondaire. L'espèce *calycotome villosa* (Poir.) Link a plusieurs utilisations en médecine traditionnelle, il était considéré comme agent antitumoral, alors que dans la médecine folklorique sicilienne il était utilisé pour le traitement de furoncle, de l'abcès cutané et du chilblain. l'activité antioxydant, antimicrobienne et cytotoxique de l'extrait méthanolique et l'huile essentielle ils ont été démontré dans des études consacrée sur cette espèce (Pistelli et al ., 2003) .

Par contre en Maroc, l'espèce *calycotome villosa* (Poir.) Link n'a aucun utilisation dans la médecine traditionnelle et même en Algérie (Pistelli et al ., 2003) .

Selon El Antri et coll (2010), l'activité vasodilatatrice des flavonoïdes isolés à partir les graines de cette espèce a été démontrée. D'autres travaux ont porté sur les propriétés pharmacologiques, notamment les activités hypotensive, diurétique et vasodilatatrice d'un glucoside chrysine isolé à partir des fleurs et des feuilles de *C .villosa subsp .intermedia*. Les résultats démontrent un effet diurétique ainsi qu'une action hypotensive du glucoside chrysine sur les rats anesthésiés. Les tests montrent un effet sur la fonction rénale. (Cherkaoui et al .,2008 ) .

### **III.1. ACTIVITE ANTIBACTERIENNE**

#### **Généralités**

Les plantes possèdent un système de défense naturelle très efficace, basé sur la biodiversité de leurs métabolites secondaires. Cette diversité, des groupes structuraux et fonctionnels, permet de se protéger efficacement contre de nombreux pathogènes tels que les bactéries, les champignons et les virus. Les plantes synthétisent, de manière constitutive ou induite, une multitude de molécules antimicrobiennes (**Jones et Dangl, 2006 ; Gibbons et Coll ,2008**), d'où l'intérêt de la recherche et le développement de la phytothérapie. Justement dans cette optique, plusieurs instituts de recherches ont procédé à des investigations dans l'étude de l'activité biologique de plantes médicinales originales de diverses régions du monde. Ces travaux sont basés sur l'usage populaire des espèces natives. Certains extraits et huiles essentielles de plantes se sont montrés efficaces dans l'inhibition de la croissance d'une grande variété de souches bactériennes (**Chikhi ,2013**).

D'autre part, les risques de contamination microbienne provenant de la manipulation et la conservation des aliments sont de plus en plus fréquents. En outre, la demande croissante à des méthodes de conservation des aliments avec des produits naturels, nécessite le développement de nouvelles méthodes de conservation basées sur l'ajout d'extraits de plantes. Ces méthodes de conservation représentent un besoin vital et pourraient éventuellement être une alternative aux antimicrobiens de synthèse. Il est donc nécessaire de développer des outils aiguisés pour tester l'activité antimicrobienne des produits naturels (**Chikhi ,2013**).

#### **III.1.1. Techniques de détermination de l'activité antibactérienne**

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 ( **Chiklouné ,2007**).

### III.1.1.1 Méthode de diffusion par disques sur milieu gélosé

La méthode des disques est l'une des plus vieilles approches d'évaluation de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et demeure l'une des méthodes les plus utilisées en routine. Elle permet une variété dans le choix des antibiotiques et ne requiert aucun matériel particulier. La technique est basée sur le principe que les agents antimicrobiens, de concentration spécifique de chaque disque, diffuseront dans le milieu et inhiberont la croissance des microorganismes sensibles, résultant en une zone d'inhibition autour du disque. Cette technique utilise des disques de papier buvard imprégnés d'une concentration donnée d'antibiotique déposé à la surface d'une gélose spécifique (Mueller-Hinton) coulée en boîte de pétri uniformémentensemencée d'une suspension de la bactérie étudiée.

Le principe de la technique est relativement simple. Lorsqu'un disque imprégné d'antibiotique est placé sur une gélose préalablement inoculée avec la bactérie testée, il s'humidifie et l'antibiotique diffuse relativement dans la gélose, en formant ainsi un gradient de concentration. L'antibiotique est présent en fortes concentrations à proximité du disque et affecte des micro-organismes même faiblement sensibles. Par contre, les organismes résistants se développent jusqu'au disque. Plus, on s'écarte du disque, plus la concentration en antibiotique diminue et seul les bactéries pathogènes, les plus sensibles, sont affectées (**Harley et al., 2010**). Les diamètres des zones d'inhibition permettent d'apprécier la sensibilité des germes. La lecture des résultats est rapportée par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions en (mm). Les zones doivent être uniformément circulaires (**Richard et al., 2007**).

### III.1.1.2. Méthode des puits ou cylindre

Cette méthode est proposée par Cooper et woodman (1946), reprise par Shroder et Messing (1949). Elle 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 (**Hellal, 2011**).

### III.1.1.3. 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.

### III.1.1.4. Méthode de dilution

Grâce aux méthodes de dilution, on peut déterminer les valeurs de la CMI et de la CML (CMB). Ces méthodes peuvent être appliquées en gélose et en bouillon. La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance sera considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI). Elle est confirmée par la recherche de la CMB. La CMB est définie comme la plus faible concentration de l'antibiotique qui détruit 99,9% de la concentration cellulaire finale. La sensibilité d'une bactérie est mesurée par la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'antibiotique considéré. C'est la méthode de référence préconisée par l'OMS. La CMI d'un germe donné peut être mesurée par différents procédés (**Chikhi, 2013**).

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). Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganisme. 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**).

## I.1. MATERIEL

### I.1.1. Matériel biologique

#### I.1.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est la partie aérienne de la plante *Calycotome villosa* (Pioret.) Link. (Les feuilles, les fleurs et les tiges). Celle-là est utilisée en médecine traditionnelle locale en Algérie.

#### I.1.1.2. Matériel microbiologique

Les souches utilisées pour détecter l'activité antibactérienne et antifongique des extraits hydro-alcooliques sont mentionnées dans le tableau II.

**Tableau II** : Les souches utilisées dans le test antimicrobien.

Souches microbiennes	Gram	Référence	Origine
<i>Escherichia coli</i>	-	ATCC 25922	CHU-Mustapha
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	ATCC 25923	Hôpital -Ténia
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	+	ATCC 15305	LAMBB
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+	ATCC 12386	LAMBB
<i>Staphylococcus coagulase négative</i>	+	ATCC 4199	LAMBB
<i>Candida albicans</i>	/	ATCC 10231	CHU-Mustapha

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

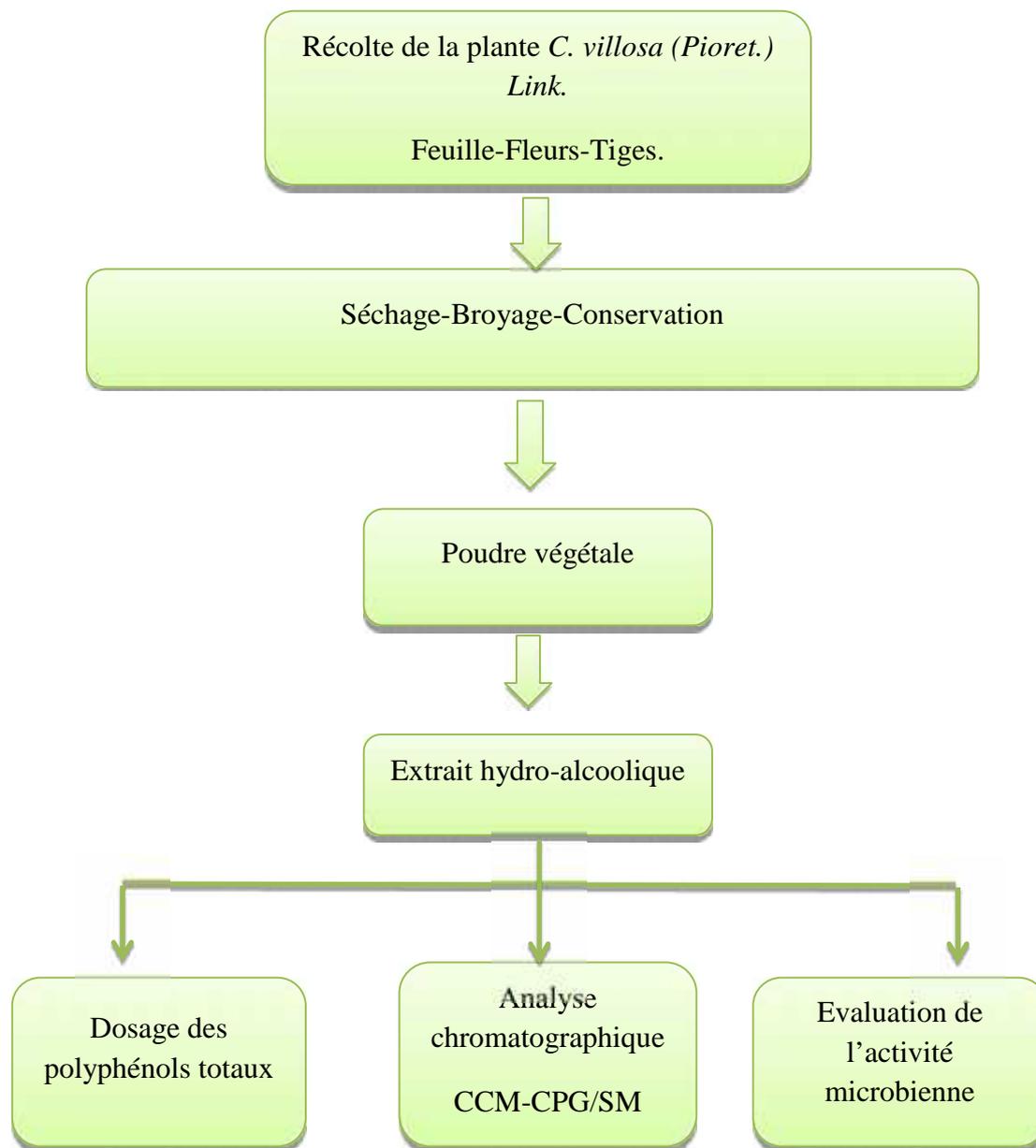
LAMBB :Laboratoire d'Analyse Médical Boudissa Boumerdes

### I.1.2. Matériel non biologique

Le matériel d'étude regroupe l'ensemble d'équipement et d'appareillages ainsi plusieurs réactifs et produits chimiques (**Annexe 2**).

## I.2.METHODES

Les différentes étapes de l'étude est représentés dans le schéma suivant :



**Figure 09** : Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'étude.

### I.2.1.Préparation de la matière végétale

#### ➤ Récolte

La plante étudiée *Calycotome villosa* a été récolté durant le mois de mars 2017 pendant le début de la période de floraison dans la station : La gare Aomar - willaya de Bouira.

Voire (figure 10).



**Figure 10** : Site de récolt de la plante *Calycotome villosa* (Pioret.) Link.(anonyme 5)

➤ **Séchage**

Le séchage de la plante *C. villosa* a été effectué dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires et de l'humidité à température ambiante pendant quelque jour (figure 13).



a. Feuilles séchées

b. Fleurs séchées

c. Tiges séchées

**Figure 11:** Les trois parties étudiées de la plante séchée (**photo originale**).

➤ **Broyage**

Les feuilles, les fleurs et les tiges sont broyées séparément en poudre à l'aide d'un broyeur puis conservée à l'abri de l'humidité jusqu'à l'utilisation.



a. Feuilles.

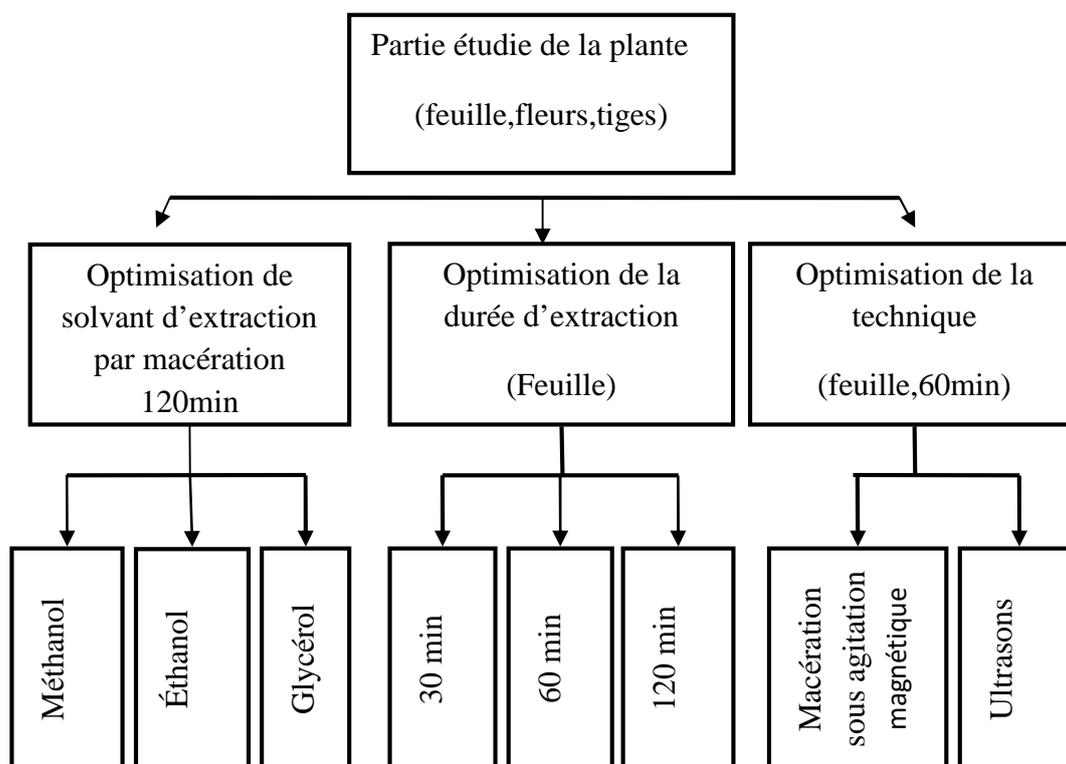
b. Fleurs.

c. Tiges.

**Figure 12:** Poudres végétales obtenus après séchages et broyage des trois parties de la plante étudiée (**photo originale**).

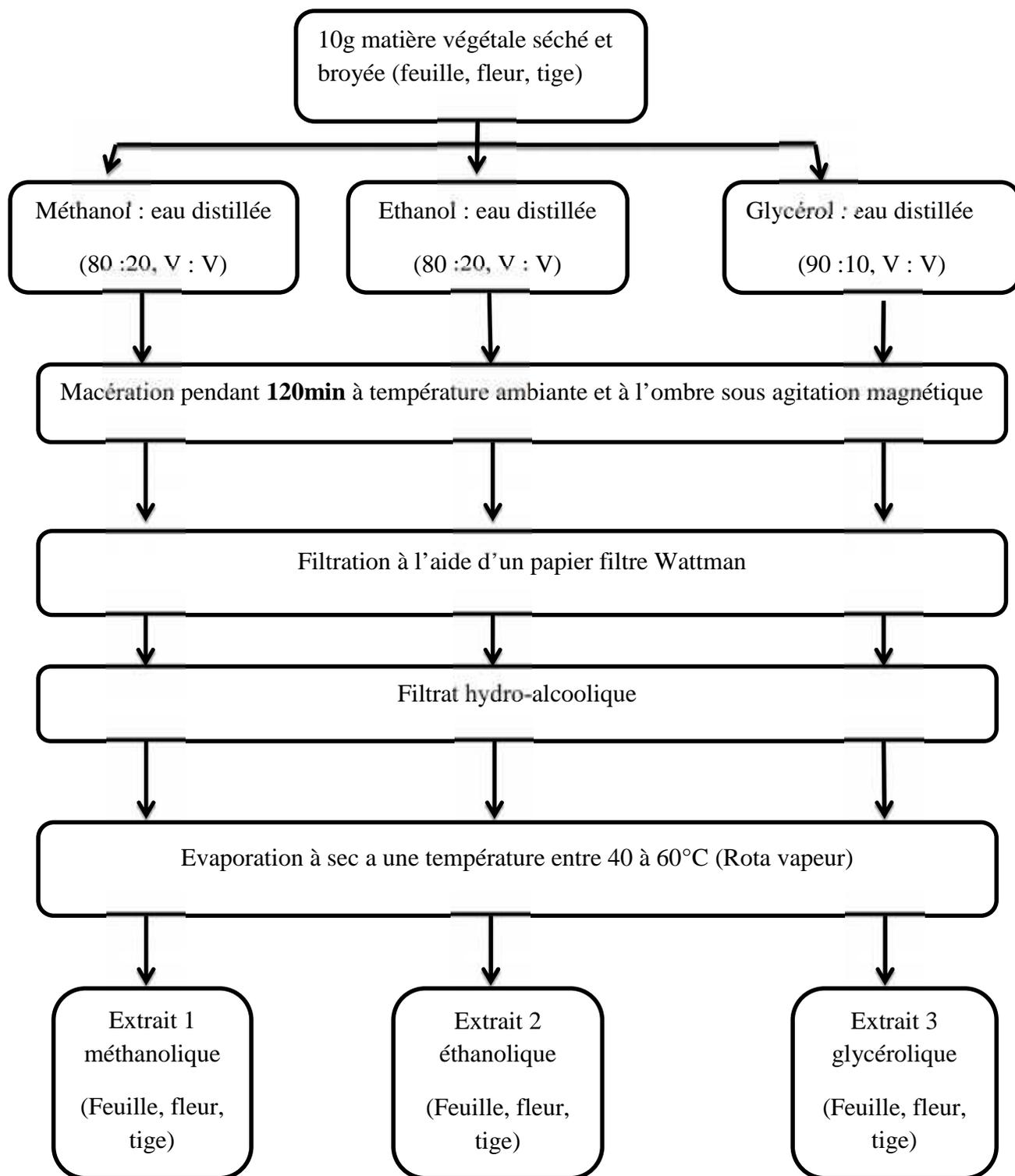
### I.2.2. Optimisation de l'extraction des polyphénols totaux

Afin de tester l'efficacité des méthodes et solvants pour extraire les polyphénols. On a utilisé trois solvants d'extraction (méthanol, éthanol et glycérol), aussi l'étude de l'influence de temps sur le rendement a été étudiée par une extraction des polyphénols pendant 30, 60 et 120 min de macération sous agitation magnétique. Finalement, deux techniques d'extraction une conventionnelle et l'autre moderne (macération et assistance par ultrasons) sont utilisées.



