REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En chimie

Spécialité : Chimie macromoléculaire

Par :

ALLICHE Fadia
ETTOUHARI Yasmina

Thème :

Extraction de biomolécules à partir de différentes plantes spontanées dans la région de la wilaya de Médéa.

Soutenu publiquement le : 19 /06 /2019, Devant le jury composé de :

EULDJI Amel	MAB	Université de Médéa	Présidente
KIRDI Rachida	MAB	Université de Médéa	Examinatrice
FARCH Sabrina	MCB	Université de Médéa	Encadreur

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Avant tout, nos vifs remerciements infinis sont adressés à « Dieu le Tout Puissant » de nous avoir donné le courage et la santé pour achever ce travail.

Au moment où s'achève ce travail, permettez-nous de remercier du fond du cœur, tous ceux et celles qui, pendant cette période de travail, nous ont dirigé, soutenu, aidé et encouragé.

*Tout d'abord, nous tenons particulièrement à remercier notre promotrice M^me^* ***FARCH .S*** *enseignante à l'université de Médéa, tant pour avoir accordé sa confiance, sa grande disponibilité, ses précieux conseils, son aide et le temps qu'elle nous a consacré pour la réalisation de ce travail.*

*Nous adressons nos vifs remerciements à M^me^* ***EULDJI .A****, enseignante à la l'université de Médéa, qui nous fait un grand honneur en acceptant de présider le jury de notre travail.*

*Nous exprimons également toute notre reconnaissance à M^me^* ***KIRDI .R****, enseignante à l'université de Médéa, pour l'intérêt qu'elle porte à ce travail, en acceptant en examiner d'être notre mémoire.*

Nous tenons aussi à exprimer notre reconnaissance à M^me^ FERARCA .S et M^me^ CHAOUTI .K Pour leurs aides au laboratoire. *Ainsi qu'à tout le personnel du laboratoire de biologie, tous les enseignants du département de chimie physique de l'université de Médéa et toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

Dédicaces

Je dédie ce travail aux deux êtres les plus chers au monde

Qui ont donnés sens à mon Existence, et qui m'ont soutenu

Nuits et jours durant tout mon parcours.

Ma très chère mère et mon très cher père,

Avec mes prières qu'ils soient toujours en bonne santé.

À ma grand-mère et mon grand-père

À mes chers frères : AHMED, ALLAL, HAMZA, BILLAL, MOHAMED

A mes, oncles, tantes et à toute ma famille

Mon cher fiancé et sa famille

A mes amies : FAIZA, NAZIHA, HANAN, SAFIA, AMEL

A toutes mes amies de collège

Ma chère binôme YASMINA et sa famille

ET à toutes les personnes qui me sont chère

FADIA

Dédicace

Je dédie ce travail à mes très chers parents

Sans eux je n'aurais pas pu être ce que je suis

En reconnaissance de leurs efforts encouragements durant toute ma vie

Je ne trouve pas les mots pour traduire tout ce que je ressens envers

Des parents exceptionnels dont j'ai la fierté d'être leur.

A mes précieuses sœurs FATIHA, FATIMA et FAIZA

A mon très cher frère RACHIDE

A toute la famille ETTOUHARI

A mes amies SOUMIA, SABRA et ZINA, FAIROUZE

A toutes mes amies de collège

A ma binôme FADIA et sa famille

YASMINA

Sommaire

Liste de figure et de tableau

Liste des abréviations

Introduction générale……1

Références bibliographiques…….3

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Plantes médicinales *(Ruta chalepensis, Thym*)

I. Introduction……..4

I.1. Description des plantes ……4

I.1.1. Plantes médicinales ……..4

I.2. Plantes étudiées ……5

I.2.1. Ruta chalepensis……5

I.2.1.1. Présentation de la famille des rutacées ……..5

I.2.1.2.Présentation de l'espèce de ruta chalpenses ……...6

a. Description générale……6

b. Systématique de *Ruta chalepensis*……*6*

c. Distribution géographique de *Ruta chalepensis*……*7*

d. Principale L'utilisation de la plante ……8

I.2.2. Thym……..8

I.2.1.1.Présentation de la famille des lamiacées ……9

I.21.2.Présentation de l'espèce de thym …….....9

a. Description générale ……..9

b. Systématique des thymus ……10

c. Distribution géographique de Thym….....11

d. Principale utilisations du Thym……12

Références bibliographiques…….13

Chapitre II : Composes phénoliques et activité biologique

II. Introduction…….16
II.1. Structure et biosynthèse des composés phénoliques……16
II.1.1. Biosynthèse des composés phénoliques ……...16
a- Voie de l'acide shikimique…….17
b-Voie d'acétate malonat……...….17
II.1.2. Biosynthèse des flavonoïdes……..17
II.1.3. Structure et catégories des composés phénoliques ……..19
a. Acides phénoliques ……....20
1. Hydroxybenzoiques……..20
2. Hydroxycinnamiques……20
b. Flavonoïde ……20
c. Tannins……..21
II.2. Activité biologique……...22
II.2.1. Activité antioxydant……22
a. Antioxydants primaire…….....22
b. Antioxydants secondaires ……..…….22
II.2.2. Sources des antioxydants……23
a. Sources synthétiques…….23
b. Sources naturelles ……....23
II.2.3. Caractérisation biologique: Activité antimicrobienne…….24
a. Introduction…….24
b. Diversité du monde microbien……...24
b.1. Bactéries ……24
b-1-1. Bactéries à gram négatif…….25
a. Escherichia coli.....…...25
b.Pseudomonasa eruginosa…… 25
b.1.2. Bactéries à gram positifs……....26
a. a. Staphylococcus aureus ……..26
b. Enterococcusfaecalis……..26
Références bibliographiques……...27

Partie II

Étude expérimentale

Chapitre III : Extraction des biomolécules et caractérisation

III. But de l'étude …….30
III.1. Matière végétale …….30
a. Récolte et identification des plantes……30
b. Parties utilisée……...30
III.2. Matériels et produits utilisés……....31
III.3. Méthodes…….....32
III.3.1. Test d'humidité……..32
a) Principe…….32
b) Mode opératoire……...32
III.3.2 Préparation des broyats……..32
a. Séchage et broyage ……...32
III.3.3. Extraction des composés phénoliques …….33
a. Extraction par macération dans l'éthanol aqueux à 80%(v/v) ….……33
b. Extraction en milieu aqueux……...34
c. Centrifugation ……...35
III.3.4. Détermination du rendement de chaque extrait ……..36
III.3.5. Dosage ……..36
III.3.5.1. Dosage des composes phénoliques totaux ……36
a. Principe …….36
b. Protocole……...36
III.3.5.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)……..……37
a. Principe……..37
b. Protocole……...37
III.3.6. Analyse spectrophotométrique UV-visible .....…...38
III.3.6.1 Spectrophotométrie……38
III.3.6.2. Domaine UV-visible de la spectrophotométrique……39
III.3.7. Tests biologiques……...40

III.3.7. 1. Test d'activité antibactérienne ……..……40
III.3.7.2. Méthodes de diffusion……..40
a- Principe ……40
b- Protocole ……41
1. souches de test ……41
2. Préparation de l'inoculum……41
3. Préparation des milieux de culture……42
4. Ensemencement……43
5. Dépôt des disques……..43
6. Lecture des résultats……..44
Référence……...*45*
Chapitre IV : Résulta et discussion
IV.1. Test d'humidité 46
IV.2. Rendement d'extraction en polyphénol ……46
IV.3. Dosage ……....47
IV.3.1. Courbe d'étalonnage pour le dosage de polyphénols totaux (PPT)……47
a. Dans l'extrait aqueux ……47
b. Dans l'extrait éthanolique ……47
IV.3.2. Teneur en composés phénoliques totaux……48
IV.3.3. Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux (FVT)……49
IV.3.3.1. Teneur en flavonoïde totaux……...50
IV.4. Résultats de l'activité antibactérienne des polyphénols isolés de Thymus et ruta chalpensis……..51
a. Bactérie à gram négative (Escherichia coli) ……51
b. Bactérie gram positif (Staphylococcus aureus).....….54
Référence……...58
Conclusion générale ……61
Résumé

Liste des abréviations

g : gramme

mL : millilitre

v /v : volume par volume

m /v: masse par volume

h : heure

min : minute

% : pourcentage

Abs : absorbance

EAG : Equivalent acide gallique

ER : Equivalent rétine

R : Rendement

H : taux d'humidité

ALCL3 : trichlorure d'aluminium

NaCO3 : bicarbonate de sodium

UV-VIS : ultra violat visible

Eth : extrait éthanolique

Aq : extrait aqueux

FCR : réactif du folan ciocalton

MH : Muleur Hinton

PPT : polyphénol totaux

FVT : flavonoïde totaux

Liste des figures

Chapitre I :

Figure 1 : Photographies de différentes espèces de Rutacées……..6

Figure 2 : Photographies de *Ruta chalpensis* (A et B : parties aériennes, C : fleurs, D : feuilles)……7

Figure 3 : Répartition géographique de la distribution de *Ruta chalpensis*……8

Figure 4 : Photographie originale de *Thym*……...……...10

Figure 5 : Distribution du genre *Thym* dans le monde….....12

Chapitre II :

