



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
scientifique
Université Ziane Achour de Djelfa



Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Biologie

Mémoire en vue de l'obtention d'un diplôme de Magister en Biologie

Option : Biotechnologie Microbienne-Microbiologie

Thème

Mise en évidence des activités antimicrobienne et antioxydante
des extraits de *Eryngium ilicifolium* Lam. (Apiaceae) de la
Wilaya de M'sila (Algérie).

Présenté Par

Safia GACEMI

Jury :

Pr. Moukhtar Boualem LAHRECH

Université de Djelfa

Président

Dr. Mostefa DAHIA

Université de Djelfa

Rapporteur

Dr. Benalia YABRIR

Université de Djelfa

Examineur

Dr. Hicham GOUZI

Université de Laghouat

Examineur

Dr. Kamel CHERIF

Université de M'sila

Examineur

Dr. M'hammed KHADER

Université de Djelfa

Invité

2013/2014

مُلخَص

تم انجاز هذا العمل في إطار دراسة علمية تهدف إلى استخلاص المركبات الفيتوكيميائية من النوع : *Eryngium ilicifolium* المنتمي للفصيلة الكرفسية , ثم تحليلها كيميائيا و اختبار نشاطها البيولوجي. باستعمال طريقتين للاستخلاص تم الحصول على اربع انواع من النواتج : المستخلص الميثانولي (EM) من الطريقة الاولى اما الطريقة الثانية فقد اعطت نواتج بقطبية متزايدة كالتالي : مستخلص الايثير البترولي (EP), مستخلص خلات الايثيل (EA) و مستخلص البوتانول (EB) ، حيث تراوحت مردودية الاستخلاص من 1.36% الى 9.9% .

الاختبارات الفيتوكيميائية الاولى مع معايرة نواتج الايض الثانوية في المستخلصات النباتية اظهرت وجود العديد من المركبات اهمها : الفينولات (الفلافونويدات و التانات) الصابونين و كذا الزيوت الطيارة.

كشفت تقييم الفعالية المضادة للأكسدة عن طريق اختبار DPPH ان المستخلصات النباتية ذات نشاط كبير مقارنة بمضادات الاكسدة المرجعية كما بين اختبار النشاط المضاد للميكروبات ان لهذه المستخلصات فعالية ضعيفة الى منعدمة ضد البكتيريا و الخميرة على التوالي في حين انها فعالة ضد العفن.

الكلمات المفتاحية : *Eryngium ilicifolium* نواتج الايض الثانوية، التحليل الكيميائي، النشاط البيولوجي.

Résumé

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une étude scientifique qui vise l'extraction, l'analyse chimique et le test de l'activité biologique des composés phytochimiques à partir de l'espèce *Eryngium ilicifolium* Lam. qui appartient à la famille des Apiaceae. Deux procédés d'extraction ont été employés pour avoir quatre types d'extraits, l'un a donné un extrait méthanolique (EM), et l'autre a donné trois extraits de polarité croissante : l'extrait de l'éther de pétrole (EP), l'extrait d'acétate d'éthyle (EA) et l'extrait du n-butanol (EB). Les rendements des extractions ont varié entre 1.36% et 9.9%.

Les tests phytochimiques préliminaires ainsi que le dosage des métabolites secondaires dans les extraits de la plante ont montrés la présence de plusieurs groupes de métabolites secondaires avec des teneurs variées: les composés phénoliques (flavonoïdes, tanins condensés), saponines et huiles essentielles.

L'évaluation du pouvoir antioxydant par le test du DPPH a révélé une activité des extraits en comparaison avec les antioxydants de référence. Le test de l'activité antimicrobienne montre que les extraits ayant une action plus ou moins faibles contre les bactéries avec une absence d'effet sur la levure tandis que pour les moisissures les extraits ont montré une bonne activité.

Mots clés : *Eryngium ilicifolium*, métabolites secondaires, analyse chimique, activité biologique.

Abstract

This work was conducted as part of a scientific study that aims extraction, chemical analysis and testing biological activity of phytochemical compounds from the species *Eryngium ilicifolium* Lam. which belongs to the family of Apiaceae. Two extraction procedures were used for four types of samples, one gave a methanol extract (EM), and the other gave three samples of increasing polarity: petroleum ether extract (EP), ethyl acetate extract (EA) and n-butanol extract (EB). Extraction yields ranged between 1.36% and 9.9%.

Preliminary phytochemical tests and the determination of secondary metabolites in plant extracts have shown the presence of several groups of secondary metabolites with various levels: phenolic compounds (flavonoids, condensed tannins), saponins and essential oils.

The Evaluation of antioxidant activity by the DPPH test revealed that the extracts are very active by comparison with the reference antioxidants. The antimicrobial activity test showed that the extracts having more or less weak action against bacteria with an absence of effect on the yeast while the extracts showed good activity against molds.

Key words: *Eryngium ilicifolium*, secondary metabolites, chemical analysis, biological activities.

Dédicace

À mes parents, merci d'être là, Sans vous, rien n'aurait été possible, Merci pour votre soutien et votre amour...

À mes frères, Merci pour tout ...

À leila, Merci d'être toujours à côté de moi...

À tous ceux qui me sont chers.

Remerciements

Grâce à Dieu le Tout Puissant qui m'a aidé à terminer ce projet en éclairant mon chemin.

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à Monsieur Mostefa DAHIA, maitre de conférences à l'université de Djelfa, d'avoir accepté de diriger ce mémoire en assurant l'encadrement tout au long de la réalisation de cette étude ;

Mes remerciements vont à Monsieur le Professeur LAHRECH Mokhtar Boualem pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury ;

Je remercie vivement l'ensemble des membres du Jury : Dr. IBRIR Benalia., Dr. GOUZI Hicham., Dr. CHERFIF Kamel., Dr. KHADER M'hammed., qui m'ont fait grand honneur d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je veux exprimer, ici, ma respectueuse gratitude, aux enseignants de la promotion de Magister 2011- Université de Djelfa- option « biotechnologie microbienne » : Dr. Boutaiba S., Dr. Yabrir B., Dr. Hakam H., D. Rahou D., M. Imessaouden A., Pr. Hassan H., Pr. Chelghoum Ch., Pr. Hamdi M. T. et Pr. Azouzi B.

J'exprime ma reconnaissance au Dr. CHAIBI Rachid. Chef de département de biologie à l'université Ammar Telidji- Laghouat, pour toute l'aide qui m'a apportée durant mes études.

Mes vifs remerciements vont aussi à M. HADJOUJJA Moustapha, chef des laboratoires pédagogiques du département de biologie –Université de Laghouat- pour son aide précieuse dans la réalisation de ce travail.

Un grand Merci au Dr. OUINTEN Mohammed, Maitre de conférence à la faculté des sciences- Université de Laghouat-, pour son aide, ses conseils et ses encouragements tout au long de mes études.

Je tiens à remercier Pr. YOUSFI Mohammed. Directeur de l'ENS – Laghouat- ainsi que tous les membres du laboratoire de recherche sciences fondamentales de m'avoir accueillie dans leur laboratoire de recherche.

J'exprime ma profonde gratitude à M. Guit Brahim, enseignant chercheur à l'université de Djelfa pour son aide inestimable en identifiant l'espèce à étudier.

Je remercie vivement M.SIFI Ibrahim, enseignant à l'Université de Laghouat pour sa participation active à la réalisation de ce travail ainsi que pour ses encouragements et sa disponibilité.

*Mes profondes reconnaissances vont à mes amies et collègues :
Mme Fatiha Elhouiti, Melle Reguia Mahfoudi, Melle Leila Maidi, Melle Djalila Takhi, Melle Hadjer Aouissi, Mme Khadidja Benarous, Melle Hadjer Boussoussa, Melle Aicha Hamdi, Merci pour tous les moments qu'on a partagé ensemble, Merci d'être toujours là.*

Je remercie Mme et M. Belyagoubi, enseignants chercheurs à l'université de Tlemcen de m'avoir orientée et conseillée.

Je dois aussi adresser mes sincères remerciements à l'équipe des ingénieurs de laboratoires pédagogiques de biologie-Université de Laghouat- : M. Chettetha M, Melle. Ghanem K., Melle. Latrech.A, Melle. Dandane S., Melle. Aouissi F.Z., Melle Atmani R., Melle Benjarba N.

Sans oublier mes collègues, les étudiants de la PG biotechnologie microbienne 2011-2012 à l'université de Djelfa : M. ADJEROUD Moussa, Melle. MAIDI Leila, Melle. SOUIDA Zineb, M. BELKASSA Salem, Melle. BENHADDA Embarka, M. AIT-SALEM Elhosseyn, Melle. CHENOUF Nadia ; Un grand objectif nous a réunis ensemble, Merci de me donner le bon exemple d'étudiants chercheurs.

Je remercie toute personne qui a contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Table des matières

	Page
Liste des abréviations	i
Liste des tableaux	iii
Liste des figures	v
Introduction	2
I.Synthèse bibliographique	
Chapitre 1 : Les plantes médicinales	
I.1.1. La phytothérapie	6
I.1.2. La Pharmacognosie	7
I.1.3. L'ethnobotanique	7
I.1.4. L'aromathérapie	7
I.1.5. Usage des plantes médicinales	8
I.1.5.1. Récolte et conservation des plantes	8
I.1.5.2. Préparation des plantes médicinales	8
I.1.5.3. Action des plantes médicinales	10
I.1.6. La famille des Apiacées	11
I.1.6.1. L'espèce <i>Eryngium ilicifolium</i>	11
Chapitre 2 : Produits du métabolisme végétal	
I.2.1. Métabolisme primaire	13
A. Glucides	14
B. Lipides	14
C. Protéines et acides aminés	14
I.2.2. Métabolisme secondaire	14
A. Les composés phénoliques	15
B. Les huiles essentielles HE	16
C. Les alcaloïdes	17
D. Les saponines	18
Chapitre 3 : Extraction et analyse des produits naturels	
I.3.1. Extraction	20
I.3.2. analyse des produits naturels	21
A. Chromatographie en phase liquide	21
B. Chromatographie en phase gazeuse	22
Chapitre 4 : Activités biologiques des extraits végétaux	
I.4.1. Activité antioxydante	24
A. Le stress oxydant et radicaux libres	24
B. Les antioxydants de plantes	24
I.4.2. Activité antimicrobienne	25
A. Les composés phénoliques	25
B. Les huiles essentielles	25

C. Les alcaloïdes	26
D. Les saponines	27
I.4.2.1. Mode d'action des extraits végétaux	27
I.4.3. Généralités sur les souches microbiennes testées	27
I.4.3.1. Les bactéries à Gram positif	28
I.4.3.2. Les bactéries à Gram négatif	29
I.4.3.3. La levure	30
I.4.3.4. Les moisissures	30

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel biologique	33
II.1.1. L'espèce végétale étudiée	33
II.1.2. Souches microbiennes testées	34
II.2. Méthodes	34
II.2.1. Tests phytochimiques	34
II.2.1.1. Test des alcaloïdes	36
II.2.1.2. Test des flavonoïdes	36
II.2.1.3. Test des tannins	36
II.2.1.4. Test des huiles essentielles	36
II.2.1.5. Test des saponines	36
II.2.2. Extraction des principes actifs de la plante	37
II.2.2.1. Extrait brut ou méthanolique	37
II.2.2.2. Extraits de polarités différentes	37
II.2.3. Analyse quantitative de certains métabolites secondaires	38
II.2.3.1. Dosage des phénols totaux	38
II.2.3.2. Dosage des flavonoïdes	40
II.2.3.3. Dosage des tannins condensés	40
II.2.3.4. Dosage des saponines	41
II.2.4. Evaluation des activités biologiques des extraits végétaux	41
II.2.4.1. Etude de l'activité antioxydante	41
II.2.4.2. Etude de l'activité antimicrobienne des extraits	43
II.2.4.2.1. Tests confirmatifs	43
a. Coloration de Gram	43
b. Isolement sur milieu sélectif	43
c. Galerie biochimique	43
d. Test de l'antibiogramme	46
II.2.4.2.2. Tests de l'activité antimicrobienne	47
A. La méthode de diffusion sur gélose	47
B. La concentration minimale inhibitrice et bactéricide (CMI, CMB)	48
C. Méthode de contact direct en milieu solide	48
II.2.5. Traitement des résultats	50

III. Résultat et discussion

III.1. Tests phytochimiques	52
III.2. Rendements des extractions	53

III.2.1. Extrait méthanoliques (EM)	53
III.2.2. Extraits des solvants de polarité croissante EP, EA et EB	53
III.3. Dosage des métabolites secondaires	55
III.3.1. Dosage des composés phénoliques	55
III.3.2. Dosage des flavonoïdes	57
III.3.3. Dosage des tannins condensés	58
III.3.4. Dosage des saponines	60
III.4. Le pouvoir antioxydant des extraits	61
III.5. Activité antimicrobienne des extraits	65
III.5.1. Résultats des tests confirmatifs sur les souches microbiennes	65
A. Coloration de Gram et isolement sur milieux sélectifs	65
B. Galerie biochimique	65
C. L'antibiogramme	66
III.5.2. Le choix du solvant	68
III.5.3. Résultat du test de la diffusion sur gélose	69
III.5.3.1. Effet de l'extrait méthanolique EM	69
III.5.3.2. Effet de l'extrait d'éther de pétrole EP	72
III.5.3.3. Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle EA	74
III.5.3.4. Effet de l'extrait du n-butanol EB	78
III.5.4. Résultat du test du pouvoir antibactérien sur milieu liquide (CMI et CMB)	81
III.5.5. Evaluation du pouvoir antifongique par contact direct sur milieu solide	82
Conclusion	89
Références bibliographiques	92
Annexe	

Liste des abréviations

% : pourcentage.

[] : Concentration.

°C : degré Celsius.

µg : microgramme.

µl : microlitre.

ADH : Arginine Déshydrogénase.

C : Carbone.

CCM : Chromatographie sur Couche Mince.

CMB : Concentration Minimale Bactéricide.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

EA : Extrait d'Acétate d'éthyle.

EB : Extrait du n-Butanol.

EC₅₀ : Concentration qui correspond à la réduction de 50% des radicaux libres DPPH dans le milieu réactionnel.

ED : édition.

EM : Extrait Méthanolique.

EP : Extrait d'éther de Pétrole.

EtOH : éthanol.

G- : Gram négatif.

g : gramme.

G+ : Gram positif.

h : heure.

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène.

H₂S : hydrogène sulfuré

HCl : Acide Chlorhydrique.

HE : Huile Essentielle.

HPLC : Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance.

IPA : Institut Pasteur d'Alger.

kg : killogramme.
Km : Killomètre.
LDC: Lysine Décarboxylase.
M : Molaire.
MeOH : méthanol.
mg : milligramme.
ml : millilitre.
mm : millimètre.
mM : millimolaire.
MRSA : methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
MSSA : methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*.
N : normale.
N°: numéro.
nm : nanomètre.
O₂: Oxygène.
ODC: Ornithine Décarboxylase.
ONPG: Orthonitrophényl β-D-galactosidase.
P, p: page.
PDA: Potato Dextrose Agar
PV : Produit Végétal.
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.
SM : Spectroscopie de Masse.
TSI : Tri Sugar Iron
UV-vis : Ultraviolet-visible.
v : volume.
Vit C : Vitamine C.
Vit E : Vitamine E.

Liste des Tableaux

	Page
Tableau 1: Récolte et conservation de différentes parties du végétal	8
Tableau 2: Quelques exemples des plantes médicinales et leurs effets	10
Tableau 3: Activités antimicrobiennes des composés phénolique	26
Tableau 4: Souches microbiennes avec référence et provenance	35
Tableau 5: Milieux de culture utilisés (de sélection et d'étude).	44
Tableau 6: Tests biochimiques réalisés sur les souches bactériennes	45
Tableau 7: Les antibiotiques utilisés dans les antibiogrammes.....	46
Tableau 8: Concentrations finales des extraits végétaux (mg/ml) dans le milieu de culture ..	49
Tableau 9: Tests de la présence des métabolites secondaires dans le matériel végétal	52
Tableau 10: Les extraits obtenus avec rendements.....	54
Tableau 11: Teneur des différents extraits en phénols totaux.....	56
Tableau 12: Teneur des extraits végétaux en flavonoïdes.....	58
Tableau 13: Teneur des extraits en tannins condensés	59
Tableau 14: Teneur des extraits EM et EB en saponines	60
Tableau 15: Valeurs des EC ₅₀ en µg/ml des extraits et molécules standards.	63
Tableau 16: Comparaison entre l'EC ₅₀ de EM et ceux des espèces du même genre	65
Tableau 17: Quelques caractéristiques morphologiques et biochimiques des souches microbiennes.....	66
Tableau 18: Résultat des antibiogrammes des souches bactériennes.....	67
Tableau 19: Diamètres des zones d'inhibition de différentes concentrations de l'extrait EM	69
Tableau 20: Diamètres des zones d'inhibition de différentes concentrations de l'extrait EP sur les souches microbienne testées.....	72
Tableau 21: Diamètres des zones d'inhibition de différentes concentrations de l'extrait EA sur les souches microbiennes testées.....	75
Tableau 22 : Diamètres des zones d'inhibition de différentes concentrations de l'extrait EB sur les souches microbiennes testées	78
Tableau 23: Pouvoir antibactérien des extraits EB et EA en contact direct sur milieu liquide.....	81

Tableau 24: Pouvoir antifongique des extraits de la plante *Eryngium ilicifolium*83

Liste des Figures

	Page
Figure 1 : Structure de base des composés phénoliques.....	15
Figure 2 : Photos de <i>Eryngium ilicifolium</i> , au site du prélèvement.....	33
Figure 3 : Image satellitaire de la région de la récolte du matériel végétal (Google Maps, 2014)	34
Figure 4 : Représentation du protocole d'extraction de EM	37
Figure 5 : Procédure d'extraction de EP, EA et EB	39
Figure 6 : Structure du DPPH, 1 : radical libre ; 2 : molécule liée	42
Figure 7 : Teneur de la plante en différents extraits	55
Figure 8 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	55
Figure 9 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	57
Figure 10 : Courbe d'étalonnage de la catéchine	59
Figure 11 : Courbe d'étalonnage de la digitonine	60
Figure 12 : Représentation graphique du pourcentage d'inhibition (PI) en fonction de la concentration des extraits : (1) l'extrait EM, (2) l'extrait EP, (3) l'extrait EA, (4) l'extrait EB..	62
Figure 13 : Représentation graphique des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des molécules standards, (a) : vitamine E (l' α -tocophérol) ; (b) : vitamine C (l'acide ascorbique)	63
Figure 14 : Valeurs des EC ₅₀ de molécules standards et extraits de la plante <i>Eryngium ilicifolium</i> par le test DPPH.....	63
Figure 15 : Effet des antibiotiques sur les bactéries à Gram positif.....	67
Figure 16 : Effet des antibiotiques sur les bactéries à Gram négatif.....	68
Figure 17 : Effet du Tween 80 sur la croissance des bactéries	68
Figure 18 : Effet du DMSO sur la croissance bactérienne	69
Figure 19 : Effet de l'extrait EM sur la croissance bactérienne avec différentes concentrations ; (a) : 3mg/disque ; (b) : 1mg/disque ; (c) : 0.5mg/ml.....	70
Figure 20 : Absence d'activité sur la levure avec les trois concentrations de l'extrait EM	71
Figure 21 : Sensibilité des microorganismes à l'extrait EM	71
Figure 22 : Sensibilité des microorganismes à l'extrait EP.....	73

Figure 23: Effet de l'extrait EP sur la croissance bactérienne avec différentes concentrations ; (a) : 3mg/disque ; (b) : 1mg/disque	74
Figure 24: Pouvoir antibactérien de l'extrait EA avec la concentration 3mg par disque.....	76
Figure 25: Sensibilité des microorganismes à l'extrait EA.....	77
Figure 26: Sensibilité des microorganismes à l'extrait EB.....	79
Figure 27: Effet de l'extrait EB sur la croissance bactérienne avec différentes concentrations ; (a) : 3mg/disque ; (b) : 1mg/disque ; (c) : 0.5mg/disque.....	80
Figure 28: Séries des cultures de différentes dilutions pour tester l'activité antimicrobienne de l'extrait EA sur la souche <i>Bacillus cereus</i> avec T : témoin.....	81
Figure 29: Pouvoir antifongique de l'extrait EA avec les concentrations : 2.5, 1 et 0.5 mg/ml sur les deux espèces étudiées ; T : témoin.....	84
Figure 30: Pouvoir antifongique de l'extrait EB avec les concentrations : (a) 1, 4 et 6 mg/ml ;(b) : 1, 2,4 et 6 mg/ml sur les deux espèces étudiées ; T : témoin.....	85
Figure 31: Pouvoir antifongique de l'extrait EM avec les concentrations ; (a) 2.5 et 5 mg/ml ; (b) : 2.5, 5 et 8 mg/ml sur les deux espèces étudiées ; T : témoin.....	86
Figure 32: Pouvoir antifongique de l'extrait EP avec les concentrations : 8 et 10 mg/ml sur les deux espèces étudiées ; T : témoin.....	86

Introduction

Les plantes médicinales ont formé la base des soins de santé dans le monde depuis des milliers d'années, encore largement utilisées, et continueront de fournir l'humanité avec de nouveaux remèdes (Ahmad et *al.*, 2006 ; Gurib-Fakim, 2006). La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme (Iserin, 2001).

Environ 25% des médicaments prescrits dans le monde proviennent de plantes, parmi les 252 médicaments considérés comme fondamentaux et essentiels par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 11% sont exclusivement d'origine végétale (Rates, 2001), selon la même organisation, plus de 80% des populations africaines ont recours à la médecine et à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de santé. Le continent africain regorge de plantes médicinales très diversifiées ; en effet, sur les 300.000 espèces végétales recensées sur la planète plus de 200.000 espèces vivent dans les pays tropicaux d'Afrique et ont des vertus médicinales (salhi, 2010).

Les médications traditionnelles et l'utilisation des plantes en médecine empirique ont souvent été à l'origine de recherches scientifiques de haut niveau. Dans la plupart des cas, ces recherches aboutissent à la découverte de substances originales présentant un intérêt thérapeutique considérable, la plupart de ces substances sont des métabolites secondaires, ces derniers normalement synthétisés par les plantes comme un mécanisme de défense contre les agents biologiques : microorganismes, insectes et herbivores ou bien de protection contre les agents physiques (exemple : rayonnements ultras violet) (Zhiri et Baudoux , 2005 ; Macheix et *al.*, 2006 ; Negi, 2014).

C'est ainsi que dans le cadre de la recherche de l'activité biologique des plantes, ce travail a été réalisé, en se basant sur le test du pouvoir antimicrobien face aux espèces biologiques pathogènes, et le test du pouvoir antioxydant face à une espèce chimique oxygénée réactive, avec la prise en considération dans le choix de l'espèce végétale le nombre d'études réalisé dans ce sens.

L'espèce choisie pour l'étude est *Eryngium ilicifolium* Lam. cette dernière appartient à la famille des Apiaceae, et au genre *Eryngium*, selon Wang et *al.* (2012) ce genre comporte 250 espèces réparties en Europe, Afrique du Nord, Amérique du sud et en Australie.

Jusqu'aujourd'hui il y a seulement 23 espèces qui ont été plus au moins étudiées phytochimiquement avec un isolement d'au moins 127 composés, qui représentent essentiellement : les composés phénoliques y compris des flavonoïdes, des coumarines et les saponines triterpéniques, les stéroïdes...etc ; sachant que la seule étude sur cette espèce était faite par Warda *et al.* (2009) au Maroc, mais en Algérie, parmi les dernières études qui ont été faites sur *Eryngium* sont celles de Kholkhal *et al.* (2012) et Khalfallah *et al.* (2014).

Notre étude est divisée en deux grandes parties suivant l'objectif planifié ci-dessus :

Partie théorique : sous forme d'une synthèse bibliographique regroupant des généralités sur la phytothérapie, les principaux groupes du métabolisme végétal et finalement une petite recherche sur l'activité biologique des extraits végétaux à partir des plantes.

Partie expérimentale : c'est le bilan des expériences réalisées au laboratoire afin d'explorer les activités biologique des extraits de la plante *Eryngium ilicifolium*, suivant les étapes citées ci-dessous :

- Une analyse qualitative et quantitative des métabolites secondaires dans les extraits de la plante.
- Extraction des principes actifs par l'emploi de deux techniques d'extraction pour l'obtention de quatre extraits dans le but de comparer les activités biologiques de ces derniers.
- Un test de l'activité antioxydante par la méthode du piégeage du radical libre DPPH.
- Un test de l'activité antimicrobienne par trois méthodes : diffusion sur gélose et contact direct en milieu liquide pour dix souches bactériennes (Gram positif et négatif) et une levure, la troisième méthode est celle du contact direct en milieu solide pour tester l'activité antifongique des extraits de la plante contre deux souches phytopathogènes.
- A la fin, nous terminerons par une conclusion avec perspectives, dont on souhaite continuer cette recherche dans plusieurs domaines de la biologie.

Synthèse Bibliographique

Chapitre 1

Les plantes médicinales

L'Homme s'est toujours intéressé aux plantes, qui ont constitué pour lui une source de nourriture (plantes comestibles ou poisons pour la chasse), voir un moyen de guérir ses maladies (plantes médicinales) (Wichl et Anton, 1999). Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuse (Farnsworth et *al.*, 1986). En 1991 Fellows a donné une citation pour l'appellation plante médicinale : « Lorsque le terme médicinal est appliqué à une plante, il indique qu'elle contient une substance qui module la physiologie des mammifères malades, et qu'elle a été utilisé par l'homme à cette fin » (Lewington, 1993).

Il est estimé qu'il existe 250 000 à 500 000 espèces de plantes sur Terre. Un pourcentage relativement faible (1 à 10%) de ceux-ci est utilisé comme aliments par les humains et les autres espèces animales (Cowan, 1990), et seulement une petite proportion qui a été étudiée d'un point de vue phytochimique et pharmacologiques (Hostettmann, 1999 ; Gurib-Fakim, 2006).

Selon Reguieg (2011), l'Algérie, grâce à ses différentes zones bioclimatiques (humide, sub-humide, semi-aride, aride ou désertique) avec hivers froids, humides, doux et secs; et sa situation géographique, occupe une place privilégiée pour l'exploitation, culture, production et exportation de plantes médicinales très divers dans leur état brut ou transformé. Le même auteur a cité deux principaux groupes de plantes médicinales utilisées en Algérie,

Groupe 1: Avec très peu d'espèces sauvages, très peu exigeant et poussent de plus en plus dans des sols très diversifiée et régions climatiques allant de la zone sub-humide pas loin de la côte méditerranéenne (moutarde, camomille, lavande) au zones arides et semi arides de l'extrême sud avec un climat chaud et sec (armoïse).

Groupe 2: Ce groupe comprend des espèces exigeantes principalement de l'eau et de l'engrais (de menthe, verveine, romarin).

I.1.1. La phytothérapie

Goetz (2013) définit La phytothérapie comme étant le traitement par des plantes dont une ou plusieurs parties contiennent des substances agissant sur une ou plusieurs pathologies ou sur un ou plusieurs symptômes.

Hammiche et *al.* (2013) a cité que la phytothérapie peut s'agir de :

- traitement traditionnel relevant d'une pratique empirique ancestrale, très présente dans les pays en voie de développement et sans assise scientifique conventionnelle.
- ou également, de l'emploi d'extraits actifs identifiés et standardisés, souvent, soumis à une autorisation de mise sur le marché sous la désignation de phytomédicaments.

N'oublions pas que de tout temps, à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont eu que les plantes pour se soigner (guérir des maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria) et pour cela, des centres de formation ont été créés en phytothérapie (dans des universités ou dans des institutions privées) par des médecins et des professeurs dynamiques (Iserin, 2001).

I.1.2. La Pharmacognosie

La pharmacognosie a été inventée par la fusion de deux mots grecs Pharmakon (drogue ou médicament) et Gnos (connaissance), c'est une discipline fondée sur la connaissance scientifique des matières premières et des substances naturelles de l'environnement qui ont été sélectionnées au cours des siècles pour la thérapeutique ou qui ont fait leurs preuves cliniques dans la médecine actuelle (Wichtl et Anton, 1999 ; Kar, 2007).

Cette science est fortement liée à la botanique et à la chimie des plantes, en effet, ces deux disciplines sont l'origine des dernières études sur les plantes médicinales (Evans et al., 2002).

I.1.3. L'ethnobotanique

C'est l'américain J. W. Harshberger qui fut le premier chercheur à proposer, en 1895, le terme "ethnobotany" pour désigner l'étude des plantes utilisées par les populations autochtones (Bellakhdar, 2008).

I.1.4. L'Aromathérapie

Le terme s'applique à l'utilisation d'essences naturelles extraites naturellement de plantes aromatiques dans le traitement d'un large spectre de maladies et comme un moyen

pour équilibrer et promouvoir la santé du corps et de l'esprit (Evans et *al.*, 2002 ; Emerson, 2004).

I.1.5. Usage des plantes médicinales

I.1.5.1. Récolte et conservation des plantes

Selon Baba Aissa (1999) et Nogaret-Ehrhart (2003), l'efficacité de la plante dépend nécessairement de sa récolte et de sa conservation.

Concernant la récolte, plusieurs éléments interviennent : l'âge de la plante, l'époque de l'année, et les parties de la plante à récolter (Tableau 1).

Tableau 1 : Récolte et conservation de différentes parties du végétal.

(Baba Aissa, 1999 ; Nogaret-Ehrhart, 2003)

Partie de la plante	Récolte	Conservation ¹
Plantes herbacées	Les feuilles récoltées avant l'épanouissement des fleurs	Sous forme de petits bouquets, séchage à l'abri de la lumière, endroit aéré.
Feuilles	Jeunes pousses riches en principes actifs	séchage à l'abri de la lumière, dans un endroit aéré
Flleurs	Période de floraison	Nettoyage et séchage à l'abri de la lumière, dans un endroit aéré
Racines et rhizomes	En dehors de la période de végétation	Après être lavés, découpés sont séchés à l'air sec ou au four
Graines	Avant de tomber sur le sol	Séchage
Ecorce ou bois	Récupérés sur des branches coupées des arbres ou des robustes	Séchage au soleil ou à l'étuve
Suc ou gel	Recueillies sur des tiges ou feuilles charnus	Conservés dans des récipients

¹ : se fait dans des sacs en papier ou dans des bocaux.