**Figure 13 :** Schéma récapitulatif d'optimisation d'extraction des polyphénols.

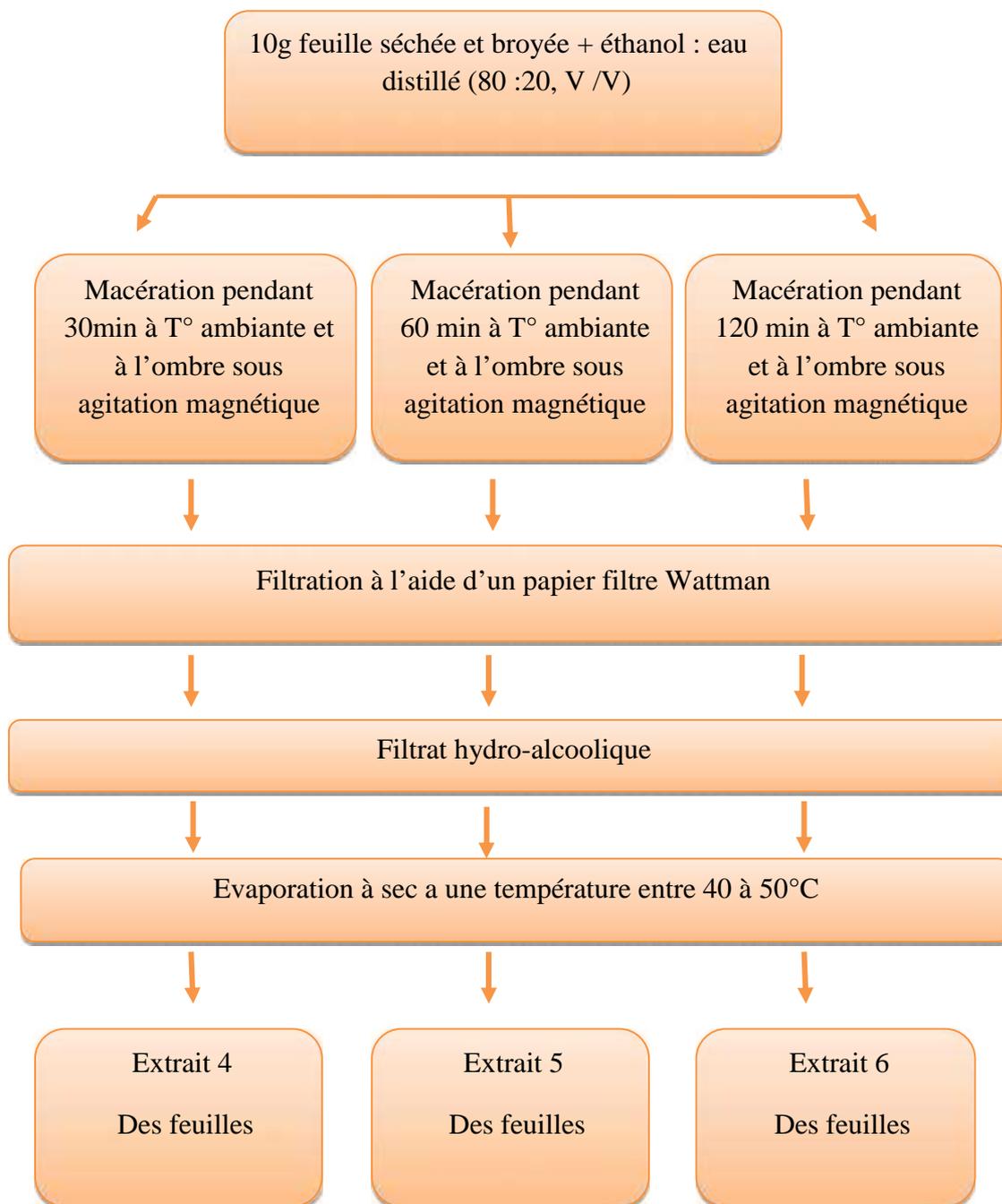
### I.2.2.1. Optimisation de l'extraction des polyphénols totaux par les solvants



**Figure 14 :** Les étapes d'optimisation du solvant d'extraction des polyphénols.

### I.2.2.2. Cinétique d'extraction des polyphénols totaux

Nous avons choisi l'éthanol comme solvant d'extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles de la plantes *C. villosa* (Pioret.) Link.



**Figure 15** : Les étapes d'optimisation de la durée d'extraction.

### I.2.2.3. Extraction par méthode conventionnelle et moderne

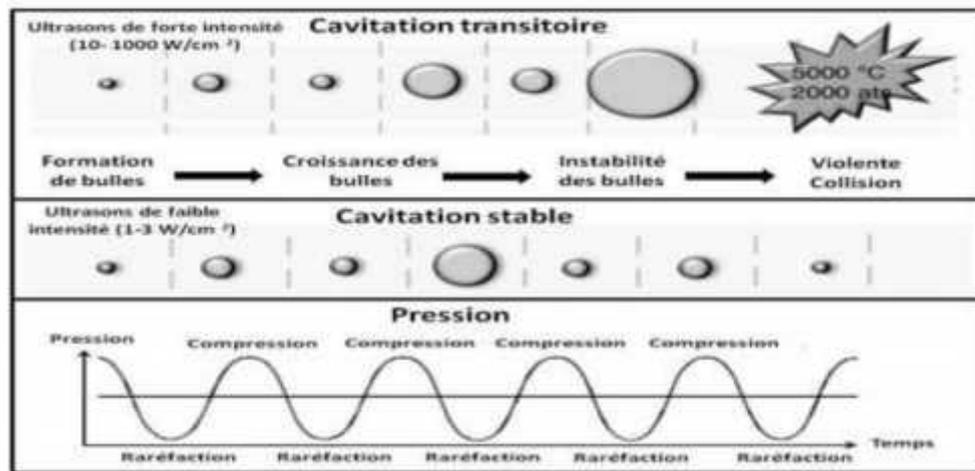
#### I.2.2.3.1. Extraction par macération sous agitation magnétique

10g de la plante séchée et broyée est mis dans l'Erlenmeyer, dans du éthanol (20 ml / 80 ml d'eau distillée, V:V). L'Erlenmeyer est fermé hermétiquement (papier parafilm et couvert par papier aluminium) et macéré pendant 30min, avec agitation magnétique. Après 60 min d'incubation, l'échantillon est filtré sous vide à l'aide d'un papier filtre Wattman et le filtrat hydroalcoolique est transvasée dans un ballon taré puis évaporé à sec à l'aide d'un rotavapeur à une température entre 40 à 60°C. Suite à cette évaporation l'extrait est pesé (on prend le poids du ballon après refroidissement) et conservé à l'abri de la lumière dans le réfrigérateur jusqu'à son utilisation.

#### I.2.2.3.2. Extraction assisté par ultrasons

##### ❖ Principe

Les ultrasons sont des ondes sonores qui génèrent des vibrations mécaniques dans un solide, un liquide ou un gaz. Elles sont principalement caractérisées par leur fréquence (15 kHz-500 MHz) (SANTOS *et al.*, 2009). À la différence des ondes électromagnétiques, les ondes sonores peuvent se propager dans une matière (BENAMOR, 2008). Dans un milieu liquide, la propagation des ondes va générer des cycles successifs de compression (haute pression) et de raréfaction (basse pression) (WANG et WELLER, 2006). Les séries de ces cycles de compressions et de raréfactions créent une pression acoustique. Au cours du cycle de basse pression, les ondes ultrasonores créent des petites bulles de cavitation dans le liquide (SUSLICK, 1998). Ces bulles vont croître pendant les phases de raréfaction et diminuer pendant les phases de compression (**Figure 20**). La répétition de ces cycles va conduire à l'implosion des bulles de cavitation, libérant ainsi une grande quantité d'énergie (PETRIER *et al.*, 2008).



**Figure 16:** Phénomène de cavitation acoustique (SANTOS et al., 2009).

Lorsque les bulles de cavitation sont formées à proximité d'une surface solide elles deviennent asymétriques, et l'implosion qui en résulte produit des jets de liquide projetés à très grande vitesse vers la surface du solide, ainsi qu'une augmentation locale de la température et de la pression. Dans le cas d'une matrice végétale, ces jets de liquides vont percer les parois végétales et permettre ainsi la libération des molécules dans le milieu liquide (WANG et WELLER, 2006).

#### ❖ Mode opératoire

10g de poudre végétale des feuilles mélangé avec 80 ml d'éthanol et 20 ml de l'eau distillée puis on les met dans un bain à ultrasons pendant 60 min. Après la filtration, on met notre extrait dans un évaporateur rotatif à une température entre 40 et 50 °C, afin d'obtenir l'extrait brut sec.



**Figure 17 :** Extraction assisté par ultrasons des feuilles. (Photo originale).

#### I.2.2.4. Calcule de rendement des extraits polyphénols totaux

Le rendement d'extraction est calculé en pourcentage du rapport de la masse d'extrait après évaporation du solvant sur la masse total de la matière végétal en poudre utilisée dans l'extraction.

$$\mathbf{R\% = [(m-m_0)/m_T].100}$$

**R%** : rendement d'extrait en pourcentage ;

**m** : masse de ballon après évaporation ;

**m<sub>0</sub>** : masse de ballon vide ;

**m<sub>T</sub>** : masse totale utilisée dans l'extraction (la poudre végétal).

### **I.2.3.Caractérisation biochimique**

#### **I.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT)**

Les composés phénoliques sont estimés par la méthode de Folin ciocalteu (ADESEGUN et al., 2010). Cette méthode est utilisée pour déterminer la teneur en polyphénols des plantes médicinales et des aliments (ABDEL-HAMEED, 2009).

##### **❖ Principe**

Ce dosage repose sur le réactif de Folin Ciocalteu qui est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés (BOIZOT ET CHARPENTIER, 2006).

##### **❖ Mode opératoire**

Une courbe d'étalonnage a été obtenue à partir de solution d'acide gallique de différentes concentrations préparées d'une solution mère de 1mg d'acide gallique/ml de méthanol. 5ml de réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué dans l'eau) a été additionné dans chaque tube. Après 2 minutes, on ajoute 4 ml de carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 20% (m/v). Les solutions sont maintenues à l'obscurité pendant 15 min à température ambiante. Les concentrations sont déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc qui contient de l'méthanol à la place de l'acide gallique.

Les concentrations des polyphénols sont déduites à partir de la courbe d'étalonnage établies avec l'acide gallique et sont exprimées en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de la matière sèche (mg EAG/g). Tous les essais sont reproduits au moins trois fois.

### **I.2.3.2. Analyse chromatographique**

La chromatographie est une technique d'analyse qualitative et quantitative de la chimie analytique dans laquelle l'échantillon contenant un ou plusieurs composés est adsorbé sur une phase stationnaire (papier, gélatine, silice, polymère, silice greffée), puis est désorbé par une phase mobile (liquide, gaz ou fluide supercritique). Les différents composés de l'échantillon sont séparés en fonction de leurs vitesses d'adsorption -désorption (**Muanda ,2010**).

#### **I.2.3.2.1. Analyse qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM)**

##### **❖ Principe**

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

la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant (**Kanoun ,2011**).

##### **❖ Mode opératoire**

Les analyses sont effectuées sur des plaques commercial prêtes à être utiliser, en gel de silice de type G60 fixé sur une plaque en verre avec dimension 10 x 10cm.

Plusieurs systèmes solvants (phase mobile) ont été essayés dans cette identification sur des minis CCM et qui sont représenté dans le tableau III.

**Tableau III** : Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM de gel de silice.

CCM sur gel de silice		
	Système solvants	Proportions
<b>Systèmes essayés</b>	<b>S1</b> : Acétat d'Ethyle /Acide formique /acide acétique glaciale /eau distillée	(100 :11 :11 :27) (v /v)
	<b>S2</b> : Acétat d'ethyle /méthanol /eau distillé	(100 :13,5 :10) (v /v)
	<b>S3</b> : Butanol /acide acétique / eau distillée	(4 :1 :5) (v /v)
	<b>S4</b> : Chloroforme / méthanol /eau distillé	(1 :1 :0,5) (v /v)
<b>Système choisi</b>	<b>S2</b> : Acétat d'ethyle /méthanol /eau distillé	(100 :13,5 :10) (v /v)

Les échantillons a séparées sont premièrement solubilisé dans une petite quantité de méthanol puis sont déposées sur la plaque à l'aide d'une pipette pasteur d'une façon perpendiculaire et linéaire sous forme de traits.

La plaque est placer dans la cuve dont l'atmosphère est saturé préalablement pendant 2 heures par l'éluant choisi, fermer et laisser l'éluant diffuser. Arrêter la CCM lorsque le front d'éluant est arrivé à 1 cm du haut de la plaque. Sortir la plaque et tracer au crayon le front de l'éluant. Sécher la plaque au pistolet ou à la chaleur d'une plaque chauffante.

Dans notre étude la révélation de la plaque est effectuée par l'ammoniaque et sous la lampe UV à 265 nm.

### I.2.3.2.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG / SM)

#### ❖ Principe

La Chromatographie en Phase Gazeuse permet de séparer les molécules d'un mélange. Cette technique s'applique aux composés susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Le mélange de solutés à analyser est vaporisé à l'intérieur d'une colonne par un injecteur qui est porté à une température appropriée à la volatilité de l'échantillon. Le mélange est transporté à l'intérieur de la colonne grâce à un gaz vecteur. Dans cette colonne, une substance active appelé phase stationnaire qui peut être liquide ou solide est présente. Le gaz porteur est inerte vis-à-vis des solutés et de la phase stationnaire. Les différentes molécules vont se séparer en fonction de leurs vitesses d'adsorption et de désorption puis sortir de la colonne les unes après les autres, ce temps de rétention dépendant de leur affinité avec la phase stationnaire. A la sortie de la colonne, un détecteur qui dans notre cas est un spectromètre de masse caractérise et quantifie chacun des constituants (Bouchonnet et Libong, 2004).

La spectrométrie de masse (SM) consiste dans une première étape à produire en phase en phase gazeuse des ions des substances à analyser (échantillons vaporiser) par différentes méthodes (par exemple, par impact électrique). Cet ion moléculaire va se fragmenté (de hoffman et stroobant ,2005)

La SM utilise le mouvement des ions ainsi obtenus dans les champs électriques et magnétique afin de les classer et séparer en fonction de leur rapport masse /charge ( $m/z$ ) le principe que les ions en mouvement peuvent être déviés par des champs électriques et magnétiques, puis détectés en proportion de leur nombre (**Belkebir et Toubal , 2015**).