Figure 6: Biosynthèse des flavonoides……18

Figure 7: Principaux composes phénoliques ……..20

Figure 8 : Hydroxycinnamiques……..….20

Figure 9: Structure moléculaire des flovonoides…….....21

Figure 10 : Structures chimiques de quelque antioxydant synthétique……23

Figure 11 : Structures chimiques des antioxydants naturels ……..23

Figure 12 : Gram^{+}.....25

Figure 13: Gram^{-}……..25

Chapitre III :

Figure 1 : Photo de *Ruta chalpensis* et *Thym*……..…30

Figure 2: l'aspet des broyats (A : *Thym*, B : *Ruta chalpensis*)….....33

Figure 3: Extraction des composes phénoliques de *Ruta chalpensis* et de *Thym* à partir de l'eau distillé et l'éthanol……...34

Figure 4 : Filtration par coton……...34

Figure 5: Filtration par papier filtre……..34

Figure 6: Extrait des polyphénols…….....35

Figure 7: Appareil de centrifugeuse…….35

Figure 8 : Principe de la spectrométrie UV-visible monofaisceau…….39

Figure 9: Spectrométrie UV….....39

Figure 10: Principe de la méthode de diffusion par disque……41

Figure 11: Préparation de la suspension bactérienne…….42

Figure 12: Milieu de culture dans une boite pétrie….....42

Figure 13 : Ensemencement……43

Figure 14: Disque en contact de polyphénols purs…….44

Figure 15 : Disque au centre de la gélose……...…44

Références bibliographiques ……....45

Résultats et discussion

Figure 16 : Teneur en eau de la partie aérienne de *Ruta chalpensis* et *Thym*……47

Figure 17 : Rendement de composés phénoliques de l'extrait éthanolique et aqueux de *Ruta chalpensis* et de *Thym*……...48

Figure 18 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques totaux Par l'extrait aqueux……..49

Figure 19 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques totaux par l'extrait éthanolique……..50

Figure20 : Teneur en composés phénoliques totaux……..50

Figure 21 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes…….51

Figure 22 : Teneur en flavonoïdes (mg ER/g) des deux extraits de plante……....52

Figure 23 : zones d'inhibition (mm) des principaux polyphénols isolés de *Thym* et de *Ruta chalpensis* vis-à-vis d'Escherichia coli……..54

Figure 24 : Zones d'inhibition (mm) d'Escherichia coli par les polyphénols testés dans le Thym éthanolique……..55

Figure25 : Zones d'inhibition (mm) d'Escherichia coli par les polyphénols testés dans le *Thym* aqueux…….55

Figure26 : Zones d'inhibition (mm) d'Escherichia coli par les polyphénols testés dans le *Ruta* éthanolique……...56

Figure27 : Zones d'inhibition (mm) d'Escherichia coli par les polyphénols testés dans le *Ruta* aqueux……..56

Figure28 : Zones d'inhibition (mm) des principaux polyphénols isolés de *Thym* et de *Ruta chalpensis* vis-à-vis Staphylococcus aureus……..57

Figure29 : Zones d'inhibition (mm) Staphylococcus aureus par les polyphénols testés dans le *Thym* éthanolique…….....58

Figure30 : Zones d'inhibition (mm) Staphylococcus aureus par les polyphénols testés dans le *Thym* aqueux…….....58

Figure31 : Zones d'inhibition (mm) Staphylococcus aureus par les polyphénols testés dans le *Ruta* éthanolique……59

Figure32 : Zones d'inhibition (mm) Staphylococcus aureus par les polyphénols testés dans le *Ruta* aqueux…….59

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau 1 : classification taxonomiques de *Ruta chalpensis*…….7

Tableau 2 : classification taxonomiques de *Thym*…….....11

Chapitre II

Tableau : classe des polyphénols…….....19

Introduction Générale

INTRODUCTION GENERALE

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies, ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique **[1]** et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant par l'évaluation de l'activité biologique de ces plantes, il est impératif de recourir à des tests biologiques de balayage chimique **[2]**. Il est néanmoins important de noter que la nature active de ces composés peut engendrer des effets bénéfiques, aussi bien que des effets néfastes sur les organismes vivants.

Ruta chalpinses et *thym* sont des plantes médicinales largement utilisée par la population algérienne, notamment dans la médecine traditionnelle.

La valeur thérapeutique de ces plantes est due à ses métabolites secondaires, notamment les huiles essentielles et les composés phénoliques. La concentration de ces molécules peut varier d'un organe à un autre de la même plante.

Les composés phénoliques (principalement composées phénoliques totaux, flavonoïdes et tannins) constituent une richesse largement exploitée par les industries agro-alimentaires, cosmétique et pharmaceutiques **[3]**. L'extraction de principes actifs de ces métabolites est une étape très importante dans leurs isolements, aussi bien que dans leurs identifications **[4]**.

La qualité alimentaire ou thérapeutique d'un extrait naturel est liée à l'efficacité et à la sélectivité du procédé d'extraction utilisé. Parmi les divers procédés utilisés dans les travaux de recherches, on compte l'extraction par macération dans le méthanol aqueux et l'extraction par l'eau distillée.

L'objectif de notre travail vise à démontrer la richesse de nos plantes en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes, en tannins et à déterminer leurs propriétés biologiques. Pour cela notre étude porte plus précisément sur le rendement d'extraction des métabolites visés.

Nous avons adopté un plan classique pour la structure de notre manuscrit :

Dans la première partie de ce mémoire, nous rapporterons une étude bibliographique, consacrée à:

- Une synthèse bibliographique sur les plantes, Composés phénoliques et activité biologique

Dans la deuxième partie, nous rapporterons les résultats et discussion de notre travail :

- Partie expérimentale, qui consiste à présenter les techniques expérimentales (i) d'extraction des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes.
- Résultats et discussion
- Conclusion général

Références bibliographiques

[1] Tyihák E., Móricz Á M and Ott P.G. **(2007)** Biodetection and Determination of Biological Activity of Natural Compounds in Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. CRC Press.

[2] Sofowera A. **(2010)** Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Karthala, Economie et Développement. Paris: 384

[3] Nkhili E **(2009)** Polyphénols de l'alimentation : extraction, interactions avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant. Thèse de doctorat. Université Cadi Ayyad – Marrakech.

[4] Mohamed A., El-Sayed M., Hegazy M., Helaly S., Esmail A and Mohamed M. **(2010)** Chemical Constituents and Biological Activities of Artemisia herbaalba Re Nat Prod. 4(1)

Partie I

Synthèses bibliographiques

Chapitre I

Plantes médicinales

(ruta chalpensis et thym)

I. Introduction

Le monde prend de plus en plus conscience du potentiel médical et économique des ressources naturelles, qui fournissent les matières premières nécessaires pour le progrès de la pharmacologie, l'industrie cosmétique et agro-alimentaire**[1]**. Les plantes sont depuis toujours une source habituelle de remèdes sous forme de préparations traditionnelles**[2]**. Les médicaments à base de plantes sont utilisés environ de 75 à 80% de la population, pour le traitement d'un grand nombre de maladies. Ces médicaments ont une meilleure compatibilité avec le corps humain et produisant de moindres effets indésirables**[3]**.

I.1. Description des plantes

I.1.1. Plantes médicinales

Depuis l'antiquité l'homme utilise les plantes comme une source principale de nourriture, par la suite s'est développé pour pouvoir utiliser comme médicaments et remèdes à fin de soigner les différentes maladies, jusqu'à maintenant les plantes sont encore destinées à la santé humaine malgré les efforts des chimistes qui essayent de synthétiser de nouvelles molécules. D'après les études statistiques, plus de 25% des médicaments dans les pays développés dérivent directement ou indirectement des plantes**[4]**.

Vers les années 1990 les grandes compagnies pharmaceutiques se sont détournées des produits naturels pour s'intéresser à la chimie combinatoire, croyant que dans quelques années le nombre de médicament serait plus élevé, cependant ce n'était pas le cas malgré le grand budget investis pour la recherche.

Par conséquent le nombre de médicaments a chuté d'une façon remarquable sachantque pour la synthèse d'un seul médicament 10000 molécules doivent être synthétisées et testées **[5]**.

En partant de ces résultats et données, les biologistes et les chimistes reconnaissaient l'importance majeure de produits naturels et que les méthodes et les techniques de biotechnologie ainsi que la chimie sont limitées; ce qui peut expliquer le grand intérêt porté à la recherche de composés issus des sources naturelles.

Les plantes avec leurs nombres illimités constituent un réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels, grâce à ses molécules qui présentent l'avantage d'une grande diversité de structure chimique et activités biologiques.

Les plantes aromatiques sont caractérisées par leurs richesses en principes actifs et en substances telles que les polyphénols et les flavonoïdes,qui sont dotées des propriétés importantes et différentes.

A partir des recherches antérieures qui sont déjà faites, et les usages traditionnels appliqués par les autochtones algériens; les plantes médicinales: *ruta chalpensis* et *thym* sont celles choisies pour notre étude.

I.2. Plantes étudiées

I.2.1. Ruta chalepensis

I.2.1.1. Présentation de la famille des rutacées

La famille des rutacées se compose d'environ 150 genres et plus de 1500 espèces. Ces plantes se distribuent dans les régions tropicales, tempérées et particulièrement en Australie et en Afrique du Sud. Pratiquement 25 genres et plus de 80 espèces de cette famille ont été jusqu'ici rapportés d'Inde**[6]**.