I.1.5.2. Préparation des plantes médicinales

En phytothérapie, il y a plusieurs modes de préparation des plantes, selon l'usage que l'on veut en faire (Morigane, 2007).

❖ **L'Infusion**

Elle est obtenue en plongeant une plante pendant une durée de 5 à 15 minutes (selon la plante) dans de l'eau bouillante dans un récipient couvert, ce procédé s'applique aux feuilles, aux fleurs, aux fruits tendres et aux parties aériennes ainsi qu'à certaines parties corticales et aux racines fragmentées (Nogaret-Ehrhart, 2003 ; Morigane, 2007 ; Chabrier, 2010 ; Uperty et *al.*, 2012).

❖ **La Décoction**

Les parties de plantes sont bouillies dans l'eau pendant plusieurs minutes et l'extrait est utilisé, plus d'une espèce de plante peuvent être utilisés en mélange. (Uperty et *al.*, 2012).

❖ **La Macération**

La macération consiste à faire tremper les plantes dans un solvant (eau, vin, alcool ou huile à température ambiante pendant une durée de 30 minutes à 48 heures, cette méthode permet une extraction douce des principes actifs, surtout lorsqu'ils sont thermolabiles il suffit de filtrer le mélange à travers un filtre papier, ou du coton hydrophile non tissé, le produit obtenu est le macérât (Nogaret-Ehrhart, 2003 ; Morigane, 2007 ; Chabrier, 2010).

❖ **Les Extraits**

C'est l'extraction d'une grande partie des principes actifs ou l'épuisement (Cazau-Beyret, 2013). Il existe différents types d'extraits :

- L'extrait fluide s'obtient en plongeant une plante dans une masse d'eau ou d'alcool égale à plusieurs fois la masse de plantes, puis en laissant s'évaporer jusqu'à ce que le poids du liquide soit égal à celui de la masse de plante initiale.
- L'extrait mou, est basé sur le même principe, sauf que l'on pousse l'évaporation jusqu'à ce que le produit ait la consistance du miel.

❖ **l'Alcoolature et teinture**

La teinture officinale est une macération à froid de plantes sèches dans de l'alcool suivie d'une filtration. L'alcoolature et la teinture mère sont des macérations alcooliques de plantes fraîches (Cazau-Beyret, 2013).

❖ **L'Huile et l'Huile Essentielle**

À température douce (voire tiède) et pendant 3 semaines, la moitié d'un bocal rempli de plantes fraîches ou sèches ou de racines broyées est macérée, dans de l'huile remplissant le reste du bocal (Morigane, 2007).

La majorité des huiles essentielles sont obtenues par distillation par entraînement à la vapeur d'eau sous basse pression (Zhiri et Baudoux, 2005).

❖ **Le Cataplasme**

Le cataplasme s'obtient en broyant la plante fraîche, et en l'appliquant ensuite sur la zone à traiter (Nogaret-Ehrhart, 2003 ; Morgane, 2007).

I.1.5.3. Action des plantes médicinales

L'action des plantes sur l'organisme dépend de la composition des plantes, on considère les plantes et leurs effets en fonction de leurs principes actifs (Tableau 2) (1 : Baba Aissa, 1999 ; Wichtl et Anton, 1999 ; Isern, 2001 ; 2004 حليمي).

Tableau 2 : Quelques exemples des plantes médicinales et leurs effets¹.

Action	Plante	Principes actifs
La Peau	Ricin <i>Ricinus communis</i>	Alcaloïdes, huiles et acides.
Système nerveux	Mélisse <i>Melissa officinalis</i> Menthe poivrée <i>Mentha piperita</i>	Huiles essentielles
Système respiratoire	Eucalyptus <i>Eucalypti folium</i>	Huiles essentielles, tannins
La circulation et le cœur	La sauge <i>Salvia officinalis</i>	Composés phénoliques, tannins et huiles essentielles
L'appareil digestif	Réglisse officinale <i>Glycyrrhiza glabra</i>	Saponines, flavonoïdes.
Système musculaire	Jasmin sauvage <i>Celsemium sempervirens</i>	Alcaloïdes, tannins et coumarines.
Système urinaire	Pin maritime <i>Pinus maritima</i>	Huile essentielle, glucosides.

I.1.6. La famille des Apiacées

Selon Judd et *al.* (2002), cette famille regroupe des plantes herbacées à lianes, buissons ou arbres, aromatique ; tiges à entre-nœuds souvent creux ; à canaux sécréteurs contenant des huiles essentielles et des résines, des saponines triterpéniques, des coumarines, des polyacétylènes falcarinone, des monoterpènes et des sesquiterpènes.

Les principaux genres de cette famille sont : *Schefflera* (600 spp.), *Eryngium* (230), *Polycias* (200)... avec un nombre de 460 genres divisés en 4250 espèces, la quasi-totalité de ces dernières sont cosmopolites, diversifiées depuis les régions tropicales jusqu'aux régions tempérées ainsi que de nombreuses plantes alimentaires et aromatiques appartiennent aux apiacées : *Anethum* (l'aneth), *Apium* (le céleri), *Carum* (le carvi), *Cuminum* (le cumin), *Daucus* (la carotte), *Foeniculum* (le fenouil), *Petroselinum* (le persil) (Dupont et Guignard., 2012).

Le genre *Eryngium*, dérivé d'un mot grec, le nom générique est dû aux propriétés des racines de cette plante, qui, faisant « éructer », avaient la réputation de faciliter la digestion (Beniston et Beniston, 1984). Selon Calvino et *al.* (2008) c' est le plus grand genre et sans doute le plus complexe sur le plan taxonomique de la famille Apiaceae.

En Algérie Quezel et Santa (1963) limitent le nombre du genre *Eryngium* en 55 genres et 130 espèces dans la flore Algérie.

I.1.6.1. L'espèce *Eryngium ilicifolium*

❖ Description botanique

C'est une espèce annuelle à tiges ramifiées. Les feuilles sont épaisses et épineuses, et sont de la base larges et moins épineuses que celles des tiges. Le dessous des feuilles comporte des nervures saillantes. Les fleurs sans tige sont regroupées en ombelles terminales très denses, elles sont en partie cachées par les feuilles (Ozenda, 1991).

❖ Répartition géographique

Espèce trouvée en d'autres régions d'Algérie et du Maghreb, *E. ilicifolium* Lam., à aire de répartition ibéro-maurétanienne, présente en Espagne, en Algérie, au Maroc et en Maurétanie. En Algérie, souvent dénommée *keffeldib*; au Maroc: *zerriga*, ou *sûka serqa* – pour son aspect épineux et bleuté, en été, lorsqu'elle est sèche- (Bellakhdar, 1997).

Panicaut en français, en Algérie, elle est très commune dans la zone littorale, les plaines littorales et l'Atlas tellien de l'Oranais, ainsi que dans les Hauts Plateaux, assez rare dans le nord du Sahara et rare ailleurs. Elle pousse surtout dans les steppes et les pâturages désertiques (Quezel et Santa, 1963 ; Ait Youcef, 2006).

Dans son étude sur les groupements végétaux de Bousaada, Kaabèche (1990) signale que *E.ilicifolium* appartient à un groupe lié à un taux d'argile moins important compris entre 10 et 20 % , limon fin entre 10 et 30 % , limon grossier 08 et 20 % , sable fin entre 30 et 40 % , un sol peu important de 5 à 10 cm de profondeur.

❖ Classification de l'espèce (Dupont et Guignard, 2012).

- Règne : plantae.
- Sous règne : Tracheobionta.
- Division : Magnoliophyta.
- Classe : Magnoliopsida.
- Ordre : Apiales.
- Famille : Apiaceae.
- Genre : *Eryngium*.
- Espèce : *Eryngium ilicifolium*. Lam.

Nom commun arabe : *keffeldib* كف الذيب (Bellakhdar, 1997).

❖ Usage de la plante

L'espèce est utilisée en médecine traditionnelle sous forme de décoction pour le traitement des désordres digestifs, gastrites, le refroidissement, aphrodisiaque ; comme cataplasme pour le froid et rhume, arthrite rhumatoïde ; gargarisme dans le cas de pharyngite et laryngite (El-Rhaffari et Zaid, 2002). La racine de *E. ilicifolium* Lam. est employée au Sahara occidental, en usage interne, soit réduite en poudre, soit sous forme de décocté, comme diurétique et dépuratif, éménagogue et comme spermatogène (Ait Youcef, 2006).

Chapitre 2

Produits du métabolisme végétal

Selon Croteau (2000), les plantes produisent un assortiment vaste et diversifié de composés organiques, qui sont indispensables à la croissance et au développement du végétal (métabolites primaires) ou autres (métabolites secondaires) ayant un rôle spécifique pour chaque plante

I.2.1. Métabolisme primaire

Les métabolites primaires, tel que les phyto-stérois, les lipides d'acyle, des nucléotides, des acides aminés et des acides organiques, sont trouvés dans toutes les plantes et jouent des rôles métaboliques qui sont essentielles et habituellement évident pour la croissance et le développement du végétal (Croteau, 2000).

Suivant Briemann et *al.* (2006) et Bruneton (2009), nous citons :

A. Glucides

Ils existent dans les plantes sous plusieurs formes :

- ✓ De stock : Amidon.
- ✓ Utilisés : saccharose.
- ✓ Polymérisés : cellulose.
- ✓ Après combinaison, ils forment les glucosides (groupes fondamentaux des autres produits naturels : phénols, terpènes et alcaloïdes).

B. Lipides

Ce sont des esters d'acide gras et d'alcool ou d'autres polyols, ils jouent un rôle fondamental dans les organismes végétaux, on distingue :

- ✓ Lipides simples.
- ✓ Lipides complexes : phospholipides et glycolipides.

C. Protéines et acides aminés

Les acides aminés sont les unités de base de la structure des protéines, ces dernières qui jouent un rôle structural et fonctionnel (enzymes) très important dans l'organisme vivant ainsi qu'ils donnent naissance à une large variété de métabolites secondaires.

I.2.2. Métabolisme secondaire

Selon Croteau (2000) et Judd et *al.* (2002), sont des molécules qui ne semblent pas participer directement à la croissance et au développement du végétal et souvent différemment répartis d'une façon limitée entre les groupes taxonomiques dans le règne végétal. Leurs fonctions, dont beaucoup restent inconnus, c'est qu'elles interviennent

dans la défense contre les prédateurs et les pathogènes ou pour attirer les agents chargés de la pollinisation ou de la dissémination des fruits.

On sait maintenant que les métabolites secondaires sont importants pour la survie et la propagation des plantes qui les produisent, ils sont produits dans une partie de la plante, stockés dans une autre et à des différents stades particuliers de développement (Raven et *al.*, 2007).

Nous citons ici les grands groupes de métabolites secondaires qui sont largement étudiés, et qui ont aussi un intérêt biologique.

A. Les composés phénoliques

Tous les végétaux contiennent des composés phénoliques mais, comme c'est le cas pour la plupart des substances naturelles qualifiées de métabolites secondaires, leur répartition qualitative et quantitative est inégale selon les espèces, les organes, les tissus et les stades physiologiques (Macheix et *al.*, 2005 ; Macheix et *al.*, 2006).

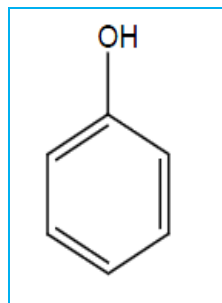


Figure 1 : Structure de base des composés phénoliques (Macheix et *al.*, 2006).

L'élément fondamental de la structure de ces composés qui les caractérisent, c'est la présence d'un noyau benzénique, auquel sont liés un ou plusieurs groupements hydroxyles (Figure 1), libres ou liés encore avec une autre fonction : éther, ester, hétéroside (Vermerris, 2006 ; Bruneton, 2009).

Les composés phénoliques sont un large groupe de composés chimiques de structure diverse, ce qui explique l'existence de plusieurs modes de classification (Vermerris, 2006), l'une de ces classification est celle de Harborne et Simmonds (1964) ; Macheix et *al.* (2006) en se basant sur le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base, parmi ces classes nous avons :

- Les phénols simples (C₆)
- Les coumarines (C₆-C₃)
- Les flavonoïdes (Flavonols, Anthocyanes, Flavonones) (C₆-C₃-C₆)
- Les tannins (C₁₅)_n

➤ **Rôle**

Macheix et *al.* (2005) ; Macheix et *al.* (2006) ont cités plusieurs rôles que jouent les polyphénols dans la physiologie du végétal ou bien dans ses interactions avec l'environnement, de ce fait ils participent :

- ✓ À la rigidification des parois cellulaires des vaisseaux du bois (la lignine). Cela permet d'une part la conduction de la sève brute à l'intérieur de la plante et d'autre part la formation d'une structure rigide qui participe au port dressé des végétaux ligneux.
- ✓ Au maintien de l'équilibre oxydo-réduction des cellules. Aussi ils sont impliqués dans certaines réactions d'oxydoréduction qui se déroulent soit dans la mitochondrie au cours de la respiration soit dans le chloroplaste pendant la photosynthèse.
- ✓ A l'attraction de certains oiseaux et insectes qui sont sensibles à certaines couleurs produites par des pigments de nature phénolique (anthocyanes, flavonols, pigments bruns).
- ✓ A la protection des végétaux contre le rayonnement solaire parce que tous les composés phénoliques absorbent les rayonnements UV.
- ✓ Aux interactions entre plantes et microorganismes ainsi que la régulation des gènes de nodulation chez les bactéries symbiotiques du genre *Rhizobium* fait intervenir des flavonoïdes.

B. Les huiles essentielles HE

Chaque fois que, après avoir écrasé un pétale de fleur, une branchette, ou une quelconque partie d'une plante, un parfum se dégage, cela signifie qu'une huile essentielle s'est libérée (Padrini et Lucheroni, 1996). Ce sont des substances organiques aromatiques liquides qu'on trouve naturellement dans diverses parties des arbres, des plantes, des

épices, etc. Elles sont très concentrées, volatiles, non huileuses et sensibles à la décomposition sous l'effet de la chaleur (Turgeon, 2001).

Pour la 8^{ème} édition de la pharmacopée française (1965), « les huiles essentielles =essence=huiles volatiles » sont : des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatiles contenus dans les végétaux (Bruneton, 2009).

Les HE peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs (bergamotier, tubéreuse), mais aussi feuilles (citronnelle, eucalyptus) et bien que cela soit moins habituel, dans les écorces (cannelier), des bois (bois de rose), des racines (vétiver), des rhizomes (gingembre), des fruits (anis, badiane), des graines (muscade) (Afssaps, 2008).

Les HE sont des mélanges complexes qui appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes qui sont d'une part : les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée (monoterpènes C_{10} et sesquiterpènes C_{15}), et d'autre part les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Bruneton, 2009).

➤ **Rôle**

Les HE ayant de multiples fonctions possibles (protection contre les prédateurs de la plante, attraction des insectes pollinisateurs, inhibition de la multiplication des bactéries et des champignons). Il est souvent difficile de les préciser pour chaque cas particulier (Richter, 1993)

L'utilité des HE pour les plantes désertiques, a été rattachée à la conservation d'une humidité indispensable à la vie des plantes, exposée à des climats désertiques (Belaiche, 1979).

C. Les alcaloïdes

Ils constituent l'une des catégories les plus larges de produits naturels, étant synthétisé pratiquement par tous les organismes vivants (Fattorusso et Tagliatela-Scafati, 2008). Ce sont des composés à faible poids moléculaire contenant de l'azote et trouvés dans environ 20 % des espèces de plantes (Facchini, 2001).

Des médicaments couramment utilisés aujourd'hui sont à base des alcaloïdes. Les exemples communs incluent la caféine, la quinine et la nicotine. Des exemples plus puissants peuvent inclure la cocaïne, la morphine et la strychnine (Briemann et *al.*, 2006 ; Fattorusso et Tagliatela-Scafati, 2008).

Les alcaloïdes ont une structure complexe, ils sont des composés basiques dérivés d'acides aminés qui contiennent un ou plusieurs atomes d'azote hétérocycliques (Bruneton, 2009 ; HarinderMakar, 2007).

➤ **Rôle**

Parmi les fonctions de ces molécules est d'intervenir dans les relations plantes-prédateurs (protection) mais jusqu'à aujourd'hui, la détermination de la fonction des alcaloïdes dans la plante reste incomplète (Bruneton, 2009).

D. Les saponines

Une petite étude bibliographique sur les saponines dans Briemann et *al.* (2006) ; HarinderMakar (2007) ; Bruneton (2009) ; Cheon et *al.* (2014), est résumée dans les paragraphes ci-dessous.

Ce sont des substances largement distribués dans le règne végétal, en général ils ont les propriétés d'un détergent et ils forment facilement la mousse dans l'eau, beaucoup de plantes pendant longtemps, ont été utilisé comme savons contiennent les saponines, ainsi qu'ils sont connus par leur toxicité aux animaux à sang froid.

Les saponines constituent un ensemble des glycosides de haut poids moléculaire contenant un groupement glycone (sucre : pentoses, hexoses, ou acide uronique) et aglycone ou génine, et selon la nature de ce dernier ils sont classés en deux groupes :

-Saponines à géninestéroïdique

-Saponines à géninetrirpènique

➤ **Rôle**

Des études effectuées sur plusieurs espèces végétales ont montré l'intervention des saponines dans la résistance de la plante contre les champignons phytopathogènes, les bactéries et des insectes prédateurs.

Chapitre 3

Extraction et analyse des produits naturels

I.3.1. Extraction

Ceske et *al.* (2006) a signalé que contrairement aux méthodes traditionnelles, Les méthodes modernes de séparation de produits naturels utilisent des principes de l'extraction qui sont basées sur la polarité (solubilité relative dans les solvants organiques), la solubilité dans l'eau, et de différentes solubilités à base des sels et du pH (acidité ou alcalinité relative).

Vue que l'extraction est un ensemble de techniques très variés , parfois complexes et précises qui cible l'obtention d'un groupe de métabolites bien déterminé, nous avons préféré dans cette partie de détailler les techniques d'extraction suivantes :

Extraction par solvants aqueux et organiques

Tiwari (2011) ; Jones et Kinghorn (2012) ; Seidel (2012) ; ont montré que toujours le principe de l'extraction dépend de la molécule ou métabolite d'intérêt, qui est suivant ses propriétés physicochimiques qu'on peut choisir le solvant d'extraction.

Pour un choix d'extraction par solvant, la première étape est de chercher les propriétés physicochimiques des molécules d'intérêt qui sont:

- Le coefficient de partage dans l'eau ou le solvant organique.
- La polarité de la molécule.
- La stabilité de la molécule dans la lumière.
- La température à employer.

Après le choix du bon solvant, la deuxième étape sert à utiliser l'une des techniques de laboratoire suivantes pour accomplir le processus d'extraction :

▪ **Macération simple**

C'est mettre le matériel végétal dans le solvant, à température choisie avec ou sans agitation et pendant un temps qui varie suivant le protocole expérimentale (Jones et Kinghorn, 2010).

▪ **Par Soxhlet**

L'échantillon entre rapidement en contact avec une portion fraîche de solvant, ce qui aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant. Cette méthode nécessite une longue durée de contact solvant-matériau végétal, un chauffage et une quantité importante du solvant (Grigonis, 2005).

▪ **Extraction par ultrasons (sonication)**

Ce processus d'extraction utilise le son en très haute fréquence pour libérer les composés phytochimiques à partir du matériau végétal, il est caractérisé par sa rapidité et son efficacité, la méthode d'extraction par sonication est récemment utilisée pour isoler les huiles essentielles, polysaccharides et autres composés phytochimiques bioactifs (Penchev, 2010 ; Seidel, 2012).

▪ **Extraction assistée par micro-ondes**

Elle constitue une alternative des techniques d'extraction traditionnelles au laboratoire, c'est une technique basée sur l'application des irradiations sur l'échantillon végétal avec des intervalles de temps de refroidissement (Penchev, 2010).

▪ **Extraction par hydrodistillation**

Cette technique est beaucoup plus employée pour l'extraction des huiles essentielles, basée sur la volatilité de ces dernières en employant l'eau comme solvant et la séparation à la fin se fait par différence de densité (Zhiri et Baudoux, 2005 ; Bruneton, 2009).

▪ **Extraction par fluides supercritiques**

L'état des fluides supercritique est obtenu lorsqu'une substance est mise sous une température et pression supérieure ou égal le point critique, l'intérêt de cette technique, qu'elle a des taux d'extraction élevée et protection des solutés de la dégradation (Grigonis, 2005 ; Penchev, 2010).

I.3.2. Analyse des produits naturels

En effet, les plantes sont de composition complexe, et plus les méthodes analytiques deviennent fines, plus apparaît la présence d'un ensemble de substances diverses, au sein desquelles peuvent émerger le plus souvent de très nombreux constituants actifs, eux même en mélange (Wichtl et Anton, 1999).

Nous citons ci-dessous les techniques chromatographiques de séparation et d'extraction à large spectre d'application.

A. Chromatographie en phase liquide

Selon Holme et Peck (1998), dans cette technique de séparation la phase mobile est sous forme liquide.

▪ **Chromatographie sur couche mince CCM**

Basée sur le principe de séparation par adsorption, Le mélange à séparer est fixé sur un support (Un gel de silice déposé en couche mince sur une plaque d'aluminium). Il est entraîné par un solvant approprié qui migre par capillarité sur la plaque (Koolman et Roehm, 2005). La révélation des taches se fait après détection (par pulvérisation d'un réactif caractéristique, par observation à la lumière UV si la plaque de silice comporte un indicateur de fluorescence, ou autre) (Holme et Peck, 1998).

▪ **Chromatographie en phase liquide de haute performance ou haute pression HPLC**

Comme son nom l'indique est une amélioration de la qualité de la phase stationnaire en diminuant des particules de petite taille, ce qui conduit à l'emploi d'une haute pression pour l'élution. En conséquence le seul moyen d'obtenir un écoulement de la phase mobile est d'utiliser des systèmes de pompes (Holme et Peck, 1998).

La détection peut se faire par plusieurs méthodes spectroscopiques : spectroscopie UV-Visible, spectroscopie de masse SM et la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire RMN (Anderson et Markham, 2006).

B. Chromatographie en phase gazeuse CPG

La CPG est une technique chromatographique qui est utilisée pour séparer les composés organiques volatils tels que les huiles essentielles, un chromatographe en phase gazeuse est constitué d'une phase gazeuse mobile, un orifice d'injection, une colonne de séparation contenant la phase stationnaire, et un détecteur (par exemple : spectroscopie de masse SM) (Ceske et *al.*, 2006).

Chapitre 4

Activités biologiques des extraits végétaux

I.4.1. Activité antioxydante

A. le stress oxydant et radicaux libres

Favier (2003) décrit le stress oxydatif comme étant le non contrôle de la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques par la cellule.

En résumant ce qui est écrit par Goussard (1999) ; Favier (2003) ; Greet (2004) ; Mengome et *al.* (2014) : Les espèces chimiques radicalaires présentes normalement dans l'organisme sont produites par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable ; mais la production peut devenir excessive ou résulter de phénomènes toxiques exogènes (ils peuvent endommager les molécules des protéines, des graisses et de l'ADN) et l'organisme va devoir se protéger de ces excès par différents systèmes enzymatiques antioxydants (glutathione, peroxidase, superoxidodismutase).

B. Les antioxydants de plantes

Suivant Roland (2004), Il existe deux types d'antioxydants :

– Les antioxydants primaires ou radicalaires ou vrais, qui permettent l'interruption de la chaîne autocatalytique : $AH + R\bullet \rightarrow A\bullet + RH$

La molécule AH est antioxydante si le radical formé A• est plus stable.

– Les antioxydants secondaires ou préventifs qui assurent l'inhibition de la production des radicaux libres. Ce sont des substances décomposant les hydroperoxydes en alcool, des thiols (glutathion, acides aminés soufrés) ou les disulfures, des protecteurs vis-à-vis des UV, comme les carotènes.

Les dérivés végétaux sont extrêmement nombreux à être utilisés principalement dans le domaine des suppléments et des produits cosmétologiques anti-vieillessement, qu'il s'agisse de principes extraits de légumes, d'épices, de fruits ou de plantes médicinales. Ils

appartiennent à de nombreuses familles chimiques, alcaloïdes, glucosides, dérivés indoliques, mais celle des polyphénols a donné le plus de molécules. Les plus utilisés sont la quercétine (flavonoïdes), le resvératrol, extrait de l'écorce du raisin rouge et la curcumine, extraite de la racine de *Curcuma* (Favier, 2003). En plus Mengome et *al.* (2014) ont cité que les études ont montré que les antioxydants à partir des plantes sont parfois plus actifs que ceux obtenus à partir de produits chimiques de synthèse.

I.4.2. Activité antimicrobienne

Les dépenses mondiales sur la recherche de nouveaux agents anti-infectieux (y compris les vaccins) devraient augmenter de 60% par rapport aux niveaux de dépenses en 1993(Cowan, 1999). La force motrice derrière beaucoup de recherches dans le domaine de phytochimie est la découverte de nouvelles molécules biologiquement actives pour des usages médicaux ou agricoles (Setzer et *al.*, 2006).

A. Les composés phénoliques

L'activité antimicrobienne de polyphénols a été largement étudiée contre un large spectre de micro-organismes. Parmi les polyphénols, flavane-3-ols, les flavonols, et des tanins qui ont un large spectre d'activité antimicrobienne plus élevée en comparaison avec d'autres polyphénols, et du fait que la plupart d'entre eux ayant la capacité d'inhiber les facteurs de virulence des microorganismes (par exemple, inhibition de la formation de biofilm, la réduction de l'hôte ligands adhérence, la neutralisation des toxines bactériennes), et une synergie avec des antibiotiques (Negi, 2014).

Le tableau trois donne quelques exemples des résultats de recherches qui ont été faites sur les composés phénoliques (Daglia, 2011).

B. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanaliaires ou au niveau de la microflore vaginale, et d'origine fongique, contre les dermatophytes, les moisissures allergisantes ou les champignons opportunistes. Elles

présentent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre (Lacroix et Caillet, 2007).

Tableau 3 : Activités antimicrobiennes des composés phénoliques (Tiwari, 2011 ; Daglia, 2011).

Classe	Activité	Exemples
Flavan-3-ol Flavonol	Antibactérienne	<i>Vibrio cholerae</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Staphylococcus cereus</i>
	Antifongique	<i>Candida albicans</i> <i>Microsporium gypseum</i>
	Antivirale	Adenovirus– Enterovirus –virus de la grippe.
Tannins condensés	Antibactérienne	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
	Antivirale	Viurs de la grippe, herpès simplex virus (HSV)
Acides phénoliques	Antibactérienne	<i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Escherichia coli</i> – <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Dans la littérature, les HE les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent aux Labiatae: Thym, Origan, Sarriette, Lavande, Menthe, Romarin, Sauge. L'essence de Thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles essentielles les plus actives, son composé majoritaire, le carvacrol, possède également une forte activité antimicrobienne (Lacroix et Caillet, 2007 ; Bruneton, 2009).

C. Les alcaloïdes

La Berbérine est un représentant important de groupe des alcaloïdes, Il est potentiellement efficace contre les trypanosomes. Les alcaloïdes diterpénoïdes, communément isolées à partir de la famille des Ranunculaceae, ils ont souvent des propriétés antimicrobiennes : la Solamargine, un glycoalcaloïde des baies de *Solanum khasianum*, et d'autres alcaloïdes peuvent être utiles contre l'infection par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) ainsi que les infections intestinales associées aux SIDA (Syndrome Immuno Déficitaire Acquis) (Cowan, 1999 ; Negi, 2014).

D. Les saponines

Bruneton (2009) a cité qu'*in vitro*, ces métabolites secondaires ayant deux activités :

- Contre les champignons phytopathogènes (saponosides de la Luzerne) et contre *Candida* ou de dermatophytes ; cette action est due à la réaction des saponosides avec les stérols membranaires des microorganismes.
- Antivirale.

Cette citation est proche de celle de Cheok et *al.*, (2014), où ils ont mentionné que les saponines et face aux résultats d'une multitude de recherche sur l'activité biologique de ces molécules, ayant une activité antifongique, antibactérienne et antivirale.

I.4.2.1. Mode d'action des extraits végétaux

En se référant à la bibliographie (Cowan, 1999 ; Mert-Turk, 2006 ; Karou, 2006 ; Silva et Fernandes, 2010 ; Tiwari et *al.*, 2011), les extraits végétaux peuvent agir sur la cellule microbienne par différents modes d'action par exemple :

- ✓ **Les composés phénoliques** : liaison aux adhésines, inactivation des enzymes avec la privation du substrat, perturbation de la membrane cellulaire, la formation d'un complexe avec la paroi cellulaire.
- ✓ **Les huiles essentielles et terpénoïdes** : rupture de la membrane cellulaire par la déstabilisation de la force motrice des protons, du flux d'électrons et du transport actif ce qui conduit à la coagulation du contenu cellulaire.
- ✓ **Les alcaloïdes** : s'intercalent dans la paroi cellulaire et inhibent la synthèse de l'ADN des cellules microbiennes, en causant la lyse cellulaire.
- ✓ **Les saponines** : perte de l'intégrité de la membrane des cellules fongiques.

I.4.3. Généralités sur les souches microbiennes testées

Dans cette partie nous avons essayé de donner un aperçu sur chaque souche choisie d'être testée, et la virulence que possèdent ces souches contre l'Homme, l'animal et le végétal.

I.4.3.1. Les bactéries à Gram positif

- ***Staphylococcus aureus***

C'est un pathogène opportuniste qui peut causer diverses maladies chez les humains, allant des affections qui évoluent spontanément vers la guérison à des pathologies mortelles. Cette bactérie est une des principales causes de toxi-infections alimentaires, résultant de la consommation d'aliments contaminés par des entérotoxines. L'intoxication alimentaire par les staphylocoques se caractérise par une période d'incubation de courte durée (1 à 6 heures, en moyenne 3) puis par des symptômes variés : nausées, vomissements, douleurs abdominales, crampes et diarrhée, Les symptômes disparaissent habituellement après 24 heures. (Guiraud, 1998 ; Kayser et *al.*, 2005). Les infections à *S. aureus* sont très fréquentes et apparaissent sous des aspects cliniques très variés, elle peut être à l'origine d'infections cutanées superficielles ou profondes (Avril et *al.*, 1992).

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) est la souche la plus connue au milieu hospitalier à cause de sa résistance à l'antibiotique Methicilline et d'autres types d'antibiotiques (Batabyal et *al.*, 2012). Les infections dues au MRSA présentent problème sérieux pour les cliniciens, car les options thérapeutiques sont limitées et le surdosage des antibiotiques contribue à une mortalité accrue et augmentation du taux de séjour à l'hôpital (Rybak et *al.*, 2005).