### **I.2.3.3. Activité biologique**

#### **I.2.4.1. L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits polyphénoliques totaux**

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

##### **1- méthode de diffusion des disques sur milieu solide (Annexe 2)**

###### **A. Préparation de l'inoculum et ensemencement**

- A partir d'une culture pure de 24h sur milieu d'isolement gélose nutritif (GN) pour les bactéries à étudier et la gélose sabouraud pour la levure, nous avons raclé à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Nous avons déchargé l'anse dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9% dans un tube.
- La suspension bien homogénéisée est réglée à une opacité à un D.O de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm pour la bactérie (presque  $10^8$  bactérie par 1 ml) et 530 nm pour la levure.
- Une dilution de l'ordre de 1/100 est effectuée afin d'avoir une suspension de  $10^6$  bactérie par ml.
- Dans la suspension préparée, nous avons trempé un écouvillon stérile et bien essoré sur les parois du tube à suspension ;
- L'écouvillon chargé est frotté sur la totalité de la surface du milieu de culture préparée préalablement avec la gélose de Mueller-Hinton dans des boîtes de Pétri pour les bactéries et Sabouraud pour la levure.
- Nous avons laissé les boîtes sécher, l'opération est répétée trois fois. (Soussy, 2012)

## B. Préparation des disques et incubation

- Les extraits des polyphénols totaux est préparé dans le méthanol à raison d'obtenir une concentration de 100 mg/ml par disque ( $\emptyset = 6\text{mm}$ );
- Les disques imprégnés stérilisés avec l'extrait sont séchés près du bec bunsen.
- Dans les boites déjàensemencés, nous avons déposé aseptiquement les disques imprégnés avec les trois solvants méthanol, éthanol et glycérol et un autre témoin contient du méthanol.
- Après avoir mis les boites dans le réfrigérateur pendant 2 heures afin de laisser l'extrait diffuser, nous les avons placés dans l'incubateur à une température de 37°C pendant 24h dans le cas de bactéries et 30°C pendant 48h pour la levure.

## C. Lecture de l'antibiogramme

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques.

Selon **Moreira et al., 2005**, l'activité antimicrobienne est exprimée en zones d'inhibition comme suit :

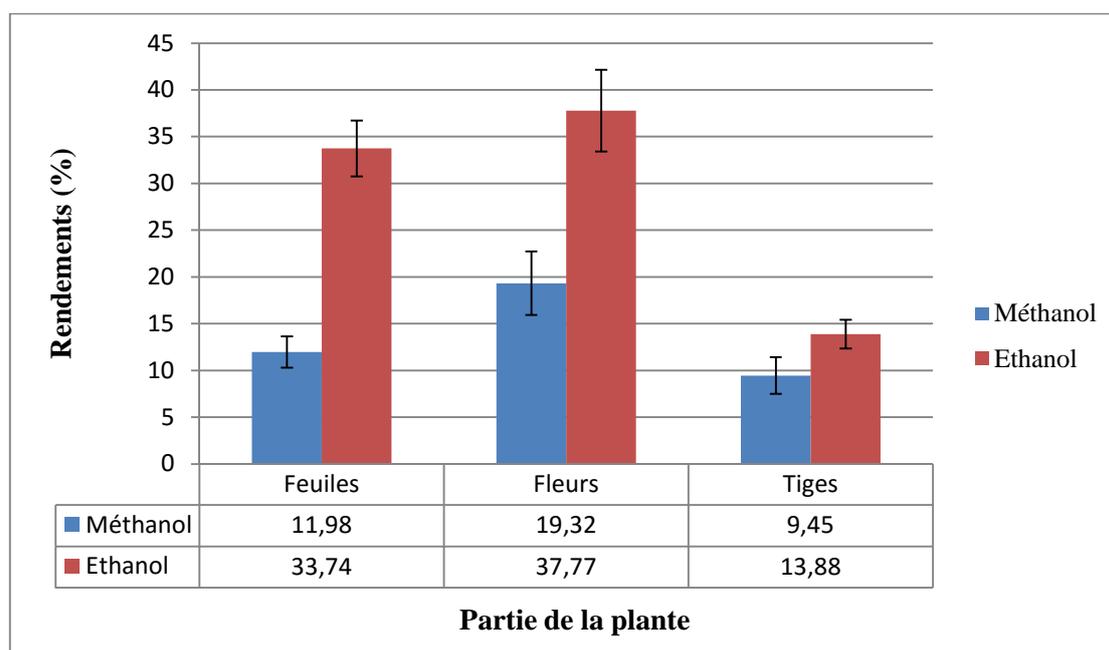
- Diamètres inférieurs à 7 mm : non sensible /résistante (-)
- Diamètres de 7 à 14 mm : Sensible (+).
- Diamètres de 15 à 19 mm : très sensible (+ +).
- Diamètres supérieurs à 20 mm : extrêmement sensible (+ + +).

## II. Résultats

### II.1. Rendement d'extractions des PPT

#### II.1.1. Rendements des extractions par macération dans les différents solvants

Les rendements d'extraction des PPT ont été calculés par rapport au poids total de la poudre végétal et présentés dans **la figure 18**.



**Figure 18** : Rendements en extraits PPT obtenus à partir des trois parties de la plante dans le méthanol et l'éthanol.

Les rendements des PPT observés après une extraction par macération de la poudre de la plante *C. villosa* sont dépendent à la fois de l'organe de la plante et aussi du solvant d'extraction. L'histogramme illustré par **la figure 18** montre que quel que soit l'organe utilisé, le rendement d'extraction obtenu avec l'éthanol est toujours plus élevé ; l'éthanol s'avère être un très bon solvant pour avoir un extrait en PPT. Cependant, les rendements les plus importants sont enregistrés dans les feuilles et fleurs avec **33,74 % et 37,77 %** respectivement.

Plusieurs littératures citent que l'éthanol est le meilleur solvant extracteur des polyphénols que le méthanol. **Joki et al, 2010** ont montrés que l'éthanol et l'eau sont

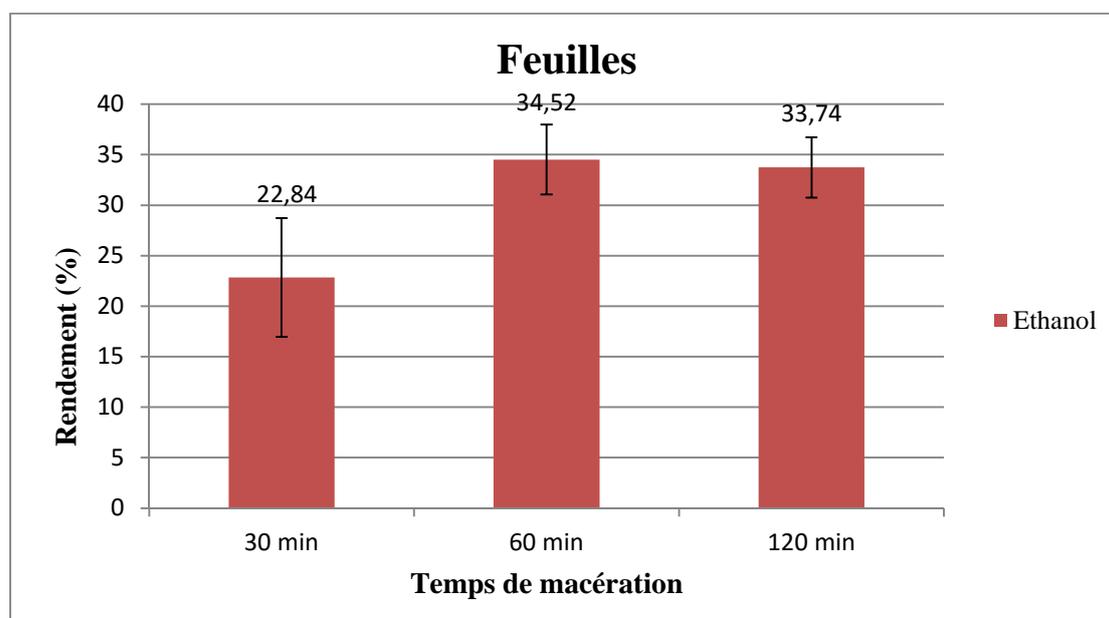
préférables car ils ont l'avantage d'être non polluants, moins chers et non toxiques par rapport à d'autres solvants comme le méthanol.

Concernant le glycérol, on n'a pas pu avoir le poids sec de l'extrait de PPT, donc on a opté pour le dosage pour faire la comparaison entre les rendements issus par la macération dans différents solvants.

### II.1.2. Optimisation du temps de macération

Vu que l'éthanol et la partie des feuilles ont le meilleur rendement en conséquence, on va les utiliser afin d'étudier l'influence du temps sur le taux des PPT.

Les rendements d'extractions des composés phénoliques obtenus par différents temps de macération sont reportés dans **la figure 19**.



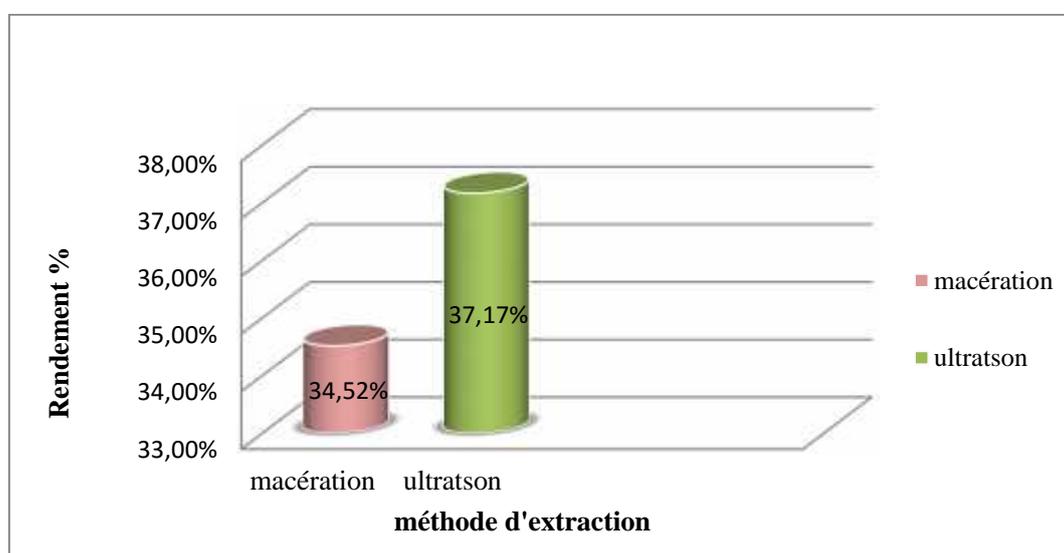
**Figure 19:** Rendements en extraits de PPT obtenus après une macération de 30, 60 et 120min.

Ces résultats nous constatons que la macération pendant 60 min donne un taux élevé d'extraits de PPT (**34,52 %**) par rapport aux 30min (**22,84 %**) et 120 min (**33,74 %**).

Selon **Rhazi et al., 2015**, la progression de temps d'extraction peut diminuer le rendement de l'extrait et cela peut être dû à la dégradation de certaines substances naturelles comme les polyphénols.

### II.1.3. Rendement d'extraction des PPT par une technique conventionnelle et moderne

Le rendement est calculé par rapport au poids de la matière sèche de *C. villosa*. L'extraction par macération représente (EAM) **34,52 %** Suivie par ultrasons (EAU) qui a donné un rendement de **37,17 %** (**figure 20**).



**Figure 20** : Rendements des extraits éthanoliques des feuilles par deux méthodes.

La différence de rendement entre les deux extraits éthanoliques des feuilles est due aux techniques d'extraction utilisées, qui sont totalement différentes, et à la composition chimique qui diffère d'un extrait à l'autre. Puisque l'effet mécanique des ultrasons sur la matière végétale induit une meilleure pénétration du solvant dans les cellules, ce qui améliore ainsi le transfert de masse et augmente le rendement d'extraction et la cinétique d'extraction (**MARSTON, 2011**). Donc L'ultrasons de puissance sont maintenant bien connus pour avoir des effets significatifs sur la cinétique de certaines réactions chimiques ou encore sur la réduction du temps des procédés industriels.

Conformément à nos résultats, **Sanae et al., (2014)** ont montré chez *Thymus hyemalis* que l'extraction assistée par ultrasons présente un meilleur taux par rapport à l'extraction par macération.

Les composés phénoliques peuvent être isolés facilement à partir d'un tissu végétal par extraction avec des solvants organiques (**Vermerris et Nicholson, 2006**). Mais la procédure de l'extraction est influencée par plusieurs paramètres tels que : la nature chimique de ces composés, la méthode d'extraction utilisée, la dimension des particules d'échantillon et le temps d'extraction (**Nazck et Shahidi, 2004**). Une autre difficulté doit être prise en considération qui est la susceptibilité des polyphénols à l'oxydation (**Dru y ska et al, 2007**). Chaque matériel végétal a ses propriétés uniques en termes d'extraction de ces composés.

## II.2. Caractères organoleptiques des extraits polyphénoliques obtenus par macération

Le tableau IV montre l'aspect et la couleur de chaque extrait obtenus par macération sous 120 min d'agitation. Les résultats montrent que les extraits méthanolique et éthanolique ont le même aspect visqueux. D'un part, d'autre part la couleur des extraits se diffère d'une partie à un autre et d'un solvant à un autre.

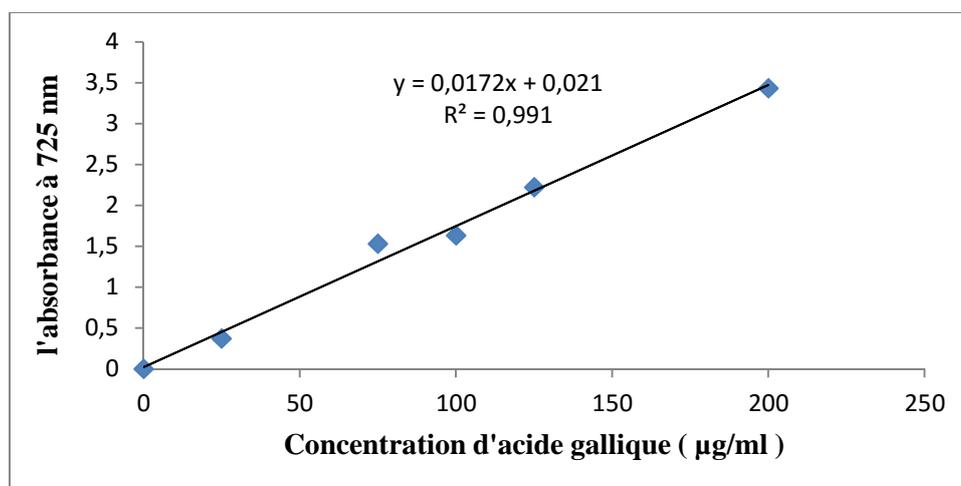
**Tableau IV:** Caractères organoleptiques des extraits obtenus par macération de la plante *C. villosa*.

Extrait Partie étudiée	Aspect			Couleur		
	Méthanol	Ethanol	Glycérol	Méthanol	Ethanol	Glycérol
<b>Feuille</b>	visqueux	visqueux	/	Verdâtre	Vert foncé	Brun
<b>Fleurs</b>	visqueux	visqueux	/	Jaune marron	Jaune marron	Brune
<b>tige</b>	visqueux	visqueux	/	Verdâtre	Vert foncé	Brun foncé

## II.3. Analyse biochimique

### II.3.1. Dosage des polyphénols totaux

Les différents extraits PPT obtenus par macération dans différents solvants, les différents durées de macération ainsi par extraction assisté par ultrasons issu d'un même organe, ont été analysés par spectrophotométrie UV-visible afin de en quantifier les polyphénols. Les résultats sont exprimés de terme d'équivalents acide gallique à l'aide d'une courbe étalonnage (**figure 21**).



**Figure 21 :** Courbe étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

En se basant sur les valeurs d'absorbance des divers solutions d'extraits, ayant réagi avec le réactif de folin-ciocalteau et comparées aux solutions étalon en équivalence d'acide gallique, les résultats d'analyse colorimétrique des composés phénolique sont résumés dans **le tableau V**



**Figure 22:** Résultats colorimétrique de dosage des extraits polyphénoliques totaux par folin -ciocalteau. (Photo originale).

**Tableau V** : Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/g) des différents extraits des feuilles.

Extraits des feuilles	Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/g d'extrait)
Extrait méthanolique des PPT 120 min	16,831± 2,918
Extrait éthanolique des PPT 120 min	32,616± 3,617
Extrait de glycérique des PPT 120 min	11,395± 0,657
Macération 60min (dans l'éthanol)	42,2085± 20,226
Macération 30min (dans l'éthanol)	51,482± 8,017
Ultrason 60min (dans l'éthanol)	33,4005± 6,865

Les résultats montrent que la grande différenciation en teneurs des polyphénols est entre les différents solvants d'extraction de la même partie de la plante étudiée pendant 120min de macération. L'extrait éthanolique possède la teneur la plus élevée, avec 32,616± 3,617 mg EAG/g. Concernant la cinétique d'extraction 30, 60 et 120 min; les résultats montrent la richesse en polyphénols pour l'extrait qui a subi une macération durant 30 min que celle de 60 et 120 min avec des valeurs de 51,482± 8,017 mg EAG/g, 42,2085± 20,226 mg EAG/g et 32,616± 3,617 mg EAG/g respectivement.