Cette famille comprend essentiellement tous les *Citrus* (Oranger, Citronnier…etc); le genre *Ruta* et *Zanthoxylum*voir la **Fig. 1**. Ces genres partagent tous un caractère ligneux (même si la rue (*Ruta*) ne se lignifie qu'après une phase de croissance à l'état herbacé), une morphologie florale similaire, et la présence d'un type bien particulier de poches à essences**[7]**,sous forme de pointillés très translucides dans les feuilles**[6]**, appelés poches schisolysigènes, dont la formation résulte à la fois de la division et de la lyse de cellules parenchymateuseset qui donnent son aspect irrégulier à la peau d'orange**[7]**. Ils sont donc riches en huiles essentielles, renferment un pourcentage élevé en vitamine C et contiennent entre autres plusieurs alcaloïdes**[6]**.



"Citrus sinensis"



"Citrus medica"



"Ruta graveolens"

Figure 1 : Photographies de différentes espèces de Rutacées**[8-10].**

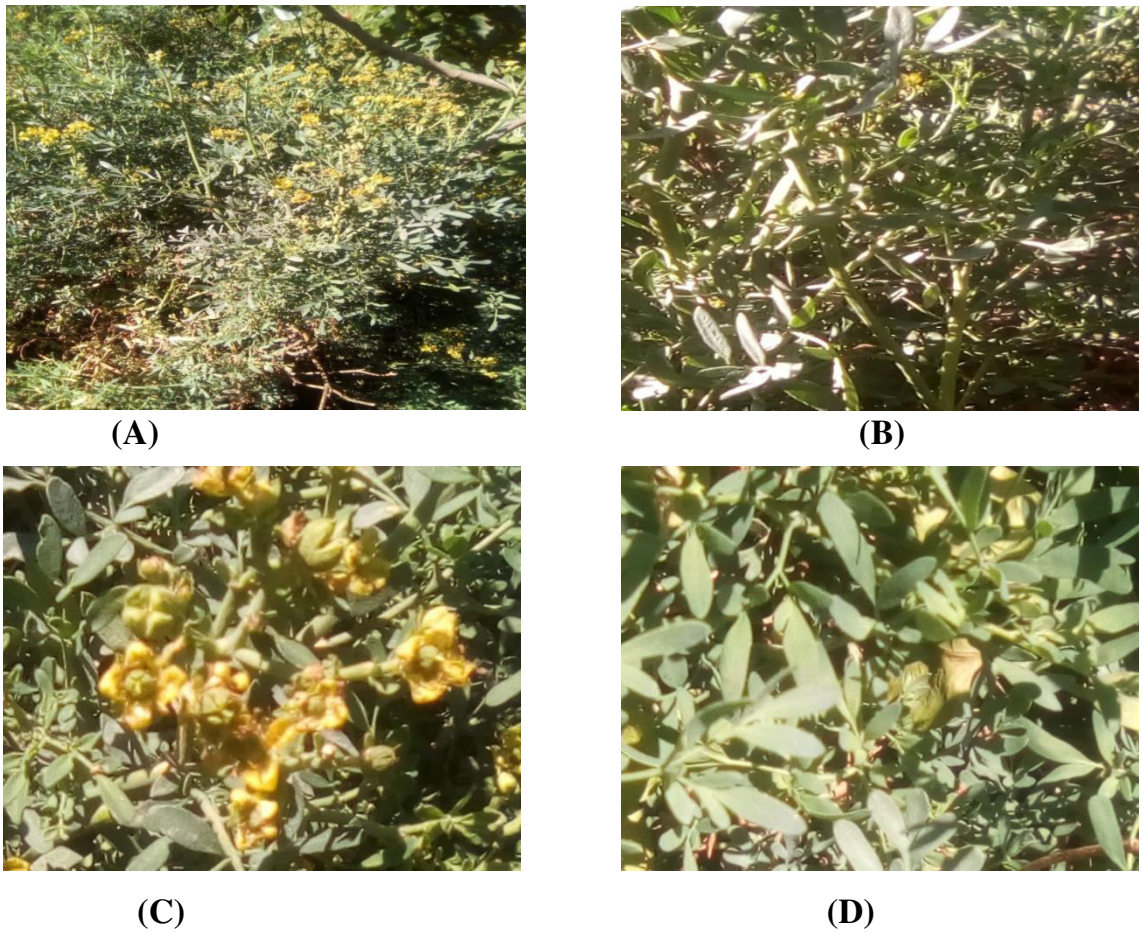
I.2.1.2. Présentation de l'espèce de ruta chalpenses

a. Description générale

Suite à la **Fig. 2** *Ruta chalepensis,* est un petit arbuste indigène d'environ 30 à 80 cm de haut **[11]**, il est largement répandu dans les régions méditerranéennes ainsi que dans les pays tempérés et tropicaux **[12,13].**

Cette plante qui se trouve habituellement sur les pentes rocheuses **[14]** est caractérisée par des feuilles de couleur verte-bleuâtre, émettant uneforte odeur désagréable et qui ont un gout amer **[11,15].**Ces feuilles portent également des glandes à huile responsables de cetteodeur **[12].**

Les tiges de l'arbuste sont glabres et portent des fleurs jaunes organisées en cymes avec des pétales dentées **[12,15]**.



(A) **(B)**

(C) **(D)**

Figure 2 : Photographies de *Ruta chalepensis*, (A et B : Parties aériennes; C : Fleurs; D : Feuilles).

b. Systématique de Ruta chalepensis

Le tableau ci-dessous représente la classification taxonomique de *Ruta chalepensis* :

Tableau 1: Classification taxonomique de *Ruta chalepensis***[11]**

Range taxonomique	***Nomenclature***
Règne	Plantae
Embronchement	Angiopernes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Rosideae
Ordre	Sapindales
Famille	Ruutaceae
Genre	Ruta
Espèce	Ruta chalpensis

c. Distribution géographique de Ruta chalepensis

Ruta chalepensis est une plante spontanée, largement répandue en Afrique du nord et plus particulièrement en Algérie voir la **Fig. 3**. On la rencontre fréquemment dans les rocailles, les pelouses et les coteaux secs. En Algérie, cette plante est aussi cultivée dans les jardins publics**[16].**

De même on la retrouve également en Europe du sud et dans les pays subtropicaux de manière générale. Cette plante est adaptée aux secteurs qui sont situées à environ 1000m au-dessus du niveau de la mer avec précipitations et lumière du soleil modérées **[17].**

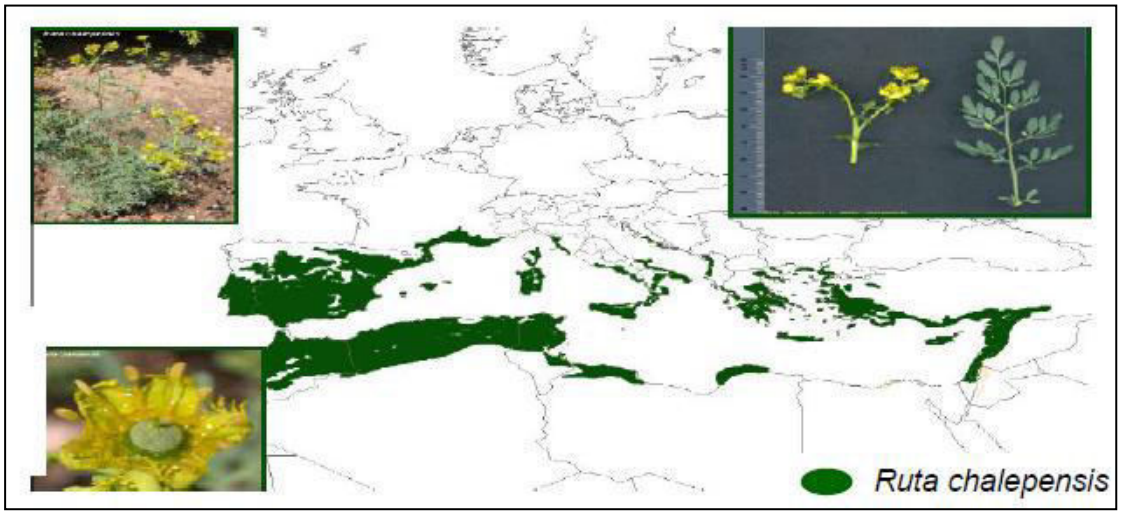


Figure 3: Répartition géographique de la distribution de *Ruta chalepensis* **[18]**

d. Principales utilisations de la plante

Cette planteest employée dans la médecine traditionnelle de beaucoup de pays pour le traitement d'une série de maladies **[19].**

La rue est très utilisée en Algérie à des fins diverses: Fébrifuge ; anti venin local ; dans le traitement des nausées, des vomissements, des constipations et du paludisme ; pour soigner les anémies, les douleurs oculaires, auditives, l'asthme ainsi que les névroses **[20]**.

- En Arabie Saoudite, la décoction de la partie aérienne de la plante est employée comme analgésique, antipyrétique et pour le traitement des rhumatismes et des troubles mentaux.
- Elle est prescrite dans la médecine indienne pour le traitement des névralgies, des désordres menstruels et autres saignement.

- En Chine, une décoction de la racine de *Ruta* est employée comme anti-venin. Les feuilles de cette plante infusées avec du vinaigre, sont données aux enfants pour le traitement des convulsions et autres désordres nerveux.
- Une décoction aqueuse des feuilles est employée pour le traitement des fièvres en Afrique **[19]**.