- ***Bacillus cereus***

C'est un bacille mésophile, aéro-anaérobie facultatif, sporulé et les spores sont thermorésistantes (Avril et *al.*, 1992).

La croissance cellulaire avec un certain nombre dans l'aliment plus la production de toxines cause une toxi-infection alimentaire chez l'Homme (Irving et *al.*, 2005).

- ***Enterococcus faecalis***

Elles se présentent sous forme de cocci à Gram positif. La taille de chaque élément est inférieure à 2 micromètre (Hart et Shears, 1999). Les entérocoques peuvent être impliqués dans les infections humaines, et qui présentent une résistance intrinsèque à de nombreux antibiotiques (Klibi et *al.*, 2013).

L'espèce *Enterococcus faecalis* est associée à des infections urinaires, des infections de plaie et des endocardites bactériennes (Hart et Shears, 1999).

I.4.3.2. Les bactéries à Gram négatif

- ***Escherichia coli***

Il s'agit d'une Entérobactérie lactose positif, gazogène, réalisant une fermentation acide mixte, habituellement mobiles. La température optimale est de 37°C ; C'est un hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux. Cette espèce comme les autres coliformes peut être responsable d'intoxication à cause d'un développement abondant. En outre, certains sérotypes peuvent être considérés comme pathogènes et provoquent des troubles digestifs spécifiques (Guiraud, 1998 ; Kaper et al., 2004 ; Singleton, 2005 ; Jafari et al., 2012).

- ***Pseudomonas aeruginosa***

Cette bactérie de la famille pseudomonadaceae, sous forme de bacilles, aérobies, l'infection par ce germe est surtout chez les immunodéprimés ainsi que la présence de *P. aeruginosa* en milieu hospitalier est responsable aux infections nosocomiales avec une multi résistance aux antibiotiques (Irving et al., 2005).

P. aeruginosa contenant de la pyocyanine, est exceptionnellement l'agent de gastroentérites à partir d'aliments contaminés, elle possède aussi au moins six toxines (entérotoxines, exotoxines A, exoenzyme S, hémolysine, leucocidine et glycolipoprotéine) (Guiraud, 1998).

- ***Klebsiella pneumoniae***

Lactose positif, immobile, la plus part des souches ayant une capsule et elle est responsable à 10% des infections nosocomiales (Kayser et al., 2004). Elle est aujourd'hui surtout reconnue comme responsable d'infections nosocomiales (infections urinaires, intra-abdominales, infections de site opératoire, septicémies, pneumonies) (Kassis-Chikhani, 2012).

- ***Salmonella typhi***

C'est l'agent pathogène de l'homme. Contrairement à d'autres sérotypes de *Salmonella* qui provoquent principalement une inflammation intestinale locale et de la diarrhée, la caractéristique de *Salmonella Typhi* est d'envahir, du tractus gastro-intestinal la circulation sanguine, survivent et se reproduisent dans les macrophages, Les salmonelles typhiques sont estimés à provoquer plus de 200 000 décès par an. La fièvre typhoïde est la plus courante dans les communautés urbaines densément peuplées où l'eau potable est contaminée par des matières fécales humaines. L'augmentation de la résistance aux antimicrobiens, risque d'accroître le taux de létalité (Luby, 2014).

- ***Salmonella enteritidis***

C'est le seul agent pathogène humain qui contamine les œufs régulièrement (Guard-Petter, 2001), la contamination par cet aliment infecté est dû à l'infection aussi de l'animal, ce germe infecte les tissus ovariens et s'installe dans l'œuf au cours de son développements (Seo et *al.*, 2003).

I.4.3.3. La levure

- ***Candida albicans***

Est un champignon (levure), pathogène opportuniste qui existe en tant que commensal des animaux à sang chaud, y compris les humains. Il colonise les surfaces muqueuses de la cavité buccale et vaginale et le tube digestif et est aussi capable de provoquer une variété d'infections, en fonction de la nature de l'hôte sous-jacent, par conséquent, les infections à *C. albicans* (candidose) sont très peu fréquents chez les individus sains (Molero et *al.*, 1998 ; Sudbery, 2011). Cependant, chez les patients immunodéprimés, les infections du flux sanguin provoquent souvent la mort, malgré l'utilisation de thérapie antifongique (Berman et Sudbery, 2002).

Nasution (2013) montre que cette espèce est la plus fréquente dans le cas des candidoses orales.

I.4.3.4. Les champignons filamenteux

- ***Fusarium culmorum***

Selon Anne-Laure, 2007 ; Leslie, 2007 ; Hmissi et *al.*, 2011, il s'agit d' un champignon filamenteux, il est présent dans le sol où il infecte les cultures de blé, considéré comme agent causal de la détérioration du pied et racines du blé il est aussi responsable à la diminution du rendement ainsi que la présence de mycotoxines dans le produit agricole.

- ***Fusarium oxysporum f. sp. albedinis (Foa)***

Le champignon *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis* est l'agent d'un flétrissement vasculaire du palmier-dattier : *Phoenix dactylifera*, appelé maladie du Bayoud ; La maladie est généralement fatale, et les arbres meurent souvent au bout de 6 mois à 2 ans. Les principaux moyens de transmission sont les spores et le mycélium dans le sol (Sedra, 1994 ; OEPP, 2003 ; Fernandez, 2006).

Cette maladie a gagnée toute la palmeraie marocaine puis progressée vers l'est pour atteindre le sahara occidental et central algérien, et elle a détruit plus de trois million d'arbre en Algérie (Tantaoui et Boisson, 1991).

Matériels et Méthodes

II.1. Matériel biologique

II.1.1. L'espèce végétale étudiée

Pour mener ce travail, nous avons choisi l'espèce *Eryngium ilicifolium*, identifiée par M. Guit Ibrahim, enseignant chercheur à l'université de Djelfa. C'est une espèce spontanée appartenant à la famille des Apiaceae et qui est présentée dans la figure 2.



Figure 2 : Photos de *Eryngium ilicifolium* au site de prélèvement.

La station dont on a prélevé les échantillons de *Eryngium ilicifolium* est montré dans la figure 3, cette région se situe à 13 km du sud-ouest de Bou-saàda (Wilaya de M'sila, Algérie), elle porte les coordonnées suivantes qui sont déterminées à l'aide d'un système de géolocalisation par satellite (GPS, Garmin®):

- Altitude: 845m
- N 35° 07' 12,9"
- E 004° 05' 33,7"

La plante a été récoltée en moi de Mai de l'année 2013, la région d'El Hamel (Figure 3), sur un terrain rocailleux à bioclimat aride, Kaabèche (1990) signale que cette région est caractérisée par un hiver froid et décembre est le mois le plus froid, en été Juillet est le mois le plus chaud ; le total annuel de précipitation est de 323.5 mm.

Traitement du matériel végétal

Après le prélèvement de la plante, le matériel végétal est séché dans un endroit sec, aéré et à l'abri de la lumière, à la fin de cette opération, la partie aérienne

(tiges, feuilles et fleurs) de la plante *Eryngium ilicifolium* a subi un broyage en poudre fine qui représente le produit végétal (PV) et sera conservé jusqu'à utilisation.



Figure 3 : Image satellitaire de la région de la récolte du matériel végétal (Google Maps, 2014).

II.1.2. Souches microbiennes testées

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits végétaux, un groupe de quelques souches microbiennes (Tableau 4) était choisi pour réaliser les tests.

II.2. Méthodes

II.2.1. Tests phytochimiques

Un ensemble d'analyses qualitatives qui a été réalisé, pour avoir des informations sur la composition du produit végétal (PV) en métabolites secondaires.

II.2.1.1. Test des alcaloïdes

Après évaporation de l'extrait éthanolique, quelques millilitres d'une solution acide (HCL, 2N) sont ajoutés au résidu sec. La solution est filtrée après et la recherche de la présence d'alcaloïdes se fait dans le filtrat à l'aide des réactifs de Wagner et de Mayer.

L'apparition de la turbidité ou d'un précipité indique la présence des alcaloïdes (Bruneton, 2009 ; Vijay et al., 2013).

Tableau 4: Souches microbiennes avec référence et provenance.

Souche	Référence	Source
Bactéries G+		
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	ATCC 43300	IPA
<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA	ATCC 29213	IPA
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	IPA
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11779	IPA
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 92212	IPA
Bactéries G-		
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	IPA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	IPA
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	IPA
<i>Salmonella typhi</i>	Isolat	LRVL
<i>Salmonella enteritidis</i>	Isolat	LRVL
Levure		
<i>Candida albicans</i>	Isolat	LRVL
Moisissures		
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i>	Isolat	SRPVG
<i>Fusarium culmorum</i>	INRA124	INRA France
Total	13	4

ATCC : American type culture collection

G- : Gram négatif.

G+ : Gram positif.

INRA France : Institut National de la Recherche Agronomique, Bordeaux, France.

IPA : Institut Pasteur d'Alger.

LRVL : Laboratoire Régional Vétérinaire de Laghouat.

SRPVG : Station Régionale de la Protection des Végétaux de Ghardaïa.

II.2.1.2. Test des flavonoïdes

Une quantité de 1g du PV est mise dans 10ml de méthanol 80%, le mélange subit une macération pendant 24 heures. Quelques millilitres du tri chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) sont ajoutés à quelques millilitres du filtrat. L'apparition d'une couleur jaune foncée indique la présence des flavonoïdes (Quettier-Deleu et *al.*, 2000).

II.2.1.3. Test des tannins condensés

Les tannins vrais (tannins non hydrolysables ou condensés) sont des polymères de polyphénols. Ces derniers ont été mis en évidence par la réaction au chlorure de fer (III) dans l'extrait méthanolique. Quelques gouttes d'une solution de tri chlorure de fer ($FeCl_3$) à 2% sont ajoutées à 2 ml de l'extrait, L'apparition d'une coloration vert-noir indique la présence de tannins vrais (Békro et *al.*, 2007).

II.2.1.4. Test des huiles essentielles

Selon Bruneton (2009), une quantité de la plante sèche un peu broyée est mise dans un volume suffisant de l'eau distillée pour procéder la technique de l'hydrodistillation en utilisant un appareil de type Clevenger. L'opération a duré 6 heures.

La teneur, en ml/kg, est définie selon Hilan et *al.* (2006), comme étant la quantité d'huiles essentielles extraites (en ml) à partir d'un Kilogramme de la plante. Cette teneur est calculée par la formule suivante

$$T = \frac{V}{m}$$

Où :

T : teneur exprimée(en ml/kg);

V : volume d'huiles essentielles extrait (ml);

m : prise d'essai initiale du matériel végétal (Kg).

II.2.1.5. Test des saponines

Une quantité de 2g du PV est chauffée dans 40ml d'eau distillée jusqu'à ébullition, puis l'extrait aqueux est refroidit ensuite agité avec quelques millilitres d'eau distillée dans un

tube à essai pendant 20 secondes, après un repos de 10 à 15min la longueur de la mousse est mesurée (Vijay et *al.*, 2013).

II.2.2. Extraction des principes actifs de la plante

II.2.2.1. Extrait brut ou méthanolique (Salvat et *al.*, 2004)

Cet extrait est obtenu par la macération de 5g du PV dans 80ml du méthanol absolu pendant 24 heure, après filtration du mélange, le filtrat est évaporé à 55°C sous pression réduite en utilisant un rotavapor, le résidu sec à la fin est conservé à 4°C jusqu'à utilisation (Figure 4).

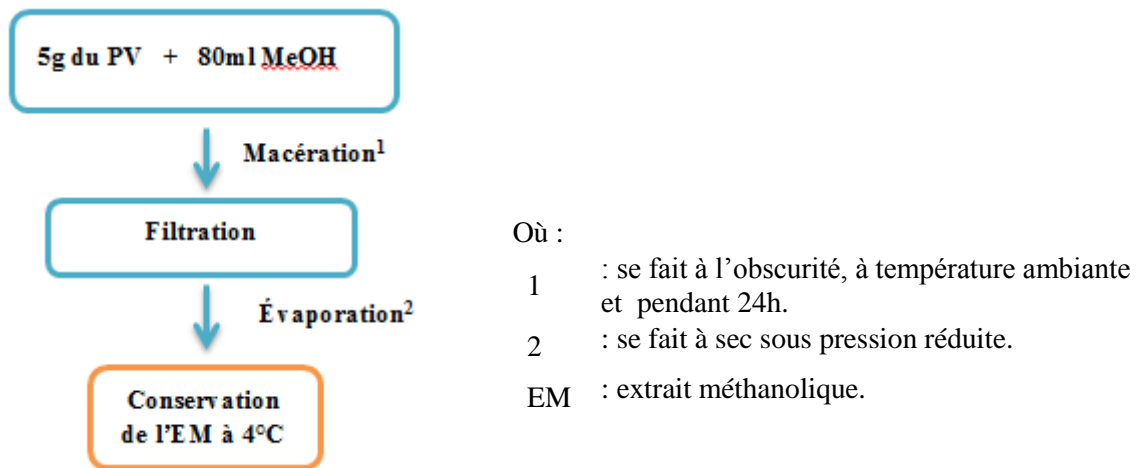


Figure 4: Représentation du protocole d'extraction du EM.

II.2.2.2. Extraits de polarités différentes

Dans le but de séparer les extraits que contient la plante, une technique d'extraction (résumée dans la Figure 5) par solvants d'ordre de polarité croissante a été procédée en employant le protocole adopté par Benarous et *al.* (2013).

La première étape est une extraction solide-liquide, 5g du PV sont ajoutés à 100ml d'un mélange de solvants EtOH/MeOH/Eau (50/40/10 : v/v/v) et laissé macérer pendant 30h à température ambiante et à l'obscurité.

Après filtration du mélange, la solution subit une évaporation à 55°C sous pression réduite jusqu'à évaporation de la fraction alcoolique et la fraction aqueuse est récupérée pour l'extraction liquide-liquide.

Le premier solvant employé est l'éther de pétrole où on fait un lavage plus d'une fois si nécessaire : phase aqueuse /phase organique (v/v). L'extrait obtenu (EP) contient les composés peu ou apolaires (les lipides, pigment...).

Pour l'élimination de toute trace d'eau, on utilise le sulfate de sodium anhydre Na₂SO₄ puis une filtration de la phase organique qui est suivi par une évaporation à 55°C sous pression réduite.

La deuxième extraction liquide-liquide est celle de la phase aqueuse récupérée après dépigmentation et l'acétate d'éthyle qui est un solvant moyennement polaire où les composés phénoliques (EA) seront ciblés dans cette extraction.

L'acétate d'éthyle est ajouté à la phase aqueuse au même volume une ou deux fois, élimination des gouttes d'eau par le sulfate de sodium anhydre Na₂SO₄ puis évaporation à sec (55°C).

Les mêmes procédures d'extraction pour le dernier solvant (n-butanol), lavage de la phase aqueuse une ou deux fois avec le solvant organique, ajout du Na₂SO₄, filtration et évaporation à 55°C sous une pression réduite, l'extrait (EB) contient les saponines qui sont polaires.

Les résidus obtenus après évaporation sont conservés à 4°C et à l'obscurité jusqu'à leur utilisation.

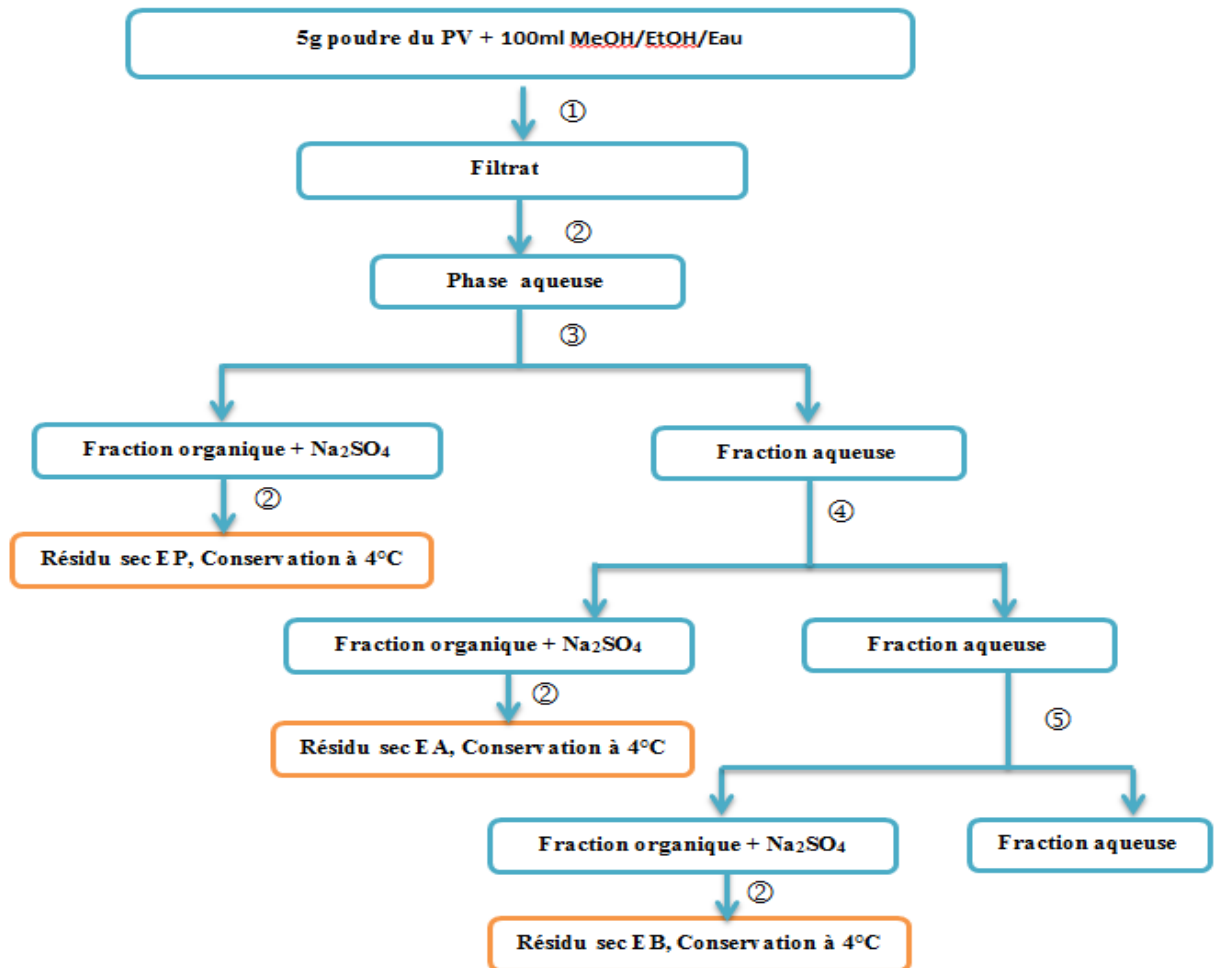
II.2.3. Analyse quantitative de certains métabolites secondaires

II.2.3.1. Dosage des phénols totaux

- **Principe**

La méthode la plus utilisée pour la quantification des composés phénoliques est celle du Folin-Ciocalteu, c'est une analyse colorimétrique basée sur la réduction d'un mélange

d'acides : phosphotungstiques et phosphomolybdiques par le groupement hydroxyle des phénols, en résultant par la formation d'un produit bleu, l'intensité de la couleur est mesurée par un spectrophotomètre UV-Visible (Vermerris et Nicholson, 2006 ; Dai et Mumper, 2010).



① : Filtration.

② : Evaporation à 55°C sous pression réduite.

③ : Extraction par l'éther de pétrole.

④ : Extraction par l'acétate d'éthyle.

⑤ : Extraction par le n-butanol.

EP : extrait d'éther de pétrole.

EA : extrait d'acétate d'éthyle.

EB : extrait du n-butanol.

Figure 5 : Procédure d'extraction de EP, EA et EB.

- **Protocole**

Un volume de 100µl de chaque extrait est mélangé avec 500µl du réactif Folin-Ciocalteu (dix fois dilué) et laissés agir 2 min, après, 2 ml d'une solution de carbonate de sodium NaCO_3 (5%) sont ajoutés au mélange, l'incubation se fait à l'obscurité pendant 30 min. La lecture est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde : 760 nm.

La courbe d'étalonnage était obtenue par les mêmes étapes en utilisant un standard : l'acide gallique, les résultats sont ensuite calculés en mg de phénols totaux équivalent d'acide gallique (GAE) par gramme de l'extrait sec.

II.2.3.2. Dosage des flavonoïdes

- **Principe**

La composition en flavonoïdes est déterminée par La méthode Lamaison et Carnat (Quettier-Deleu et *al.*, 2000), qui est basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium lors de la réaction avec le tri chlorure d'aluminium ayant une absorbance à 430 nm.

- **Protocole**

Suivant cette méthode : 1ml de chaque extrait est ajouté à 1ml de la solution de tri chlorure d'aluminium six fois hydraté ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ à 2%) et le mélange est incubé pendant 15 min jusqu'à la lecture des absorbances au spectrophotomètre UV-Visible à 430nm.

Une gamme de concentration était préparée pour le traçage de la courbe d'étalonnage en utilisant comme standard : la quercétine.

II.2.3.3. Dosage des tannins condensés

- **Principe**

Selon Hagerman (2002), c'est la réaction entre, tannins condensés (proanthocyanidines), flavan 3-ol et la vanilline qui donne la couleur rouge au produit ayant une absorbance à 500 nm.

- **Protocole**

Le standard utilisé dans cette méthode pour établir la courbe d'étalonnage est la catéchine en préparant une gamme de solutions diluées qui vont réagir avec la vanilline.

Pour le dosage, on prépare une solution de vanilline (1%) avec le HCL (8%) qui seront en même proportion dans la solution (1 :1, v/v), 2.5 ml du mélange précédant sont ajoutés aux 0.5ml de l'extrait (ou bien la catéchine), une incubation des solutions se fait au bain marie à 30°C pendant 20 min.

La lecture des absorbances se fait à 500 nm dans un spectrophotomètre UV-Visible.

II.2.3.4. Dosage des saponines

- **Principe**

La réaction de saponines déshydratées dans un milieu très acide avec un aldéhyde aromatique (vanilline) donne un chromogène qui absorbe à une longueur d'onde 544nm suivant la méthode de Hiai et *al.* (1976).

- **Protocole**

Puisque la réaction nécessite un milieu acide, on prépare une solution d'acide sulfurique (72%), on prend 2.5ml de cette dernière avec 250µl de la vanilline (8%) et 250µl de l'extrait végétal (ou bien la digitonine dans le cas de l'étalon).

Après un temps d'incubation de 10min à 60°C puis de 4 min à l'eau glacée, on lit les absorbances des solutions dans un spectrophotomètre UV-visible à la longueur d'onde : 544nm.

II.2.4. Evaluation des activités biologiques des extraits végétaux

II.2.4.1. Etude de l'activité antioxydante

Le test du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est la méthode la plus utilisée à cause de la stabilité du réactif DPPH (Sharma et Bhat, 2009).

- Principe du test DPPH (Molyneux, 2004 ; Popovici et *al.*, 2009).

Pour tester l'activité antioxydante des extraits de la plante, on utilise le composé chimique : DPPH, qui possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure 6 : 1). La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution

de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH• (Figure 6 :2), mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.

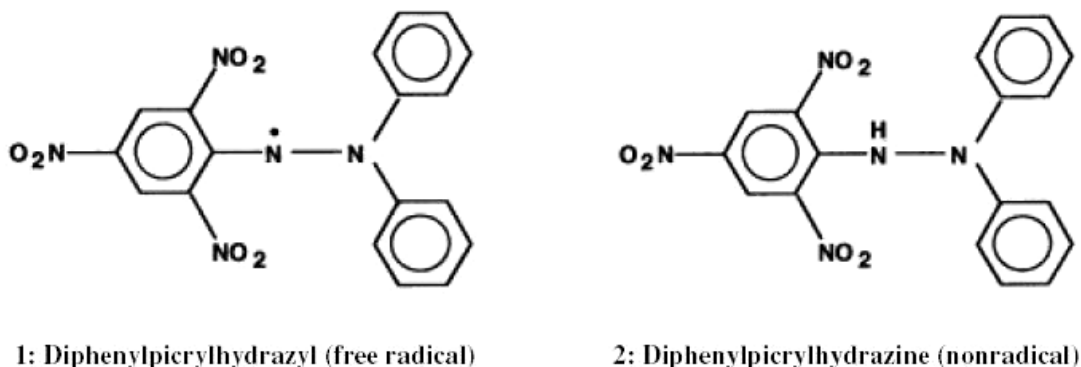


Figure 6: Structure du DPPH, 1 : radical libre ; 2 : molécule liée.

- **Protocole**

Des solutions diluées ont été préparé par les extraits dans le méthanol puis, 1ml de chaque dilution est ajouté à 1ml d'une solution de DPPH (0.2mM).

Après un temps de réaction de 30 min à l'obscurité, l'absorbance de chaque solution est mesuré à 517nm dans un spectrophotomètre UV-Visible.

Le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule suivante :

$$I(\%) = \left[\frac{(A_0 - A)}{A_0} \right] \times 100$$

Où :

A_0 est l'absorbance de la solution de DPPH sans extrait.

A est l'absorbance de la solution de DPPH avec l'extrait.

La réactivité de l'antioxydant est aussi estimée par l'EC₅₀, ce qui correspond à une concentration de l'antioxydant qui peut réduire 50% de l'activité (de l'absorbance) du DPPH• dans le milieu réactionnel.

L'acide ascorbique (vitamine C) et l' α -tocophérol (vitamine E) sont utilisés comme des antioxydants de référence dans ce test.

II.2.4.2. Etude de l'activité antimicrobienne des extraits

II.2.4.2.1. Tests confirmatifs

Pour la certitude de la pureté des souches à cause de la sensibilité des tests de l'activité antimicrobienne, nous avons procédé à un ensemble de tests de confirmation de la structure, forme (macroscopique et microscopique) et des critères biochimiques des cellules microbiennes.

a. Coloration de Gram

Selon Bousseboua, (2005), cette technique (Annexe B) spécifique des bactéries, nous permet de mettre en évidence :

- L'organisation structurale de paroi bactérienne.
- la forme des cellules.
- le type d'association entre les cellules.

b. Isolement sur milieu sélectif

Les milieux sélectifs (Tableau 5) avec leurs compositions spécifiques permettent la culture des espèces microbiennes recherchées tout en inhibant les bactéries concurrentes du milieu (Benson, 2001 ; IPA, 2002).

c. Galerie biochimique

Classique ou miniaturisée, la galerie biochimique est un ensemble de tests qui donnent le profil métabolique des souches microbiennes (Bousseboua, 2005).

➤ Galerie classique

Une culture des souches à tester est préparée dans des tubes de bouillon nutritif, après incubation à 37°C pendant 18 à 24h, ces cultures sontensemencées dans une batterie de milieux liquides et/ou gélosés stériles (Tableau 6).

La lecture des résultats se fait momentanément ou après incubation des tubes plus l'inoculum à 37°C pendant 18 à 24h, en plus il y a des tests qui nécessitent l'ajout d'un réactif.

Tableau 5: Milieux de culture utilisés : de sélection et d'étude (Benson, 2001 ; IPA, 2002).

Milieu de culture	Critère de sélection	Souche
Hektoen	Isolement et identification des entérobactéries pathogènes.	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. typhi</i> , <i>S. enteritidis</i> .
ENDO	Fermentation du lactose chez les entérobactéries	<i>E. coli</i>
Milieu au Désoxycholate	Fermentation du lactose chez les entérobactéries.	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i>
Gélose au sang frais de cheval	Isolement et culture des micro-organismes exigeants, la recherche des formes hémolytiques	<i>S. aureus</i> , <i>MRSA</i> , <i>MSSA</i> et <i>K. pneumoniae</i>
Chapman	Isolement et enrichissement des staphylocoques pathogènes	<i>S. aureus</i> , <i>MRSA</i> , <i>MSSA</i>
Gélose nutritive et Muller Hinton	Non sélectif, pour l'étude des bactéries.	Toutes les souches
Sabouraud et Sabouraud + chloramphénicol	Isolement des levures, moisissures et inhibition de la croissance bactérienne.	<i>Candida albicans</i>
Gélose Salmonella-shigella (SS)	Fermentation du lactose, la production de l'acide sulfhydrique.	<i>S. typhi</i> , <i>S. enteritidis</i>
Milieu de King A	Production de pigments spécifiques (pyocyanines).	<i>P. aeruginosa</i>
Milieu PDA (potato dextrose agar)	Milieu d'étude des moisissures	<i>Fusarium sp</i>

➤ La galerie API 20E et API Candida

Elle se présente sous la forme de Kits multi-tests, intégrés en microplaques, chaque cupule contient un milieu de culture déshydraté qui correspond à l'identification d'un caractère métabolique.

A l'aide du manuel d'usage de la galerie API (Biomérieux, 2013) nous avons réalisé le test résumé dans les étapes ci-dessous.

Le test nécessite une culture jeune des microorganismes en milieu liquide, après ouverture de la plaque api dans une zone stérile, quelques gouttes d'eau distillée stériles ont été mises pour créer une atmosphère humide.

Tableau 6 : Tests biochimiques réalisés sur les souches bactériennes (Djelouat, 1990 ; IPA, 2002 ; Roberts et Greenwood, 2003 ; Bousseboua, 2005).

Test	Caractère biochimique	Révélation
Milieu TSI (1)	-Fermentation du lactose, saccharose et du glucose -Dégagement gazeux - production d'H ₂ S	-Virage de la couleur rouge du milieu vers le jaune -bulles de gaz - coloration noire
Milieu citrate de Simmons (1)	-Utilisation du citrate comme seule source de carbone	-Virage de la couleur verte du milieu vers le bleu
Urée-indole (1)	-Présence de l'uréase -Présence de l'indole	-Virage de la couleur du milieu. -Avec le réactif de KOVACS forme un anneau rouge
Milieu mannitol-mobilité. (1)	-Métabolisme du mannitol -Mobilité de la bactérie	-Virage de la couleur vers le jaune -Diffusion autour de la pique centrale
ONPG (1)	-Présence de la β -galactosidase	-Coloration jaune du milieu
Oxydase (2)	-Présence du cytochrome oxydase	-Virage de la couleur du disque au violet
Catalase (2)	-Présence de l'enzyme catalase (dégradation du peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂)	-Contact avec le H ₂ O ₂ dégagement gazeux (O ₂)
ADH/LDC/ODC (1)+(3)	-Présence des décarboxylases (dégradation des acides aminés)	-Couleur pourpre du milieu

(1) : incubation 24h, à 37°C.