Les composés phénoliques sont généralement plus solubles dans le solvant polaire ce qu'est confirmé par l'étude d'*Aouicha et al., 2017*, sur les graines et les gousses de la plante *Calycotome villosa*. Ceux-là ont montré que les teneurs en polyphénols des extraits méthanoliques sont les plus élevés par rapport aux extraits d'acétate d'éthyl.

**AL JABRI, (2013)** et **HENEIDAK et al., (2006)** ont montré que les polyphénols obtenus par ultrasons sont plus ou moins faible par rapport à ceux obtenus par macération conventionnelle, ce qui est trouvé dans nos résultats (42,20 mg EAG/g pour la macération et 33,40 mg EAG/g pour ultrason). Ceci est peut être du à l'effet des ondes ultrasonores qui ont la capacité de couper les liaisons moléculaire des substances **Veillet et al., 2009**.

En effet, la teneur polyphénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (le climat, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (PODSEDEK, 2007). En plus la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux (LEE et al., 2003).

## II.3.2. Analyse chromatographique

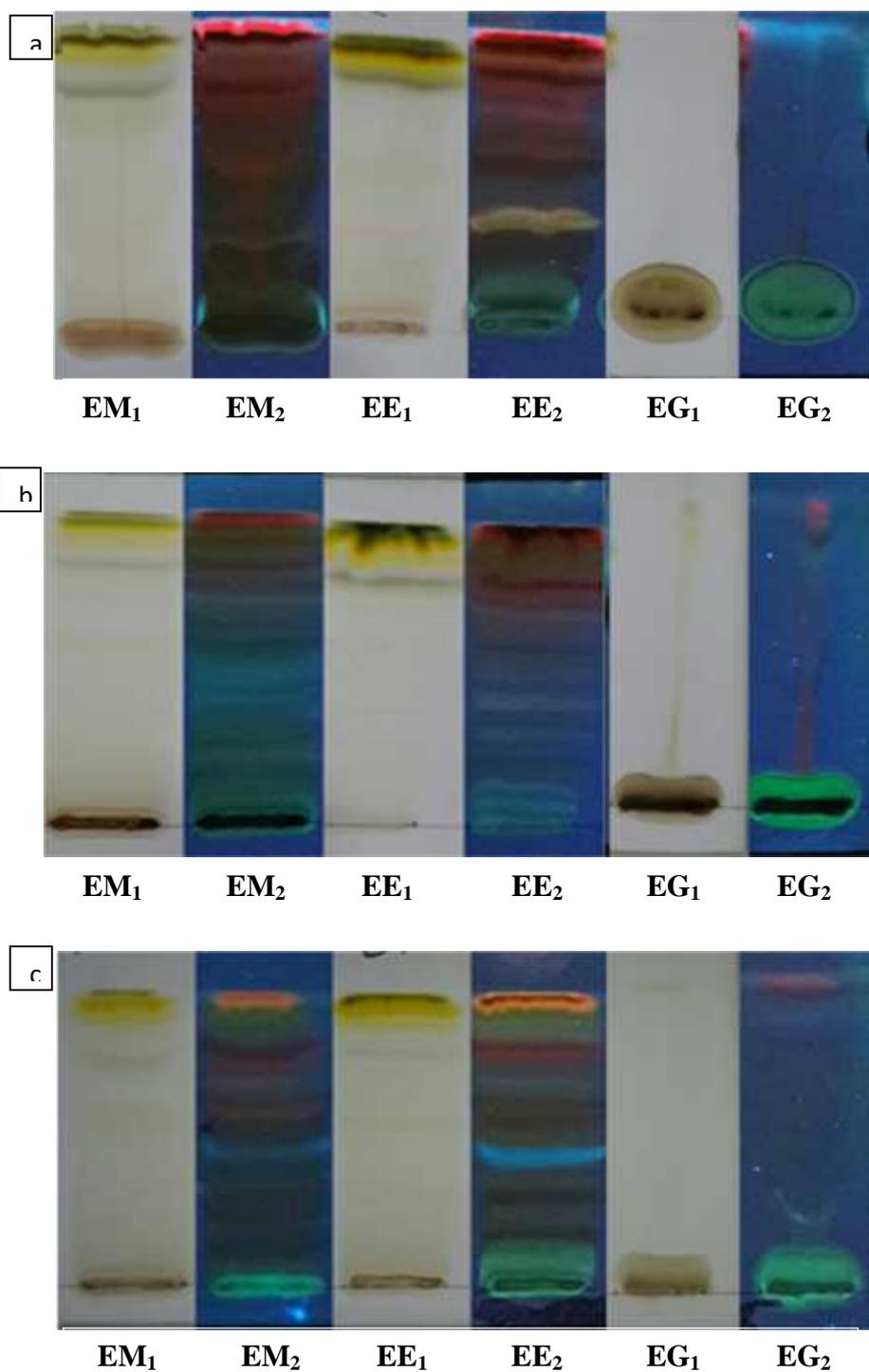
### II.3.2.1. Analyse qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM)

Pour une caractérisation partielle des différents extraits du *C. villosa*, une analyse par chromatographie sur couche mince a été réalisée.

Le choix du meilleur système solvant de séparation des composants polyphénoliques des extraits étudiés est obtenu à partir des tests préliminaires par les différents systèmes solvants cités à la partie matériel et méthodes. Les résultats sont montrés dans l'annexe 03.

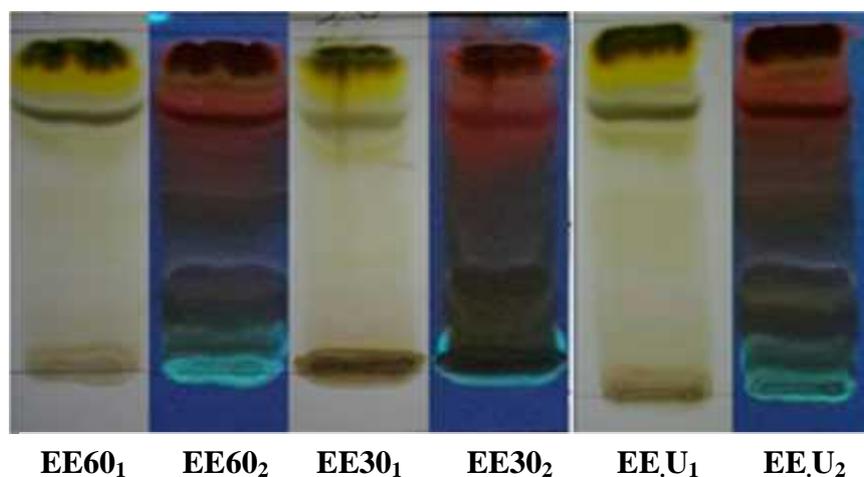
Le système solvants Acétate d'éthyle/méthanol/eau distillée (100 :13,5 :10) présente une bonne séparation des composants de nos extraits polyphénoliques totaux et révèle la présence de nombreux taches fluorescentes observées sous la lampe UV à une longueur d'onde 365nm.

Les figures 23 et 24 et .représentent les différents chromatogramme des extraits des parties aériennes de la plante sur les plaques de la CCM .



**Figure 23** : Chromatogrammes des extraits PPT des feuilles (a) ; fleurs (b) et tiges (c) de *C. villosa*.

$EM_1$  : extrait méthanolique réveillé par ammoniacque,  $EM_2$  : extrait méthanolique sous UV365nm  $EE_1$  : extrait éthanolique réveillé par ammoniacque,  $EE_2$  : extrait éthanolique sous UV365nm,  $EG_1$  : extrait glycérique réveillé par ammoniacque,  $EG_2$  : extrait glycérique sous UV365nm.



**Figure 24** : Chromatogramme des extraits éthanoliques des feuilles obtenus par macération (60,30 min) et ultrason de *C. villosa*.

**EE60<sub>1</sub>** : extrait éthanolique macération 60min réveille avec l'ammoniaque ; **EE60<sub>2</sub>** : sous UV 365 nm ; **EE30<sub>1</sub>** : extrait éthanolique macération 30min réveille avec l'ammoniaque ; **EE30<sub>2</sub>** : sous UV 365nm ; **EE U<sub>1</sub>** : extrait éthanolique par ultrasons réveillé avec l'ammoniaque ; **EE U<sub>2</sub>** : sous UV 365nm.

Les tableaux VI à IX représentent les différentes valeurs des rapports frontaux ( $R_f$ ) et les couleurs qui caractérisent les composés séparés à partir des feuilles, fleurs et tiges de *C. villosa*.

**Tableau VI** : Résultats de CCM des extraits PPT méthanolique, éthanolique et glycérique des feuilles de *C. villosa*.

Les extraits PPT des feuilles						
$R_f$ \ E	EM	Couleur des taches sous UV 365nm	EE	Couleur des taches sous UV 365nm	EG	Couleur des taches sous UV 365nm
	0,15	Bleu	0,06	Marron		
	0,28	Bleu	0,12	Bleu *	0	
	0,5	Marron	0,22	Marron		

	0,68	marron	0,31	Jaune *		
	0,72	rose	0,5	-		
	0,77	rouge	0,62	Marron		
	0,86	rose	0,75	Rose		
	0,92	rouge	0,78	Rose		
	0,95	rose *	0,81	Rouge		
			0,87	Orange		
			0,91	Rose*		
Nombre des taches	9		11		1	

(\*) : fluorescent.

**Tableau VII** : Résultats de CCM des extraits des PPT méthanolique, ethanolique et glycérique des fleurs de *C. villosa*.

Les extraits PPT des fleurs						
E R <sub>f</sub>	EM	Couleurs des taches sous UV 365nm	EE	Couleurs des taches sous UV 365nm	EG	Couleurs des taches sous UV 365nm
	0,17	-	0,18	-	0,85	Bleu*
	0,22	-	0,27	Violet	0,9	Mauve
	0,31	Violet claire	0,32	-	0,93	violet
	0,43	Bleu*	0,43	Bleu *		
	0,56	-	0,53	-		
	0,6	Orange	0,57	Orange		
	0,67	Violet	0,68	Bleu		
	0,72	Rouge*	0,75	Rouge*		
	0,78	Mauve	0,78	Mauve		
	0,85	Bleu *	0,81	Violet		
	0,87	Vert foncé	0,91	Vert foncé		
	0,95	Orange	0,93	Orange		
	0,97	Rouge	0,97	Rouge		
Nombre des taches	13		13		3	

**Tableau VIII** : Résultats de CCM des extraits des PPT méthanolique, éthanolique et glycérique des tiges de *C. villosa*.

Les extraits des PPT des tiges						
E R <sub>f</sub>	EM	Couleur des taches sous UV 365nm	EE	Couleur des taches sous UV 365nm	EG	Couleur des taches sous UV 365nm
	0,12		0,12	Bleu	0,78	Vert
	0,32	-	0,31	Blanc	0,81	Brun
	0,4	-	<b>0,35</b>	-	0,87	Brun
	0,56	Bleu*	0,43	Blanc		
	0,72	Brun	0,56	Brun		
	0,8	Blanc	0,68	Rose		
	0,82	Rouge *	0,75	Rouge*		
	0,85	Brun	0,78	Brun		
	0,92	Rouge *	0,81	Rouge*		
	0,95	Vert pistache	0,87	Vert *		
	0,97	Rouge*				
		Orange				
Nombre des taches	11		10		3	

**Tableau IX** : Résultats de CCM des extraits éthanolique des PPT des feuilles obtenus par macération (60 et 30 min) et ultrason de *C. villosa*.

Les extraits éthanolique des PPT des feuilles				
E R <sub>f</sub>	60 min	30 min	ultrason	Couleur des taches sous UV365 nm
	0,18	0,17	0,18	-
	0,27	-	0,27	Jaune
	0,33	0,33	0,33	Blanc
	0,53	0,53	0,53	Rose
	0,66	0,66	0,66	-
	0,72	0,72	0,72	Orange
	0,77	0,77	0,77	Brune
	0,83	0,83	0,83	Orange

	0,87	0,87	0,87	Jaune
Nombre des taches	9	8	9	

Les chromatogrammes ci-dessus montrent que le système solvant a permis de séparer les composants des feuilles, fleurs et tiges pour les extraits méthanoliques et éthanoliques par contre aucune séparation pour les extraits glycériques.

Les résultats de l'analyse chromatographique ont permis de mettre en évidence la présence des différents composés polyphénoliques. Une vue d'ensemble des résultats des CCM permet de constater que ces extraits présentent des spots après révélation au réactif d'ammoniac et visualisation sous UV365 nm, plusieurs couleurs sont présentes dans les chromatogrammes ; parmi eux les couleurs bleu clair (fluorescents), Jaune terne, Jaune, fluorescence orangée, brun noir et noir qui sont des spots caractéristiques des flavonoïdes (**Lahouel, 2005**).

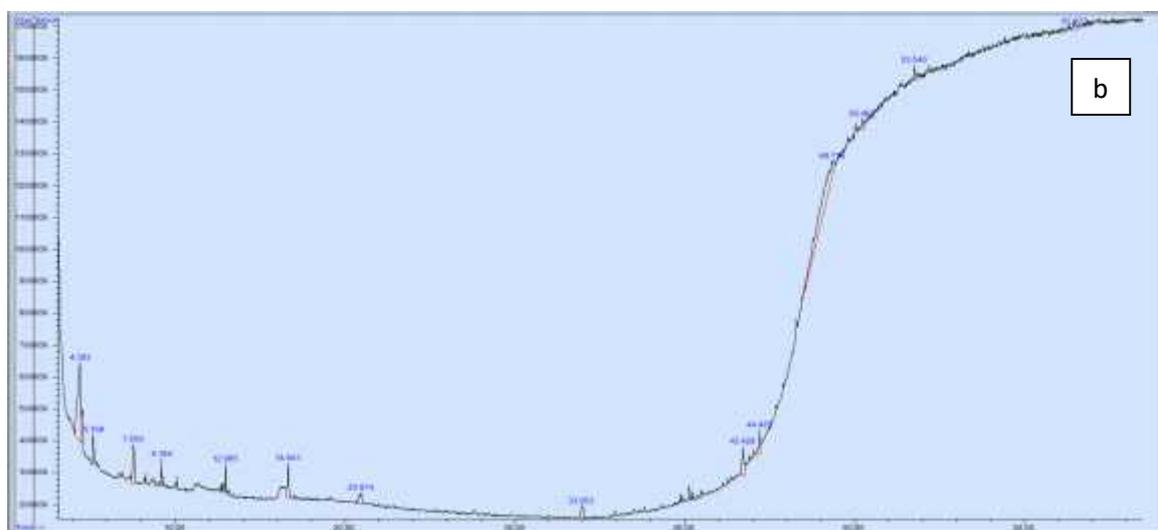
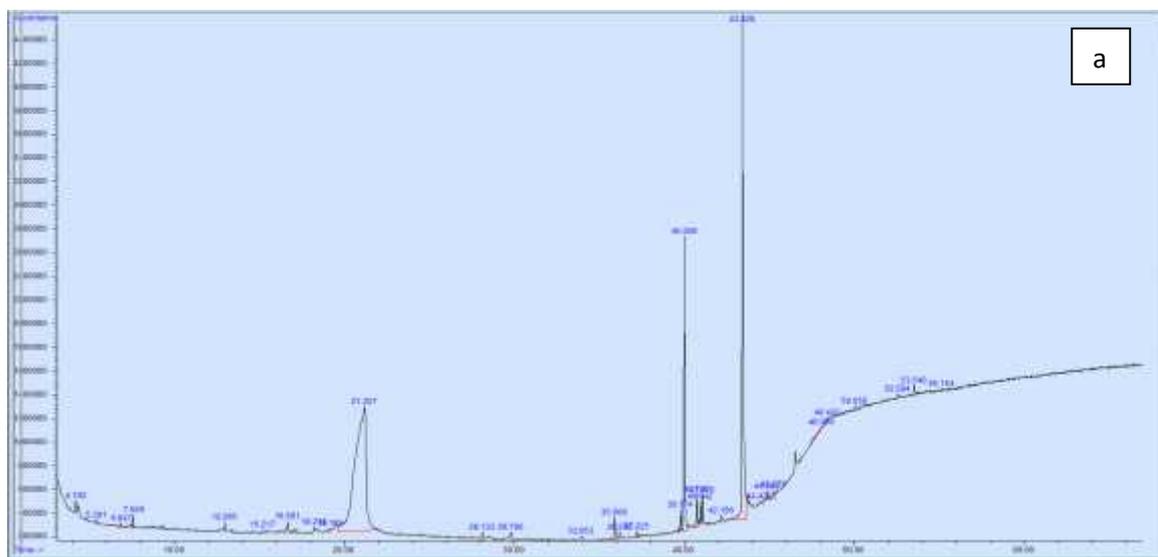
Les profils chromatographiques des extraits méthanoliques et éthanoliques de différentes parties aériennes de la plante étudiée montrent une similarité avec quelques points de différence, dont les profils chromatographiques des extraits éthanoliques montrent des bandes plus épaisses, plus fluorescentes et plus déterminées.