I.2.2 Thym

I.2.2.1. Présentation de la famille des lamiacées

La famille 1ere des Lamiaceae (Labiées) du Latin (Labia) lèvre, signifiant que les fleurs ontune forme caractéristique à deux lèvres, **[21,22]** comprend environs 6970 espèces réparties en 240 genres. Cette famille est l'une despremières à être distinguées par les botanistes et ceci par la particularité de ses caractères. Ce sont généralement des plantes herbacées odorantes, à tiges quadrangulaires,feuilles en général, opposées sans stipules. Le plus souvent hermaphrodites, les fleurs pentamères sont généralement réunies en cymes axillaires plus ou moinscontractées simulant souvent des verticilles, ou encore condensées au sommet des tiges, etsimulant des épis fruit constitué par quatre (4) akènes plus ou moins soudés par leur faceinterne **[23].**

I.2.2.2. Présentation de l'espèce de thym

a. Description générale

Le nom ***Thym*** vient probablement du latin "*Thym*" qui signifie «parfumé» ou du grec "*Thymos*" qui signifie "courage" ou "force"**[24].**

Les grecques brûlaient cette herbe pour chasser les insectes piquants de la maison. Le *Thym* représentait le style et l'élégance des premiers Grecs et l'esprit républicain en France au moyen Age. A cette époque, les moines bénédictins apportaient du *Thym* en Europe centrale et en Angleterre car ils pensaient que les oreillers à *Thym* soulageaient l'épilepsie et la mélancolie. Au XVII siècle, le *Thym* a été utilisé au cours de la peste qui a balayé l'Europe.Il est utilisé aussi par les Egyptiens pour embaumer les morts. Les Romains, de leur part brûlaient le *Thym* pour éloigner les créatures venimeuses. Ils s'en servaient aussi pour aromatiser le fromage **[25].**

Les plantes du genre *Thym* sont des arbustes perpétuels herbacés avec des racines Ligneuses, elles peuvent atteindre une hauteur de 45 cm (2 pieds). Les tiges sont verticales, les branches sont persistantes, les feuilles sont aromatiques et recouvertes de glandes et les fleurs sont colorées avec une couleur violette pâle à deux lèvres avec un calice glandulaire **[25].**

Ce genre contient des propriétés aromatiques et médicinales et le plus populaires dans le monde. La connaissance de la composition chimique et les effets pharmacologiques de ce genre permettent la classification des différents hémotypes. Ces espèces de *Thym*, se rencontrent, en plaine, en montagne, dans les rocailles, les garrigues, les pelouses et les broussailles **Fig. 4[26].**



Figure 4 : Photographies Originale de *Thym*

b. Systématique de thym

Le tableau suivant représente la classification taxonomique de Thym.

Tableau 2: Classification taxonomique de Thym **[27]**

Rang Taxonomique	***Nomenclature***
Règne	*Plantae*
Sous-règne	*Tracheobionta*
Embranchement	*Magnoliophyta*
Sous-embranchement	*Magnoliophytina*
Classe	*Magnoliopsida*
Sous-classe	*Asteridae*
Ordre	*Lamiales*
Famille	*Lamiaceae*
Genre	*Thymus*
Espèce	*Thymus vulgaris*

c. Distribution géographique de Thym

Le *Thym* est distribué dans le vieux continent et dans la région macaroni-sienne (les Canaries, Madère et les Açores).

C'est une plante très répandue dans le nord-ouest de l'Afrique (Maroc, Tunisie,Algérie et Libye) ainsi que dans les montagnes d'Ethiopie, les montagnes d'Arabie du sud-ouest et la péninsule de Sinaï. Passant par les régions de l'Asie occidentaleJusqu'à l'Himalaya. Dans le nord, elle pousse en Sibérie et en Europe nordique **[28].**

Le cercle en rouge représente la zone de distribution du genre *Thym* dans le monde sur la cartographie suivante :

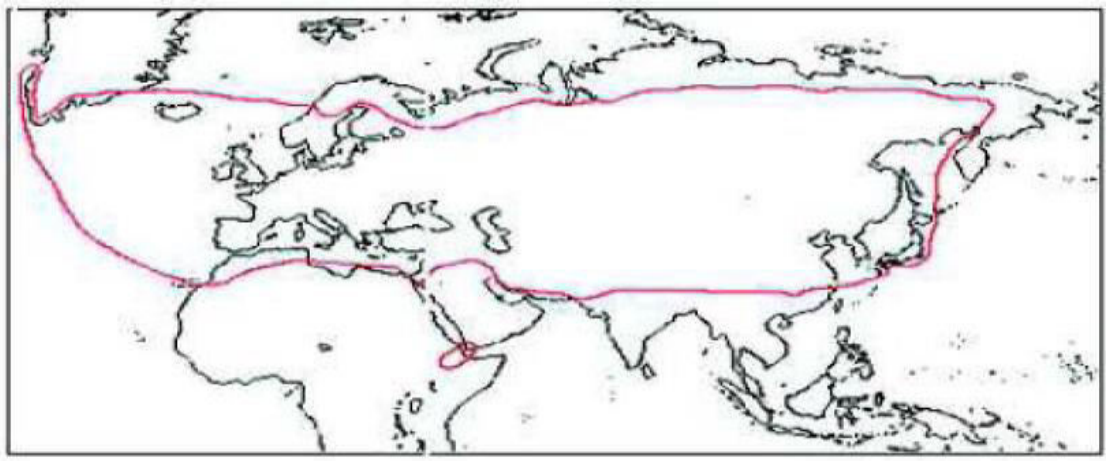


Figure 5: Distribution du genre *Thym* dans le monde **[29].**

d. Principale utilisations du Thym

Le *Thym* est utilisé fréquemment par les populations autochtones grâce à ses diverses propriétés importantes. Citant ci-dessous les plus connues et appliquées :

Cette plante aromatique très odorante, utilisée dans la cuisine algérienne pour faire les différents plats ; recommandée contre tous les types de faiblesse, et indiquée pour les crampes d'estomac, les inflammations pulmonaires et les palpitations, ainsi que les affections de la bouche, les contusions (lésion produite par un choc sans déchirure de la peau), et les accidents articulaires **[30]**.

Il est considérée aussi comme l'un des remèdes populaires les plus utiles et efficaces, dans le traitement des affections respiratoires ; rhume, grippes, et angine.

Il contribue également dans le nettoyage et la cicatrisation des plaies et aussi l'expulsion des gaz intestinaux **[31]**.

Références bibliographiques

[1] Chiriti A., Belboukhri N., Boulenouari N., Marouf A. et Hocini S. (**2011**). Potentiel ethnopharmacologique et phytochimique de quelques asteraceaes du saharaalgérien ,6 : p. 114-122.

[2] Djerrou Z. (**2011**). Etude des effets pharmaco-toxicologique de plante médicinalesd'Algérie : l'activité cicatrisante et innocuité de l'huile végétale de Pistacialentiscus L. Thèse de Doctorat en sciences. Université Mentouri, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Constantine, p.156

[3] Nahid A., Ansari S. H. et Siddiki A.(**2015**).Pistacia lentiscus: a review on phytochemistry and pharmacological properties. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 4: p. 16-20.

[4] Damintoti K., Mamoudou H.D., Jacques S., Saydou Y., Souleymane S., et Alfred S.T. (**2005**). Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Mémoire de l'université de Burkina Faso.

[5] Bérubé-Gagnon J. (**2006**). Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de Piceamariana. Mémoire de l'université de Québec.

[6] Sharma, O.P. (**1993**). Plant taxonomy. Tata McGraw- Hill Education, Rajcamal, p. 244 - 246.

[7] Gravot, A. (**2002**).Etude de P450s impliqués dans la biosynthèse des furocoumarines chez *Ruta graveolens*. Thèse soutenue publiquement en vue de l'obtention du diplôme de Docteur de L'INPL en sciences agronomiques. Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, p. 221.

[8] Lambert, P. (**2011**). Citrus sinensis (L.)Osbeck.Bastelicaccia, BDNFF.

[9] Tasset, J.L. (**2007**).Photo flora Citrusmedica.Menton - Alpes Maritimes, France, BDNFF.

[10] Richerdeforges, T. (**2011**). *Ruta graveolens* L. Morée. BDNFF.

[11] Bock, B. (**2011**).*Ruta chalepensis* L. BDNFF, Tela Botanica, vol. 4(2).

[12]Günaydin, K. &Savcib, S. (**2005**).Phytochemical studies on *Ruta chalepensis* (lam.) lamarck. Natural Product Research, vol. 19 (3), p. 203-210.

[13] Tounsi, S.M., Aidi-Wannes, W., Ouerghemmi, I., Msaada, K., Smaoui, A. &Marzouk, B.(**2011**).Variation in essential oil and fatty acid composition in different organs of cultivated and growing wild *Ruta chalepensis* L. Industrial Crops and Products, vol. 33, p. 617-623.

[14] Iauk, L., Mangano, K., Rapisarda, A., Ragusa, S., Maiolino, L., Musumeci, R.,Costanzo, R., Serra, A. &Speciale, A.(**2004**). Protection against murineendo toxemia by treatment with *Ruta Chalepensis* L., a plant with anti-inflammatory properties. Journal of Ethnopharmacology,vol.90, p. 267-272.

[15]Brener, S. et Friedman, J. (**1985**).Phytophotodermatisis induced by *Ruta chalepensis* L. Contact-dermatisis, vol. 12, p. 2-230.

[16] Merghache, S., Hamza, M. &Tabti, B. **(2009)**.Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta Chalepensis* L. de Tlemcen, Algérie. Afrique Science, 05(1): 67 - 81.