(2) : test rapide (pas d'incubation 24h).

(3) : ajout de l'huile de paraffine sur le milieu.

La deuxième étape sert à introduire l'inoculum dans les cupules à l'aide d'une pipette Pasteur stérile suivant les recommandations d'usage de la galerie.

Incubation des galeries à 37°C pendant 24h et 48h pour les bactéries et les levures respectivement.

Finalement la lecture des résultats se fait à l'aide d'un tableau de lecture qui permet à la fin de donner un code d'identification de la souche en comparant avec la référence.

d. Test de l'antibiogramme

Selon le MSPRH (2005), le principe de l'antibiogramme est de mettre en évidence la sensibilité spécifique d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou de plusieurs antibiotiques (Tableau 10).

Tableau 7 : Les antibiotiques utilisés dans les antibiogrammes.

Antibiotique	Concentration
Chloramphénicol -C-	30µg
Amoxicilline + acide clavulanique -AMC-	20µg
Vancomycine -VA-	30µg
Pénicilline G -P-	10µg
Oxacilline -OX-	1µg
Spiramycine -SP-	100µg
Erythromycine -E-	15µg
Acide nalidixique -NA-	30µg
Bacitracine -B-	10µg
Ampicilline -AM-	10µg

A partir d'une culture pure de 18h sur milieu d'isolement, on prépare une dilution avec l'eau physiologique stérile (0.9%) : 5 à 10ml plus quelques colonies bien identiques.

Sur des boîtes de Pétri coulées avec le milieu MH, on fait un ensemencement en tapis à l'aide d'un écouvillon stérile.

Après séchage de la surface, on applique les disques d'antibiotiques espacés de 24mm centre à centre.

Les boîtes sont incubées à 37°C et la lecture se fait après 18 à 24h en mesurant les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse. Pour classer les bactéries, les diamètres des zones d'inhibition sont comparés avec ceux qui figurent dans les tables de lecture.

II.2.4.2.2. Tests de l'activité antimicrobienne

A. La méthode de diffusion sur gélose

C'est la technique employée pour la mise en évidence de l'activité des extraits sur les souches bactérienne et la levure (Tepe et *al.*, 2004 ; Klančnik et *al.*, 2010).

Préparation de l'extrait

Le solvant choisi parmi les trois (DMSO, Tween 80 et la solution d'agar) est le diméthylsulfoxyde (DMSO) où il est testé par la méthode décrite ci-après en imprégnant les disques en papier par le solvant.

La pré-culture

Les souches bactériennes ainsi que la levure sont ensemencées dans des tubes à essai contenant 10 ml de bouillon nutritif stérile, une incubation à 37°C pendant 24h pour les bactéries et de 48h à 30°C pour la levure.

Le test

La suspension microbienne est préparée par la dilution de quelques millilitres de la préculture dans de l'eau physiologique puis on mesure la densité optique à 625 nm, une valeur obtenus entre 0.1 et 0.08 correspond approximativement à une charge microbienne de 10^8 UFC/ml.

Des boites de pétri contenant du milieu MH pour les bactéries et le milieu sabouraud pour les levures, sont ensemencées en tapis à l'aide d'un écouvillon stérile.

A l'aide d'une pince stérile, on dépose des disques en papier whatman N°3 de diamètre 6mm imprégnés de 15µL d'extrait (3, 1, 0.5 et 0.25 mg/disque), chaque boite contient trois disques avec la même concentration.

Comme control positif de chaque test, on utilise des disques d'antibiotiques, le control négatif correspond à un disque imbibé du solvant sans extrait.

Pour permettre une bonne diffusion des extraits, les boites sont mises sous 4°C pendant 2h puis incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 30°C pendant 48h pour la levure.

La lecture

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés en millimètre (mm) par un pied à coulisse.

B. La concentration minimale inhibitrice et bactéricide (CMI, CMB)

Selon Dramane et *al.* (2010), les extraits dont la zone d'inhibition a un diamètre supérieur ou égal à 10 mm, sont sélectionnés pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMB) par la méthode de contact direct en milieu liquide.

Préparation de l'extrait

Des dilutions progressives de 8, 7, 6, 4, 2 et 1 mg d'extrait par millilitre de milieu de culture, les dilutions ont été faites dans une solution de DMSO à 10%.

La pré-culture

Des cultures de 24h et 48h des bactéries et levure respectivement dans un milieu liquide (bouillon nutritif) ont été préparées avant le test.

Le test

Des tubes à essai suivant la série des dilutions de l'extrait en plus un tube servant comme témoin, chaque tube contient :

- 668µl de l'extrait,
- 32µl de l'inoculum (10^8 cellule/ml),
- 2.7ml du bouillon nutritif.

La lecture

Elle se fait à l'œil nu, où le premier tube qui ne contient pas de troubles microbiens est considéré comme CMI, puis ces derniers tubes sont ensemencés à l'aide d'une anse calibrée sur milieu solide, incubés à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 48h pour la levure ; au but de chercher la concentration minimale bactéricide (CMB), qui correspond à une absence de croissance dans les boites ensemencées.

C. Méthode de contact direct en milieu solide

Cette méthode était réalisée pour les deux espèces de champignons filamenteux.

Le contact direct entre les moisissures et les extraits mélangés avec le milieu de culture selon Fandohan et *al.*, détermine l'activité des extraits de la plante sur les souches fongiques (Bougandoura et Bendimared, 2012).

La Pré-culture

Une culture des moisissures dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA pendant 5 à 7 jours à 25°C vont servir comme culture jeune.

Préparation de l'extrait

Les extraits sont préparés dans une solution d'agar 0.2%, puis mélangés avec le milieu PDA pour avoir les valeurs affichées dans le tableau 11.

Tableau 8 : Concentrations finales des extraits végétaux (en mg/ml) dans le milieu de culture.

Extrait	EM	EP	EA	EB
[] mg/ml	8, 5 et 2.5	10 et 8	2.5, 1 et 0.5	6, 4, 2 et 1

EM : extrait méthanolique

EP : extrait d'éther de pétrole

EA : extrait d'acétate d'éthyle

EB : extrait butanolique

Le test

Une quantité de 13.5ml du milieu PDA (potato dextrose agar) est ajoutée à 1.5ml de la solution d'agar à 0.2% contenant l'extrait, une petite agitation du mélange qui est mis à 45°C pour assurer une bonne homogénéisation du milieu de culture, puis coulés dans des boîtes de Pétri.

L'inoculation se fait par le dépôt au centre de la boîte d'un disque du mycélium d'environ 0,6 cm de diamètre d'une pré-culture de 5 à 7 jours.

Les boîtes servant comme témoin, contiennent 13.5ml du PDA plus 1.5ml de la solution d'agar à 0.2% sans extrait.

L'incubation des boîtes se fait à 25°C pendant 7 jours.

La Lecture

Selon Wang et *al.* (2005) ; en premier lieu les diamètres de la croissance mycélienne ont été mesurés après 7 jours d'incubation (en mm) puis, les résultats sont présentés sous forme de pourcentages d'inhibition de la croissance des souches fongiques en utilisant la formule suivante :

$$T = (D_k - D_0) / D_k \times 100$$

Où :

D_k : Diamètre de la colonie fongique du témoin (en mm).

D_0 : Diamètre de la colonie fongique en présence de l'extrait (en mm).

T : Taux d'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage.

II.2.5. Traitement des résultats

- Les tests de la partie « matériel et méthodes » ont été fait trois fois (trois répétitions pour chaque test).
- Nous avons utilisé le logiciel Microsoft Excel 2010, pour le traitement des résultats obtenus.

Résultats et discussions

III.1. Tests phytochimiques

Les résultats des tests phytochimiques sur les extraits de la plante *Eryngium ilicifolium* sont regroupés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Tests de la présence des métabolites secondaires dans le matériel végétal.

Test	Alcaloïdes	Flavonoïdes	Tannins condensés	Saponines	Huiles essentielles
Résultat	-	+	+	+	+(1ml/kg)

- + Une réaction positive.
- Absence du métabolite.

Ces tests représentent un ensemble de réactions chimiques (changement de couleurs, apparition d'un précipité ou changement d'aspect), l'intensité du produit de la réaction est proportionnelle à la quantité du métabolite présent dans l'extrait.

Nous constatons d'après ces résultats que la partie aérienne de la plante:

- Est riche en composés phénoliques : tannins condensés, flavonoïdes.
- Contient les saponines, le test a montré la présence de ces métabolites secondaires.
- Contient des huiles essentielles, le rendement montre leur existence dans la plante mais pas en quantités importantes.
- Dépourvus d'alcaloïdes.

Comme dans tout le règne végétal, la famille des apiacées d'après Judd et *al.* (2002) contient des huiles essentielles, saponines, et autre métabolites secondaires ainsi que plusieurs travaux ont montré la composition du genre *Eryngium* en flavonoïdes (Zhizhen et *al.*, 2008 ; Khalfallah et *al.*, 2014), saponines (Ikramov et *al.*, 1971 ; Wang et *al.*, 2013), tannins (Marčetić, 2014) et huiles essentielles (Hashemabadi et Kaviani, 2010 ; Thiem et *al.*, 2011 ; Dunkic et *al.*, 2013 ; Mohamedhosseini et *al.*, 2013 ; Merghache et *al.*, 2014).

Ce résultat peut être comparé avec celui d'une étude similaire sur la même espèce mais d'origine Marocaine, par Warda et *al.* (2009) où les tests phytochimiques ont révélé la présence des flavonoïdes, saponines et tannins en citant l'absence d'alcaloïdes, ces derniers

sont aussi absent dans une autre espèce du même genre : *Eryngium creticum* (Farhan et al., 2012).

III.2. Rendements des extractions

Le tableau dix (10) résume les rendements obtenus des deux techniques d'extraction, ainsi que les aspects et couleurs de ces extraits.

III.2.1. Extrait méthanolique (EM)

Nous remarquons d'après le résultat affichés dans le tableau 10, que le taux de l'extrait est important (9.9%), c'est parce que le méthanol vient après l'eau avec un indice de polarité : 5.1, ce qui lui rend parmi les solvants les plus polaires dans le système solvant d'extraction des produits naturels (Seidel, 2012), ainsi que Kumoroa et al. (2009) dans leur étude, ont montrés l'efficacité des solvants organiques portants des fonctions hydroxyles (méthanol, éthanol et eau) pour donner les rendements les plus élevés d'extraction.

Les études qui ont été faites dans le même but (extraction par solvants organiques) sur huit espèces Turques appartenant au genre *Eryngium*, montrent des valeurs qui varient entre 4.3% et 10.3% pour *E. trisectum* et *E. maritimum* respectivement, sachant que les données représentent les rendements des extraits éthanoliques à partir des parties aériennes de *E. creticu*, *E. compestre*, *E. davicii*, *E. falcatum*, *E. isauricum*, *E. kotschyi*, *E. maritimum* et *E. trisectum* (Kupeli et al., 2006).

III.2.2. Extraits végétaux des solvants de polarité croissante (EP, EA, EB)





Le système solvant utilisé dans cette extraction est un mélange hydro-alcoolique de proportion (éthanol/méthanol/eau, 5/4/1, v/v/v), qui a donné après l'emploi de trois solvants de polarité croissante, trois fraction ou extraits, d'après le tableau 10 l'extrait butanolique (EB) représente la plus grande valeur (2.38%) suivi par l'extrait d'éther de pétrole (2.17%) et en fin l'acétate d'éthyle avec une teneur de 1.36%.

Snyder in Kumoro (2009) défini la polarité comme la capacité d'une molécule à s'engager dans de fortes interactions avec d'autres molécules polaires (non spécifiquement la présence d'une molécule de grand moment dipolaire). La richesse du produit végétal en composés de différentes structures chimiques et par conséquent de différentes polarités explique cette séparation en plusieurs fractions selon la polarité du solvant (Cseke, 2006 ; Tiwari et al., 2011 ; Seidel, 2012 ; Jones et al., 2012).

Nous trouvons aussi d'autres travaux employant l'extraction des produits naturels par solvants de polarité croissante à partir des espèces du même genre *Eryngium* ont donnés des teneurs en extraits butanoliques plus élevées que celles des extraits d'acétate d'éthyle (Kholkhal et al., 2012 ; Khalfallah et al., 2014).

La figure 7 montre la différence de la teneur en produits naturels, en fonction du type de l'extraction (extrait d'un seul solvant ou bien à partir de plusieurs solvants).

Tableau 10 : Les extraits obtenus avec rendements.

Extrait	Aspect et couleur	Rendement (%) ± ES
EM 	Visqueux vert foncé	9.9 ± 0.65
EP 	Visqueux vert foncé	2.17 ± 0.23
EA 	Visqueux vert foncé	1.36 ± 0.15
EB 	Caramel marron miel	2.38 ± 0.15

ES : Erreur standard.

EM : extrait méthanolique

EP : extrait d'éther de pétrole

EA : extrait d'acétate d'éthyle

EB : extrait de n-butanol

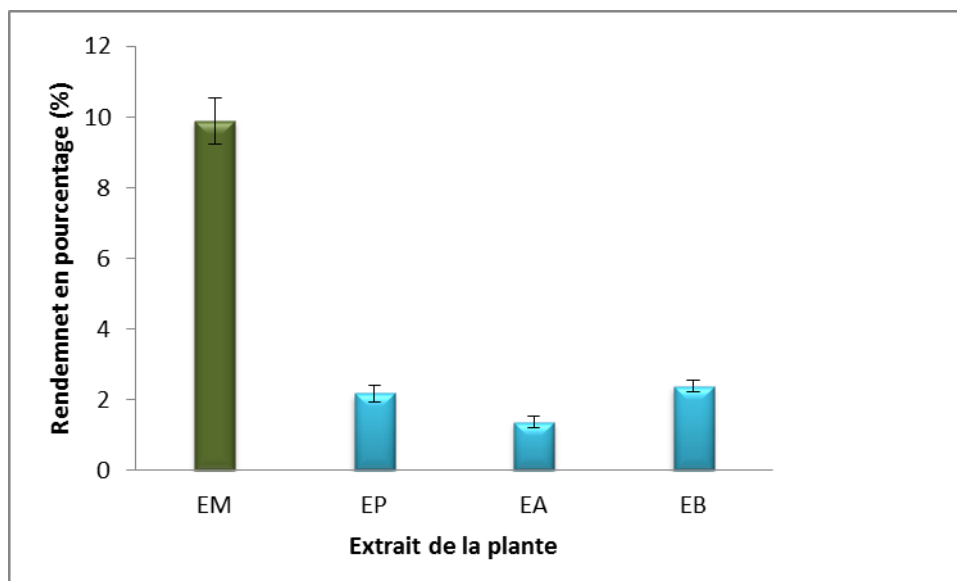


Figure 7 : Teneur de la plante en différents extraits.

Nous remarquons que l'extrait méthanolique issu de l'extraction solide-liquide, est le plus riche en produits naturels que les trois fractions issus d'une extraction liquide-liquide par trois systèmes solvants, ce qui signifie la capacité du méthanol d'extraire une grande partie de métabolites végétaux (Tiwari *et al.*, 2011).

III.3. Dosage des métabolites secondaires

III.3.1. Dosage des composés phénoliques

A l'aide de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Figure 8), on a pu déterminer la teneur en phénols totaux dans les quatre extraits non purifiés (EM, EP, EA et EB) représentés dans le tableau 11.

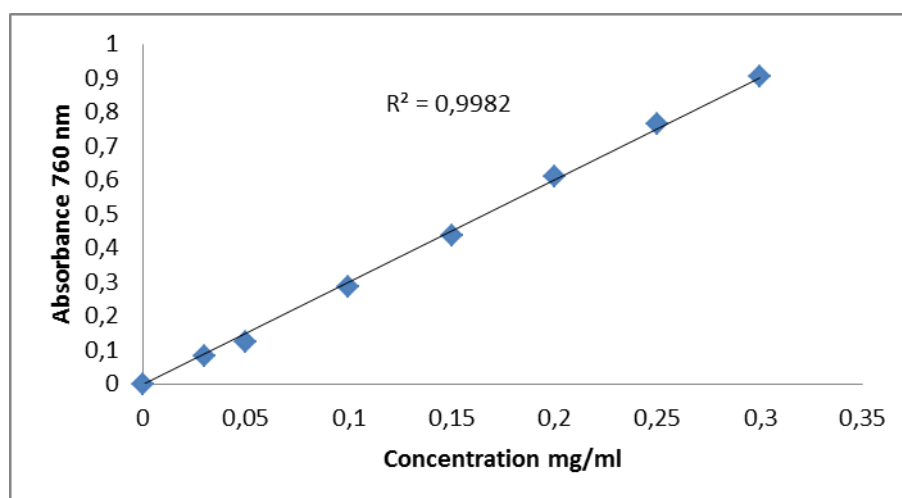


Figure 8 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Nous remarquons dans le tableau 11 que l'extrait EM est le plus riche en phénols totaux avec un taux de 5.40 mg d'équivalent acide gallique par gramme de résidu sec, par rapport aux autres extraits obtenus à l'aide du fractionnement par solvant.

Tableau 11 : Teneur des différents extraits en phénols totaux.

Extrait	Teneur mg GAE/g \pm SE
EM	<u>5.40 \pm 0.04</u>
EP	0.51 \pm 0.002
EA	<u>4.21 \pm 0.009</u>
EB	2.33 \pm 0.002

GAE : équivalent acide gallique

SE : erreur standard

Les solvants tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle, et leurs combinaisons ont été utilisées pour l'extraction de composés phénoliques à partir des matières végétales, souvent avec des proportions différentes de l'eau et la sélection du solvant influe sur la quantité et le taux de polyphénols dans les extraits (Dai et Mumper, 2010). Routray et Orsat (2013) ont cité le méthanol parmi les solvants les plus importants dans l'extraction des composés phénoliques à cause de sa polarité élevée.

L'élimination des lipides, chlorophylle et terpènes (composés non phénoliques) par l'éther de pétrole explique le taux faible des phénols (0.51 mg GAE/g de résidu sec) dans cette fraction, par contre la fraction de l'acétate d'éthyle a révélé le taux le plus élevé (4.21 mg GAE/g de résidu sec) à cause de la solubilité de ces composés (ensemble de plusieurs classes) dans le solvant, et enfin la quantité trouvés dans la fraction butanolique peut être expliquée par la solubilité des molécules de haut poids moléculaire (molécules hautement polymérisée, tannins, molécules liées à des carbohydrates) (Naczka et Shahidi, 2004).

La richesse du genre *Eryngium* en composés phénoliques était prouvée par plusieurs études qui ont procédé l'extraction, analyse et même isolement des molécules appartenant à cette classe (Wang et al., 2012 ; Kholkhal et al., 2012 ; Khalfallah et al., 2014).

Suivant l'étude de Dai et Mumper (2010), la méthode du Folin-Ciocalteu est la plus utilisée pour le dosage des phénols totaux dans les extraits, mais cette dernière est moins

sensible à cause de la non spécificité de la réaction chimique, et selon les mêmes auteurs, la présence d'autres groupes de métabolites dans la solution à doser (amines cycliques, sucres, acide ascorbique) peuvent réagir avec le réactif Folin-Ciocalteu et donnent des faux-positif en augmentant l'absorbance et par conséquent l'augmentation de la concentration.

III.3.2. Dosage des flavonoïdes

La courbe d'étalonnage de la molécule standard : quercétine (flavonoïde) tracée dans la figure 9, nous a permis de déterminer la teneur de cette classe des composés phénoliques dans les extraits ayant les plus grandes teneurs en ces derniers (EM, EA et EB).

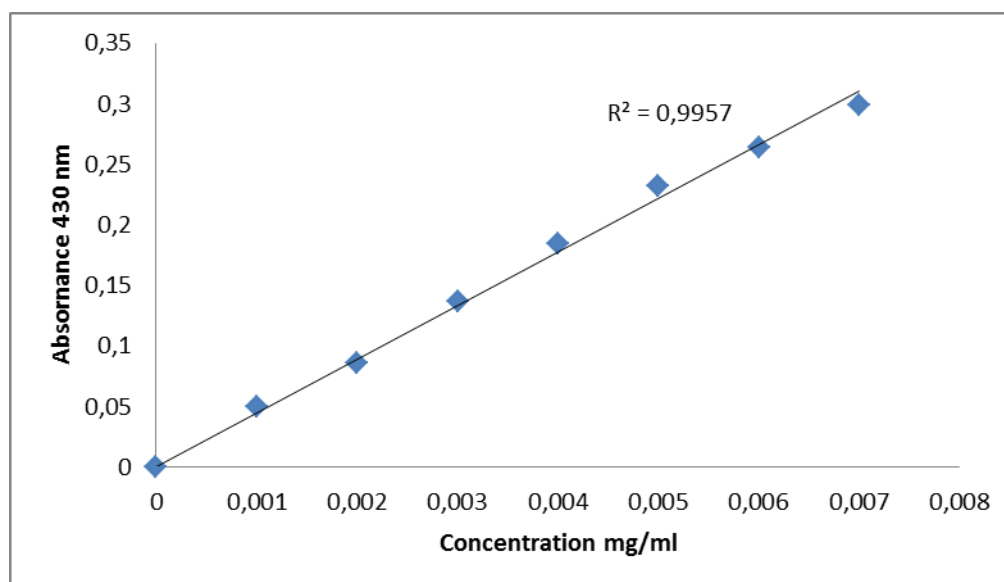


Figure 9 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Après calculer les teneurs de chaque extrait choisi en des flavonoïdes, les résultats obtenus sont affichés dans le tableau 12, ce dernier montre que l'extrait méthanolique EM est plus riche en flavonoïdes avec une concentration de 1.51 mg par gramme de l'extrait sec suivi par la fraction butanolique EB qui contient 0.24 mg par gramme, et finalement la valeur la plus faible est dans l'extrait EA avec 0.21 mg par gramme de l'extrait sec.

Tableau 12: Teneur des extraits végétaux en flavonoïdes.

Extrait	Teneur mg EQ/g ± SE
EM	1.51±0.01
EA	0.21±0.002
EB	0.24±0.006

EQ : équivalent quercétine

ES : erreur standard

Une concentration des flavonoïdes a été trouvée dans l'extrait méthanolique par Kholkhal et *al.* (2012), qui correspond à 1.13 mg équivalent de la rutine par gramme de matière sèche sachant que l'espèce était *Eryngium maritimum*, ces résultats nous reflètent la richesse des extraits méthanoliques en flavonoïdes où la polarité du solvant joue un rôle dans la solubilité et la teneur de ces composés dans la fraction organique.

L'extrait d'acétate d'éthyle (EA) présente une quantité de flavonoïdes (0.21 mg équivalent de quercétine par gramme de résidu sec) moins que la quantité présentée par l'extrait (EB), et ça peut être dû à la richesse de la plante en flavonoïdes glycosylés qui sont plus polaires que les flavonoïdes moyennement polaires (isoflavones, flavanones, flavones méthylés, et flavonols), ceux-ci sont extractibles par l'acétate d'éthyle (Marston et Hostettmann *in* Anderson et Markham, 2006).

III.3.3. Dosage des tannins condensés

La quantification des tannins dans les extraits a été établie à l'aide de la courbe d'étalonnage du standard : la catéchine (Figure 10).

Les valeurs obtenues après le calcul des teneurs des trois extraits (EM, EA et EB) en tannins, sont affichées dans le tableau 13, nous remarquons que l'extrait EM contient toujours la teneur la plus élevée en métabolite secondaire (4.90 mg équivalent de catéchine par gramme de résidu sec), c'est une grande différence comparant la quantité trouvée dans les extraits EA et EB qui ont 0.55 et 0.36 mg EC/g respectivement.

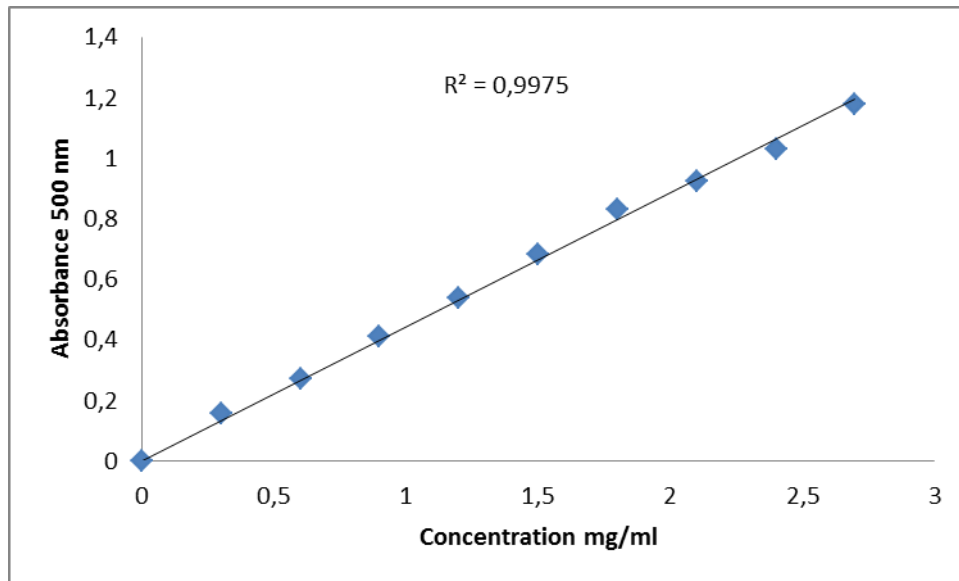


Figure 10: Courbe d'étalonnage de la catéchine.

Tableau 13 : Teneur des extraits en tannins condensés.

Extrait	Teneur mg EC/g ± SE
EM	4.90 ±0.03
EA	0.55±0.001
EB	0.36±0.003

EC : équivalent catéchine.
ES : erreur standard

Les teneurs en tannins condensés se diffèrent d'une fraction à une autre de solvant, elle est de 0.55 à 0.36 mg d'équivalent catéchine par g du résidu sec pour l'acétate d'éthyle et le n-butanol respectivement, selon la littérature (Naczka et Shahidi, 2004 ; Vermerris et Nicholson, 2006 ; Bruneton, 2009) les tannins représentent un large groupe de composés chimiques, et leur solubilité varie selon leur structure chimique ainsi que leur degré de polymérisation.

L'étude de Warda et al. (2009) révèle la présence des tannins dans la même espèce , ainsi que Marcetic et al. (2014) ; Thara Saraswathi et al. (2014) ont noté la présence des tannins dans *Eryngium palmatum* et *Eryngium Foetidum* respectivement.

Nous remarquons d'après le tableau 13, une différence en quantité dans les extraits qui peut être expliquée d'une part, par Jones et Kinghorn (2012), que beaucoup de tanins

végétaux donnent des résultats faux-positifs dans divers dosages biologiques, généralement en raison de leur tendance à former des complexes avec les protéines (y compris les enzymes, des récepteurs et des protéines structurales) par plusieurs liaisons hydrogènes ; et d'autre part, la détection du test vanilline-catéchine, où la catéchine est un monomère flavon-3-ol et la vanilline est beaucoup plus sensible aux polymères de proanthocyanidines que les monomères flavon-3-ols, ce qui conduit à une surestimation des proanthocyanidines dans la solution à doser (Naczka et Shahidi, 2004).

III.3.4. Dosage des saponines

Le dosage de ce groupe de métabolites secondaires était fait en calculant la teneur à partir d'une courbe d'étalonnage du standard : la digitonine (Figure 11).

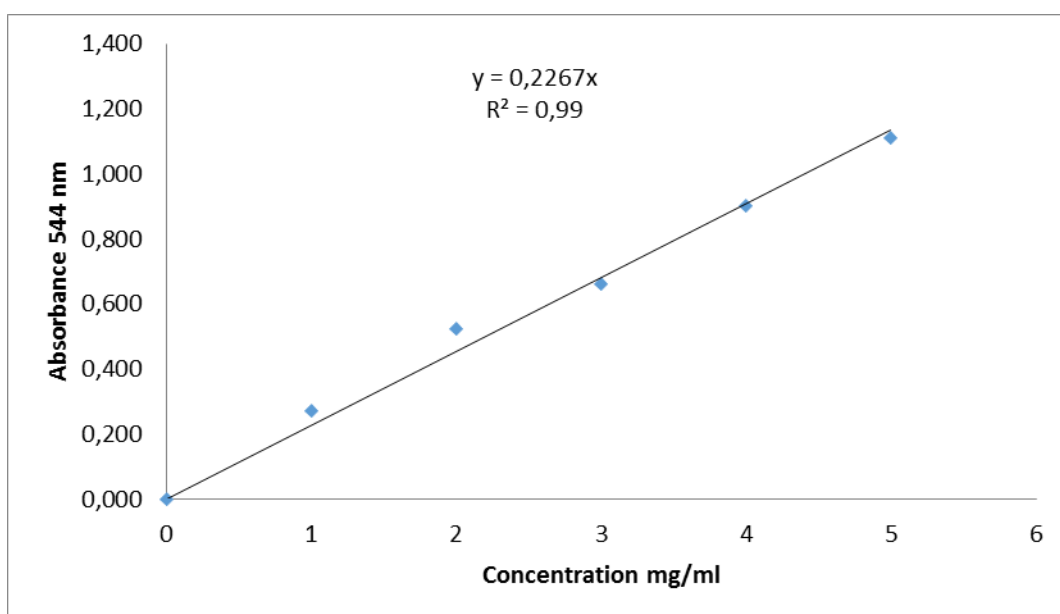


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de la digitonine.

Les teneurs obtenus à l'aide de la courbe d'étalonnage de la digitonine sont enregistrées dans le tableau 14.

Tableau 14: Teneur des extraits EM et EB en saponines.

Extrait	Teneur mg ED/g ± SE
EM	122.72 ± 1.60
EB	145.5 ± 3.02

ED : équivalent digitonine.

ES : erreur standard

Nous remarquons d'après le tableau 14, que *Eryngium ilicifolium* est très riche en saponines, la quantité la plus élevée est dans l'extrait EB issu d'une extraction par solvants de polarité croissante et qui correspond à 145.5 mg équivalent digitonine par gramme du résidu sec.

Le fractionnement des extraits éthanoliques par le n-butanol est communément utilisé pour concentrer les saponines à partir de matières végétales (Chan et *al.*, 2014) sachant que les saponines sont présents dans les plantes en quantité notable et ils sont de forte polarité, donc très solubles dans l'eau et dans les alcools (Bruneton, 2009 ; Cheok et *al.*, 2014), c'est peut-être l'emploi d'un mélange hydroalcoolique (éthanol/méthanol/eau) puis séparation par le n-butanol qui a fait augmenter le rendement (Jones et Kinghorn, 2012), par rapport au méthanol pure.