Mieux encore, tous les extraits éthanoliques contiennent plus de composés que les autres extraits si on se base sur le nombre des taches obtenues ; dont l'extrait des fleurs montre un nombre plus élevé de taches (13) par rapport aux deux autres extraits des feuilles (11) et des tiges (10). Et si on se base sur les colorations des spots obtenus on note que les extraits éthanoliques contiennent plus de flavonoïdes.

Les extraits éthanoliques des feuilles (macération et ultrasons) semblent avoir des composés en commun avec des profils similaires, mais avec des concentrations différentes selon l'intensité des taches obtenues. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par (**Tlili mohammed, 2015**) qui a étudié la plante *Pergularia tomentosa* ou il a trouvé que les extraits obtenus par les deux méthodes d'extraction (macération et ultrasons) donnent des profils chromatographiques plus ou moins analogues.

### II.3.2.2. Analyse qualitative GC/MS des extraits éthanoliques des parties aériennes de la plante *C. villosa*

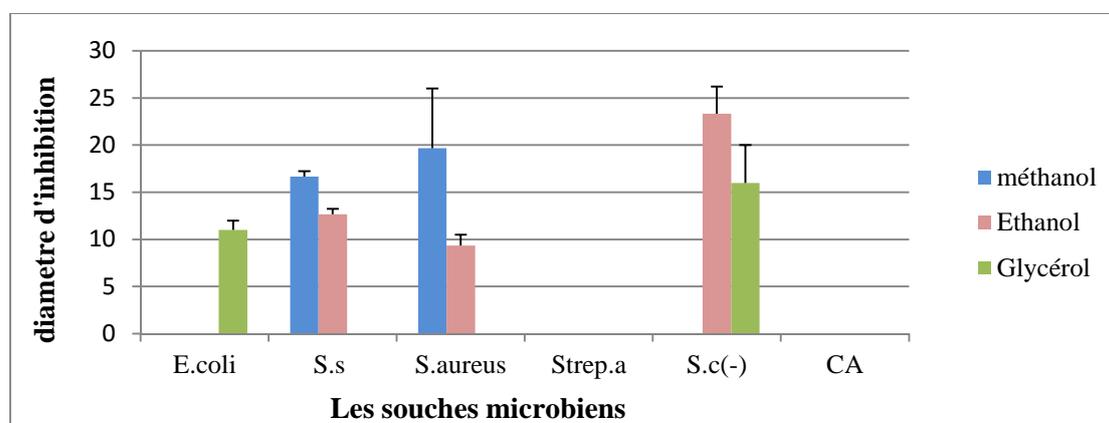
L'analyse chromatographique montre la présence de plusieurs substances naturelles dans l'extrait obtenu par l'éthanol après 120min de macération à partir des feuilles avec 3 pics majoritaire dont le temps de rétention(Tr) =21,207 min (54.246%) ; 40,008 min (10.018%) et 43,428min (21.154%), fleurs (2 pics majoritaire avec Tr= 4,383min (21.736%) et 48.718 min (36.338%), tiges avec 5 pics dont le Tr= 14,197min (9.617%); 40,008min (5.813%) ; 43,449min (39.768%); 46,827min (3.614%) et 48,441min (5.313%) ainsi l'extraits des feuilles obtenu par ultrason ou le chromatogramme montre 2 pics à Tr=40,008 min (27.156%) et 43,428 min(41.061%).





**Tableau X** : Valeur des diamètres des zones d'inhibition (mm) obtenus par les extraits des PPT des feuilles de *C. villosa* par la méthode de diffusion par disques sur gélose.

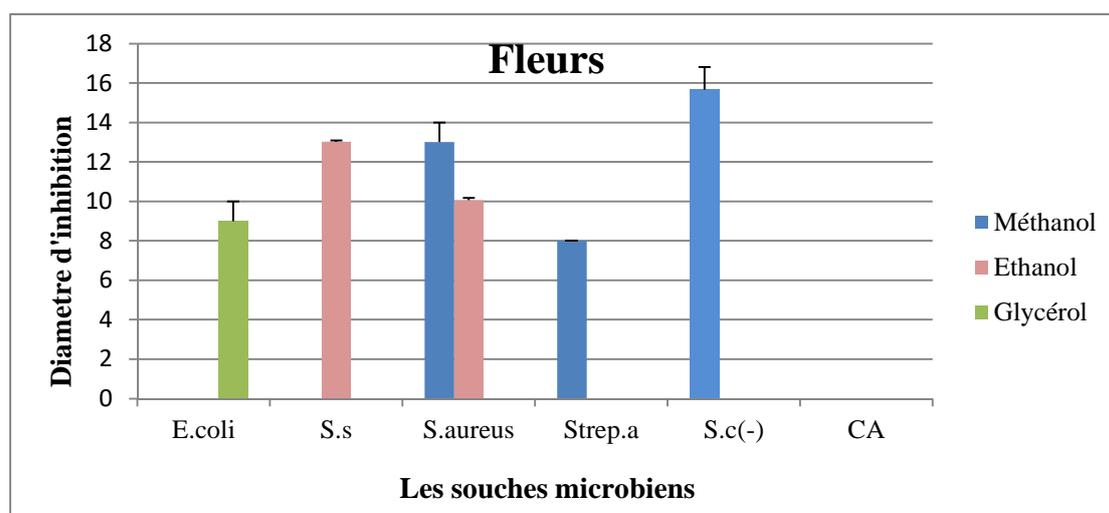
Bactéries		Extraits des feuilles	Zone d'inhibition ± écart type (mm)	Sensibilité des souches
Gram -	<i>E.coli</i>	Méth	/	Résistante
		Eth	/	Résistante
		Gly	11 ±1	Sensible
Gram +	<i>S. Saprophyticus</i>	Méth	16,66 ± 0,577	Très sensible
		Eth	12,66 ± 0,577	sensible
		Gly	/	Résistante
	<i>S.aureus</i>	Méth	19,66± 6,350	Très sensible
		Eth	9,33 ± 1,154	sensible
		gly	/	Résistante
	<i>S. agalactia</i>	méth	/	Résistante
		éth	/	Résistante
		gly	/	Résistante
	<i>S.coagulase (-)</i>	méth	23,33 ± 2,886	extremément sensible
		éth	16 ± 4	Très sensible
		gly	/	Résistante
<i>C. albicans</i>	méth	/	Résistante	
	éth	/	Résistante	
	gly	/	Résistante	



**Figure 26** : Histogramme des diamètres d'inhibitions des souche vis-à-vis des extraits PPT de feuilles.

**Tableau XI:** Valeur des diamètres des zones d'inhibitions (mm) obtenus vis à –vis les souches microbiennes des extraits PPT des Fleurs de *C. villosa* par la méthode de diffusion sur gélose.

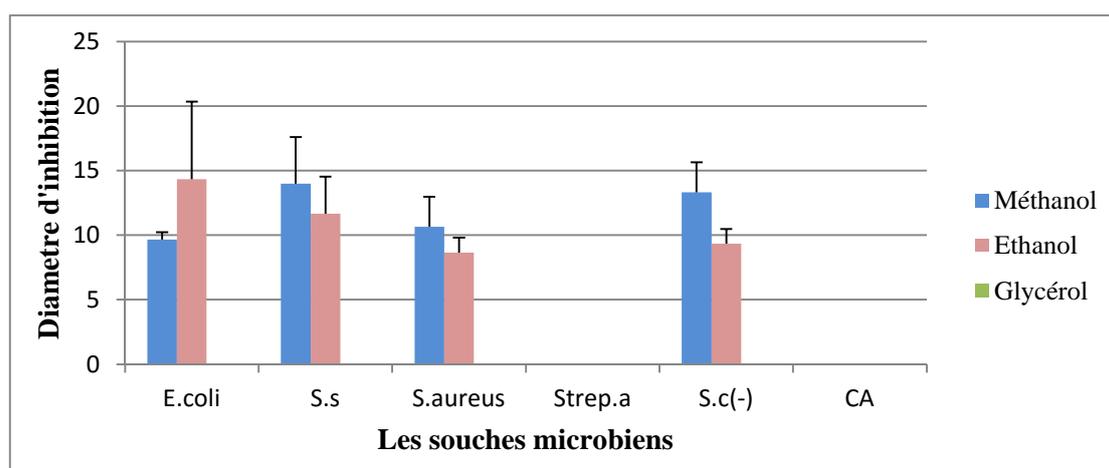
Bactéries		Extraits des fleurs	Zone d'inhibition ± écart type (mm)	Sensibilité des souches
Gram -	<i>E.coli</i>	méth	/	Résistante
		éth	/	Résistante
		gly	9 ±1	Sensible
Gram +	<i>S. Saprophyticus</i>	méth	/	Résistante
		éth	13,03 ±0,057	Sensible
		gly	/	Résistante
	<i>S.aureus</i>	Méth	13 ±1	Sensible
		éth	10,06 ±0,115	Sensible
		gly	/	Résistante
	<i>S. agalactia</i>	méth	8 ±0	sensible
		éth	/	Résistante
		gly	/	Résistante
	<i>S. coagulase (-)</i>	méth	15,66 ±1,154	Très sensible
		éth	/	Résistante
		gly	/	Résistante
<i>C. albicans</i>	méth	/	Résistante	
	éth	/	Résistante	
	gly	/	Résistante	



**Figure 27:** Histogramme des diamètres d'inhibitions des souche vis-à-vis des extraits de fleurs de *C. villosa*.

**Tableau XII** : Diamètres des zones d'inhibitions (mm) obtenus par les extraits des PPT des tiges de *C. villosa* par la méthode de diffusion sur gélose.

Bactéries		Extraits des tiges	Zone d'inhibition ± écart type (mm)	Sensibilité des souches
Gram -	<i>E.coli</i>	méth	9,66 ± 0,577	Sensible
		éth	14,33 ± 6,027	Sensible
		gly	/	Résistante
Gram +	<i>S. Saprophyticus</i>	méth	14 ± 3,605	Sensible
		éth	11,66 ± 2,886	Sensible
		gly	/	Résistante
	<i>S.aureus</i>	Méth	10,66 ± 2,309	Sensible
		éth	8,66 ± 1,154	Sensible
		gly	/	Résistante
	<i>S. agalactia</i>	méth	/	Résistante
		éth	/	Résistante
		gly	/	Résistante
	<i>S.coagulase (-)</i>	méth	13,33 ± 2,309	Sensible
		éth	9,33 ± 1,154	Sensible
		gly	/	Résistante
Candida albicans	méth	/	Résistante	
	éth	/	Résistante	
	gly	/	Résistante	



**Figure 28**: Histogramme des diamètres d'inhibitions des souche vis-à-vis des extraits des PPT des tiges.

D'après nos résultats, nous remarquons que les extraits méthanoliques des différentes parties aériennes de la plante exercent un effet remarquable sur l'ensemble des souches. Ceci peut s'expliquer par le fait que cette plante contient des composants antibactériens actifs extractibles par ce solvant. Par contre les extraits glycériques n'ont aucune activité contre les différentes souches testées.

Il apparaît que *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus coagulase-* (gram positive) sont les bactéries les plus sensibles aux extraits méthanoliques des feuilles ( $19,66 \pm 6,3$  mm et  $23,33 \pm 2,8$  mm respectivement), fleurs et tiges par rapport aux autres souches (gram positive) et *E.coli* (gram négative). Ceci peut être attribué à la différence structurale entre les bactéries gram positives et les bactéries gram négatives (David et Sudarsanam, 2013).

Notons aussi que les extraits éthanoliques des trois parties aériennes de la plante étudiée montrent un effet remarquable sur les souches *S. Saprophyticus* et *S. aureus*. Conformément à nos résultats l'étude de Chikhi et al., 2014, ont montré l'efficacité des extraits éthanoliques des parties aériennes de la plante *C. villosa* contre *S.aureus* avec une zone d'inhibition de 10mm.

Pour l'espèce *E. Coli*, on n'a pas signalé une sensibilité vis-à-vis des extraits éthanoliques des feuilles et fleurs par contre une sensibilité remarquable pour l'extrait éthanolique des tiges avec une zone d'inhibition de  $14,33 \pm 6,027$  mm. L'étude de l'activité antimicrobienne d'autre partie de *C. villosa* (les grains et les gousses) par Aouicha et al. 2017 ont montré la grande sensibilité de la souche *E.coli* contre les extraits méthanoliques de ces deux parties ayant un pouvoir antimicrobien non négligeable.

Les résultats de *S. coagulase (-)* montrent une sensibilité significative contre les extraits éthanoliques des PPT des feuilles et tiges avec des zones d'inhibitions de  $16 \pm 4$  mm et  $9,33 \pm 1,154$  mm respectivement, par contre aucune sensibilité de cette espèce contre l'extrait des PPT des fleurs.

En fin, la bactérie *Streptococcus agalactiae* ne montre aucune sensibilité contre les extraits éthanoliques des trois parties aériennes de la plante étudiée.

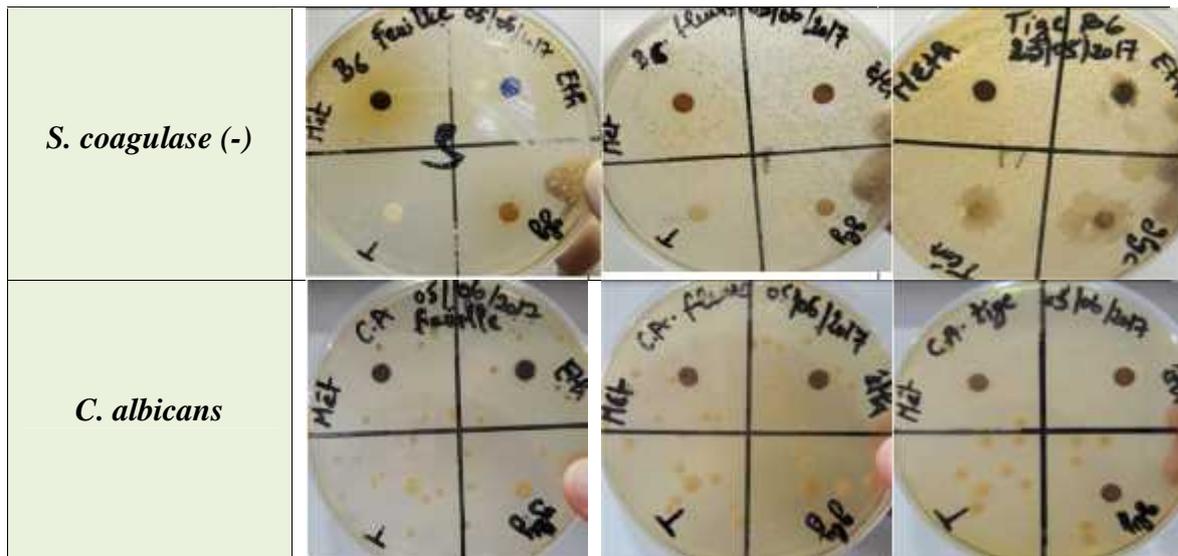
Néanmoins *Candida albicans* est une levure résistante aux tous les extraits des PPT testés. Nos résultats viennent confirmer les travaux de Chikhi et al. 2014, qui n'a

trouvé aucune sensibilité de *Candida albicans* contre les extraits éthanoliques des parties aérienne de la même plante.

*Giuseppe Loy et al., 2001* a rapporté que l'extrait méthanolique de feuille isolée de *C. villosa* n'a aucune activité inhibitrice sur *C. albicans*.

**Tableau XIII:** Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits des feuilles, fleurs et tiges de la plante *C. villosa*.

Partie de la plante \ Bacterie	Feuilles	Fleurs	Tiges
<i>E. Coli</i>			
<i>S. Saprophyticus</i>			
<i>S. aureus</i>			
<i>S. agalactia</i>			



On peut conclure que les composants biologiquement actifs de la partie aérienne de *C. villosa* et spécifiquement les feuilles pourraient représenter une nouvelle source antimicrobienne à exploiter en médecine moderne.

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substance naturelle et bioactifs. Parmi ces composés on retrouve d'une grande mesure les métabolites secondaire, comme les polyphénols, qui sont surtout illustrés en thérapeutique.