[17] Joy, P.P., Thomas, J., Mathew, S., & Skaria, B.P. **(2001)**.Medicinal Plants. Tropical Horticultur
e, 2: 449 - 632.

[18]Mansion, G. & Salvo, G. (**2005**). Dating the origin of plants endemic to the Corso- Sardinian Plate: a window on the biogeography of the Mediterranean Basin. p. 268-280.

[19] Mansour, S.A.L., Tariq, M., Al-Yahya, M.A., Rafatullah, S., Ginnawi, O.T. &Ageel, A.M.(**1990**). Studies *on Ruta chalepensis*, an ancient medicinal herb stillused in traditional medicine. Journal of Ethnopharmaeology, vol. 28, p. 305-312.

[20] Attou, A. **(2011)**.Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent. Mémoire soutenue publiquement en vue de l'obtention du diplôme de

[21] Couplan F., **(2000)**. Dictionnaire étymologie de botanique .Nestlé (Ed). Luisane.Paris.

[22] Naghibi F., Mosaddegh M., Mohammadi Motamed S.,Ghorbani A.,**(2005)**. Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotanyto pharmacology, Iran, J. Pharm. Res. 2**:** 63-79.

[23] Messaili B., **(1995)**. Botanique, systématique des spermaphytes. OPU (Ed).Alger, 91p.

[24] Stahl-Biskup E. **(2002),** Essential oil chemistry of the genus *Thymus* D a global view. In: *Thyme* D the Genus *Thymus* (Stahl-Biskup E. and Saez F., Eds.). Francis & Taylor, London, p. 75-124.

[25] Charles, D. J. **(2012)**.Antioxidantproperties of spices, herbs and other sources.SpringerScience & Business Media.

[26] Bellakhdar J. **(1997)**.La pharmacopée marocaine traditionnelle. Paris : Ibis Press. p.358.

[27] Quezel, P. **(1963)**.Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (No.581.965 Q8).

[28] Biskup E.; Stahl (**2002).** Essential oil chemistry of the genus *Thymus*- A global view. In E. Stahl-BiskupET F. Saez (Eds.) Medicinal and aromatic plants – Industrialprofiles vol. 17. London: Taylor and Francis.

[29] Morales, R. (**2002**).The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*.Thyme: the genus Thymus, p. 1-43.

[30] Djerroumi A., et Nacef M. (**2004**). 100 plantes médicinales d'Algérie. Ed Palais du livre,p. 135-131.

[31] Hans W.K. (**2007**). 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition.

Chapitre II

Composés Phénoliques

Et

Activité biologique

II. Introduction :

Les composés phénoliques sont des substances présentes dans tous les végétaux et dans tous les organes de la plante, ils possèdent un noyau aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles **[1-3]**.

Leur présence dans les tissus animaux est généralement due à l'ingestion d'aliments d'origine végétale**[1]**.

Il est connu depuis l'antiquité que les composés phénoliques des activités biologiquessont nombreuses et variées telles que, les activités antiseptiques, antimicrobiennes, antitoxiques, antivenimeuses, anti-oxydantes, antiparasitaires, diurétiques…etc. Récemment, on leur reconnaît par des activités anticancéreuses.

II.1. Structure et biosynthèse des composés phénoliques

Chez les végétaux, comme chez autres organismes vivants, des enzymes spécifiques participent à la formation de petites molécules qui constitueront les éléments de base des macromolécules : protéines, acides nucléiques, polysaccharides, et les lipides. Leur synthèse caractérise les cellules ou les organismes en croissance et constitue le métabolisme primaire**[4]**. En outre, l'une des singularités des végétaux est de former de nombreux composés dont le rôle n'est pas bien établi.

Le fait que ces composés ne se rencontrent pas chez tous les êtres vivants indique qu'ils n'entrent pas dans le métabolisme général mais qui prend naissance de ses produits; ce sont les métabolites secondaires. Ces derniers sont les outils principaux de la coévolution plante-être vivant et environnement.

Au début, les recherches s'intéressaient aux effets protecteurs des polyphénols. Ces composés sont présents en grande quantité dans les plantes consommées par les herbivores; parce qu'ils limitent leur appétence et digestibilité.

Par conséquent, ils ont été pendant longtemps considérés comme des facteurs antinutritionnels. Ce qui est absolument différent de ce qu'on pense aujourd'hui après la reconnaissance de leurs propriétés et effets présumés sur la santé humaine **[5]**.

II.1.1. Biosynthèse des composés phénoliques

Les grandes lignes des voies de biosynthèse des principaux composés phénoliques sont maintenant bien connues.

Les deux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont présents dans les protéines mais sont également à l'origine de la formation de la plupart des 00.molécules phénoliques chez les végétaux **[6]**. Ces composés sont issus par deux grandes voies métaboliques :

a. Voie de l'acide shikimique

Elle conduit à la formation du précurseur immédiat des phénols par désamination de la phénylalanine. La séquence biosynthétique qui suit, dénommée séquence des phényl-propanoides, permet la formation des principaux acides hydroxy-cinnamiques. Les formes actives de ces derniers avec le coenzyme a permettent d'accéder aux principales classes des composés phénoliques citant quelques transformations :

- Vers les acides de la série benzoïque (acides gallique, protocatéchique…etc) par Béta-oxydation. L'acide gallique lui-même, par combinaison avec des sucres simples, conduit aux tannins hydrolysables (tannins galliques et ellagiques).
- Vers les esters de type chlorogénique par estérification avec un acide alcool (acide quinique, tartrique, shikimique…etc) **[6]**.
- Vers les coumarines, par cyclisation interne des molécules suivie de modifications complémentaires (glycosilations, prénylations…etc)
- Vers les lignines par réduction, formation des monolignols puis polymérisation oxydative initiée dans la paroi cellulaire par les peroxydases et éventuellement les laccases**[7]**.

b. Voie d'acétate malonate

Elle conduit par condensations répétées à des systèmes aromatiques exemple: les chromones, les isocoumarines, et les quinones. La pluralité structurale des composés phénoliques due à cette origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité très fréquente d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration des composés mixtes comme les flavonoïdes, les stilbènes et les xanthones**[6]**.

II.1.2. Biosynthèse des flavonoïdes

La formation de ces molécules flavonoiques s'effectue par un intermédiaire connu: tétrahydroxychalcone à partir de la quelle se différencient plusieurs types des flavonoides**[7]**.

Le squelette moléculaire de base a une double origine : 3 molécules d'acétylCoA (CoA = coenzyme A) pour le cycle A qui dérive de la voie acétate malonate, une molécule de p-coumaryl pour le cycle B qui dérive de la voie shikimate et aussi pour l'hétérocycle C. C'est alors à partir de la chalcone ainsi formée par cette condensation chimique que vont être mis en place les flavonoides appartenant aux diverses classes, en particuliers des pigments comme les anthocyanes et les flavonols, ou encore certains monomères de type flavonols dont la polymérisation conduira aux tannins condensés. La biosynthèse des différents groupes de flavonoides implique un ensemble complexe de réactions comprenant des hydroxylations, méthylations, oxydations, réductions, glycosilations…etc**[6].**

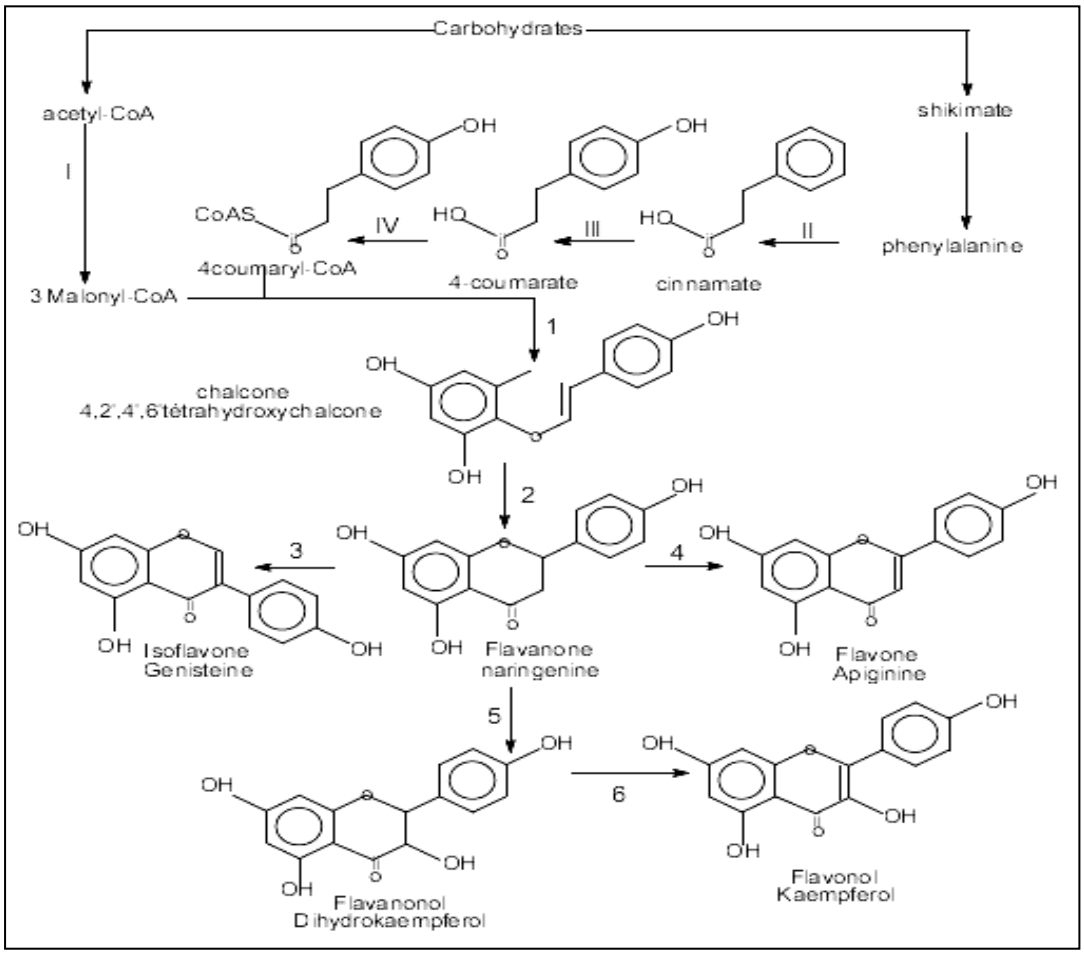


Figure 6 : Biosynthèse des flavonoides**[8]**

Les enzymes :