Un résultat proche à celui de Warda et *al.* (2009) qui ont montré la richesse de l'espèce *E. ilicifolium* (Maroc) en saponines. De plus, Wang et *al.* (2012) dans leur étude sur le genre *Eryngium* ont mentionné qu'il y a 25 composé de la classe des saponines ont été isolé à partir de ce genre.

Les résultats de l'analyse quantitative des métabolites secondaires de la plante *E. ilicifolium* ont confirmés ceux obtenus par l'analyse qualitative où nous pouvons dire d'après cette petite étude phytochimique que l'espèce végétale contient plusieurs composés de différentes classes et différentes quantités.

III.4. Le pouvoir antioxydant des extraits

Le test du pouvoir antioxydant par le piégeage du radical libre DPPH, nous avons dans la figure 16, les pourcentages d'inhibition sont représentés en fonction des concentrations des extraits : figure 12 (1), (2), (3) et (4).

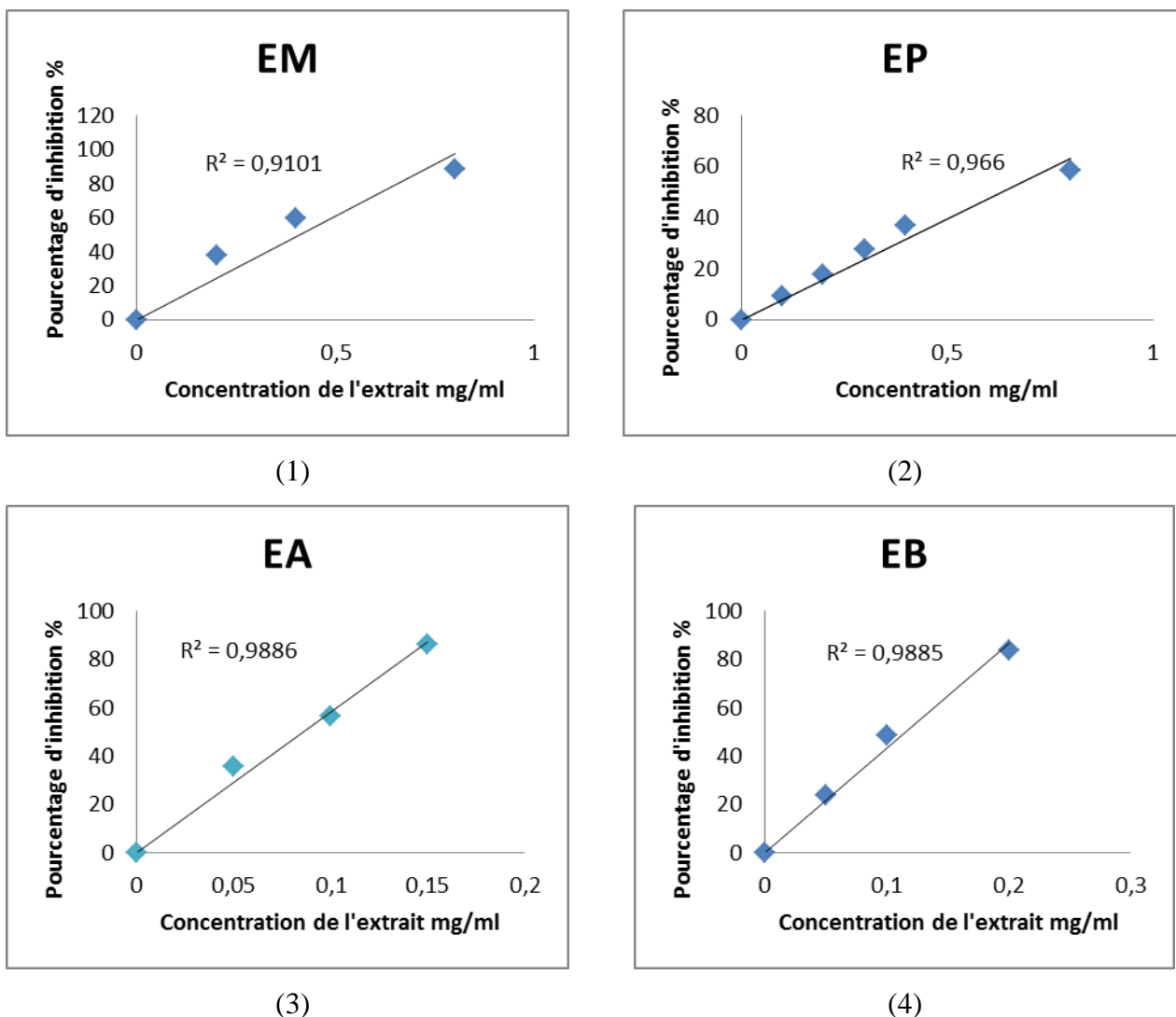


Figure 12 : Représentation graphique du pourcentage d'inhibition (PI) en fonction de la concentration des extraits : (1) l'extrait EM, (2) l'extrait EP, (3) l'extrait EA, (4) l'extrait EB.

La figure 13 montre les graphiques des molécules standards (Vitamine C et Vitamine E) qui ont une forte activité antioxydante, le test a pour but de comparer les EC_{50} des extraits avec ceux des antioxydants forts.

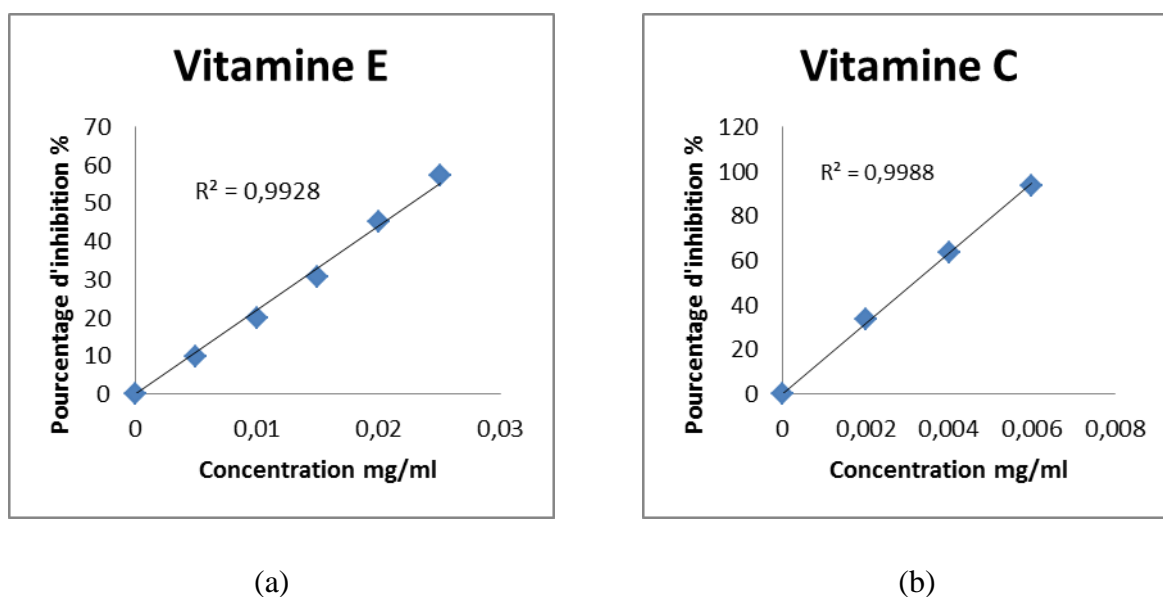


Figure 13 : Représentation graphique des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des molécules standards, (a) : vitamine E (l' α -tocophérol) ; (b) : vitamine C (l'acide ascorbique).

Les EC_{50} des extraits ainsi que les EC_{50} de la Vitamine E et C sont résumés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Valeurs des EC_{50} en $\mu\text{g/ml}$ des extraits et molécules standards.

Extrait	EC_{50} $\mu\text{g/ml}$
EM	410.84 \pm 0.2
EP	633.07 \pm 0.06
EA	<u>98.27\pm0.004</u>
EB	115.24 \pm 0.03
Vitamine C	3.16 \pm 0.05
Vitamine E	22.58 \pm 0.08

D'après les résultats obtenus (Tableau 15 et Figure 12), parmi les quatre extraits, celui qui a présenté une activité antioxydante importante est l'extrait d'acétate d'éthyle (EA) avec une EC_{50} de 98.27 $\mu\text{g/ml}$, suivi par l'extrait du n-butanol (EB) d'une EC_{50} de 115.24 $\mu\text{g/ml}$, tandis que les extraits qui apparaissent les moins actifs sont EM et EP qui ont eu 410.84 $\mu\text{g/ml}$ et 633.07 $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

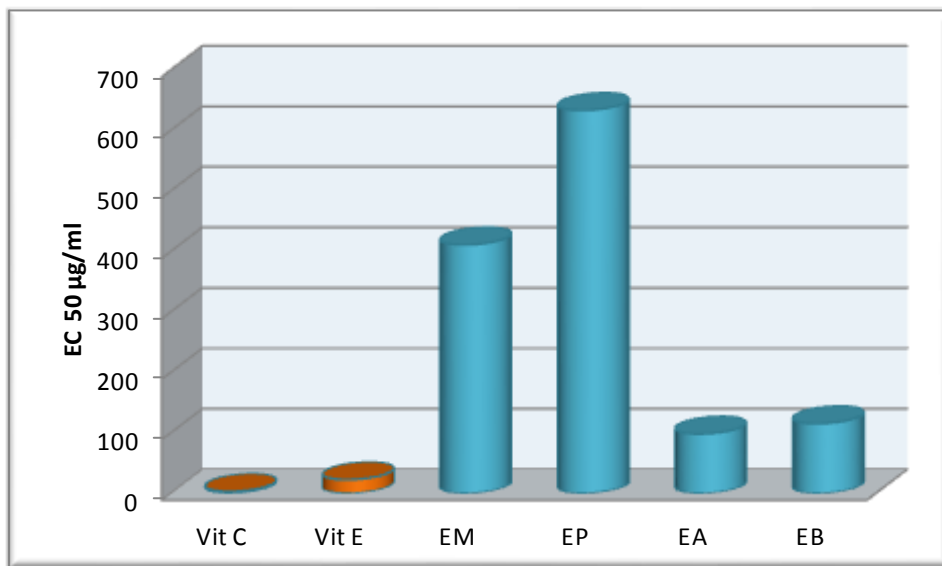


Figure 14 : Valeurs des EC₅₀ de molécules standards et extraits de la plante *Eryngium ilicifolium* par le test DPPH.

Citant que les extraits issus de l'extraction par solvants de polarité croissante (EA et EB) ayant les teneurs en polyphénols les plus élevées, c'est peut être que la richesse en ce grand groupe de composés qui est responsable de l'activité importante des extraits sachant que les polyphénols doivent leur activité, comme leur nom l'indique, à un très grand nombre de résidus hydroxyles, qui sont autant de munitions pour lutter contre les radicaux libres et stopper la réaction en chaîne (Rolland, 2004 ; Berset *in* Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Une étude a été faite par Tunalier et *al.* (2004), sur 27 espèces du genre *Sideritis*, a montré la corrélation linéaire entre la composition en polyphénols et l'activité antiradicalaire.

L'EC₅₀ de l'extrait méthanolique EM, est proche des EC₅₀ des espèces du même genre déterminés dans les extraits alcooliques de ces derniers (Tableau 16).

Tableau 16: Comparaison entre l'EC₅₀ de EM et ceux d'espèces du même genre.

Extrait alcoolique	EC ₅₀ µg/ml
<i>Eryngium ilicifolium</i>	410.84
<i>Eryngium cocacticum</i> ¹	390
<i>Eryngium maritimum</i> ¹	280
<i>Eryngium palmatum</i> ²	600

1 : Wang et al., 2012.

2 : Marčetić et al., 2014.

Selon Wang et al. (2012), plusieurs tests *in vitro* sur de nombreuses espèces du genre *Eryngium*, qui sont utilisés comme plantes comestibles et / ou médicinales en Thaïlande, Jordanie, Vietnam, Europe et en Iran, ont montrés des activités antioxydantes.

III.5. Activité antimicrobienne des extraits

III.5.1. Résultats des tests confirmatifs sur les souches microbiennes

A. Coloration de Gram et isolement sur milieux sélectifs

Les résultats de la coloration de Gram (forme et association des cellules bactériennes) ainsi que l'observation macroscopique des colonies sur les milieux sélectifs sont regroupés dans le tableau 17.

Tester les souches par ces techniques permet la comparaison avec la bibliographie (Guiraud, 1998 ; IPA, 2002 ; Bousseboua, 2005), où toutes les souches ayant presque les mêmes caractéristiques décrites par ces références.

B. Galleries biochimiques

Les tableaux A1, A2 et A3 (Annexe A) montrent les résultats des galleries classiques, API *Candida* et API 20E respectivement, selon ces tableaux, et par comparaison avec la référence Biomerieux api *Candida* et Biomerieux api 20 E (2013), nous constatons que les souches présentent des profils biochimiques identiques.

Tableau 17 : Quelques caractéristiques morphologiques et biochimiques des souches microbiennes.

Souches	Gram	Aspect microscopique	Aspect de la colonie (milieu)
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA, MSSA	+	Cocci en grappes	Petites colonies de couleur jaune doré (Chapman)
<i>Bacillus cereus</i>	+	Bacilles en chainettes	/
<i>Escherichia coli</i>	-	Bacilles	Rouge avec éclat métallique chatoyant (ENDO), rouges avec halo de précipité (Désoxycholate)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Bacilles	Colonies de couleur bleu-vert (king A), vertes à bleuâtres, aplaties bords irréguliers (Hektoen).
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	Bacilles	Incolore (Desoxycholate).
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	Cocci en petites chainettes	petites colonies transparentes (gélose nutritive)
<i>Salmonella typhi</i>	-	Bacilles	Transparentes avec centre noir (SS), bleu vert avec centre noire (Hektoen)
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	Bacilles	
<i>Candida albicans</i>	/	Cellules rondes de grande taille	Colonies rondes blanchâtres (Sabouraud+ chloramphénicol)

/ : test non réalisé
 + : test positif
 - : test négatif

C. L'antibiogramme

Les souches bactériennes ont révélé une sensibilité variée vis-à-vis les antibiotiques testés (suivant la dose de l'antibiotique et la virulence de la souche bactérienne), nous remarquons d'après le Tableau 21 que la souche la plus résistante est *Pseudomonas aeruginosa* (Figure 16), tandis que les souches les plus sensibles sont *Bacillus cereus* (Figure 15) et MSSA.

Tableau 18 : Résultat des antibiogrammes des souches bactériennes.

Antibiotique Souche	ENR	C	AMC		VA	P	OX	SP	E	NA	B	AM
	Les doses en µg											
	5	30	20	10	30	10	1	100	15	30	10	10
<i>Salmonella typhi</i>	S	S	S	S	/	/	R	/	/	/	R	/
<i>Salmonella enteritidis</i>	S	S	S	S	R	R	S	/	/	/	/	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	/	R	/	I	S	R	/	/	/	/	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	R	R	R	R	/	/	/	/	/	I
<i>Escherichia coli</i>	S	S	I	R	R	R	/	/	/	/	S	/
<i>Enterococcus faecalis</i>	/	/	/	/	I	S	R	/	S	/	R	/
<i>Bacillus cereus</i>	/	/	S	/	S	/	/	S	/	S	R	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	/	S	/	/	R	S	I	R	S	/	/	/
MRSA	/	/	/	/	R	R	R	S	/	I	S	/
MSSA	S	S	S	S	/	/	S	/	/	R	/	/

S: sensible
 I: intermédiaire
 R: résistante
 /: test non réalisé

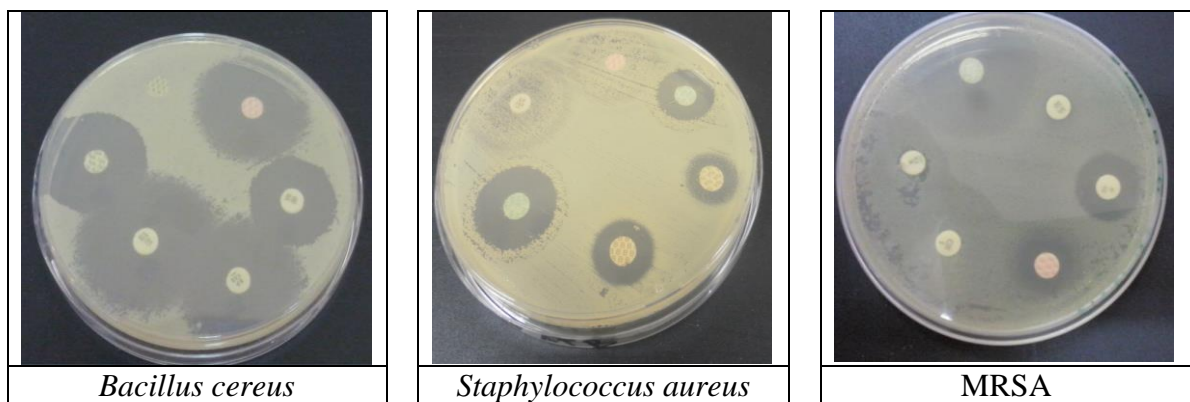


Figure 15 : Effet des antibiotiques sur les bactéries à Gram positif.

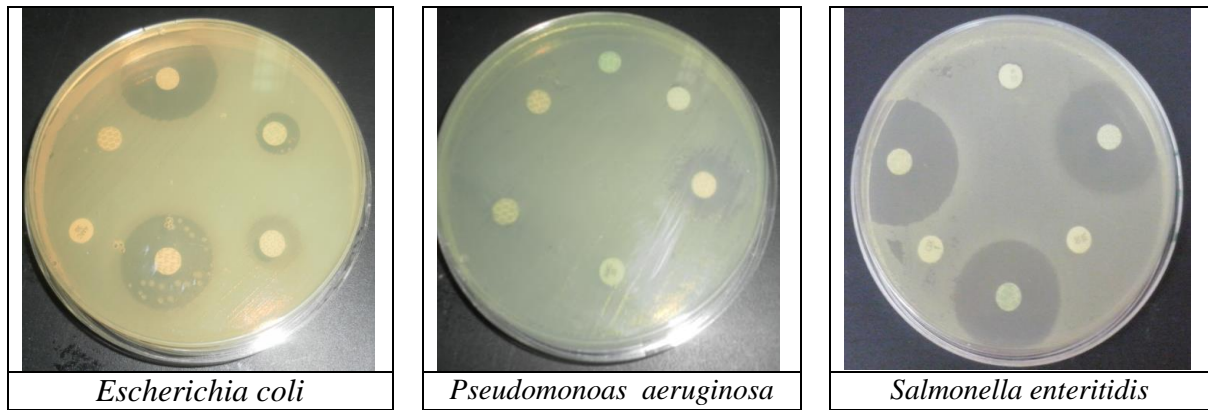


Figure 16 : Effet des antibiotiques sur les bactéries à Gram négatif.

III.5.2. Le choix du solvant

Après avoir fait les tests de diffusion sur gélose pour toutes les souches dans le but de tester la toxicité du solvant choisi sur la croissance microbienne, nous avons eu le résultat présenté dans la figure 17 et 18, où nous remarquons que les trois solvants DMSO (diméthylsulfoxyde) et Tween, solution d'agar n'ont aucun effet sur la croissance bactérienne.

Le choix du solvant est effectué en se basant sur deux facteurs : l'inactivité sur les souches microbiennes et la meilleure homogénéité avec l'extrait.



Figure 17 : Effet du Tween 80 sur la croissance des bactéries.

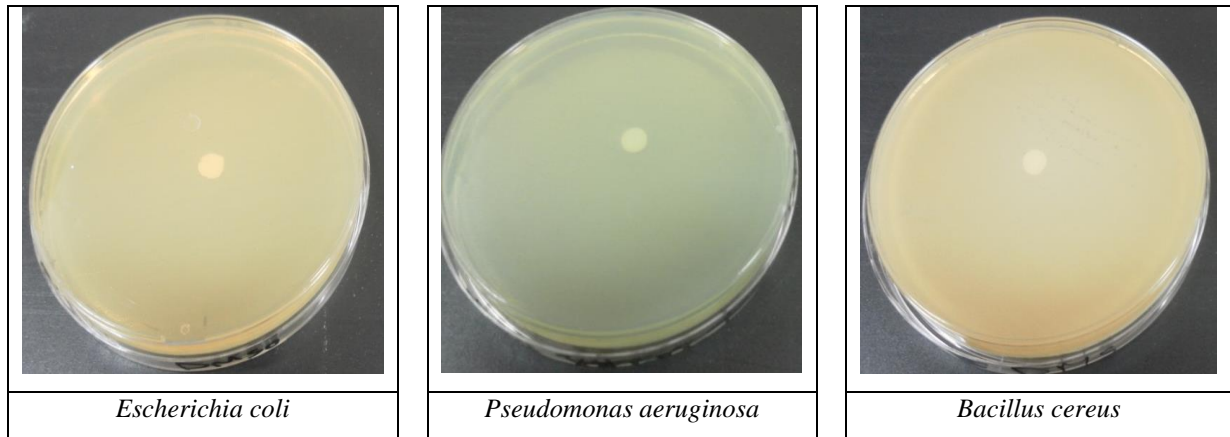


Figure 18 : Effet du DMSO sur la croissance bactérienne.

III.5.3. Résultat du test de la diffusion sur gélose

Après incubation des cultures microbiennes, et observation des résultats, les diamètres des zones d'inhibition autour de chaque disque contenant une certaine concentration en extrait est mesurée à l'aide d'un pied à coulisse.

III.5.3.1. Effet de l'extrait méthanolique EM

Le tableau 19 montre les diamètres mesurés des zones d'inhibition de la croissance des souches microbiennes testées par l'extrait EM.

Tableau 19 : Diamètres des zones d'inhibition de différentes concentrations de l'extrait EM.

Microorganismes		Diamètres des zones d'inhibition (mm) ± SE			
		Extrait méthanolique EM (mg /disque)			
		3	1	0.5	0.25
G-	<i>Escherichia coli</i>	8.66±0.28	8.33±0.57	8.33±0.28	PI
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.6±0.17	PI	PI	PI
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9.86±0.23	8.5±0.3	PI	PI
	<i>Salmonella typhi</i>	9.83±0.76	9.33±0.1	8.46±0.15	PI
	<i>Salmonella enteritidis</i>	9.33±0.15	7±0	PI	PI
G+	MRSA	PI	PI	PI	PI
	MSSA	8.66±0.57	7.8±0.26	PI	PI
	<i>Staphylococcus aureus</i>	9.83±0.28	PI	PI	PI
	<i>Bacillus cereus</i>	9.28±0.20	PI	PI	PI
	<i>Enterococcus faecalis</i>	8.9±0.17	8.33±0.28	7.66±0.28	PI
L	<i>Candida albicans</i>	PI	PI	PI	PI

PI : pas d'inhibition
 G+ : Gram positif
 G- : Gram négatif
 L : levure
 SE : erreur standard

D'après ce tableau, on remarque que l'activité de l'extrait méthanolique varie en fonction de la souche microbienne et la dose employée, entre un diamètre maximale de 9.86 mm et une absence d'effet sur la croissance microbienne.

A la concentration 3 mg par disque (Figure 23,a), l'extrait montre une activité sur les souches bactériennes, où toutes les bactéries (Gram positif et négatif), à l'exception la souche *Staphylococcus aureus* qui est résistante à la méthiciline (MRSA), sont sensibles à l'extrait de la plante *Eryngium ilicifolium*.

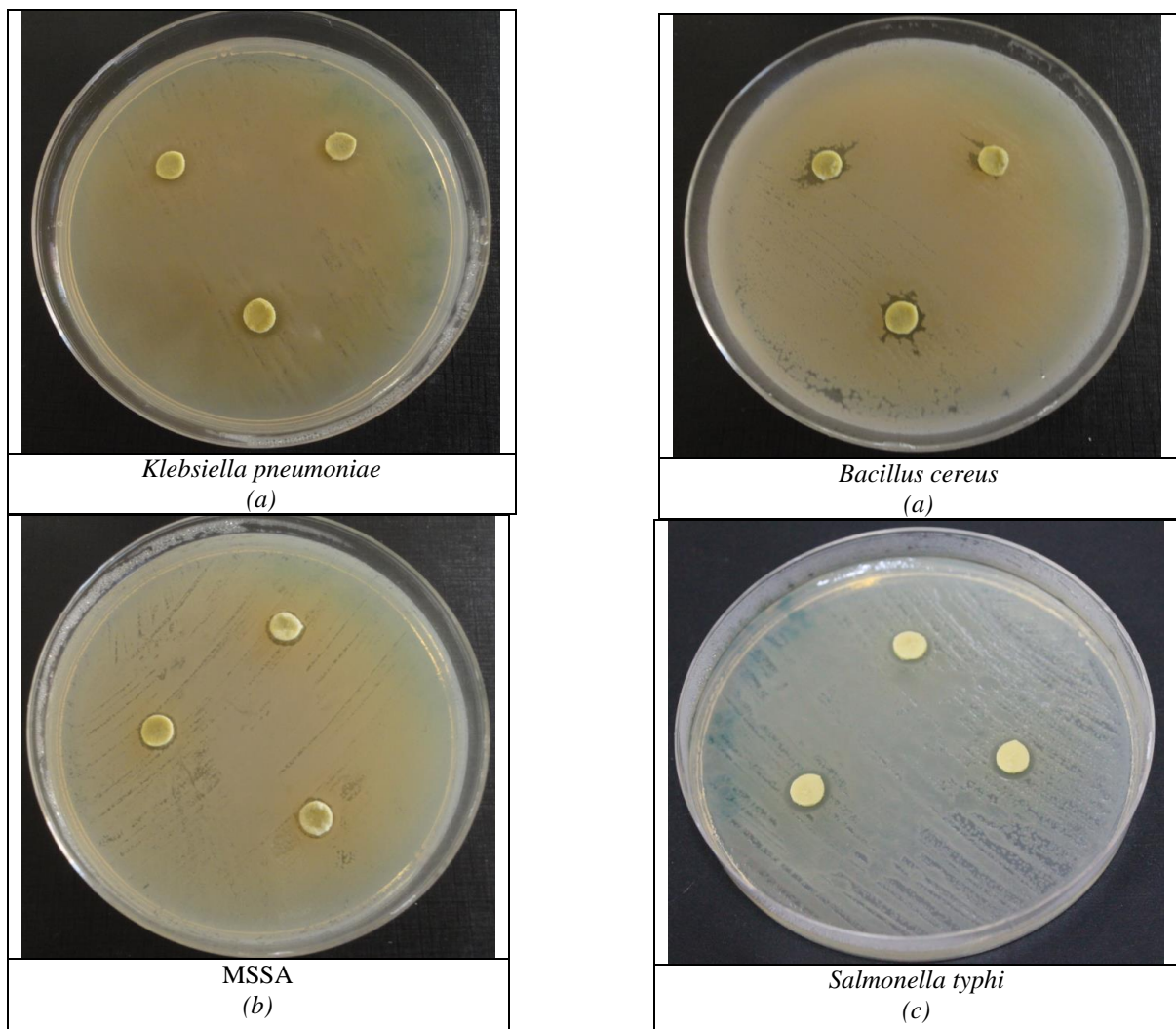


Figure 19 : Effet de l'extrait EM sur la croissance bactérienne avec différentes concentrations ; (a) : 3mg/disque ; (b) : 1mg/disque ; (c) : 0.5mg/ml.

Avec les concentrations 1mg et 0.5mg par disque (Figure 19 b et c), les bactéries à Gram négatif ont été plus sensibles que les bactéries à Gram positif.

En revanche, la plus faible concentration testée (0.25 mg par disque), n'a présenté aucun effet sur les souches microbiennes.

Pour la levure *Candida albicans*, l'extrait EM est inactif sur la croissance de ce champignon (Figure 20).



Figure 20: Absence d'activité sur la levure avec les trois concentrations de l'extrait EM.

L'activité remarquée de EM sur les souches bactériennes pourrait s'expliquer par la présence de métabolites secondaires, notamment les flavonoïdes, les tanins, (Cowan, 1999 ; Setzer et Vogler *in* Cseke *et al*, 2006 ; Tiwari, 2011 ; Dabria, 2012).

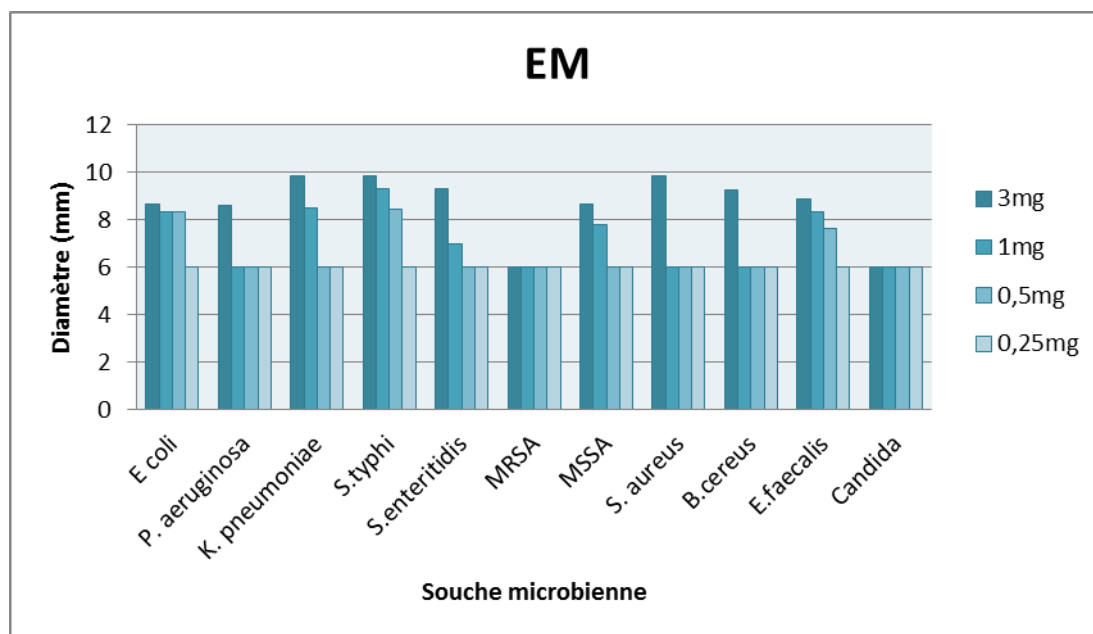


Figure 21 : Sensibilité des microorganismes à l'extrait EM.