Le présent travail a porté d'une part sur l'optimisation de l'extraction des polyphénols en se basent sur l'utilisation de différents solvants, différents durés de macération et deux méthodes d'extraction «macération et ultrasons» et d'autre part sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne d'une espèce médicinale *Calicotome villosa* de la famille de *Fabaceae*, choisie sur la base de leur usages traditionnels.

L'extraction des composés phénoliques est une étape principale pour la valorisation des principes actifs. Elle dépend à la fois du solvant d'extraction et de la nature d'organe étudié. Nous avons tenté, dans un premier temps, d'optimiser à extraire les composés phénoliques par macération en utilisant trois solvants choisis de manière à solubiliser un maximum de composés et trouver l'organe riche en polyphénols. Les rendements en polyphénols des différents organes aériens sont relativement importants, les feuilles et les fleurs ont présenté les rendements maximaux soit 33,74 % et 37,77 % respectivement avec l'éthanol .

La durée optimal permettent d'obtenir les meilleurs rendements d'extraction des polyphénols et de 60 min de macération par rapport à 30 et 120 min .

Tous ces résultats préliminaire permis de nous effectuer la meilleur méthode d'extraction, nous constatons que l'extrait éthanolique des feuilles a permis d'obtenir des rendements qui sont différents en fonction des méthodes d'extractions utilisées (34,52 % pour l'extrait obtenus par macération et 37,17% pour l'extrait obtenus par ultrasons).

La teneur en polyphénols totaux pour les extraits des feuilles testés a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu, les résultats obtenus montrent que l'extrait éthanolique possède la tenue la plus élevé, avec la valeur  $32,616 \pm 3,617$  mg EAG/g par rapport au deux autres extraits méthanolique et glycérolique. Par rapport auduré de macératon , les résultat de l'extrait de 30 min de macération montre la richesse en polyphénols (avec  $51,482 \pm 8,017$  mg EAG/g) que de 60 et 120 min, notons aussi que les teneurs en polyphénols des extraits bruts sont

voisines pour les deux méthodes d'extraction par ultrasons et par macération simple avec  $33,4005 \pm 6,865$  EAG/g et  $42,2085 \pm 20,226$  EAG/g respectivement.

Les analyses qualitatives des différents extraits méthanolique, éthanolique et glycérolique des parties aérienne par chromatographie sur couche mince (CCM) nous a conduit d'obtenir après la révélation par l'ammoniaque la présence des composés phénoliques obtenus par macération et celle d'ultrasons notamment les flavonoïdes .

En outre, l'analyse par GC/MS montre la présence de plusieurs substances naturelles dans l'extrait éthanolique de 120min de macération dans chaque partie aérienne (feuilles, fleurs et tiges) , ainsi dans l'extrait des feuilles d'ultrason de 60min dont quelques molécules étaient identifier dans les feuilles grâce au spectrophotomètre de masse.

En fin, les extraits des parties aériennes de *C.villosa* ont été également soumis à un criblage pour leur possible activité antimicrobienne *in vitro*, contre cinq souches des bactéries pathogènes et une espèce de levure, par la méthode de diffusion sur disque. Les résultats de cette étude ont montré que la plus part des extraits polyphénoliques des parties aériennes de la plante *C.villosa* ont une activité importante sur les bacteries *S.coagulase* (-), *S.Saprophyticus* et *S.aureus* et faible activité inhibitrice contre les bacteries *E.Coli* et *Streptococcus agalactia*. De même *Candida albicans* a été une levure résistante aux tous les extraits testés.

Ces résultats ne constituent qu'une ébauche dans le domaine d'extraction et des recherches des antimicrobiens naturels, il serait intéressant détaillé ce travail par :

- ✓ Testé des nouvelles méthodes d'extraction par ex : micro-onde.
- ✓ Etude photochimique afin d'isoler le maximum des métabolites secondaires contenus dans les extraits.
- ✓ Dosage des différents types de substances polyphénoliques présentes dans les extraits polyphénoliques totaux de la plante, essentiellement les flavonoides .
- ✓ Caractériser les constituants de la plantes par des méthodes analytiques plus performantes : HPLC, UV et RMN.
- ✓ 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 l'antimicrobienne de cette plante.

- ✓ Explorer d'autres activités biologiques notamment l'activité antioxydant.

**Abdel-Hameed E S., (2009).** Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. Food Chemistry, vol. 114:1271–1277.

**Aberkane M.C. (2006)** . Etude phytochimique de la plante *Publicaria laciniata*. Thèse de doctorat. Batna, 163p.

**Adesegun S. A., Alabi S. O., Olabanji P.T., et Babatunde Coker H A., (2010).** Evaluation of Antioxidant Potential of *Melanthera scandens*. J Acupunct Meridian Stud, vol. 3 (4):267–271.

**Afanas'ev I.B., Dcrozko A.I., Brodskii A.V., Kostyuk V.A., Potapovitch A.I. (1989).** Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. Biochemical pharmacology. 38(11):1763-1769.

**Aharoni A., Galili G., (2011)** - Metabolic engineering of the plant primary, secondary metabolism interface. Current Opinion in Biotechnology. Vol.22 : 239–244.

**Akroum S. (2011)** - Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de Doctorat en sciences. Université Mentouri de Constantine. Algérie. 113 p.

**Al jabri S (2013).** Chemical and Bio-analytical Studies on *Pergularia tomentosa* and Species from the *Mentha* Genus. Thèse doctorat. Université de Leicester. 244 p.

**Ali EA ., Ibtissam M ., Rachida CT ., Mohamed B ., Rachid EA , Brahim EB ., Mohammed L (2004).** Flavone Glycosides from *Calycotome Villosa* Subsp. *Intermedia* . Journal of Molecules . ISSN 1420-3049 , Vol .9, Issue :30 juin 2004 , pp. 568-573 .

**Alkurd A., Hamed T. R., Al-Sayyed H.(2008)** . Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan. Jordan Journal of Agricultural Sciences 4: 265 - 274.

**Anderson, C.M., Halleberg, A., Hogberg, T.(1996)** . Advances in the development of pharmaceutical antioxydants. Adv. drug Res., 28, pp 65-180.

**Antonot, E; Marchal, R. (1998).** Chromatographie. Stage MAPEN, p 5.

*Calycotome* . **Aouicha E., Ali EA., Hanane EH., Brahim EB., Hassan O., Mohammed L** Journal of chemistry . *intermedia* Phytochemical constituents from the seeds of *villosa subsp* . (J Arabian .King Saud University .Vol .4, Issue :Mars (2014

**Axelsson, M., Sjovall, J., Gustafsson, B.E., Setchell, K.D.(1982)** . Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants. *Nature*, 298, pp 659-660.

**Bahorun, T. (1997)**. Substances Naturelles actives: La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice. AMAS, Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius , p 83.

**Barros L., Calhelha R.C., Vaz J.A., Ferreira I.C.F.R., Baptista P., Estevinho L.M., (2007)**. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *European Food Research and Technology*, Vol. 225, Issue: 2,2007. pp. 151–156.

**Belkebir A.,Toubal LI., (2015)**. Etude phytochimique d'une plante de la famille des fabaceae et évaluation de l'activité antimicrobienne .Université M'hamed Bougara. Boumerdes.pp 35 .

**Benayache F. (2005)** - Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires d'espèces du Genre Genista (Fabaceae) : *G. saharae*, *G. ferox*. Thèse de Doctorat en chimie organiques. Université MentouriConstantine. Algérie. 199 p.

**Benbrinis S. (2012)** - Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de *Santolina chamaecyparissus*. Thèse de Magister en biochimie. Université Ferhat Abbas-Sétif. Algérie. 84p.

**Blagoj K., Spyros G., Sofia L., Ioannis M., Dimitris P M.,(2015)**. Optimisation of Organic Solvant –Free Polyphenol Extraction From *Hypericum trifolium* Turra Using Box-Behnken Experimental design and Kinetics ;*Int J Ind Chem*.6:85-92.

**Boizot N. et Charpentier J.P., (2006)**.Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour d'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, Le Cahier des Techniques de l'INRA, pp : 79-82.

**Bondia-Pons I., Aura A-M., Vuorela S., Kolehmainen M., Mykkanen H., and Poutanen K. (2009)**. Rye phenolics in nutrition and health.*J. of Cereal Science* ., 3:1-14.

**Boubekri C, (2014)** . Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques . Thèse de Doctorat en chimie : Université Mohamed Khider – Biskra. Algérie. P 176.

**Bouchonnet, S., Libong D., (2004).** Le couplage chromatographique en phase gazeuse-spectrométrie de masse. Actual. Chim ., 275, pp 7-14.

**Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales. 4e Ed. Éditions médicales internationales (Tec & Doc), Paris. 1288.

**Bruneton J.(1999).**Pharmacognosie :Phytochimie Plantes Médicinales.Techniques et documentation,3ème Ed,Lavoisier,Paris.1120p.

**Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinale. Edition Technique et documentation, p233

**Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (2000)** . American Society of Plant Physiologists, chapitre 24, pp 1250-1318.

**Cherkaoui-Tangi K., Lachkar M., Wibo M., Morel N., Gilani A.H., Lyoussi B., (2008)** . Pharmacological studies on hypotensive, diuretic and vasodilator activities of chrysin-glucoside from *Calycotome villosa* in rats. Journal of Phytotherapy Research, Vol.22, Issue: 3, Mar 2008, pp.356-361.

**Chikhi I. (2013)** -Composition Chimique et Activités Biologiques Des Extraits De Cinq Plantes Aromatiques Et Médicinales De L'ouest D'algerie . Thèse de doctorat en Chimie Bio-Organique & Thérapeutique .Université Abou Beker Belkaid, Tlemcen .Algérie . 120p.

**Chikhi I., Allali H., Bechlaghem K., Fekih N., Muselli A., Djabou N., El Amine Dib M., Tabti B., Halla N., Costa J., (2014).** Assessment of in vitro antimicrobial potency and free radical scavenging capacity of the essential oil and ethanol extract of *Calycotome villosa* subsp. *intermedia* growing in Algeria . Asian Pacific Journal of tropical Disease ,Vol.7,Issue: October 2014 ,pp.356-362.

**Chikloun 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-Hrrach –Alger..

**Cox, P.A., Balick, M.J. (1994)** . The ethnobotanical approach to drug discovery. Sci. Am., 270 (6), pp 82-87.

**Dangles O, Stoeckel C, Wigand MC, Brouillard R. (1992).** Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. Tetrahedron Lett. 33: 5227-30.

**David B C., Sudarsanam G., (2013).** Antimicrobial activity of *Gymnema sylvestre* (Asclepiadaceae). *Journal of Acute Disease*, Vol.4 , pp 222-225.

**De Hoffman E .et Stroobant V.,(2005)** . Spectrométrie de masse .3<sup>ème</sup> Ed.DUNOD ,Paris.

**Dru y ska B., Stepniewska A., Wolosiak R., (2007).** The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts; *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, Vol. 6, pp 27-36.

**Duke, J.A. ( 1993).** Medicinal plants and the pharmaceutical industry. In *New Crops*. (Eds.) Janick, J. and Simon, J.E., John Wiley and Sons, Inc., New York, NY. pp.664-669.

**Dupont F. and Guignard J.L. (2007).** *Abrégé de Botanique* 14<sup>ème</sup> édition. Editions Masson, Paris; 285 p.

**Edwin Haslam. (1996)** . *J. Nat. Prod* ,59, 205-215

**El Antri A., Lachkar N., El Hajjaji H., Gaamoussi F., Lyoussi B., El Bali B., Morel N., Allouchi H., Lachkar M., (2010).** Structure elucidation and vasodilator activity of methoxyflavonols from *Calycotome villosa* subsp. *intermedia*. *Arabian Journal of Chemistry*, Vol.3, Issue: 3, July 2010, pp.173–178.

**El Gharras H. (2009)** . Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12): 2512–2518.

**Elkhamlichi A, El hajaji H, Alami A, El Bali B, Lachkar M.(2017).** Phytochemical screening and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of seeds and pods extracts of *Calycotome villosa* subsp. *Intermedia* . *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 7 (04), pp. 192-198, April, 2017.

**Fleuriet A. (1982).** Thèse Doc. Etat, Montpellier.

**Fleuriet A., Jay-Allemand C., Macheix J.J.(2005)** . Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes* pp 121-216.

**Fuerst F.(1976)** *Microbiologie Clinique*.ED HR W Québec.507p.

**Ghasemzadeh, A. & Ghasemzadeh, N. (2011)** . Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research* 5 (31), 6697-6703.

**Gibbons S.(2008)**. Phytochemicals for bacterial resistance-strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Medica*, Vol. 74, Issue: 6 , pp. 594-602.

**Giuseppe L., Filippo C., Donatella G., Delia D.,Raffaello P., Leonardo B., (2001)**. Chemical composition and cytotoxic and antimicrobial activity of *Calycotome villosa* (Poiret) Link leaves. *Elsevier Journal of IL FARMACO* , Vol.4,Issue: 10 January 2001 ,pp.433-436.

**Guide illustré de la flore algérienne ,wilaya d'alger(2010 -2011)** ; mairie de paris . avec le soutien du ministère des affaires étrangères européennes de la république française.N° ISBN :978-2-7466-4242-3.p29.

**Guignard J.L., (1996)** . Abrégé de biochimie végétale, Ed. *Masson*, Paris, 160 p.

**Guignard JL, Dupont F (2005)** Botanique. 13<sup>ème</sup> Edition *Masson*, Paris. pp. 336.

**Gurib-Fakim A. (2006)** . Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27, 1-93.

**Habauzitv.and Horcaada M.N.(2008)**. Phenolic Phytochemicals and bone.Phytochem Rev.,7:313 – 344.

**Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Richel TL.(1998)**. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1887-92.

**Hallal Z.,(2011)**-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,16-17 p.

**Harborne J.B. and Williams C.A. (2000)** . Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry*, 55: 481–504.

**Harley J.P.(2010)**. Klein D.A., Prescott L.M., Sherwood L.M., Willey J.M., Woolverton C.J. *Microbiologie*, Ed. De Boeck.

- Harrar A.E.N. (2012)** - Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus*L. Thèse de Magister Biochimie et physiologie expérimentale, Université Ferhat Abbas, Sétif. Algérie.73 p.
- Haslam E. (1994).** Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. Nat. Prod. 11: 41-66.
- Hatem T., Ahmed EO .(2014).** Jordan Plant Red List . N° ISBN : 978-9957-8709-0-4.Royal botanic jarden , jordan
- Hay, A.E. (2003)** . Métabolites secondaires isolés de deux plantes néo-calédonienne, *Calophyllum caledonicum* vieill. et *Garcinia vieillardii* P : Etude chimique et valorisation biologique. Thèse de l'université d'Angers.
- Heller W., Forkmann G. (1993)** - The flavonoids. Advances in research since 1986. In Harborne JB. Secondary Plant Products. Encyclopedia of plant physiology. Ed. Chapman et Hall, London. UK. Pp 399-425.
- Heneidak S., Grayer RJ., Kite GC., Simmonds M S J., (2006).**Flavonoid glycosides from Egyptian species of the tribe Asclepiadeae (Apocynaceae, subfamily Asclepiadoideae), Biochemical Systematics and Ecology. 34 ,pp.575-584.
- Herbert ,R.B. ,(1989).**The Biosynthesis of secondary metabolites.2ème edition Chapman and Halle .p2,11 – 115 .
- Hernández I., Alegre L., Van Breusegem F. and Munné-Bosch S. (2009).** Trends in Plant Science, 14 (3), 125–132.
- Heywood, V.H. (1996).** Flowering Plants of the World. 3thedition, Oxford University Press, Oxford, pp. 141-145, 149-152.
- Hopkins, W. G. (2003).** Physiologie végétale. De Boeck Supérieur, p 280.
- Igor Passi, L.B. (2002).** Etude des activités biologique de *Fagara zanthoxyloïdes*, lam (Rutaceae). Thèse de pharmacie, Bamako, p 133.
- Iwashina T. (2000)** . The structure and distribution of the flavonoids in plants. Journal of Plant Research, 113: 287–299.

**Iwueke A.V., Nwodo O. F.C. (2008)** . Antihyperglycaemic effect of aqueous extract of *Daniella oliveri* and *Sarcocephalus latifolius* roots on key carbohydrate metabolic enzymes and glycogen in experimental diabetes. *Biokemistri* 20: 63 - 70.

**Jennan S ., Farah A., Mahjoubi F., (2014).**Optimisation Of Ultrasound Assisted Extraction Of *T.Hyemals* Using The Response Surface Methodology . *Innovation Thérapeutique :du fundamental à l'appliqué* .

**Jones J.D., Dangl J.L., (2006).**The plant immune system.*Nature*, Vol. 444 , pp. 323-329.

**Jutiviboonsuk A., Zhang H., Tan T.G., Ma C., Van Hung N., Cuong N.M., Bunyapraphatsara N., Soejarto D D., Fong H H S.(2005)** . Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*. *Phytochemistry* 66: 2745 - 2751.