I.AcetylCoA carboxylase	1.Chalconesynthase
II.Phenylalanineammonia lyase	2.Chalcone isomérase
III.Coumarate 4-hydroxylase	3. Hydroxy-2 isoflavonesynthase
IV. 4-**coumarate**CoA ligase	4.Flavonesynthase
	5. Flavanone-3 hydroxylase
	6.Flavonolsynthase

II.1.3. Structure et catégories des composés phénoliques

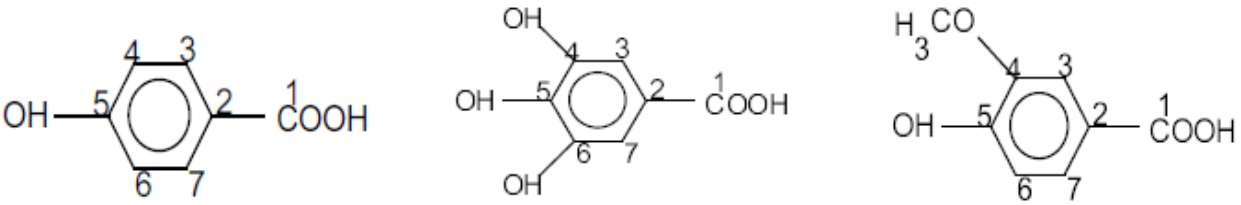
Structuralement, les composés phénoliques comprennent un noyau aromatique, qui possède un ou plus de substituant hydroxylé. Ce dernier conduit les composés phénoliques simples à se polymériser pour obtenir des phénols complexes ou polymérisés; malgré la grande diversité structurale ce groupe est connu sous le nom : Polyphénols.

La plupart des composés phénoliques sont présents conjugués avec un mono ou poly saccharides, liés à un ou plusieurs groupes phénols, ça peut être aussi des dérivations fonctionnelles comme des esters et des méthyles esters. Ces composés peuvent être groupés dans plusieurs classes; comme le montre le tableau suivant **[9]**:

Tableau 3: Classe des polyphénols

Classe	***Structure***
Phénols simples, benzoquinones	C6
Acide hydroxybenzoique	C6-C1
Acéthophénones, acide phénylacétique	C6-C2
Acide hydroxycinnamique, phénylpropanoides (coumarines, isocoumarines, chromones)	C6-C3
Flavonoides, isoflavonoides	C6-C3-C6
Lignanes, néolignanes	(C6-C3)*2
Biflavonoides	(C6-C3-C6)*2
Tannins condensés (proanthocyandines, ou flavolans)	C6-C3-C6)*n

D'après la classification si dessus, on distingue que : les acides phénoliques, les flavonoides, et les tannins sont considérés comme les principaux composés phénoliques.



Acide hydroxybenzoique Acide gallique Acide vallinique

Figure 7 : Principaux composés phénoliques

A. Acides phénoliques

Cette classe est divisée en deux sous classe sont les suivantes **[9]**:

1. Hydroxybenzoiques

Incluse plusieurs molécules et les plus fréquentes sont : L'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide syringique et le p-hydroxybenzoique. Ces composants ont une structure de C6-C3 en commun.

2. Hydroxycinnamiques

Ces molécules possèdent un cycle aromatique avec 3 carbones en plus C6-C3, à titre exemple : l'acide caféique, l'acide férulique, p-coumarique, et l'acide sinapique.

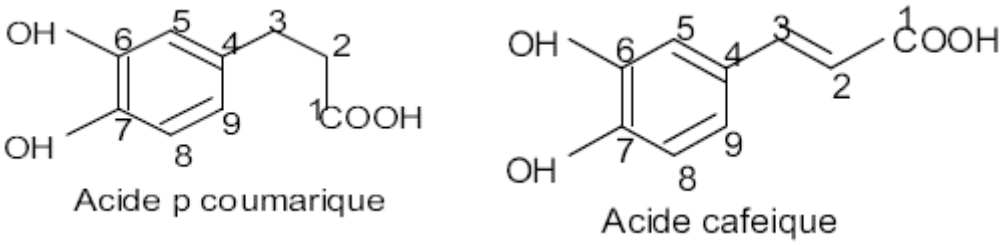


Figure 8 : les hydroxycinnamiques

B. Flavonoïdes

Ils constituent le plus large groupe des phénols dans la plante. Les flavonoïdes identifiés jusqu'à maintenant 4000 composés, ces pigments sont responsablesde la

coloration des fleurs, des fruits et des feuilles aussi sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV **[10]**.

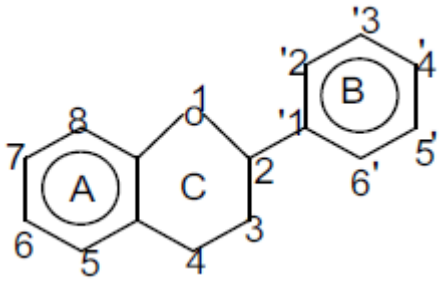


Figure 9 : Structure nucléaire des flavonoïdes**[11]**

Ces molécules ont un poids moléculaire faible, consiste à 15 atomes de arrangés comme suit : C6-C3-C6 sont composés de deux noyaux aromatiques A et B, liés par un pont de 3 carbones souvent sous forme d'un hétérocycle **[10]**.

Les substitutions variées au sein de l'hétérocycle C donnent les différentes sous classes des flavonoïdes suivantes:

- ***Flavonols:***quercétine, myricétine, rutine, kaempférol…
- ***Flavones:***apigénine, lutéoline…
- ***Flavanones:***eriodictyol, naringine, naringénine…
- ***Isoflavones:***génistéine, daidzéine…
- ***Anthocyanidines:*** alpha tocophérol, malvidine… **[6]**.

Les flavones, et les flavonols sont les plus connus grâce à leur pouvoir antioxydant élevéet les plus divers sur le plan structural.

Les substitutions touchant les noyaux A ou B qui peuvent parvenir dans chaque classe des flavonoïdes sont : une oxydation, alkylation, glycosylation, acylation etsulfations.

C. Tannins

Ce sont des molécules à poids moléculaire relativement élevé, ils constituent le 3ème groupe important des composés phénoliques. Les tannins possèdent 2 sous groupes; tannins hydrolysables et tannins condensés. Les premiers sont des esters acides galliques (gallo et ellagi tannins).

Les derniers sont des polymères de polyhydroxyflavan-3-ol monomères (sont aussi connu par le nomproanthocyanidine).

Il existe un 3 sous groupes; les phlorotannins ont été isolés à partir des algues brunes, mais qui ne sont pas inclus dans l'alimentation humaine **[6]**.

II.2. Activités biologiques

II.2.1. Activité antioxydante

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité de résister à l'oxydation. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, la capacité de ces composés naturels de piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH•) et superoxydes (O•2) **[12]**.

Les antioxydants sont des molécules qui aident le corps à lutter contre les radicaux libres en les neutralisant, afin qu'ils deviennent inoffensifs **[13],** ils peuvent être classés en deux groupes selon le niveau de leurs actions : les antioxydants primaires et les antioxydants secondaires.

a. Antioxydants primaires

Ils sont appelés également les antioxydants vrais ou antioxydants radicalaires, sont des molécules (notées AH) capables d'interrompre la chaine auto catalytique de l'oxydation en bloquant les radicaux lipidiques R• et ROO• par transfert d'un atome d'hydrogène pour reformer RH et ROOH. De la même manière, ils peuvent transformer les radicaux RO• en ROH, bloquant ainsi la formation des aldéhydes **[14]**.

b. Antioxydants secondaires

Ils sont appelés aussi préventifs qui assurent l'inhibition de la production des radicaux libres. Ce sont des molécules exogènes; des substances décomposant les hydro-peroxydes en alcools, des thiols (glutathion et acides aminés soufrés) ou des disulfures, des protecteurs vis-à-vis des UV **[15]**. Contrairement aux enzymes antioxydants, une molécule antioxydante piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule antioxydante doit donc être régénérée par d'autres systèmes **[16]**.

II.2.2. Sources des antioxydants

a. Sources synthétiques

Ils constituent une source importante d'antioxydants. Actuellement, les classes thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les anti-hyper-lipoprotéinémiques, les *β*-bloquants et autres antihypertenseurs ont été évalués pour leurs propriétés antioxydantescomme la représente la**Fig.10[17]**.