L'activité de l'extrait méthanolique de la même espèce, était démontrée par Warda *et al.* (2009) contre une bactérie à Gram positif *Streptococcus pneumoniae*, les diamètres enregistrés sont de 12 à 15 mm avec 0.5 mg par disque, ceci confirme l'action

de EM contre les bactéries, mais la différence de dose et de diamètre d'inhibition peut être due à la différence des souches microbiennes elle-même, à l'origine de la plante et la technique d'extraction employée (la durée, l'agitation, pureté du solvant...etc) (Rio et Recio, 2005 ; Pavia *et al.*, 2010).

A titre comparatif des résultats obtenus (Figure 21) avec d'autres espèces différentes appartenant au genre *Eryngium*, citant Ali-Shetayeh *et al.* (1998) qui ont trouvé des diamètres atteignant 9.1 mm par le test de l'extrait éthanolique de *Eryngium creticum* avec une concentration de 10 mg par disque, cette activité était déterminée contre les bactéries *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa* et *K.pneumoniae* ; alors qu'aucune activité n'est observée chez l'espèce fongique : *Candida albicans*.

III.5.3.2. Effet de l'extrait d'éther de pétrole EP

Après avoir eu les cultures microbiennes, chaque concentration de l'extrait avait un certain effet sur la croissance des microorganismes (Tableau 20).

Tableau 20 : Diamètres des zones d'inhibition de différentes concentrations de l'extrait EP sur les souches microbiennes testées.

Microorganismes		Diamètres des zones d'inhibition (mm) ± SE			
		Extrait d'éther de pétrole EP (mg /disque)			
		3	1	0.5	0.25
G-	<i>Escherichia coli</i>	9.6± 0.36	7.83±0.57	PI	PI
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.5±0.5	6.83±0.28	PI	PI
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8.66±0.57	8.66±0.28	PI	PI
	<i>Salmonella typhi</i>	9.63±0.05	9.16±0.76	8.33±0.76	7.16±0.28
	<i>Salmonella enteritidis</i>	7.66±0.28	PI	PI	PI
G+	MRSA	PI	PI	PI	PI
	MSSA	8.83±0.28	PI	PI	PI
	<i>Staphylococcus aureus</i>	9±0	7.16±0.35	PI	PI
	<i>Bacillus cereus</i>	9.6±0.1	8.33±0.57	7.66±0.56	PI
	<i>Enterococcus faecalis</i>	8.5±0	PI	PI	PI
L	<i>Candida albicans</i>	PI	PI	PI	PI

PI : pas d'inhibition

G+ : Gram positif

G- : Gram négatif

L : levure

SE : erreur standard

Nous constatons d'après le tableau 20 que :

- La zone la plus large est de 9.63 mm de diamètre, enregistrée chez *B.cereus*, *S.typhi* et *E.coli* pour la plus grande concentration de l'extrait : 3 mg par disque (Figure 23 a) ;
- La bactérie la plus sensible est *S.typhi*, et les plus résistantes sont MRSA (Figure 23 b) et *E. faecalis*.
- La concentration 0.25 mg par disque a un très faible pouvoir antimicrobien, notant aussi que les bactéries à Gram négatif sont plus sensibles que les bactéries à Gram positif.
- La souche fongique *Candida albicans* n'est pas sensible à la présence de l'extrait EP dans le milieu de culture, où elle apparait dans un état macroscopique de croissance normale.

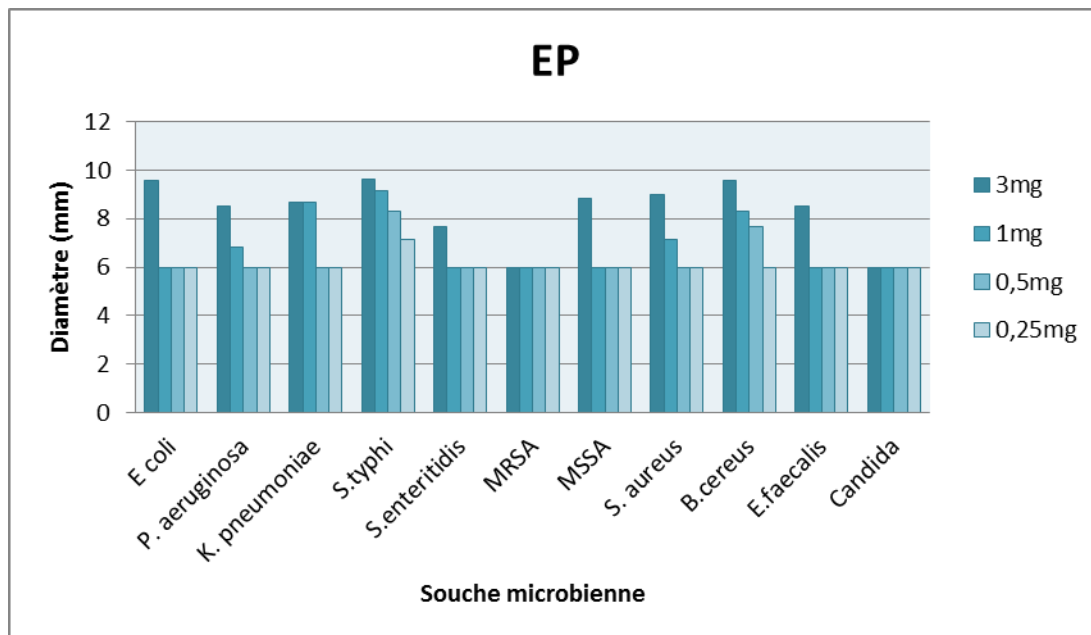


Figure 22 : Sensibilité des microorganismes à l'extrait EP.

Pratiquement l'éther de pétrole est un solvant qui peut extraire selon Bruneton (2009) ; Hosikian et al. (2010) ; Tiwari et al. (2011), un ensemble de métabolites primaires et secondaires (acides gras, chlorophylle, coumarines et huiles essentielles). Dans notre cas cet extrait a présenté un certains pouvoir antibactérien (Figure 22) qui peut être dû à la

richesse de ce produit végétal en composés bioactifs (Yukiko et *al.*, 2002 ; Hosikian et *al.*, 2010 ; Bouzid et *al.*, 2011), en ajoutant ce que Thormar (2011) a publié dans son livre que plusieurs travaux montrent la capacité des lipides et acides gras de désintégrer la membrane cellulaire et changer la forme des cellules bactériennes.

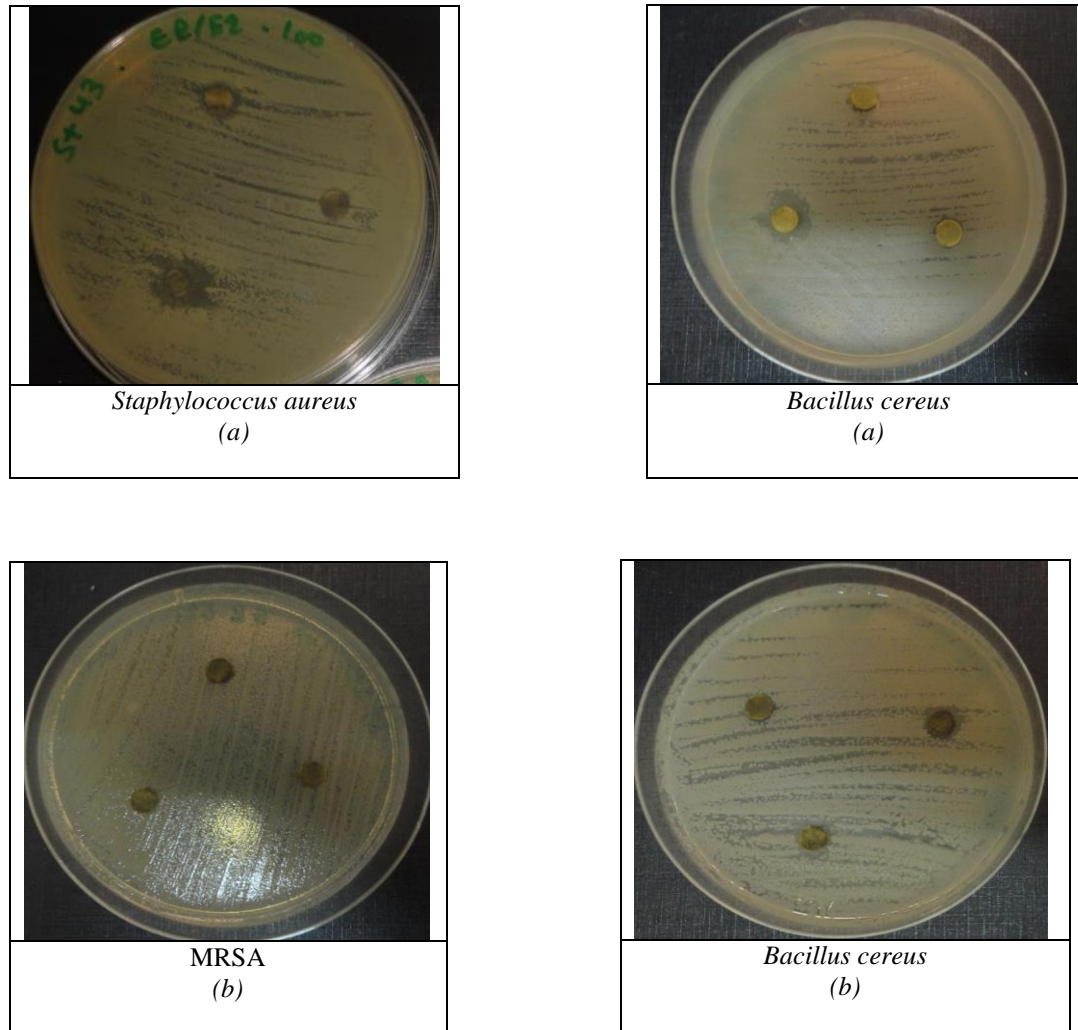


Figure 23 : Effet de l'extrait EP sur la croissance bactérienne avec différentes concentrations ; (a) : 3mg/disque ; (b) : 1mg/disque.

III.5.3.3. Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle EA

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait EA a été faite sur milieu solide, les résultats de ce test sur les dix souches ainsi que la levure sont regroupés dans le tableau 21.

Tableau 21: Diamètres des zones d'inhibition de différentes concentrations de l'extrait EA sur les souches microbiennes testées.

Microorganismes		Diamètres des zones d'inhibition (mm) ± SE			
		Extrait d'acétate d'éthyle EA (mg /disque)			
		3	1	0.5	0.25
G-	<i>Escherichia coli</i>	7.33±0.28	PI	PI	PI
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9.66±0.28	PI	PI	PI
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PI	PI	PI	PI
	<i>Salmonella typhi</i>	9.36±0.15	8.66±0.28	PI	PI
	<i>Salmonella enteritidis</i>	PI	PI	PI	PI
G+	MRSA	PI	PI	PI	PI
	MSSA	7.20±0.26	PI	PI	PI
	<i>Staphylococcus aureus</i>	9±07	8.16±0.28	7.3±0.35	PI
	<i>Bacillus cereus</i>	11.76±0.25	PI	PI	PI
	<i>Enterococcus faecalis</i>	8.5±0.5	8.33±0.76	PI	PI
L	<i>Candida albicans</i>	PI	PI	PI	PI

PI : pas d'inhibition
 G+ : Gram positif
 G- : Gram négatif
 L : levure
 SE : erreur standard

Les diamètres obtenus reflètent le pouvoir de l'extrait EA contre les souches bactériennes avec une absence d'activité sur la levure *Candida albicans*, l'activité la plus importante était sur la souche bactérienne à Gram positif : *B. cereus*, où on a enregistré un diamètre de 11.76 mm avec une concentration de 3 mg par disque, nous citons aussi *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *S. typhi* qui ont été sensibles à cette dose avec des diamètres supérieurs ou égales à 9 mm (Figure 24).

Il faut marquer aussi la résistance de la souche MRSA, tandis que toutes les souches bactériennes à Gram positif étaient sensibles à ce test.

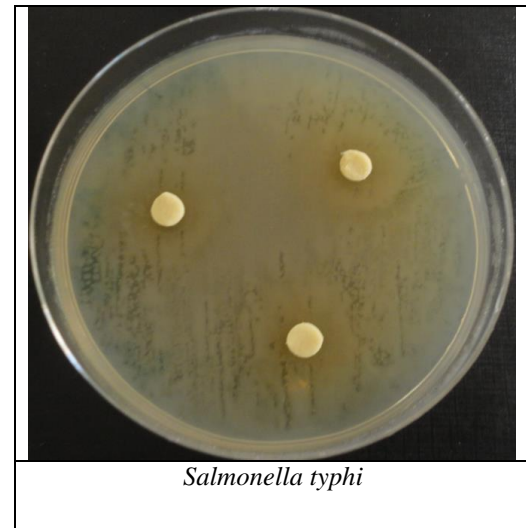
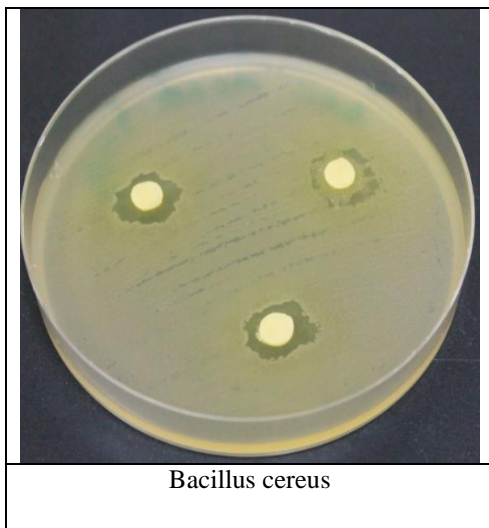
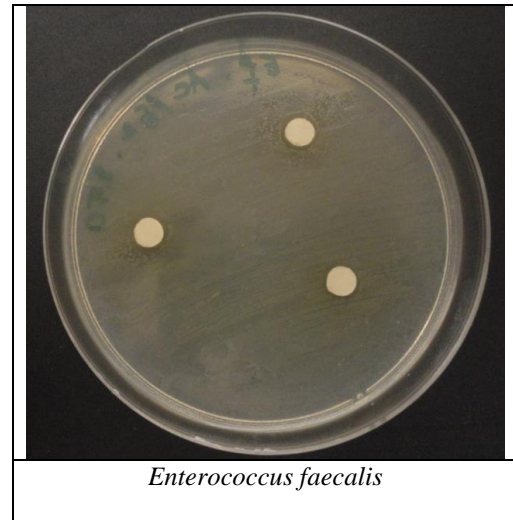
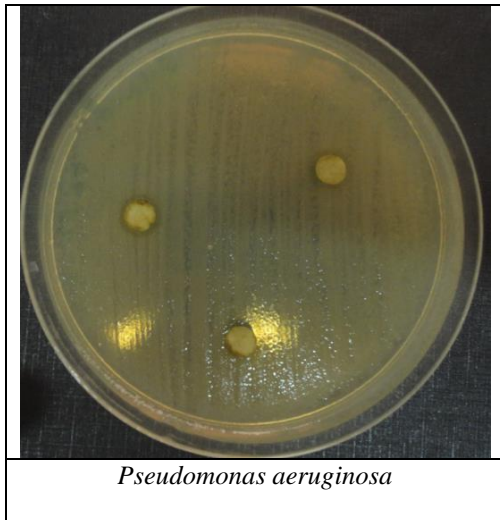


Figure 24 : Pouvoir antibactérien de l'extrait EA avec la concentration 3mg par disque.

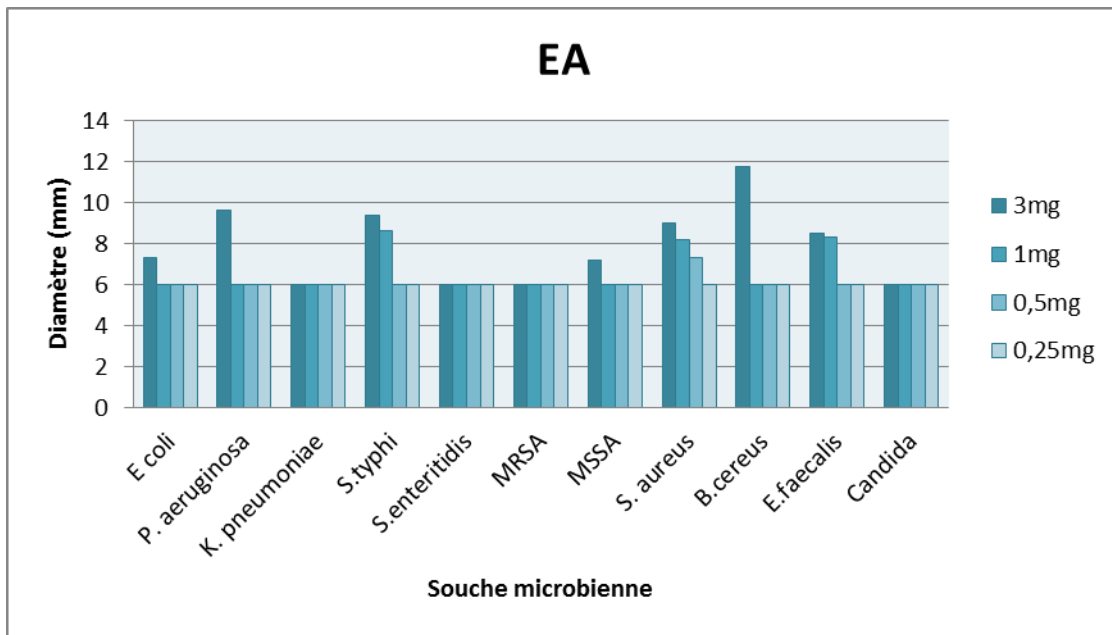


Figure 25 : Sensibilité des microorganismes à l'extrait EA.

L'extrait EA issu d'une extraction liquide-liquide de la phase aqueuse, a montré une certaine richesse en composés phénoliques, tannins et flavonoïdes, c'est peut être sa composition en ces métabolites est le responsable de son pouvoir antibactérien (Figure 25) (Cushnie et Lamb, 2005 ; Cowan, 2009 ; Yi et al., 2010 ; Daglia, 2012 ; Negi, 2014) sachant que :

- La tolérance des polyphénols par les bactéries dépend des espèces bactériennes et de la structure des composés phénoliques.
- Les différences dans les structures chimiques font enquêtes dirigées vers leurs propriétés biologiques, ou à leurs relations structure-activité (par exemple la toxicité des composés phénoliques est liée à leurs groupements hydroxyles).
- La plupart des polyphénols ayant la capacité d'inhiber les facteurs de virulence des bactéries (par exemple, inhibition de la formation de biofilm, la réduction de ligands adhérence à l'hôte, et la neutralisation des toxines bactériennes).

Pavia et al. (2010) ont cité quelques effets de certains composés phénolique (sur un groupe de bactéries), les composés testés n'ont pas montré la même action sur les microorganismes, par exemple la quercétine était efficace pour l'inhibition d'un large

groupe de bactéries tandis que l'acide gallique n'a inhibé que *Pseudomonas aeruginosa*, et la catéchine n'a présenté aucun effet sur les microorganismes testés.

III.5.3.4. Effet de l'extrait du n-butanol EB

Le résultat de ce test a été regroupé dans le tableau 22, où chaque souche microbienne est représentée par un diamètre de la zone d'inhibition mesuré en millimètre.

Le tableau 22 nous indique les valeurs des zones d'inhibition de la croissance microbienne mesurées en millimètre.

Tableau 22 : Diamètres des zones d'inhibition de différentes concentrations de l'extrait EB sur les souches microbiennes testées.

Microorganismes		Diamètres des zones d'inhibition (mm) ± SE			
		Extrait du n-butanol EB (mg /disque)			
		3	1	0.5	0.25
G-	<i>Escherichia coli</i>	9.93±0.11	PI	PI	PI
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10.66±0.28	10.5±0.09	9.33±0.28	7.6±0.25
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8.8±0.26	8.5±0.5	8.1±0.36	PI
	<i>Salmonella typhi</i>	8.96±0.15	8.33±0.28	8±0	PI
	<i>Salmonella enteridis</i>	8.66±0.20	PI	PI	PI
G+	MRSA	PI	PI	PI	PI
	MSSA	7.5±0.1	7.06±0.11	7±00	PI
	<i>Staphylococcus aureus</i>	9.6±0.17	8.66±0.28	7.5±00	PI
	<i>Bacillus cereus</i>	PI	PI	PI	PI
	<i>Enterococcus faecalis</i>	9.3±0.26	7.83±0.76	PI	PI
L	<i>Candida albicans</i>	PI	PI	PI	PI

PI : pas d'inhibition
 G+ : Gram positif
 G- : Gram négatif
 L : levure
 SE : erreur standard

La sensibilité de la souche *Pseudomonas aeruginosa* (Figure 26) est remarquable avec le plus grand diamètre (10.66 mm), la sensibilité de cette souche résistante aux antibiotiques (voir antibiogramme page 67) est peut être due à la présence de composés phénoliques dans cette fraction selon l'étude de Yi et al. (2010) sur le pouvoir antimicrobien des polyphénols extraits à partir du thé vert contre la souche *P. aeruginosa* où ils ont détectés une corrélation entre la largeur du diamètre d'inhibition et la dose introduite dans le milieu (pour une concentration de 1.50 mg/ml, une zone de 10.45 mm de diamètre).

Au contraire, à la concentration 0.25mg d'extrait par disque où aucune activité n'est observée, à la concentration 3 mg, la plupart des bactéries étaient sensibles à la présence de l'extrait EB dans le milieu et aucune activité sur la croissance de la levure *Candida albicans* n'est observée.

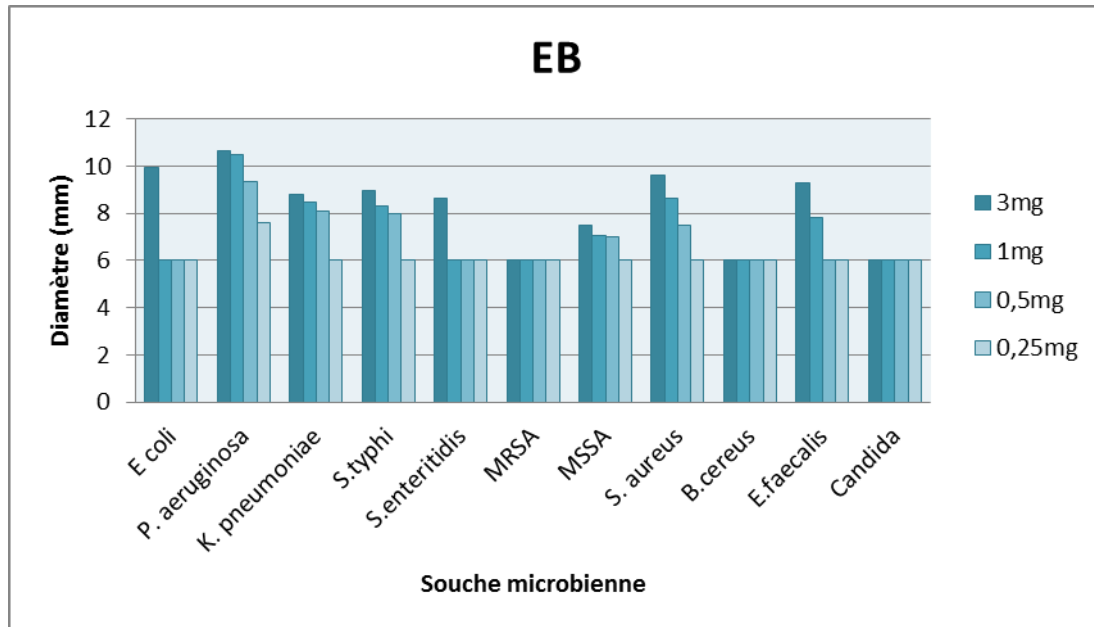


Figure 26 : Sensibilité des microorganismes à l'extrait EB.

En se basant sur le dosage des saponines dans cet extrait, qui a révélé une quantité élevée en ces métabolites secondaires (145 mg équivalent digitonine par gramme d'extrait sec), et selon les études qui ont été faites sur l'activité antimicrobienne des extraits butanolique (Sprag, 2004 ; Cheok, 2014), le pouvoir antimicrobien (Figure 27) est peut être lié à la présence des saponines dans ces extraits, notant que Thiem et *al.* (2010) ont cité que l'activité pharmacologique de *Eryngium* dépend principalement de leur forte teneur en saponines.

Chan et *al.*, (2014) ont fait la liaison entre l'activité antimicrobienne présentée par les saponines et leurs structure unique : des glycosides qui sont constitués d'un stéroïde ou terpénoïde aglycone lié à une ou plusieurs chaînes de sucre.

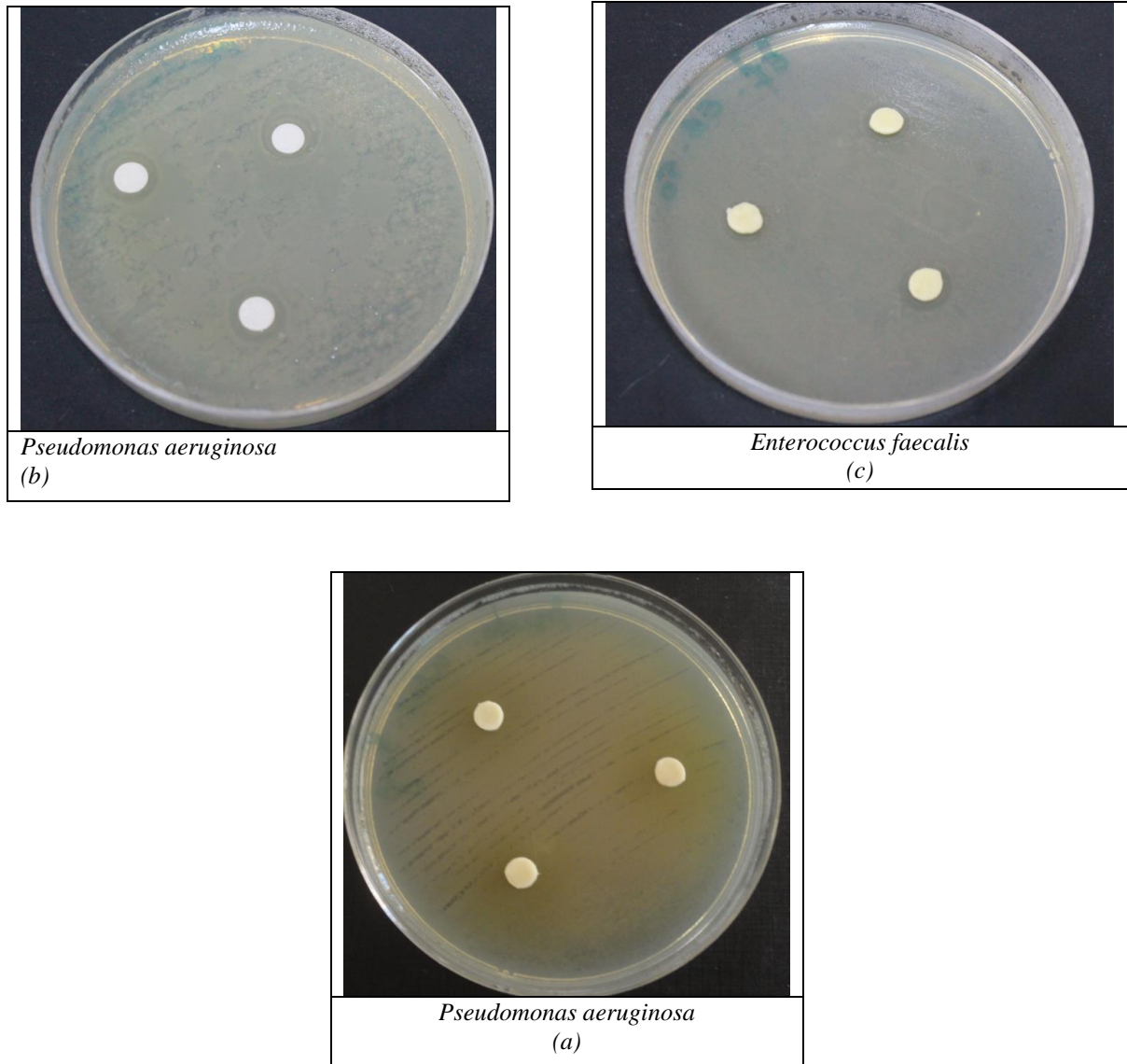


Figure 27: Effet de l'extrait EB sur la croissance bactérienne avec différentes concentrations ; (a) : 3mg/disque ; (b) : 1mg/disque ; (c) : 0.5mg/disque.

Les mécanismes d'action antimicrobienne des métabolites secondaires des plantes ne sont pas entièrement compris, mais plusieurs études ont été menées dans ce sens : les flavonoïdes peuvent agir par inhibition de la fonction de la membrane cytoplasmique ainsi que par l'inhibition de l'ADN gyrase (Paiva et *al.*, 2010), le mécanisme d' action des tanins peut être liée à leur capacité à inactiver les adhésines microbiennes, les enzymes, les protéines de transport dans l'enveloppe cellulaire (Negi, 2014).

III. 5.4. Résultat du test du pouvoir antibactérien sur milieu liquide (CMI et CMB)

Les concentrations minimales inhibitrices des souches bactériennes ont été déterminées par la méthode de contact direct sur milieu liquide, ce test permet la révélation de l'inhibition de la croissance bactérienne qui se traduit par la clarté du milieu de culture liquide (bouillon nutritif).

Les résultats obtenus après incubation des cultures bactériennes sont présentés dans le tableau 23.

Tableau 23 : Pouvoir antibactérien des extraits EB et EA en contact direct sur milieu liquide.

Microorganismes	[] Extrait en mg/ml (CMI/CMB)	
	AE	EB
<i>Escherichia coli</i>	TN	>8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6/>6	>8
<i>Salmonella typhi</i>	>8	TN
<i>Staphylococcus aureus</i>	>8	>8
<i>Enterococcus faecalis</i>	TN	>8
<i>Bacillus cereus</i>	2/4	TN

TN : test non réalisé

Le tableau 23 nous donne les CMI et CMB des souches (Gram positif et Gram négatif) qui ont présenté une sensibilité élevée par rapport au reste des souches du groupe bactérien ; ainsi que le test n'est réalisé qu'avec deux extraits (EA et EB) à cause de la couleur foncée du milieu lorsqu'on utilise des concentrations importantes en extraits méthanoliques et d'éther de pétrole, la richesse de ces derniers en pigments verts ne permet pas la visualisation du changement du milieu (limpide ou trouble).