**Kamra D.N., Agarwal N., Chaudhary L.C. (2006)** . Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series*. Vol. (1293) : 156–163.

**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.p 95.

**Kar A. (2007).** Pharmacognosy and Pharmabiotechnologie; Ed 2: New Age International Publishers ; p: 1-30.

**Khenaka K. (2011)** - Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Thèse de Magister En Microbiologie Appliquée. Université Mentouri- Constantine. Algérie. 81p.

**Kolai N.,Berkani A., Lotmani B.,(2007).**Analyse chromatographique (CCM) des flavonoides des feuilles des *Citrus* en relation avec le contamination de *phyllocnistis citrella* (lepidoptera ; Gracillariidae).Université de Mostaganem .pp195.

**Kundu J.K. and Surh Y. (2008).** Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. *Cancer Letters*, 269(2): 243– 261.

**Lacy, A. & O'Kennedy, R. (2004).** Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. *Current Pharmaceutical Design* 10, 3797-3811.

**Lafay S .and Gil-Izquierdo A .(2008)** .Bioavailability of phenolic acids.*Phytochem Rev* .,7 :301-311.

**Lahouel M. (2005)** . Interaction flavonoides-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de Mgister en Biotechnologie végétale .Université Mentouri -Constantine. Algérie .96 p.

**Lee KW., Kim YJ., Lee HJ .,LEE CY.,(2003)** . Cocoa Has More Phenolic,Phytochemicals and a Higher Antioxydant Capacity than Theas and Red Wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. Vol. (3): 7292-7295.

**Lehout R et Laib M ,(2015)**. Comparaison de trois méthodes d'extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes à partir de la plante médicinale : *Artemisia herba alba* Asso . Mémoire de fin d'étude de Master II, Biochimie moléculaire et santé (Biologie) . Université des Frères Mentouri Constantine Algérie . 52p.

**LesPiquemal G.(2008)**. Les flavonoïdes (en ligne) : [http://www.detoursante.com/index.php?Option=com\\_content&view=article&id=166&Itemid=215'](http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=215) .

**Leybros J, Fremeaux P., (1990)**. Extraction solide-liquide aspects théoriques. *Techniques de l'ingénieur, Génie des procédés*. Vol. (2J2780): J2780.1-J2780.22.

**Lobstein, A.(2010)** . Substances naturelles et pharmacognosie, les alcaloïdes, pp 3-25.

**Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005)**. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques, 192 pages.

**Malagas D. (1992)** . Arbres et arbustes guérisseurs des savanes Maliennes. ACCT- Karthala, p. 232.

**Malešev D. et Kunti V. (2007)** . Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the serbian chemical society.*, 72 (10) : 921-939.

**Marston A., (2011)**. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*. Vol. (19): 2676-2683.

**Martone P., Estevez , J., Lu F., Ruel K., Denny M., Somerville C., Ralph J. (2009).** Discovery of Lignin. *Current biology*, 19(2): 169–75.

**Meddour A., Yahia M., Benkiki N., Ayachi A. (2013)** - Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du Capparis Spinosa L. *Lebanese Science Journal*. Vol. (14): 49-60.

**Millogo H., Guisson I. P., Nacoulma O. et Traore A. S. (2005)** . Savoir traditionnel et médicaments traditionnels améliorés. Colloque du 9 décembre. Centre européen de santé humanitaire –Lyon.

**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 Scienc and technology*, 38(5),565-570.

**Moss, G.P. (2000)** .Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000) .*Pure and Applied Chemistry* , vol.72,n°8, pp.1493-1523.

**Muanda, F. N. (2010).** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de Doctorat Chimie organique : Université PAUL VERLAINE-METZ .France . p 238.

**Nazck M ., Shahidi F., (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food; *Journal of Chromatography A*, Vol. 1054, pp 95-111.

**Peterson, J., Dwyer, J., Adlercreutz, H., Scalbert, A., Jacques, P. & McCullough, M. L. (2010).** Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutr. Rev.* 68(10), 571–603

**Petrier C., Gondrexon N., and Boldo P., (2008).** Ultrasons et sonochimie. *Techniques de l'ingénieur*. Vol. (AF6310) : 1-14

**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.

**Pieri F.,Kirkiacharian S.(1992).**Pharmacologie et Thérapeutique ,2eme édition Marketing.Paris.443p.

**Pistelli L., Fiumi C., Morelli I., Giachi I. (2003)** . Flavonoids from *Calicotome villosa* .  
Journal of Fitoterapia , Issue: 20, mars 2003 , pp .417–419.

Plantes hôtes potentielles de *Xylella fastidiosa* Subsp. *multplex* en France ; Guide de reconnaissance .1<sup>er</sup> Edition , juillet (2016).

**Podsdek A., (2007)** .Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables:  
A review. LWT. Vol. (40):1-11.

**Quèzel P., Santa S., (1963)** .Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques  
méridionales, Tome2, Ed. Centre nationale de la recherche scientifique, Paris, pp.935-936.

**Richard S., Steele-Moore L., Goodwin A.C.(2007)**. Antimicrobial susceptibility testing  
protocols Ed. Goodwin Boca Raton: CRC Press, pp.77.

**Sadasivam, S. & Thayumanavan, B. (2003)**. Molecular host plant resistance to pests.  
Volume 96 de Books in soils, plants and the environment. CRC Press, p221.

**Saffidine K . (2015)**- Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus caeruleus* L. et de *Plantago major* L. Thèse de doctorat en microbiologie. Université Ferhat abbas ,Setif .Algérie . 101p.

**Sainvitu, P., Nott, K., Richard, G., Blecker, C., Jérôme, C., Wathelet, J.-P., Paquot, M. & Deleu, M. (2012)**. Structure, properties and obtention routes of flaxseed lignan secoisolariciresinol: a review. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 16(1), 115-124.

**Sakagami H., Hashimoto K., Suzuki F., Ogiwara T., Satoh K., Ito H., Hatano T., Takashi Y., Fujisawa S. (2005)** . Molecular requirements of lignin–carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. Phytochemistry 66: 2108 - 2120.

**Sanago R. (2006)**. Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako(Mali): 53.

**Santos H.M., Lodeiro C., Capelo-martinez J.L., (2009)**. The Power of Ultrasound. Ultrasound in chemistry : Analytical Applications. Edited by José-Luis Capelo-Martinez, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.Germany. 32p.

**Sarni-Manchado P, Cheynier V. (2006)**. Les polyphénols en agroalimentaire, Ed. Lavoisier (Tec & Doc), Paris, 300-398.

**Scalbert A .,Williamson G.,(2000)** - Dietary intake and bioavailability of polyphenols. Journal of Nutrition. Vol. (130): 2073-2085.

**Schaechter , M.(2009)** .Escherichia coli ,Encyclopedia of Microbiology (Third Edition),125-132.

**Soussy c.j. (2012)** . Comité de l'antibiogramme de la société Française de microbiologie.

**Spichiger R. E., Savolainen V. V., Figeat M., Jeanmoned D. (2002)**.Botanique systématique des plantes à fleur. Presses polytechniques et Universitaires romandes, CH - Lausanne.

**Spichiger, R.E., Savolainen, V.V., Figeat, M. and 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.

**Suslick K.S.,(1998)**. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 4ème édition. Ed. J. Wiley & Sons, New York. USA. Pp 517-541.

**Svoboda K. et Svoboda T. (2000)**. Secretory structures of aromatic and medicinal plants; Ed: Microscopix PublicationsI ; p: 7-12.

**Telli A .,Mahboub N .,Boudjeneh S ., Siboukeur O.E.K. Moulti-Mati F.,(2010)**. Optimisaation Des Conditions D'extraction des Polyphénols de Dattes Lyophilisees (Phoenix dactylifera L) Variété ghars. Annales des Sciences et Technologie .Vol.2. N°2.Décembre 2010. pp107-114.

**Telli A .,Mahboub N .,Boudjeneh S ., Siboukeur O.E.K. Moulti-Mati F.,(2010)**. Optimisaation Des Conditions D'extraction des Polyphénols de Dattes Lyophilisees (Phoenix dactylifera L) Variété ghars. Annales des Sciences et Technologie .Vol.2. N°2.Décembre 2010. pp107-114.

**Thompsen J. C., et Mottola H. A. (1984)**. Kinetics of the complexation of iron (II) with ferrozine. Analytical Chemistry . 56(4): 755-757.

**Tlili M L.(2015)** . Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de Pergularia tomentosa issue de quatre sites sahariens différents (Sahara

septentrional). Thèse de Magister en biochimie et analyse de bioproduits .Universite Kasdi Merbah – Ouargla .Algérie .98 p.

**Urquiaga I. et Leighton F. (2000).** Plant polyphenol antioxidant and oxidative stress. *Biological Research*, 33(2): 55–64.

**Veillet S., Tomao V., Chemat F. (2009).** Ultrasound Assisted Extraction of Aromas and Antioxidants. In: *Essential oil and aromas green extractions and applications*. Chemat F. Ed. HKB, New Delhi.

**Vermerris W., Nicholson R., (2006).** Phenolic compounds biochemistry; Ed. Springer, pp 1-58.

**Visioli, F., Borsani, L. & Galli, C. (2000)** . Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of Phytochemicals. *Cardiovascular Research* 47, 419–425.

**Vivas de Gaulejac . (2001)** . N.Vin et santé . Les bases scientifiques du French Paradox. Bordeaux :Féret .

**W –Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly., Hollman J. P., L –Keen C., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G. et Burrowes J. (2007)** . Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition.*, 137 (3 supp 1) : 718 s-737 s.

**Wang L ., Weller C.L., (2006).** Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*. Vol. 17(6): 300-312.

**Wichtl M., Anton R.( 2009)** . Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Édition LAVOISIR, Paris: 38, 41.

**Yao J ., Wang J.Y. and Liu L.(2010).** "Anti-oxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis". *Arch Med Res* 41:288-294.

**Yao L.H., Jiang Y.M., Shi J .(2004)** . Tomas-Barberan F.A., Datta N ., Singanusong R. and Chen S.S.(2004). Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr.* 59:113-122.

**Yusuf Y.( 2006)** . *Trends Food Sci. Tech*, 17, 64-71.

**Références Electroniques :**

**Anonyme 01:** [http://www.planetefleurs.fr/Systematique/Fabaceae/Calicotome\\_villosa.htm](http://www.planetefleurs.fr/Systematique/Fabaceae/Calicotome_villosa.htm)

**Anonyme02:**

[http://mglebrusc.free.fr/textes/la%20mer/Plantes\\_a\\_fleurs/Calicotome%20villosa.htm](http://mglebrusc.free.fr/textes/la%20mer/Plantes_a_fleurs/Calicotome%20villosa.htm).

**Anonyme 03:** <http://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-12179-synthese>

**Anonyme 04:** <http://www.Luring.altervista.org/pics/display.php?pos=233482> .disponible le 25/02/2017

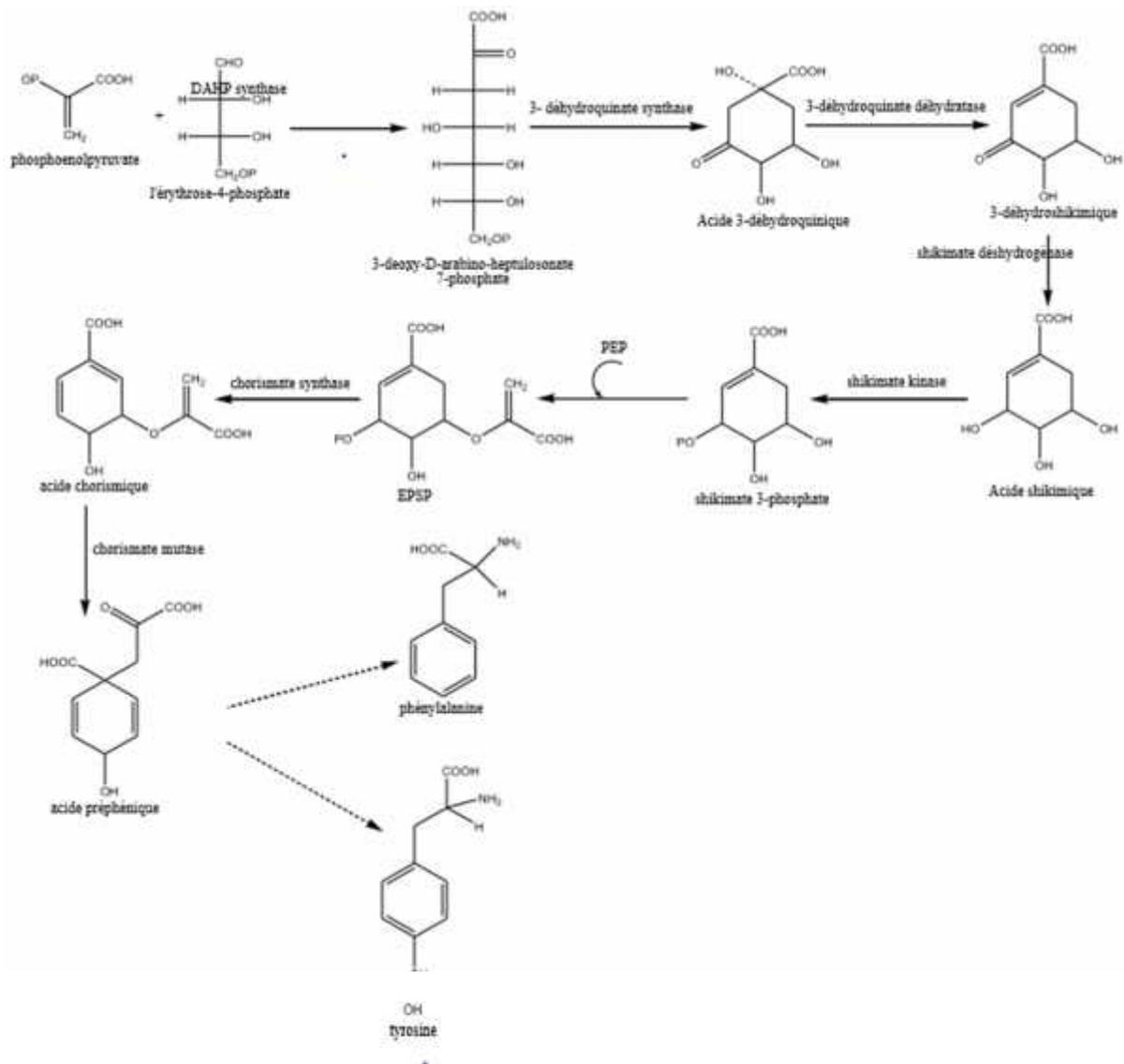
**Anonyme 05:** [http:// https://www.google.dz/maps/place/Aomar/](http://https://www.google.dz/maps/place/Aomar/)

**Anonyme 06:** <http://ppdictionary.com/bacteria/gpbac/agalactiae.htm> .

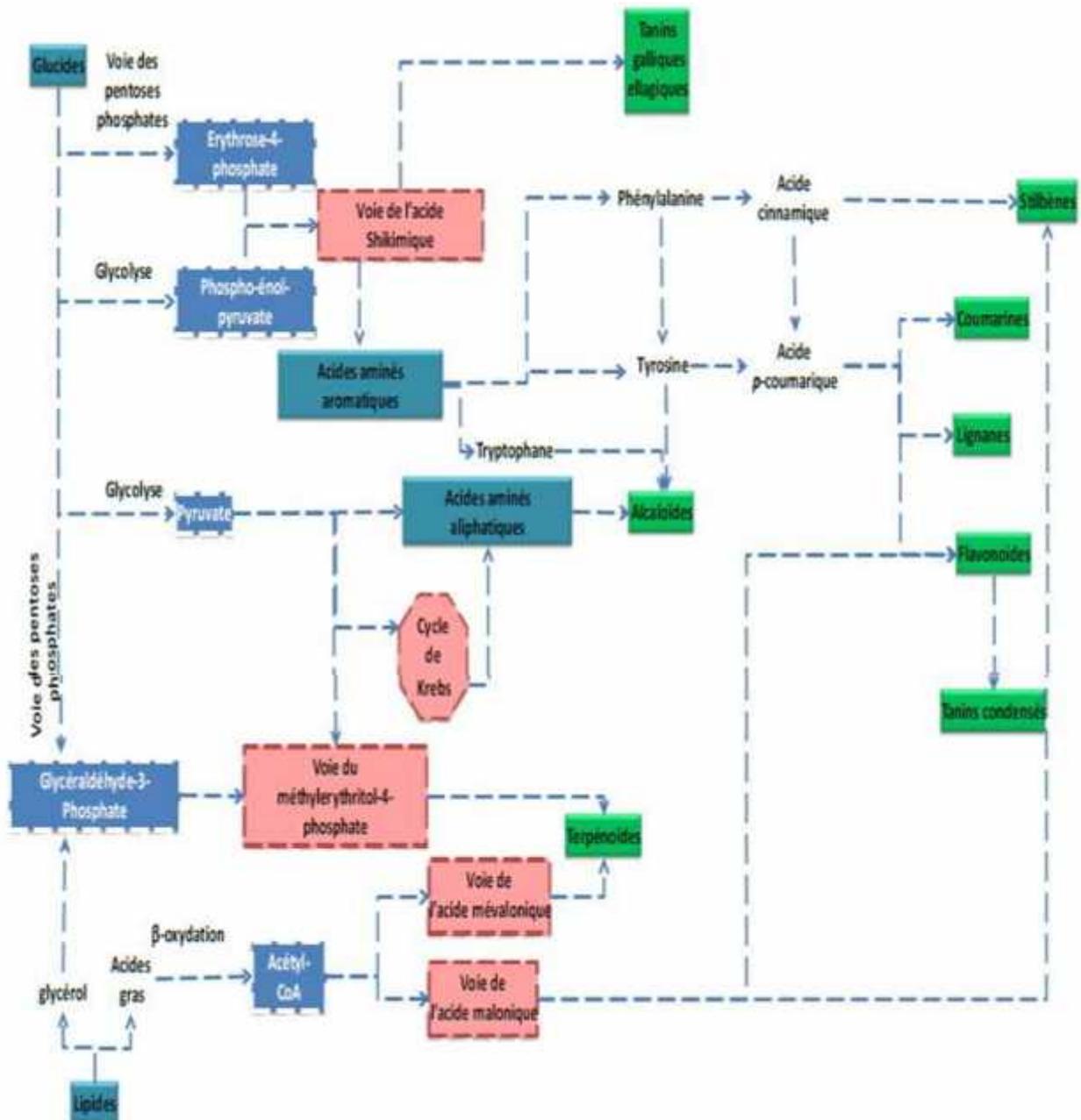
**Anonyme 07:** <https://microbewiki.kenyon.edu>.