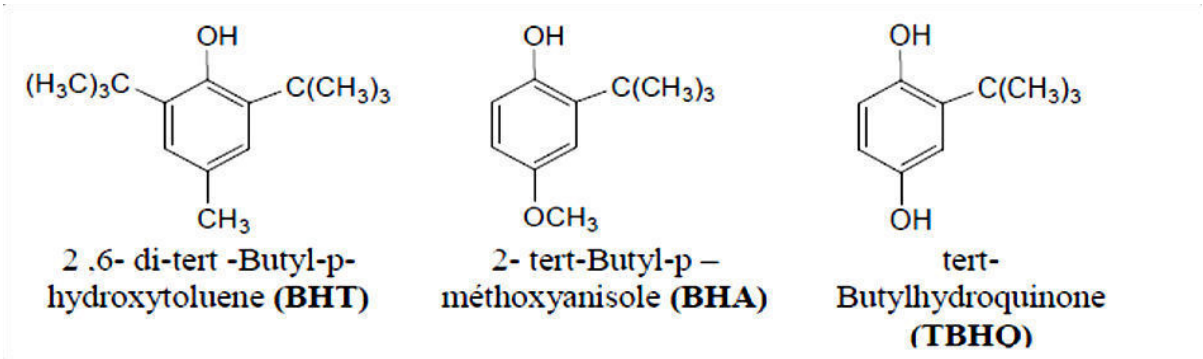


Figure 10: Structures chimiques de quelques antioxydants synthétiques.

b. Sources naturelles

Les antioxydants d'origine alimentaire sont nombreux, certains sont liposolubles comme : tocophérols ; β carotène ; lycopène et d'autres sont hydrosolubles comme l'acide ascorbique,ainsi que certains sont plus hydrosolubles que liposolubles comme les polyphénols.

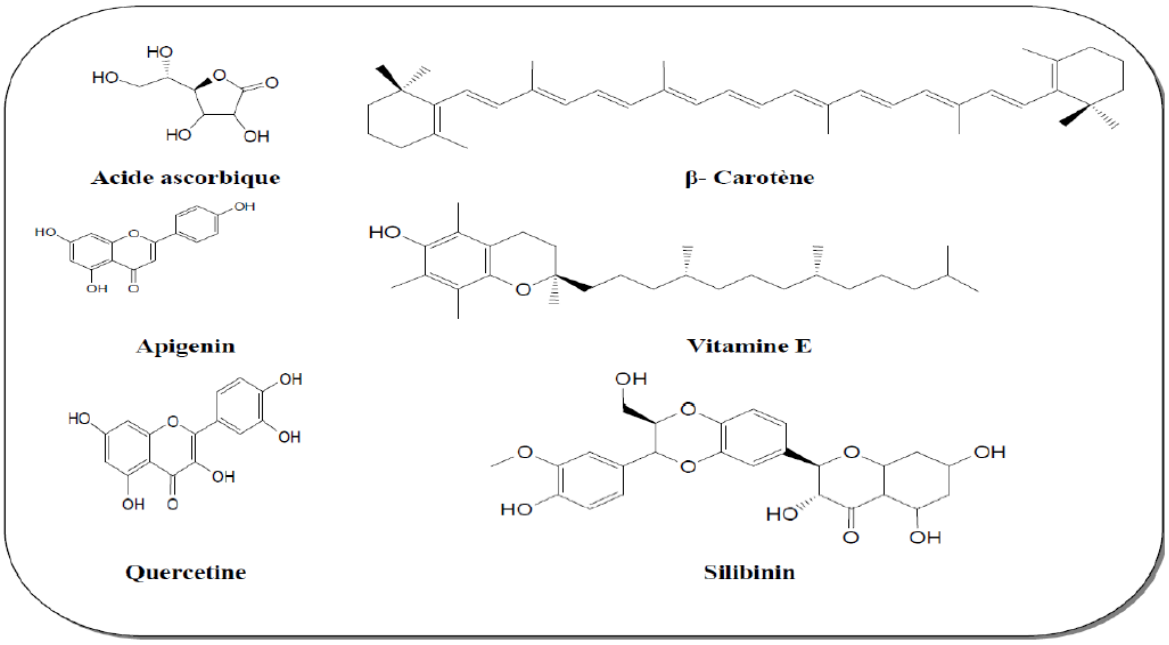


Figure11: Structures chimiques des antioxydants naturels.

II.2.3. Caractérisation biologique: Activité antimicrobienne

a. Introduction

L'organisme humain, constamment exposé à une multitude de microbes, bactéries, virus, parasites, champignons,…etc), possède un système complexe de défense qui lui permet de rencontrer ou d'héberger ces microbes sans leur permettre d'envahir ses tissus **[18,19]**. Cependant, dans certaines conditions, l'infection peut entraîner une maladie infectieuse grave **[20]**.

Les maladies infectieuses causées par les bactéries et les champignons affectent des millions de personnes dans le monde entier et causent de lourdes pertes au niveau économique. De nombreux programmes ont été conduits pour découvrir et développer de nombreux agents antimicrobiens d'origine biologique **[21]**.

b. Diversité du monde microbien

b.1. Bactéries

Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires et procaryotes présents dans tous les milieux. La plupart des bactéries possèdent une paroi cellulaire glucidique. Les bactéries les plus grosses mesurent plus de 2µm et jusqu'au début du XXIe siècle, les spécialistes considéraient que les plus petites mesuraient 0,2µm, mais il existe des « ultramicrobactéries », y compris en eau douce **[22]**.

Les bactéries présentent de nombreuses formes : sphériques (coques), allongées ou en bâtonnets (bacilles), des formes plus ou moins spiralées.

Pour distinguer entre les bactéries au microscope optique, une méthode importante et largement utilisée en bactériologie, c'est ***"la coloration de Gram"***. Elle consiste à traiter des bactéries fixées à la chaleur, par un colorant basique (violet de gentiane) puis une solution iodo-iodurée (mordançage), toutes les cellules se colorent en violet. Soumises ensuite à l'action de l'alcool éthylique elles se répartissent en : cellules qui conservent la coloration violette dites à **gram positif** et qui sont décolorées, appelées cellules à **gram négatif**. Pour mieux distinguer ces deux catégories, le frottis bactérien est finalement traité par de la fuchsine basique, les bactéries à gram négatif sont roses et celles à gram positif restent violettes **[23]**.

Après leur réaction avec les différents colorants utilisés par cette méthode, les bactéries se divisent en deux groupes majeurs : bactéries à gram positif (colorées en violet), bactéries à gram négatif (colorées en rose). Cette distinction de réponse à la coloration de gram est due à la différence qui existe dans la composition des parois bactériennes, celles des bactéries à gram négatif laissent passer la solution alcoolique, tandis que les bactéries à gram positif représentent une véritable barrière que la solution alcoolique ne peut franchir comment représentent les deux figures ci-dessous**[18,19]**.

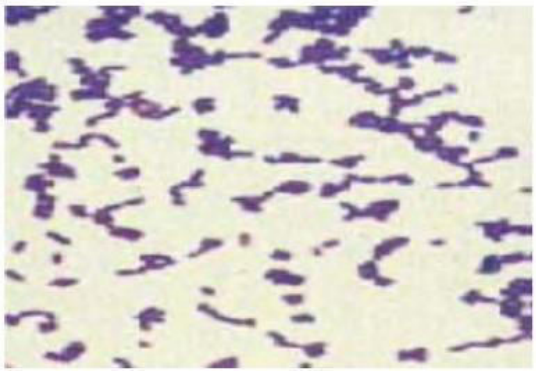


Figure12: Gram **+**.



Figure13: Gram **-**

b.1.1. Bactéries à gram négatif

a. Escherichia coli

Ce genre *d'Escherichia* fait partie de la famille des entérobactéries et comprend cinq espèces dont une seule, l'Escherichia coli, est utilisée à titre d'indicateur de la qualité des eaux. Presque la totalité des souches *d'Escherichia coli* ne sont pas pathogènes puisque cette bactérie est une hôte normale de l'intestin des mammifères **[24]**. L'Escherichia coli est la seule qui soit sans équivoque toujours d'origine fécale et à ce titre, elle est de plus en plus considérée comme organisme indicateur spécifique d'une pollution fécale.

b. Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa, autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique, bacille du pus bleu, est une bactérie gram-négatif du genre *pseudomonas*. Les bacilles sont fins, droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire: ciliature monotriche, dépourvus de spores et de capsules. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en

diplobacilles. Elle peut dans certaines conditions être pathogène. Très résistante, elle est avec d'autres bactéries à gram négatif de plus en plus souvent responsable d'infections nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement. Le taux de mortalité atteint 50 % chez les patients vulnérables (immunodéprimés) **[23]**. Est une cause rare mais connue de septicémie néonatale et d'une forme de méningite à évolution grave, provoquant une mortalité de 10 à 80 %. Plusieurs infections ont été mises en rapport avec la consommation d'aliments pour nourrissons.

b.1.2. Bactéries à gram positifs

a. Staphylococcus aureus

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

Le *staphylococcus* est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et dans certains cas extrêmes de septicémies physiques (greffe, prothèses cardiaques). *Staphylococcus aureus* se présente comme une coque en amas (grappes de raisin), gram positif etcatalase positif. Sa teneur en caroténoïdes lui confère une couleur dorée à l'origine de son nom **[22]**.

a. Enterococcusfaecalis

Enterococcusfaecalis est une bactérie commensale à gram positif, habitant dans le tube digestif des humains et d'autres mammifères.