La souche *Bacillus cereus*, d'après le tableau 23, présente la valeur la plus faible de concentration inhibitrice et bactéricide avec 4 et 2 mg d'extrait EA par millilitre respectivement (Figure 28), les autres souches ont montré des CMI plus élevées avec les deux extraits.

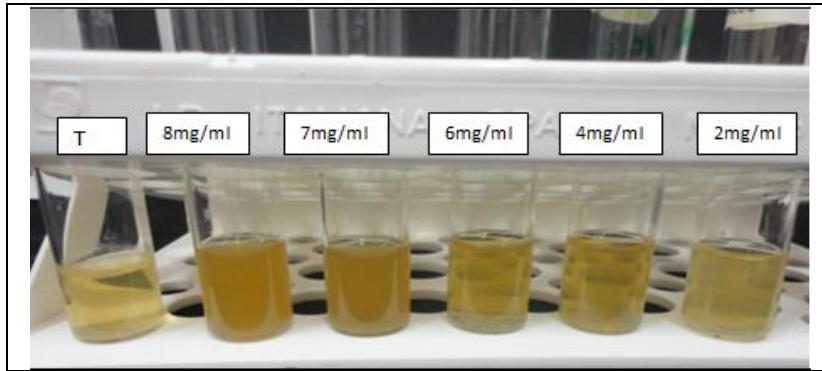


Figure 28: Séries des cultures de différentes dilutions pour tester l'activité antimicrobienne de l'extrait EA sur la souche *Bacillus cereus* avec T : témoin.

La grande différence en concentration entre la méthode de diffusion sur gélose et le contact direct en milieu liquide était traitée par Rhayour (2002) où elle a cité plusieurs recherches et études qui critiquent ces deux techniques à cause du problème de solubilité, diffusion et changement de structure de la molécule bioactive avec l'agent émulsifiant et milieu de culture, de plus et dans le même contexte Klančnik et *al.* (2010) ont discuté le problème de la diffusion des extraits dans les milieux de culture surtout pour les composés moins polaires et que la méthode de diffusion sur gélose est la plus utilisée mais pas toujours fiable.

III.5.5. Evaluation du pouvoir antifongique par contact direct sur milieu solide

Des tests réalisés *in vitro* (Tableau 24), sur les deux souches fongiques *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et *Fusarium culmorum*, afin de voir l'effet des extraits de la plante *Eryngium ilicifolium* sur la croissance de ces champignons phytopathogènes.

Tableau 24 : Pouvoir antifongique des extraits.

souche [] mg/ml	<i>Fusarium oxysporum</i> (Foa) Témoin = 71.2mm		<i>Fusarium culmorum</i> (F124) Témoin = 80.5mm	
	Extrait EM			
	Ø (mm)	T (%)	Ø (mm)	T (%)
8	33.5	53.23	48.1	40.24
5	44.10	37.92	55.5	31.05
2.5	47.5	33.28	58.4	27.57
Extrait EP				
10	21.0	70.50	36.1	55.15
8	28.1	60.53	42.0	47.82
Extrait EA				
2.5	29.5	58.56	29.6	63.22
1	42.3	40.58	49.8	38.13
0.5	51.1	28.37	68.1	15.40
Extrait EB				
6	40.4	43.25	48.3	40
4	44.1	30.06	52.1	35.27
2	51.5	27.66	60.4	24.96
1	58.6	17.69	68.5	14.90

Con : concentration

Ø (mm) : diamètre en millimètre

T(%) : pourcentage d'inhibition

Le tableau 24 regroupe tous les résultats du test de pouvoir antifongique, obtenus après la lecture, qui ont été traité et présenté sous forme de pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne.

Nous remarquons d'après ce tableau que :

- Tous les extraits ont présenté un pouvoir inhibiteur de la croissance des moisissures testés avec un intervalle de pourcentage d'inhibition entre 14.90 % et 70.50 %.
- L'espèce *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa) est plus sensible que l'espèce *Fusarium culmorum* (F124) avec une sensibilité élevée vis-à-vis les trois extraits EM, EP et EB tandis que l'extrait EA était plus actif sur l'espèce Foa.
- Le pourcentage d'inhibition le plus élevé est celui marqué dans le test de l'extrait EP avec plus de 70% à la concentration 10mg/ml.

- L'extrait qui possède le pouvoir antifongique le plus puissant parmi les quatre est l'extrait EA, qui a inhibé à 63.22% la croissance du *F124* avec une dose de 2.5 mg par millilitre de milieu de culture.

Beaucoup d'études ont montré que les espèces appartenant au genre *Eryngium*, ayant un pouvoir antifongique, citons l'espèce *E. creticum* qui a montré une activité antifongique sur huit espèces phytopathogènes (Wang et al., 2012).

Abad et al. (2007), a cité dans son étude sur le pouvoir antifongique des extraits végétaux, que l'espèce *Fusarium oxysporum* a montré une sensibilité aux extraits de plusieurs familles de plantes parmi elles, la famille des Apiaceae, c'est ce qui explique dans notre cas l'activité enregistré des extraits sur *Foa*.

L'extrait le plus actif est l'EA (Figure 29), ce dernier a présenté une richesse en composés phénoliques (flavonoïdes, tannins condensés) après le dosage qui a été fait dans ce travail, ça nous laisse constater que le constituant responsable à l'inhibition de la croissance fongique est peut être les composés phénoliques, selon Cushnie et Lamb (2005), les flavonoïdes ont la capacité d'inhiber la germination des spores des champignons phytopathogènes.

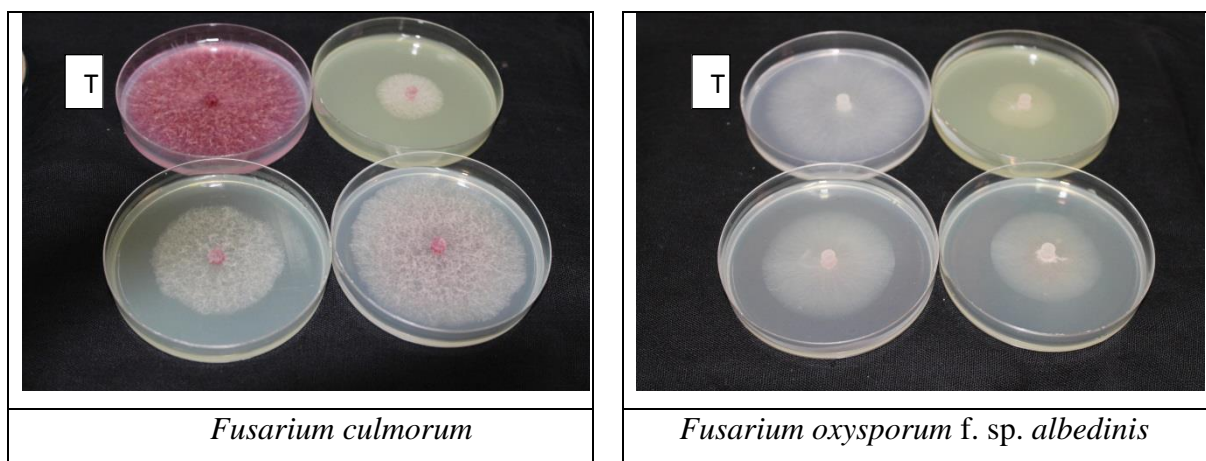


Figure 29: Pouvoir antifongique de l'extrait EA avec les concentrations : 2.5, 1 et 0.5 mg/ml sur les deux espèces étudiées ; T : témoin.

L'extrait EB est aussi actif sur la croissance fongique (Figure 30) sachant que le dosage des saponines dans ce dernier a montré qu'il en contient en quantité importante.

En se référant à la bibliographie, nous découvrons que ces métabolites secondaires jouent un rôle de défense dans la plante contre les champignons phytopathogènes de plus la fraction du n-butanol a montré une activité contre les champignons (Bruneton, 2009 ; Cheok et *al.*, 2014). Le mécanisme d'action antifongique des saponines n'est pas bien compris, mais c'est peut être que leur complexe avec les stérols dans la membrane cellulaire, conduit à la formation de pores et par conséquent la perte de l'intégrité de la membrane (Mert-Turk, 2005).

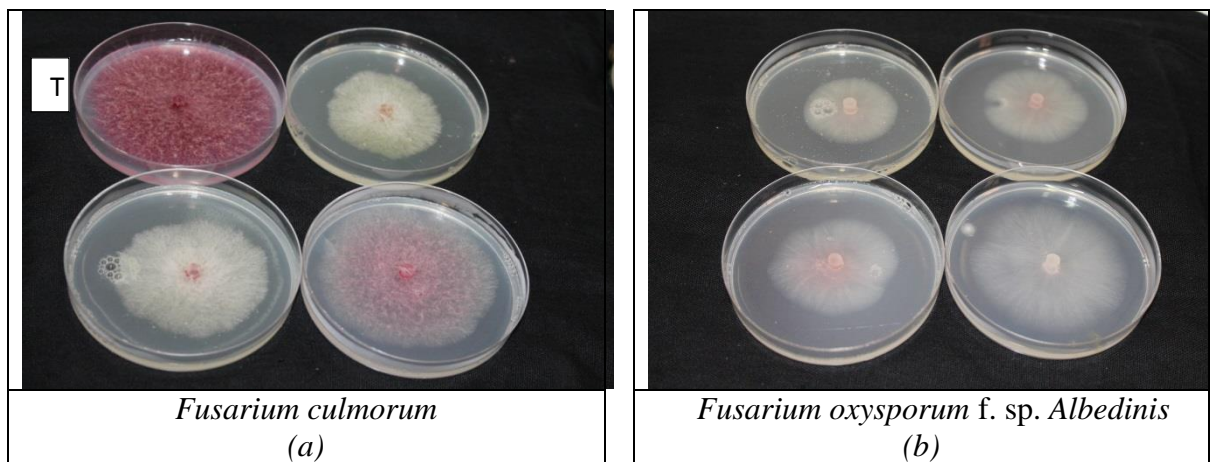


Figure 30: Pouvoir antifongique de l'extrait EB avec les concentrations : (a) 1, 4 et 6 mg/ml ; (b) : 1, 2,4 et 6 mg/ml sur les deux espèces étudiées ; T : témoin.

De même que pour les extraits EM et EP, leur activité sur les souches fongiques (Figure 31 et 32) peut être liée à leur composition en métabolites secondaires, surtout l'EM où il était riche en composés phénoliques (tannins, flavonoïdes) et saponines.

Une étude sur la composition de la même espèce mais d'origine espagnole (Pinar et Galan, 1985) a montré la présence des coumarines ce qui peut lier l'action de l'extrait EP (Tiwari et *al.*, 2011) sur les souches phytopathogènes sachant que les coumarines sont synthétisés principalement dans les feuilles, et elles s'accumulent sur la surface des feuilles, des fruits et des graines afin de protéger les plantes contre les pathogènes fongiques (Negi, 2014).

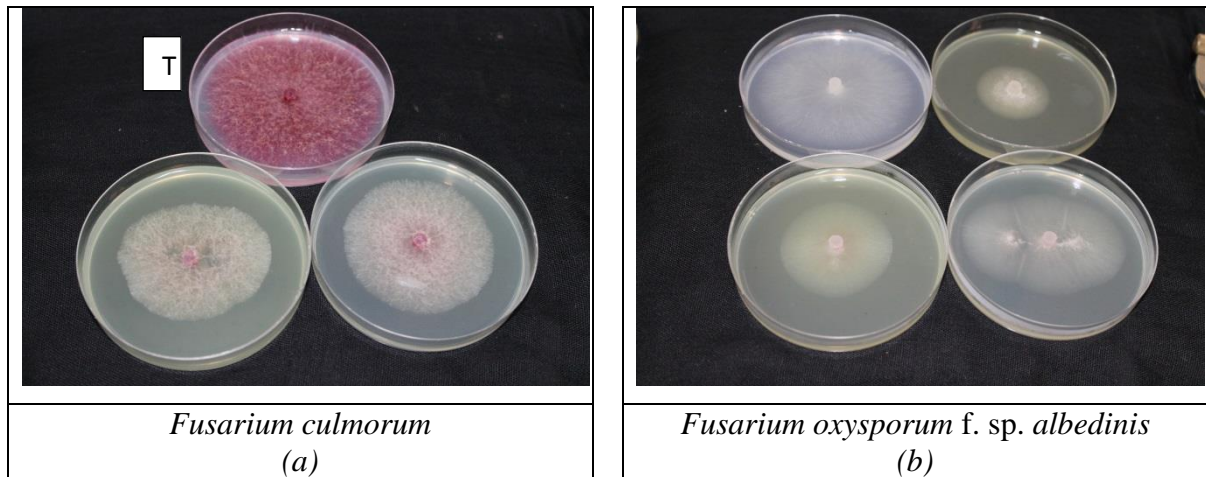


Figure 31: Pouvoir antifongique de l'extrait EM avec les concentrations ; (a) 2.5 et 5 mg/ml ; (b) : 2.5, 5 et 8 mg/ml sur les deux espèces étudiées ; T : témoin.

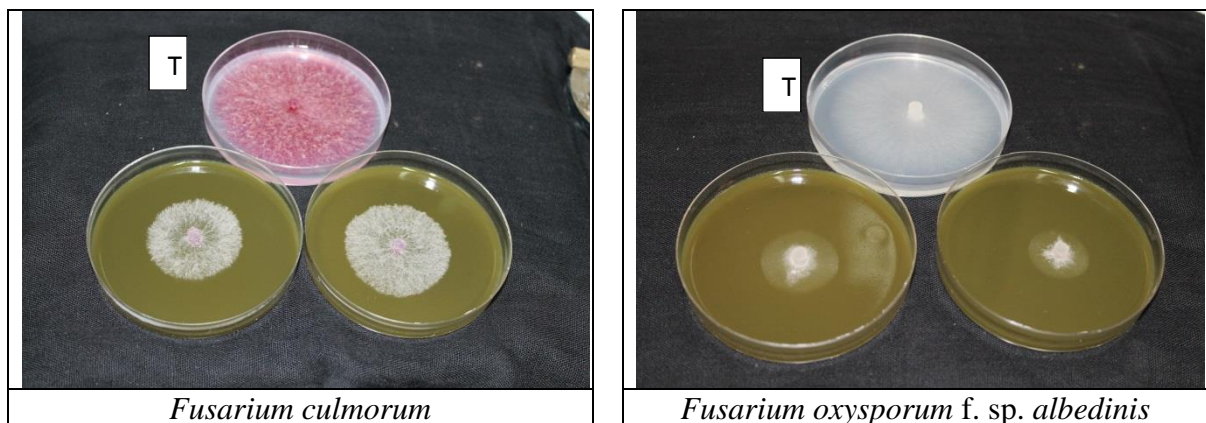


Figure 32: Pouvoir antifongique de l'extrait EP avec les concentrations : 8 et 10 mg/ml sur les deux espèces étudiées ; T : témoin.

A la lumière des résultats obtenus après le test du pouvoir antimicrobien des différents extraits de *Eryngium ilicifolium*, nous pouvons conclure :

- L'espèce végétale est riche en composés bioactifs d'une action modérée (antibactérienne) à significative (antifongique), un résultat proche est celui obtenu par Thiem et *al.* (2010) où ils ont étudié le pouvoir antimicrobien de trois espèces appartenant au même genre, ce qui confirme la capacité de ce taxon de produire des composés responsables des propriétés antifongiques des extraits.

- La différence d'action entre les extraits de la même plante prouve la complexité et la diversité des composés, le changement du solvant d'extraction a fait la différence entre les quatre extraits en quantité et en qualité, et par conséquent influence sur le pouvoir antimicrobien, ce qui est confirmé dans la littérature (Rio et Recio, 2005 ; Tiwari, 2009 ; Seidel, 2012 ; Routray et Orsat, 2013 ; Prado et *al.*, 2014).

Conclusion

Cette étude a été effectuée dans le but de tester l'activité biologique des extraits de l'espèce végétale *Eryngium ilicifolium*, la première étape était de tester la présence de certains métabolites secondaires dans la partie aérienne de la plante *E.ilicifolium*, les résultats ont montré l'existence des flavonoïdes, tannins condensés, saponines et huiles essentielles tandis que le test des alcaloïdes a donné une réaction négative.

Deux différents procédés d'extraction sont employés pour avoir Les quatre extraits : l'extrait méthanolique (EM) et trois extraits issus des fractions de solvants avec polarité croissante : l'extrait d'éther de pétrole (EP), l'extrait d'acétate d'éthyle (EA) et l'extrait du n-butanol, les rendements d'extraction sont de 9.9% pour l'extrait EM, et (2.38%) EB > (2.17%) EP > (1.36%) EA.

Le dosage des produits du métabolisme secondaire (phénols totaux, flavonoïdes, tannins condensés et saponines) à l'aide des molécules standards, a révélé la richesse des extraits en ces composé avec des teneurs plus au moins importantes.

L'évaluation du pouvoir antioxydant des extraits EM, EP, EA et EB par les tests de piégeage du radical libre DPPH, nous a laissé constater que cette plante est riche en composés biochimiques ayant des EC₅₀ compris entre 633.07µg/ml et 98.27 µg/ml et qui sont importantes en comparaison avec la molécule standard, la vitamine E qui a un EC₅₀ de 22.58 µg/ml.

Une dernière partie des essais a été réalisée qui est le test de l'activité antimicrobienne des extraits de *E.ilicifollium* contre treize (13) souches microbienne pathogènes (procaryotes et eucaryotes), nous pouvons déduire à la lumière des résultats obtenus de ces essais que :

- L'activité des extraits était plus au moins faible contre les bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus*, MRSA, MSSA, *Bacillus cereus* et *Enterococcus faecalis*, et à Gram négatif : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* et *Salmonella enteritidis*, où la souche révélée la plus sensible à nos extraits (EA) est *B.cereus* dans les deux méthodes : diffusion sur gélose et contact direct sur milieu liquide, notant la sensibilité de la souche *P. aeruginosa* à l'extrait EB cette souche paraît résistante aux antibiotiques.

- Les extraits n'ont aucun effet sur la croissance de la levure *Candida albicans*.
- Le test du pouvoir antifongique des quatre extraits contre deux souches de champignons phytopathogènes qui sont *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et *Fusarium culmorum*, reflète l'activité de ces composés sur la croissance microbienne avec une inhibition de la croissance allant jusqu'à un pourcentage d'inhibition de plus de 70%.

Cette étude peut être le premier pas dans le chemin de la découverte et de l'exploitation des composés biologiquement actifs de l'espèce *Eryngium ilicifolium*, en se basant sur la poursuite des expérimentations qui seront à plusieurs niveaux :

- L'essai avec plus d'une méthode d'extraction en optimisant les conditions physicochimiques ainsi que la technique pour pouvoir arriver à un maximum de nombre d'extrait de différence qualitative et quantitative.
- L'identification chimique des extraits par les techniques d'analyse biochimique (chromatographie et spectroscopie).
- L'évaluation de l'activité antioxydante par d'autres tests.
- Elargir le spectre des essais de l'activité antimicrobienne par l'augmentation du nombre des souches bactériennes et fongiques testées ainsi que tester *in vitro* l'activité antiparasitaire et antivirale de ces principes actifs.
- Isolement par des méthodes d'analyse et séparation chimique des molécules actives et étude de la réaction molécule active-cellule microbienne, en plus la recherche de la synergie entre ces composés bioactifs et d'autres considérés comme molécules antimicrobiennes.

Références
Bibliographiques

• حليمي. ع. 2004. النباتات الطبية في الجزائر. BRITED. 302 p. Alger.

A

- **Abad M. J., Ansuategui M. et Bermejo P., 2007.** Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc*, 116-145.
- **Afssaps., 2008.** Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles, contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. 16 p.
- **Ahmad I., Aqil F. et Owais M., 2006.** Modern Phytomedicine , Turning Medicinal Plants into Drugs. *Weinheim*, 369p.
- **Ait Youcef M., 2006.** Plantes médicinales de Kabylie, *IBIS PRESS*. Paris, 249p.
- **Anderson Ø. M. et Markham K. R., 2006.** Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications. *Taylor&Francis*, 1199p.
- **Anne-Laure B., Vessela. A.P., Jacques G., Barreau C. et Forget-Richard F., 2007.** Analyse de facteurs biochimiques interagissant dans le processus de biosynthèse des TCT B. *Colloque Fusariotoxines des Céréales – Arcachon*. 22p.
- **Avril J. L., Dabernat H., Denis F. et Monteil H., 1992.** Bactériologie Clinique. 2ème ED, *ellipses*. Paris, 135-148.

B

- **Baba Aissa. F., 1999.** Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb. *Edas*, 368 p.
- **Batabyal B., Kundu G.K.R. et Biswas S., 2012.** Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* : a brief review. International research, *journal of biological sciences*, **1**, 65-71.
- **Bekhechi C., Atik-Bekkara F. et Abdelouahid D. E., 2008.** Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Pharmacognosie, Phytothérapie*, **6**, 153-159.
- **Békro Y.A., Mamyrbekova Békro J. A., Boua B. B., Fézan H. et Éhilé E., 2007.** Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Sciences & Nature*, **2**, 217 – 225.

- **Belaiche. J., 1979.** Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 l'aromatogramme. *Maloine S.A. EDITEUR*. Paris, 204 p.
- **Bellakhdar J., 1997.** Pharmacopée traditionnelle marocaine. *Ibis Press*. Paris, 764p.
- **Bellakhdar J., 2008.** Hommes et plantes au Maghreb. Eléments pour une méthode en ethnobotanique. *Plurimondes*. France, 386 p.
- **Benarous K., 2010.** Evaluation de l'activité antioxydante et étude des effets inhibiteurs des extraits phénoliques, saponines et alcaloïdes sur la lipase de *Candida rugosa*, mémoire de magister, *Université Amar Telidji – Laghouat*, 105 p.
- **Benarous K., Djeridane A., Kamli A. et Yousfi M., 2013.** Inhibition of *Candida rugosa* Lipase by Secondary Metabolites Extracts of Three Algerian Plants and their Antioxydant Activities. *Current Enzyme Inhibition*, **9**, 75-82.
- **Beniston N.T et Beniston W.C., 1984.** Fleurs d'Algérie. ENAL. Algérie, 359p.
- **Benson., 2001.** Microbiological Applications Lab Manual, *the McGraw–Hill Companies*, 478p.
- **Berman J. et Sudbery P. E., 2002.** *Candida albicans* : A molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature Publishing Group*, **3**, 918-930.
- **Berset C.** antioxydants phénoliques-structure, propriétés, source végétales.p265 in **Sarni-Manchado P. et CheynierV., 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier, *Tech&Doc*, 380p.
- **Boudoux D., 2001.** L'aromathérapie se soigner par les huiles essentielles. 2ème ED, *Atlanatica*, Paris. P. 11- 34.
- **Bougandoura N. et Bendimerad N., 2012.** Effet antifongique des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp.(Nepeta) briq.* *Revue des Bio Ressources*, **2**, 1-7.
- **Bousseboua H., 2005.** Eléments de microbiologie, *Campus –Club*, 303p.
- **Bouzid, W., Yahia M., Abdeddaim M., Aberkane M.C. et Ayachi A., 2011.** évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'aubépine monogyne. *Lebanese Science Journal*, **12**, 59-69.
- **Briemann H. L., Setzer W.N., Kaufman P .B., Kirakosyan A.etCseke L. J.** Phytochemicals: The Chemical Components of Plants. P1, in **Cseke L. J., Kirakosyan A., Kaufman P. B., Warber S.L., Duke J. A. et Briemann H. L., 2006.** Natural products from plants. 2ème ED, Taylor & Francis Group, 587p.
- **Bruneton J., 2009.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Medicinales. Techniques et Documentation, 4e ED, *Lavoisier*. Paris, 1243p.

C, D

- **Calvino C., Martí'nez G. S., et. Downie R .S., 2008.** The evolutionary history of *Eryngium* (Apiaceae, Saniculoideae): Rapid radiations, long distance dispersals, and hybridizations. Elsevier, *Molecular Phylogenetics and Evolution* ,**46**,1129–1150.
- **Cazau-Beyret N., 2013.** Prise en charge des douleurs articulaires par aromathérapie et phytothérapie. Thèse de doctorat. *Université de Toulouse III Paul Sabatier*, 192p.
- **Chabrier J-Y., 2010.** Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse de doctorat. *Université Henri Poincare.Nancy1*, 165p.
- **Chan K. W., Iqbal S., Khong M. H. N., Ooi J. D. et Ismail M., 2014.** Antioxidant activity of phenolics-saponins rich fraction prepared from defatted kenaf seed meal. Elsevier, *Food Research International* ,**59**, 16–40.
- **Cheon C.Y., Abdel Karim Salman H. et Sulaiman R., 2014.** Extraction and quantification of saponins. Elsevier, *Food Research International* ,**59**, 16–40.
- **Cowan M. M., 1990.** Plant Products as Antimicrobial Agents. American Society for Microbiology, *Clinical microbiology* , **12**, 564-582.
- **Croteau T., Kutchan T. M. et Lewis N. G., 2000.** Natural products (secondary metabolites). American society of plant physiologists. *Biochemistry & molecular biology of plants*, 1250-1318.
- **Cseke L. J., Setzer W. N., Vogler B., Kirakosyan A., et Kaufman P. B.** Traditional, Analytical, and Preparative Separations of Natural Products. P263 in **Cseke L. J., Kirakosyan A., Kaufman P. B., Warber S.L., Duke J. A. et Brielmann H. L., 2006.** Natural products from plants. 2èmeED, *Taylor & Francis Group*, 587p.
- **Cushnie T.T.P. et Lamb A. J., 2005.** Antimicrobial activity of flavonoids. Elsevier, *International Journal of Antimicrobial Agents* ,**26**,343–356
- **Daglia M., 2012.** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* , **23**,174–181.
- **Dai J. et Mumper J. R., 2010.** Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* , **15**, 7313-7352.
- **Djelouat S., 1990.** **Le diagnostique biochimique bactérien.** ED Science Technique. Constantine, 112p.
- **Dramane S., Witabouna K M., Kagoyire K., 2010.** Evaluation des Activites Antimicrobiennes et Anti-Radicaux Libres de Quelques Taxons Bioactifs de Côte D'ivoire, *European Journal of Scientific Research*, **40**, 307-317.

- **Dupont F. et Guignard J.-L., 2012.** Botanique les familles de plantes. Elsevier *Masson*. 285p.
- **Dunkić V., Vuko E., Bezić N., Kremer D. et Ruščić M., 2013.** Composition and antiviral activity of the essential oils of *Eryngium alpinum* and *E. amethystinum*. *Chem Biodivers*, **10**, 1894-902.

E, F

- **El Rhaffari L. et Zaid A., 2002.** Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. *Des sources de savoir aux médicaments de futur*, 293-318p.
- **Emerson J., 2004.** Aromatherapy, *BizDirect*. 73p.
- **Evans W. C., Trease E. G. et Evans D., 2002.** Trease and Evans Pharmacognosy. 15ème ED, *Elsevier*, 585 p.
- **Facchini P.J., 2001.** Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Plant Physiology, Plant Molecular Biology*, **52**, 29–66
- **Fandohan P., Gbenou J. and Gnonlofin B., 2004.** Effet of essential oil on the growth of Fumonisin contamination in corn. *J. Agric, Food Chem.*, **52**, 6824-6829.
- **Farhan H., Malli F., Rammal H., Hijazi A., Bassal A., Ajouz N. et Badran B., 2012.** Phytochemical screening and antioxidant activity of Lebanese *Eryngium creticum* L. Elsevier, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. ,**S**, 1217-1220.
- **Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D. et Guo Z., 1986.** Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé.*, **64**, 159-164.
- **Fattorusso E. et Tagalialatela-Scafati O., 2008.** Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology. *Wiley-VCH. Verlag* . 641p
- **Fattorusso E. et Taglialatela-Scafati O., 2008.** Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, *Weinheim*, 641p.
- **Favier A., 2003.** Le stress oxydant. mécanismes chimiques. *L'actualité chimique*, 108-115p.
- **Fernandez D., 2006.** Dossier pour l'obtention du diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches. *Université Montpellier II Sciences de la vie*. 68p.

G, H

- **Goetz P., 2013.** La diversité de la phytothérapie. Springer, *Phytothérapie*, **11**,147–148.
- **Goussard J-P., 1999.** Les radicaux libres et antioxydants.*in* Guide nutritionnel des sports d'endurance.11p.
- **Greet V., 2004.** Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Symposium « Antioxydants et alimentation », Institut *Danone*, 2p.
- **Grigonis D., Venskutonis P.R., Sivik B., Sandahl M. et Eskilsson C.S., 2005.** Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloë odorata*). *The Journal of Supercritical Fluids*, **33**,223-233.
- **Grunwald. J et Janicke. C., 2004.** Guide de la phytothérapie. *Marabout*, 416p.
- **Guard-Petter J., 2001.** The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environmental Microbiology*, **3**, 421-430.
- **Guiraud. J.P., 1998.** Microbiologie alimentaire. *DUNOD*. Paris, 615p.
- **Gurib-Fakim A., 2006.** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Elsevier, *Molecular Aspects of Medicine*, **27**, 1-93.
- **Hagerman A.E., 2002.**Tannin Handbook. Miami University, 2ème ED .*Oxford*, 116 pp.
- **Hamliche V., Merad R. et Azzouz M., 2013.** Plantes toxiques à usage médicinal du parcours méditerranéen. *Springer*. Paris, 391p.
- **Harborne et Simmonds (1964) p 3. in Vermerris W. et Nicholson R., 2006.** Phenolic compound biochemistry. *Springer*, 267p.
- **Harinder Makkar P.S., Siddhuraju P. et Becker K., 2007.** Plant Secondary Metabolites. *Humana Press*, Totowa, New Jersey, 123p.
- **Hart T. et Shears P., 1999.** Atlas de poche de microbiologie. *Medicine-Sciences, Flammarion*. 310p.
- **Hashemabadi D. et Kaviani B., 2010.** Seasonal and geographical variations in the essential oils of *Eryngium craucasicum* Trautv. growing in Iran. *American- Eurasian J.Agric & Environ. Sci*, **8**, 212-215.
- **Hiai S., Oura H., and Nakajima T., 1976.** Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulphuric acid. *in Harinder Makkar P.S., Siddhuraju P. et Becker K., 2007.* Plant Secondary Metabolites. *Humana Press*, Totowa, New Jersey, 123p.