**Anonyme 08:** <http://www.microbes-edu.org/etudiant/staph.html>.

# Annexe 1

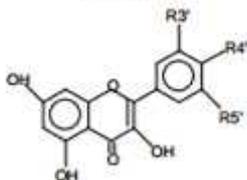
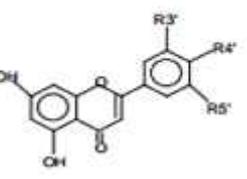
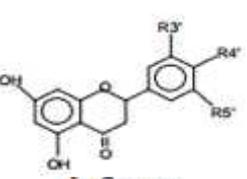
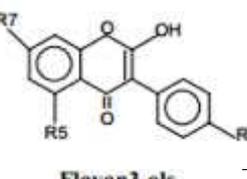
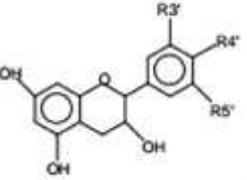
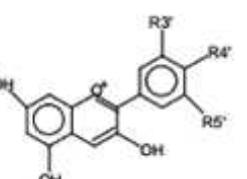


**Figure 1** : Voie de l'acide shikimique(Ghasemzadeh , 2011).



**Figure 02:** Origine biosynthétique des métabolites secondaires(Aharoni et Galili, 2001).

**Tableau I : Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes (W- Erdman et al ,2007)**

Flavonoïde	Exemple	Aliments	Caractéristiques
<p><b>Flavonols</b></p> 	Quercétine, Kaempférol	Oignon, poireau, brocolis, pommes, chou frisé, vin rouge, thé.	Le groupe le plus abondant des composés phénoliques.
<p><b>Flavones</b></p> 	Lutéoline Apigénine	Persil, céleri.	Le groupe le plus abondant des composés phénoliques, les flavones se différencient des flavonols seulement par le manque d'un OH libre en C3, ce qui affecte ainsi leur absorption aux UV, mobilité chromatographique et les réactions de coloration
<p><b>Flavanones</b></p> 	Naringénine Eriodictyol	Fruits du genre Citrus.	Sont caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3, le Flavanone le plus abondant est la naringénine, isolée pour la première fois à partir des écorces de citrus.
<p><b>Isoflavones</b></p> 	Genistéine Daidzéine	Graines de soja et produits qui en dérivent.	Caractérisés par leur variabilité structurale dont l'attachement du cycle B se fait en C3. Ils sont présents dans les plantes sous forme libre ou glycosylée.
<p><b>Flavan-3-ols</b></p> 	Catéchine Epicatéchine Epigallocatechine	Vin rouge, thé noire, thé vert, cacao, chocolat.	Flavan-3-ols ainsi que flavan-3,4-diols sont tout les deux impliqués dans la biosynthèse de proanthocyanidines (tanins condensés) par des condensations enzymatiques et chimiques
<p><b>Anthocyanidines</b></p> 	cyanidine Delphéridine	Raisins, vin rouge, certaines variétés de céréales.	Représentent le groupe le plus important des substances colorées, ces pigments hydrosolubles contribuent à la coloration des angiospermes.

## Annexe 2

Verrerie	Matériels divers	Appareillage et dispositifs	Réactifs
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Mortier et pilon</li> <li>▪ Verre de montre</li> <li>▪ Erlenmeyer</li> <li>▪ Entonnoirs</li> <li>▪ Eprouvettes graduées</li> <li>▪ Ballon à fond rond</li> <li>▪ Pipette pasteur en verre</li> <li>▪ Béchers gradués</li> <li>▪ Tubes à visse</li> <li>▪ Flacon en verre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Seringues en plastique 10ml,1ml</li> <li>▪ Cuve de spectrophotomètre</li> <li>▪ Disques de papier buvard (6 mm)</li> <li>▪ Boîtes pétrie en plastique</li> <li>▪ Cuve de CCM en verre</li> <li>▪ Portoirs de tube à essai</li> <li>▪ Barreau magnétique</li> <li>▪ Papier filtre wattman</li> <li>▪ Marqueur permanent,Crayon ,Règle, Etiquette</li> <li>▪ Papier aluminiumPapier filme , Para filme</li> <li>▪ Coton tige, Compresse</li> <li>▪ Eppendorff , Pissettes, Embouts</li> <li>▪ Spatule, Pince</li> <li>▪ Gants,Lunette,Masque</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Balance analytique de précision</li> <li>▪ Broyeur électrique</li> <li>▪ Etuve</li> <li>▪ Bain-marie</li> <li>▪ Rota vapeur</li> <li>▪ Autoclave</li> <li>▪ Bain à ultrason</li> <li>▪ Plaque chauffante</li> <li>▪ Vortex</li> <li>▪ Spectrophotomètre UV</li> <li>▪ Agitateur magnétique</li> <li>▪ Chambre à UV 365 nm</li> <li>▪ Incubateur</li> <li>▪ Réfrigérateur</li> <li>▪ Micropipette (100µl)</li> <li>▪ Hotte ,Bec-bunsen</li> <li>▪ Distillateur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Méthanol</li> <li>▪ Ethanol</li> <li>▪ Glycérol</li> <li>▪ Acétate d'éthyle</li> <li>▪ Acide formique</li> <li>▪ Acide acétique glaciale</li> <li>▪ Butanol</li> <li>▪ Acide acétique</li> <li>▪ Chloroforme</li> <li>▪ Ammoniaque</li> <li>▪ Acide gallique</li> <li>▪ Réactif Folin-Ciocalteu</li> <li>▪ Carbonate de sodium</li> <li>▪ Eau distillée</li> <li>▪ Eau physiologique stérile</li> <li>▪ Eau Ultra-pure</li> </ul>

**Figure 01** : l'ensemble d'équipement , appareillages ,réactifs et produits chimiques

## 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 virulents ,capable de déclencher spécifiquement chez l'homme des infections spontanées ,des voies digestives ou urinaires ou bien encore des meningites 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**).

*Streptococcus agalactiae*

Egalement connu sous le nom de streptocoque de groupe B ou bêta .Est un coccus a Gram positif, non mobile, non formant de spore , catalase-négatif, sphérique ou ovoïde et moins de 2 µm (micromètre) de diamètre ; Il est habituellement -hémolytique et peut croître par paires ou chaînes courtes . *S. agalactiae* provoque une maladie envahissant principalement chez les nouveau-nés et chez les femmes en période post-partum. Les adultes atteints d'infections sévères non liées à la grossesse sont habituellement des personnes âgées et ont une maladie sous-jacente comme le diabète sucré, l'insuffisance hépatique, la malignité, le syndrome d'immunodéficience acquise ou une insuffisance rénale (**Anonyme 06**). .

*Staphylococcus saprophyticus*

Espèce Cocci à gram positive ,coagulase négative. C'est une bactérie anaérobie facultative , et se révèle être pathogène opportuniste , Responsable d'infections du tractus urinaire principalement chez la jeune femme. Elle présente une résistance naturelle à la novobiocine et à la fosfomycine . Les colonies sont non pigmentées. (**Anonyme 07**).

Définition	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Plus communément appelé staphylocoque doré. Espèce Cocci à Gram positive et catalase positive , ubiquitaire, commensal de l'homme et des animaux à sang chaud, et se révèle être pathogène opportuniste. Responsable d'infections nosocomiales, d'intoxications alimentaires et sa résistance aux antibiotiques est parfois un grand problème pour le traitement des patients ( <b>Saffidine ,2015</b> ). Cependant, éliminées dans le milieu extérieur, ces bactéries très résistantes sont fréquemment retrouvées dans l'environnement. ( <b>Anonyme 08</b> ).
<i>Staphylococcus Coagulase négative</i>	La définition du groupe hétérogène de staphylocoques coagulase-négatifs (CoNS) repose toujours sur des procédures de diagnostic qui répondent au besoin clinique de différencier <i>Staphylococcus aureus</i> et les staphylocoques classés historiquement comme étant moins ou non pathogènes. En raison des changements liés au patient et à la procédure, CoNS représente maintenant l'un des principaux agents pathogènes nosocomiales, avec <i>S. epidermidis</i> et <i>S. haemolyticus</i> étant les espèces les plus importantes. Ils concernent essentiellement les infections et les infections liées au corps étranger chez les nouveau-nés prématurés. Alors que <i>S. saprophyticus</i> a été associé à une urétrite aiguë, <i>S. lugdunensis</i> a un statut unique. En plus de CoNS trouvés comme saprophytes alimentaires, de nombreuses autres espèces de CoNS colonisent la peau et les muqueuses des humains et des animaux et sont moins fréquemment impliquées dans des infections cliniquement manifestées( <b>Karsten et al.,2014</b> ).
<i>Levure candida albicans</i>	Les levures sont typiquement unicellulaires , très souvent les cellules restent collées les unes aux autres après la division cellulaire ( <b>Fuerst .,1976</b> ) . <i>Candida albicans</i> 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 <i>candida</i> , notons le diabète , la grossesse , 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 ( <b>Pieri et Kirkiacharian., 1992</b> )

**Tableau II:** Les souches utilisées dans le test antimicrobien.



**Figure 1 :** Evaporation de solution hydroalcoolique par rotavapeur. (photo original) .



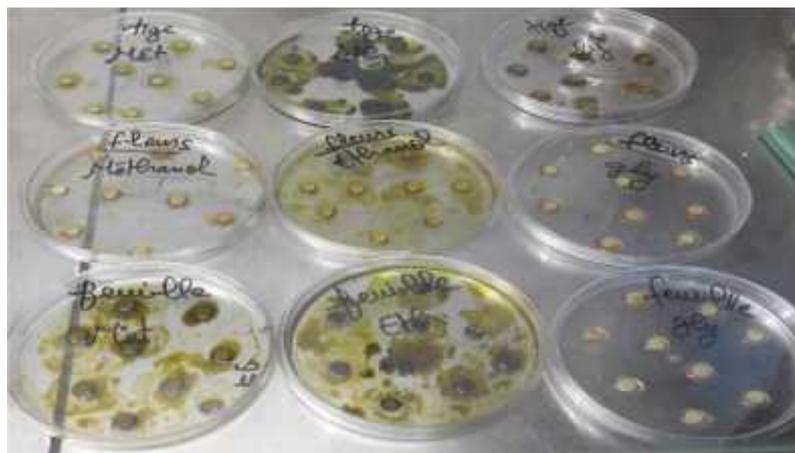
**Figure 2 :** Appareil de la CPG/SM.(Photo originale)



**Figure 3 : Coulage des boîtes pétries par le milieu de la culture (Muller-Hinton) sous la hotte . (Photo originale).**



**Figure 4 : suspensions bactériennes préparées.(Photo originale).**



**Figure 5 : Les disques préparés imprégnés par les extraits hydroalcooliques.**

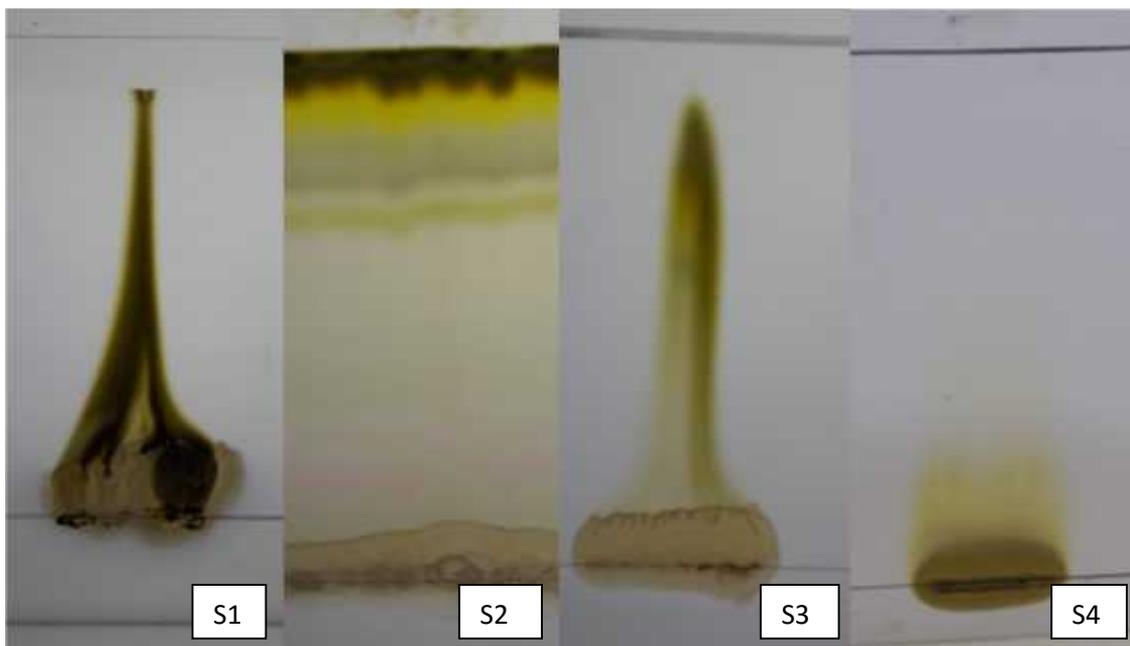
<b>Le milieu</b>	<b>Composition</b>	<b>Auteur</b>
<b>Gélose nutritif</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gélose nutritif poudre(GN) 40g</li> <li>• Agar 18g</li> <li>• Eau distillée 1000 ml</li> </ul>	CRD Sonatrach
<b>Gélose Muller-hinton</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Extrait de viande 2g</li> <li>• Peptone tryptique de caseine 17.5g</li> <li>• Amidon 1.5g</li> <li>• Agar 15g</li> <li>• Eau distillée 1000ml</li> </ul>	CRD Sonatrach
<b>Milieu Sabouraud</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptone de gélatine 10g</li> <li>• Glucose 20g</li> <li>• Agar 18g</li> <li>• Eau distillée 1000ml</li> </ul>	CRD Sonatrach

**Tableau III** : Composition des différents milieux de culture utilisés.(Photo originale).

### Annexe 3



**Figure 1 :** Les extraits polyphénolique obtenus après l'extraction par macération 120min.  
(Photo originale).



**Figure 2 :** les systèmes solvants testés dans la chromatographie sur couche mince CCM.  
(Photo originale).

## Annexe 4



**Figure 1 :** Appareillages et dispositifs utilisé :

**a)** Réfrigérateur , **b)**Spectrophotomètre UV , **c)** Balance analytique de précision , **d)** Chambre à UV 365 nm , **e)** Broyeur électrique , **f)** Agitateur magnétique , **j)** Bain à ultrason , **h)** Bain-marie  
**i)** Etuve , **g)** Incubateur , **k)** Vortex .(Photo originale).

# *Introduction*

*Synthèse  
bibliographique*



# *Matériel & méthodes*



## *Résultats & discussion*

*Conclusion &  
perspectives*

*Références  
bibliographiques*