- **Hiai S., Oura H., and Nakajima T., 1976.** Color reaction of some saponins and saponins with vanillin and sulphuric acid. *in Vuonga Q. V., Hiruna S., Roacha P. D., Bowyera M. C., Phillips P.A. et Scarlett C. J., 2013.* Effect of extraction conditions on total phenolic compounds and antioxidant activities of *Carica papaya* leaf aqueous extracts. Elsevier, *Journal of herbal medicine*, **3**, 104-111.
- **Hilan C., Sfeir R., Jawish D. et Aitour S., 2006.** Huiles essentielles de certaines Plantes médicinales libanaises de la Famille des lamiaceae. *Lebanese Science Journal*, **7**, 13-22.
- **Hmissi, I., Gargouri, S., et Sifi, B., 2011.** Attempt of wheat protection against *Fusarium culmorum* using *Rhizobium* isolates. *Tunisian Journal of Plant Protection*, **6**, 75-86.
- **Holme D.J. et Peck H., 1998.** Analytical biochemistry. 3ème ED, Printice Hall, 481p.
- **Hosikian A., Lim S., Halim R. et Dunquah M.K., 2010.** Chlorophyll extraction from microalgae: a review on the process engineering aspects. *International journal of chemical engineering*, 11p.
- **Hostettmann K., 1999.** Strategy for the Biological and Chemical Evaluation of Plant Extracts. *Pure Appl. Chem*, **70**, 9p.
- **Ikramov M.T., Khazanovich R.L. et Khalmatov K.K., 1971.** The saponins of two species of *Eryngium*. *Tashkent pharmaceutical Institut.* N 6.p 843.

I, J

- **IPA : Institut Pasteur d'Algérie., 2002.** Catalogue, milieux de culture réactifs de laboratoire. *Institut Pasteur d'Algérie*, 105p.
- **Irving W., Ala'Aldeen D. et Boswell T., 2005.** Medical Microbiology. *Taylor&Francis*, 345p.
- **Iserin. P., 2001.** Encyclopédie des plantes médicinales. 2ème ED, *Larousse*, 335 p.
- **Jafari A., Aslani M.M. et Bouzari S., 2012.** *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. *Iranian journal of microbiology*, **4**, 102-117.
- **Jones W. P. et Kinghorn A. D., 2012.** Extraction of Plant Secondary Metabolites Natural Products Isolation, *Methods in Molecular Biology*, **864**, 342-366.
- **Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A et Stevens P., 2002.** Botanique systématique une perspective phylogénétique. *De Boeck Université*, 459p.

K

- **Kaabache M., 1990.** Les groupements végétaux de la région de Boussaâda(Algérie), essai de synthèse sur la végétation steppique du Maghreb. Thèse de doctorat, *Université de Pari- Sud*, Centre d'Orsay, 94p.
- **Kaper J.B., Nataro J. P. et Mobley H. L. T., 2004.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews, microbiology*, **2**, 123-140.
- **Kar A., 2007.** Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. 2ème ED. *New age international*, 835p.
- **Karou D., Sawadogo A., Canini A., Yameogo S., Montesano C., Simpure J., Colizzi V. et Traore A.S., 2006.** Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *African journal of biotechnology*, **5**, 195-200.
- **Kassis-Chikhani N., 2012.** *Klebsiella pneumoniae* pathogène nosocomial résistance et virulence. Thèse de doctorat .*Université Pierre et Marie Curie Paris 6*, 190p.
- **Kayser M.D. F. H., Bienz K. A., Eckert Ph.D. J. et Zinkernagel M.D. M. R., 2005.** *Medical Microbiology. Thieme*, 698 p.
- **Khalfallah A., Berrehal D., Kabouche A., Karioti A., Bilia A-R. et Kabouche Z., 2014.** Flavonoids, antioxidant and antibacterial activities of *Eryngium triquetrum* . *Chemistry of Natural Compounds*, **50**, 130-132.
- **Kholkhal W., Ilias F., Bekhechi C. et Atik Bekkara F., 2012.** *Eryngium maritimum*: A Rich Medicinal Plant of Polyphenols and Flavonoids Compounds with Antioxidant, Antibacterial and Antifungal Activities. Maxwell Scientific Organization, *Current Research Journal of Biological Sciences*, **4**,437-443.
- **Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B. et Možina S. S., 2010.** Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. Elsevier. *Journal of Microbiological Methods*, **81**,121–126.
- **Klibi N., Said L.B, Jouini A., Ben Slama K., López M., Ben Sallem R., Boudabous A. et Torres C., 2013.** Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in enterococci from meat in Tunisia. Elsevier, *Meat Science*, **93**,675–680.
- **Koolman J et Rhom K.H., 2005.** Color atlas of biochemistry. 2ème ED, *Thieme* , 437p.
- **Koolman J. et Roehm K-H., 2005.** Color Atlas of Biochemistry. 2ème ED *Thieme*, Stuttgart · New York, 437p.

- **Kmuro A. C., Hasan M. et Singh H., 2009.** Effects of solvent properties on the Soxhlet extraction of diterpenoid lactones from *Andrographis paniculata* leaves. Short report. *ScienceAsia* ,**35**, 306–309.
- **Kupeli E., Kartal M., Aslan S. et Yesilada E., 2006.** Comparative evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activity of Turkish *Eryngium* species. Elsevier, *Journal of Ethnopharmacology*, **107**, 32–37.

L, M

- **Lacroix. M et Caillet. S., 2007.** RESALA (Recherche en sciences appliquées à l'alimentation). France, P. 1-3.
- **Lamaison, J.L., Carnat, A., 1990.** Teneurs en acide rosmarinique, en dérivés hydroxycinnamiques totaux et activités antioxydantes chez les Apiacées, les Borraginacées et les Lamiacées médicinales. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* , **65**, 315–320.
- **Leslie J.F. et Summerell A.B., 2007.** The *Fusarium* laboratory manual. *Blackwell Publishing*, 369p.
- **Lewington A., 1993.** Medicinal plants and plant extracts. *Traffic international*, 36p.
- **Luby S.P., 2014.** Bacteria: *Salmonella Typhi* and *Salmonella paratyphi*. Elsevier, *Encyclopedia of Food Safety*, 1,515–522.
- **Macheix J.J., Fleurit A. et Jay-Allemand C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux. « un exemple de métabolites secondaires d'importance économique ». *Presse polytechniques et universitaires romandes*, 192 p.
- **Macheix J.J., Fleurit A. et Sarni-Manchado P. p 2 in Sarni-Manchado P. et CheynierV., 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier, *Tech&Doc*.380p.
- **Marčetić M.D., Petrović S.D., Milenković M.T. et Niketić M. S. 2014.** Composition, antimicrobial and antioxidant activity of the extracts of *Eryngium palmatum* Pančić and Vis. (Apiaceae). *Central European Journal of Biology*, **9**,149-155.
- **Marston A. et Hostettmann K. in Anderson Ø. M. et Markham K. R., 2006.** FLAVONOIDS Chemistry, Biochemistry and Applications. *Taylor&Francis*, 1199p.
- **Mengome L. E., Voxeur A., Akue J. P. et Lerouge P., 2014.** Screening of antioxidant activities of polysaccharides extracts from endemic plants in Gabon. Elsevier, *Bioactive carbohydrates and dietary fiber*, **3**, 77-88.

- **Merghache D., Boucherit-Otmani Z., Merghache S., Chikhi I., Selles C. et Boucherit K., 2014.** Chemical composition, antibacterial, antifungal and antioxidant activities of Algerian *Eryngium tricuspdatum* L. essential oil. *Nat Prod Res*, **28**,795-807.
- **Mert-Turk F., 2006.** Saponins versus plant pathogens. *Journal of cell molecular biology*, **5**, 13-17.
- **Mohammadhosseini M., Mahdavi B. et Akhlaghi H., 2013.** Characterization and Chemical Composition of the Volatile Oils from Aerial Parts of *Eryngium bungei* Bioss. (Apiaceae) by Using Traditional Hydrodistillation, Microwave Assisted Hydrodistillation and Head Space Solid Phase Microextraction Methods Prior to GC and GC/MS Analyses: A Comparative Approach. *Taylor & Francis Group*, 11p.
- **Molero G., Díez-Orejas R., Navarro-García F., Monteoliva L., Pla J., Gil C., Sánchez-Pérez M. et Nombela C., 1998.** *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. Springer, *Internatl microbial*, **1**, 95–106.
- **Molyneux P., 2004.** The use of the stable free radical diphenyl picryl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin, Sci. Technol*, **26**, 211-219.
- **Morigane ., 2007.** Grimoire des plantes. *Creative Commons*.194p.
- **MSPRH (Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière) ., 2005.** Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. Algérie, 94p.

N, O, P

- **Naczka M. et Shahidi F., 2004.** Extraction and analysis of phenolics in food. Elsevier. *Journal of Chromatography A*, **1054**, 95–111.
- **Nasution A. I., 2013.** Virulence factor and pathogenicity of *Candida albicans* in oral Candidiasis. *World journal of dentistry*, **4**, 267-271.
- **Negi S., 2014.** Exploring Plant and Agro-industrial Wastes for Antimicrobial Biochemicals. *Springer Science+Business Media*, New York.335-365.
- **Norgat-Ehrhart A.S., 2003.** La phytothérapie, se soigner par les plantes. *Eyrolles*, 20p.
- **OEPP (Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes), 2003.** *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Bulletin OEPP/EPPO*, **33**, 265–269.
- **Ozenda P., 1991.** Flore et végétation du Sahara. *CNRS*. Paris, 662p.
- **Padrini. F., et Lucheroni. M.T., 1996.** Le grand livre des huiles essentielles. *De Vecchi*, Paris, P. 11.

- **Paiva P.M.G., Gomes F.S., Napoleão T.H., Sá R.A., Correia M.T.S. et Coelho L.C.B.B., 2010.** Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. *FROMATEX*, 396-406.
- **Penchev P. I., 2010.** Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de doctorat. *Université de Toulouse*. 218p.
- **Pinar M. et Galiano W. P., 1985.** Coumarins from *Eryngium ilicifolium*. *Journal of natural products*, **48**, 853-854.
- **Popovici C., Saykova I. et Tylkowski ., 2009.** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, **4**, 25-39.
- **Pradoa A. C. P., da Silva H S ., da Silveira S .M ., Barretoa P. L.M., Vieiraa C .R. W., MaraschincM, Ferreirad S. R.S. et Blocka J. M., 2014.** Effect of the extraction process on the phenolic compounds profile and the antioxidant and antimicrobial activity of extracts of pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] shell. Elsevier, *Industrial crops and products*, **52**, 552-561.

Q, R

- **Quettier-Deleu C., Gressier B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyckx M., Cazin M., Cazin J-C., Bailleul F. et Trotin F., 2000.** Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. Elsevier, *Journal of Ethnopharmacology*, **72**, 35-42.
- **Quezel P. et Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II. *CNRS*. Paris, p 650.
- **Rates S.M.K., 2001.** Plants as source of drugs. Elsevie., *Toxicon*, **39**, 603-613.
- **Raven P.H., Evert R. F. et Eichhorn S .E., 2007.** Biologie végétale. *De Boeck et Larcier*, 733 p.
- **Reguieg L., 2011.** Using medicinal plants in Algeria. *American journal of food and nutrition*, **1**, 126-127.
- **Rhayour F., 2002.** Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de doctorat. *Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, -Fès-*, 161p.

- **Richter. G., 1993.** Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie. *Presses polytechniques et Universitaires, Romandes*, 526 p.
- **Rio J.L. et Recio M. C., 2005.** Medicinal plants and antimicrobial activity. Elsevier, *Journal of ethnopharmacology*, **100**, 80-84.
- **Roberts D et Greenwood M., 2003.** Practical food microbiology. 3ème ED, Blachwell publishing. London, 294p.
- **Roland Y., 2004.** Antioxydants naturels végétaux. *Burgundy Botanical Extracts*, **11**, 419-424.
- **Routray W. et Orsat V., 2013.** Preparative Extraction and Separation of Phenolic Compounds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. *Natural products*, 2014-2037.
- **Rybak M.J., Pharm D et LaPlante K.L., 2005.** Community –Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* : a review. Reviews of therapeutics, *pharmacotherapy*, **25**, 74-85.

S, T

- **Salhi S., Fadli M., Zidane L. et Douira A., 2010.** Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc). *LAZAROA*, **31**, 133-146.
- **Salvat A., Antonacci L., Fortunato R.H., Suarez E.Y. et Godoy H.M., 2004.** Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. Elsevier, *Phytomedicine*, **11**, 230–234.
- **Sedra H.M., 1994.** Evaluation de la résistance au bayoud (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*) chez le palmier dattier. Comparaison de méthodes d'inoculation expérimentales en palmeraie et en pépinière. Elsevier, *Agronomie*, **14**, 445-452.
- **Seidel V., 2012.** Initial and Bulk Extraction of Natural Products Isolation. Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology, vol. 864.
- **Seo K-H., Holtb P. S., Stoneb H.D., et Gastb R. K., 2003.** Simple and rapid methods for detecting *Salmonella enteritidis* in raw eggs. *International Journal of Food Microbiology*, **87**, 139– 144.
- **Sharma O. P. et Bhat T.K., 2009.** Analytical Methods, DPPH antioxidant assay revisited. Elsevier, *Food chemistry*, **113**, 1202-1205.
- **Silva NCC et Fernandes J. A., 2010.** Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, **16**, 402-413.

- **Singleton P., 2005.** Bactériologie pour la médecine, la biologie et la biotechnologie. *DUNOD*. Paris, 542 p.
- **Sparg S.G., Light M.E. et van Staden J., 2004.** Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* ,**94**, 219–243
- **Sudbery P.E., 2011.**Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature reviews microbiology*, **9**, 737-748.
- **Tantaoui A. et Boisson C., 1991.** Compatibilité végétative d'isolats du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et de *Fusarium oxysporum* de la rhizosphère du Palmier dattier et des sols de palmeraies. *Phytopnth. Inedit* , **30**, 155-163.
- **Tepe B., Donmeza E., Unlub M., Candanc F., Dafererad D., Vardar-Unlub G., Polissioud M. et Sokmena A., 2004.** Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). Elsevier, *Food chemistry* , **84**, 519-525.
- **Thara Saraswathi K.J., Chandrika R., Jayalakshmi N. R., et Mythri B., 2014.** Ecotypic variations in Indian populations of *Eryngium foetidum* L. *International Journal of Current Research and Review*, **6**, 01-06.
- **Thiem B., Goślińska O., Kikowska M. et Budzianowski J., 2010.** Antimicrobial activity of three *Eryngium* L. species (Apiaceae). *Herba polonica*, **56**, 53-58.
- **Thiem B., Kikowska M., Kurowska A. et Kalemba D., 2011.** Essential Oil Composition of the Different Parts and *In Vitro* Shoot Culture of *Eryngium planum* L. *Molecules*, **16**, 7115-7124.
- **Thormar H., 2011.** Lipids and essential oils as antimicrobial agents. John Wiley & Sons, 307p.
- **Tiwari P., Kumar B., Kaur M., Kaur G. et Kaur H., 2011.** Phytochemical screening and extraction: A review. *Internationale pharmaceutica sciencia*, **1**, 98-106.
- **Tunali Z., Kosar M., Ozturk N., Baser K. H. C., Duman H., et N. Kirimer., 2004.** Antioxidant properties and phenolic composition of *Sideritis* species. *Chemistry of Natural Compounds*, **40**, 206-210.
- **Turgeon M., 2001.** Profil des produits forestiers première transformation Huiles Essentielles. Gouvernement du Québec, Ministère des ressources naturelles. P 1.
- **Uperty Y., Asselin H., Dhakal A., et Julien N., 2012.** Traditional use of medicinal plants in the boreal forest of Canada, review and perspectives. *Journal of ethnobiology and ethnomedecine*, **8**, 14p.

V, W

- **Vermerris W. et Nicholson R., 2006.** Phenolic compound biochemistry. *Springer*, 267p.
- **Vijay P., Nivedita et Bellundagi A., 2013.** Ethanobotany and qualitative phytochemical analysis of some indian medicinal plants. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, **4**, 59-63.
- **Wang P., Yuan W., Deng G., Su Z et Li S., 2012.** Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Eryngium* L. (Apiaceae). *Pharmaceutical Crops* , **3**, 99-120.
- **Wang P., Yuan W., Deng G., Su Z et Li S., 2013.** Triterpenoid saponins from *Eryngium yuccifolium* “Kershow blue”. Elsevier, *Phytochemistry letters*, **6**, 306-309.
- **Wang S. Y, Chen. P. F et Chang. S. T., 2005.** Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophleoum*) leave against wood decay fungi. *Bioresource Technology* ,**96**, 813- 818.
- **Warda K., Markouk M., Bekkouche K., Larhsini M., Abbad A., Romane A. et Bouskraoui M., 2009.** Antibacterial evaluation of selected Moroccan medicinal plants against *Streptococcus pneumonia*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* ,**3**, 101-104.
- **Wichtl. M et Anton. R., 1999.** Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. *Technique & Documentation. Paris*, 636 p.
- **William N. Setzer and Bernhard Vogler.** Bioassays for Activity. p389 in **Cseke L. J., Kirakosyan A., Kaufman P. B., Warber S.L., Duke J. A. et Brielmann H. L., 2006.** Natural products from plants. 2ème ED, *Taylor & Francis Group*, 587p.

Y, Z

- **Yi S., Zhu J., Fu L. et Li J., 2010.** Tea polyphenols inhibit *Pseudomonas aeruginosa* through damage to the cell membrane. Elsevier, *International Journal of Food Microbiology*, **144**, 111–117.
- **Yukiko T., Shikishima Y., Takaishi I., Shibata H. and Higutu T., 2002.** Coumarins and gamma pyrone derivatives from *Prangos pabularia*: antibacterial activity and inhibition of cytokine release. *Phytochemistry*, **59**, 649-654.
- **Zhang Z., Li S., Ownby S., Wang P., Yuan W., Zhang W. et Beasley R. S., 2008.** Phenolic compounds and rare polyhydroxylated triterpenoid saponins from *Eryngium yuccifolium*. *Phytochemistry*, **69**, 2070.

- **Zhiri A., et Baudoux D., 2005.** Huiles Essentielles Chémotypées Et Leurs Synergies. *Inspir Development*, 80 p.

Annexes

Annexe A

Tableau A1 : Galerie biochimique classique des souches bactériennes testées.

Les Souches bactérienne	T.S.I	Mannitol	Mobilite	ONPG	Citrate de Simmons	Urease	Indole	TDA	LDC	ODC	ADH	Oxydase	Catalase
<i>Escherichia coli</i>	Glu+Lac+Sac+Gaz +H ₂ S-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Glu+Lac+Sac+Gaz +H ₂ S-	+	-	+	+	+	-	/	+	-	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glu+Lac+Sac+Gaz +H ₂ S-	+	+	-	+	+	-	/	-	-	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i> *	Glu+Lac+Sac+Gaz- H ₂ S-	+	-	-	-	-	-	/	-	-	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Glu+Lac+Sac+Gaz- H ₂ S-	+	-	-	-	+	-	/	+	+	+	-	+
<i>Bacillus cereus</i>	Glu+Lac+Sac+Gaz- H ₂ S-	-	+	-	-	-	+	/	+	+	+	/	-

+ : réaction positive
- : réaction négative
/ : test non réalisé
Glu : glucose
Lac : lactose
Sac : saccharose
*Plus le teste de l'esculine : Esculine +

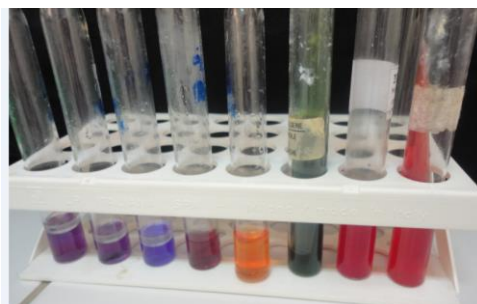
Figure A1 : Résultat de la galerie classique *Staphylococcus aureus*.



Figure A3 : Résultat de la galerie API Candida : *Candida albicans*.

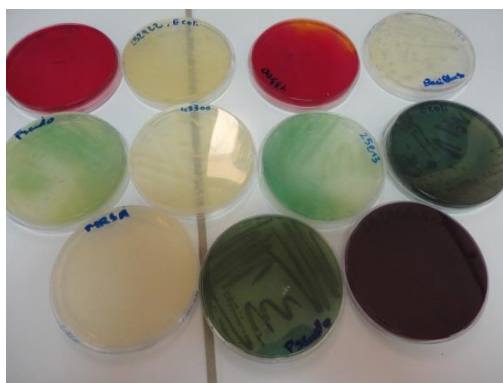


Figure A4 : Milieux sélectifs pour l'isolement des bactéries.



Figure A5 : Extraction liquide-liquide par solvants de différente polarité.

Annexe B

Coloration de Gram (Bousseboua, 2005)

- 1) **Fixation du frottis** de la suspension bactérienne par le séchage à la chaleur douce sur une lame porte objet ;
- 2) **Coloration primaire** au violet de gentiane pendant 1 min;
- 3) Stabilisation de la coloration au lugol pendant 1 min ;
- 4) **Décoloration** par l'éthanol à 95° pendant 30s ;
- 5) **Contre coloration** par une solution de fuschine diluée à 10% ou safranine 2.5%, pendant 20 à 30s.

Composition de certains milieux de culture

- **PDA (Potatoes dextrose Agar)**

Infusion de pomme de terre	200 ml
Agar-agar	15 g
Glucose	20 g
Eau distillée	qsp 1L

- **Milieu MH (Muller-Hinton)**

Infusion de viande de bœuf déshydratée	3 g
Hydrolysate de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar-agar	16 g
Eau distillée	qsp 1L
pH final	7,2 – 7,4

- **BN (Bouillon Nutritif)**

Peptone pancréatique	10 g
Extrait de viande	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	qsp 1L
pH final	7,2 – 7,4

- **Sabouraud gélose**

Neopeptone	30 g
Glucose	20 g

Agar-agar	20 g
Eau distillée	qsp 1L

▪ **Solution d'Agar 0,2%**

Agar-agar	2 g
Eau distillée	qsp 1L

▪ **Réactif de MAYER**

Chlorure de Mercure	1.36 g
Iodure de potassium	5 g
Eau distillée	100 ml

▪ **Réactif de Wagner**

Iodure de potassium	2 g
Iode	1.27 g
Eau distillée	100 ml

Annexe C

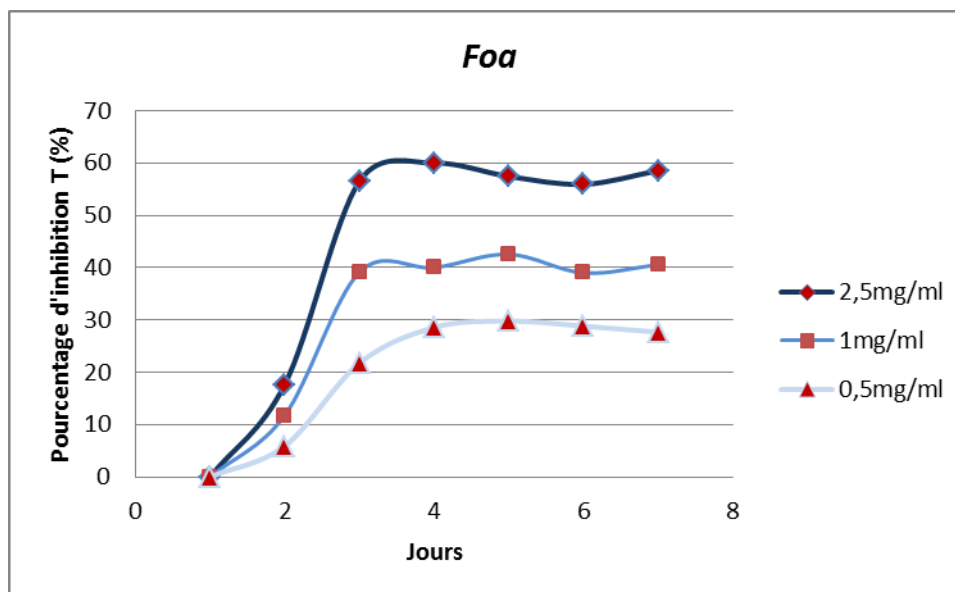


Figure C1 : Cinétique d'inhibition de la croissance fongique par l'extrait EA.

Foa: Fusarium oxysporum . f.sp . albedinis.

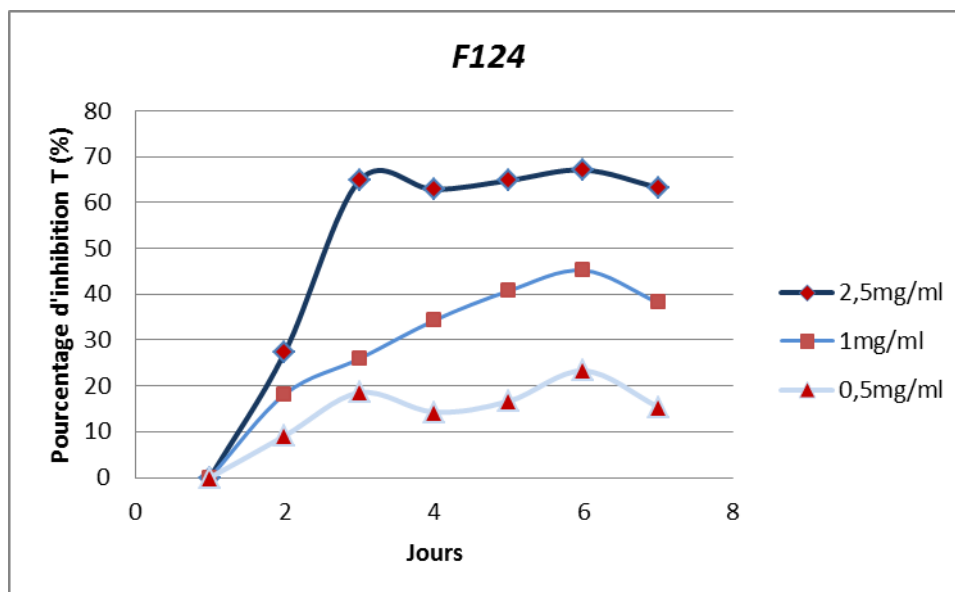


Figure C2 : Cinétique d'inhibition de la croissance fongique par l'extrait EA.

F124: Fusarium culmorum

ملخص

تم انجاز هذا العمل في إطار دراسة علمية تهدف إلى استخلاص المركبات الفيتوكيميائية من النوع: *Eryngium ilicifolium* المنتمي للفصيلة الكرفسية، ثم تحليلها كيميائياً و اختبار نشاطها البيولوجي. باستعمال طريقتين للاستخلاص تم الحصول على اربع انواع من النواتج: المستخلص الميثانولي (EM) من الطريقة الاولى اما الطريقة الثانية فقد اعطت نواتج بقطبية متزايدة كالتالي: مستخلص الايثير البترولي (EP), مستخلص خلات الايثيل (EA) و مستخلص البوتانول (EB). حيث تراوحت مردودية الاستخلاص من 1.36% الى 9.9%. الاختبارات الفيتوكيميائية الاولى مع معايرة نواتج الايض الثانوية في المستخلصات النباتية اظهرت وجود العديد من المركبات اهمها: الفينولات (الفلافونويدات و التانات) الصابونين و كذا الزيوت الطيارة. كشف تقييم الفعالية المضادة للأكسدة عن طريق اختبار DPPH ان المستخلصات النباتية ذات نشاط كبير مقارنة بمضادات الاكسدة المرجعية كما بين اختبار النشاط المضاد للميكروبات ان لهذه المستخلصات فعالية ضعيفة الى منعدمة ضد البكتيريا و الخميرة على التوالي في حين انها فعالة ضد العفن.

الكلمات المفتاحية: *Eryngium ilicifolium* نواتج الايض الثانوية، التحليل الكيميائي، النشاط البيولوجي

Résumé

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une étude scientifique qui vise l'extraction, l'analyse chimique et le test de l'activité biologique des composés phytochimiques à partir de l'espèce *Eryngium ilicifolium* Lam. qui appartient à la famille des Apiaceae. Deux procédés d'extraction ont été employés pour avoir quatre types d'extraits, l'un a donné un extrait méthanolique (EM), et l'autre a donné trois extraits de polarité croissante: l'extrait de l'éther de pétrole (EP), l'extrait d'acétate d'éthyle (EA) et l'extrait du n-butanol (EB). Les rendements des extractions ont varié entre 1.36% et 9.9%. Les tests phytochimiques préliminaires ainsi que le dosage des métabolites secondaires dans les extraits de la plante ont montrés la présence de plusieurs groupes de métabolites secondaires avec des teneurs variées: les composés phénoliques (flavonoïdes, tanins condensés), saponines et huiles essentielles. L'évaluation du pouvoir antioxydant par le test du DPPH a révélé une activité des extraits en comparaison avec les antioxydants de référence. Le test de l'activité antimicrobienne montre que les extraits ayant une action plus ou moins faibles contre les bactéries avec une absence d'effet sur la levure tandis que pour les moisissures les extraits ont montré une bonne activité.

Mots clés: *Eryngium ilicifolium*, métabolites secondaires, analyse chimique, activité biologique.

Abstract

This work was conducted as part of a scientific study that aims extraction, chemical analysis and testing biological activity of phytochemical compounds from the species *Eryngium ilicifolium* Lam. which belongs to the family of Apiaceae. Two extraction procedures were used for four types of samples, one gave a methanol extract (EM), and the other gave three samples of increasing polarity: petroleum ether extract (EP), ethyl acetate extract (EA) and n-butanol extract (EB). Extraction yields ranged between 1.36% and 9.9%. Preliminary phytochemical tests and the determination of secondary metabolites in plant extracts have shown the presence of several groups of secondary metabolites with various levels: phenolic compounds (flavonoids, condensed tannins), saponins and essential oils. The Evaluation of antioxidant activity by the DPPH test revealed that the extracts are very active by comparison with the reference antioxidants. The antimicrobial activity test showed that the extracts having more or less weak action against bacteria with an absence of effect on the yeast while the extracts showed good activity against molds.

Key words: *Eryngium ilicifolium*, secondary metabolites, chemical analysis, biological activities.