Comme d'autres espèces du genre *Enterococcus*, E.faecalispeutcauser des infectionsmortelles chez l'homme et le singe, particulièrement dans un environnement spitalier, le haut niveau de résistance naturelle aux antibiotiques de la bactérie contribue à sa pathogénicité et au risque nosocomial. Elle peut aussi déclencher des inflammations chroniques de l'intestin **[25]**.

Références bibliographiques

[1] Naczk M and Shahidi F. **(2003)** Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton, FL: CRC Press.

[2] Barboni T**. (2006)** Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et derisques d'incendie. Thèse de doctorat. Université de Corse Pascal Paoli.

[3] Sun L., Zhang J., Lu X., Zhang L and Zhang Y**. (2011)** Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (Diospyros kaki L.) leaves. Food Chem Toxicol. 49: 2689-2696

[4] Ferrari J. (**2002**). Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : Gnidia involucrata Steud. Ex A. Rich. Thèse de doctorat de l'université de Lausanne.

[5] Scalbert A. (**2004**). Fruits et légumes, polyphénols et santé (en ligne) :http://culturesciences.chimie.ens.fr/dossiers-chimie-societe-article-FruitsPolyphenol.html#d0e17.

[6] Sarmi M.P., et Cheymer V. (**2006**). Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Lavoisier.P 2 -10.

[7] Bouheroum M. (**2007**). Etude phytochimique des plantes medicinales algériennes : Rhantherimadpressum et Ononisanfustissima. Thèse de doctorat de l'université de Constantine.

[8] Treki A. (**2002**). Effets biologiques de polyphénols extraits de plantes médicinales Ranunculus repens et Thymus hirtus sur l'activité de microorganismes responsables de certaines pathologies. Thèse de magistère de l'université de Constantine.

[9] Nagendran B., Kalyana S., et Samir S. (**2006**). Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemitry.**99** : 191–203.

[10] Hadi M. (**2004**). La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres : Etudes et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université Louis Pasteur.

[11] Rania A. A. (**2007**). Complexation des proteineslaitieres par les extraits de gousses vertes de caroubier : Proprietes technologiques des coagulums obtenus. Thèse de doctorat de l'université de Paris.

[12] Barus C., Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieux homogène et diphasique - Application aux produits cosmétiques, Thèse de Doctorat université deToulouse, **(2008)**, p.8

[13] Lévy-Dutel L., Scotto E., Les saveurs du bien être : Vivre heureux et centenaire, Ed. Eyrolesse, (**2011**), p. 31, ISBN : 97B-2-212-54681-1.

[14] Alain dit Philippe BIDIE, Banga B. N'GUESSAN, Adou F. YAPO, Jean David N'GUESSAN, Allico Joseph DJAMAN, Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne, Sciences & Nature Vol. 8 N°1: 1 - 11 **(2011)**.

[**15**] Rolland Y., Antioxydants naturels végétaux, Oléagineux. Corps Gras Lipides(CPL), **(2004)**, 11 (6) : 419-24.

[**16**] Dacosta Y., Les phytonutriments bioactifs : 669 réfeérences bibliographiques, Ed. Yves Dacosta, Paris, (**2003**), p. 317

[17] Diallo A., Etude de la phytochimie et des activités biologiques de Syzygiumguine e nseWilld (Myrtacées), Thèse de Doctorat en Pharmacie université de Bamako, **(2005)**, p.11, 13.

[18] Hill R.B.J., Rowlands D.J.&Rifkind D., Infectious pulmonary disease inpatient receiving immunosuppressive therapy for organ transplantation. The New England Journal of Me dicine

[19] Hart P.E, RusselE.Jr& Remington J.S., The compromised host and infection II, Deep fungal infection. The Journal of Infectious Disease, **(1969)**, 120: 169-176. **(1964)**, 271: 1021-1028.

[20]Persidis A., Antibacterial and antifugal drug discovery. Nature Biote chnology, **(1999)**, 17:1141-1142.

[21] Rhayour K., Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillussubtilis* et sur *Mycobacteriumphlei* et *Mycobacterium fortuitum*, Thèse de Doctorat de Biologie Cellulaire université de Fès, (**2002),** p.2.

[22] Hahn M. W., Lunsdorf H., Schauer M., Hofle M. G., Boenigk J., and Stadtler P., Isolation of novel ultra-micro-bacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. Applied Environmental of Microbiology, **(2003)**, 69:1442-1451.

[23] Leclerc H., Gaillard J-L, Simonet M., Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien, Doin Editeur, Paris, **(1995)**, p.506.

[24] Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J., Brock Biology of Microorganisms, Prentice Hall International Ed., **(1997)**.

[25] Edberg S.C., Rice E.W., Karlin R.J., Allen M.J., Esch e rich ia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection. Journal of Applied Microbiology, **(2000)**, 88: 106S-116S.

Partie II

Etude expérimentale

Chapitre III

Extraction des Biomolécules

Ce travail de recherche a été réalisé au laboratoire de biologie de l'université de Médéa. Son objectif est d'extraction de biomolécules à partir des différentes plantes spontanées dans la région de la wilaya de Médéa.

Notre travail a consisté, dans un premier temps, à extraire de composés phénoliques de *Ruta chalpensis* et *Thym* ensuite à effectuer son analyse par les différentes méthodes de caractérisation.

III.1. Matière végétale

a. Récolte et identification des plantes

Les composés phénoliques étudiées ont été extraites à partir de la partie aérienne de deux plantes, sont : *Ruta chalpensis* et *Thym* **(Fig.1)** ont été récoltées en mois de Mars 2019 dans la région de la wilaya de Médéa.



Figure 1: photo de la partie aérienne de *Ruta chalpensis* et *Thym*

b. Parties utilisées : Feuilles pour les deux plantes**.**

III.2. Matériels et produits utilisés

Matériels	*Produits*
- Pilon et mortier	-Ruta chalpensis
- Bécher	-Thym
- Erlenmeyer	-L'eau distillé
- Balance	-Éthanol
- Agitateur magnétique	-Bicarbonate de sodium (Na_2CO_3)
- Etuve	-Folin ciocalteu
-micro Pipette	-$AlCl_3$
- Spectrophotomètre UV-visible	-Retine
- Papier filtre	-Acide gallique
- Boites à Petrie	- Escherichia coli
- Tubes essais	- Staphylococcus aureus
- Seringue	-DMSO
-Vortex	-Mueller Hinton
-Spatule	-Eau physiologique
-Pipette de pasteur	-Eau de javel
-Ecouvillon	
- Becbunsen	
-Pince	
- Disques	
-Flacon	
-Autoclave	
-Bain marie	
-Centrifugeuse	
-Barreaux magnétiques	

III.3. Méthodes

III.3.1. Test d'humidité

a) Principe

La teneur en humidité de la plante a été déterminée selon la méthode utilisée par Amarti *et al*., (2010) **[1]**. Elle consiste en la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve à 60 °C.

Le taux d'humidité est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'humidité \%} = (M_f - M_s / M_f) * 100$$

Où :

Mf : poids de la matière fraîche exprimé en grammes.

Ms : poids de la matière sèche exprimé en grammes.

b) Mode opératoire

Le protocole du test d'humidité effectué consiste à placer deux échantillons de matière végétale fraîche de 30g chacun, dans une étuve à une température de 60°C jusqu'à stabilisation du poids **[1]**.

III.3.2 Préparation des broyats

a. Séchage et broyage

Les matériels végétales sont constituées des feuilles des plantes *Ruta chalpensis* et *Thym***.**

Les feuilles sont lavées puis laissées sécher à l'ombre et à température ambiante dans une étuve, pendant 5h.

Les feuilles sèches ont été broyées à l'aide d'un mortier et le broyat obtenu a été conservé dans des sachets en papier à température ambiante, dans un endroit sec et à l'abri de l'humidité et de la lumière jusqu'à son utilisation **(Fig. 3)**.



A **B**

Figure 2: L'aspect des broyats (**A** : *Thym*, **B** : *Ruta chalpensis*)

III.3.3. Extraction des composés phénoliques

Les composés phénoliques et flavonoïdes ont été extraits à partir des feuilles de cette plantes par deux méthodes différentes : Extraction par macération dans l'éthanol aqueux, extraction avec de l'eau.

a. Extraction par macération dans l'éthanol aqueux à 80%(v/v)

La macération est une opération qui consiste à laisser séjourner la matière végétale (broyat) dans l'éthanol aqueux pour extraire les principes actifs (composés phénoliques et flavonoïdes).

Le protocole de la macération de ces plantes est le suivant :

Peser 3 g de broyat de chaque plante (*Ruta chalpensis* et *Thym*) et prendre 24 mL de éthanol et 6 mL d'eau distillé on ver ces mélange dans un erlenmayer de 250 mL, ensuit mettre cette plantes sur l'éthanol aqueux, le tous est placer dans un agitateur magnétique pendant 24 h **(Fig.4)**, l'extrait a été filtré sur du coton hydrophile puis sur du papier filtre wattman N°1**(Fig. 5,6).**

A la fin, récupérer le filtrat dans un flacon **(Fig.7)**.

b. *Extraction par aqueux*

Le protocole de cette pour chaque plante est le suivant:

Peser 3 g de chaque plante (*Ruta chalpensis* et *Thym*);et prendre 30 mL d'eau distillé dans un erlenmayer de 250 mL, ensuit mettre cette plantes sur l'eau distillée, le tous

est placer dans un agitateur magnétique pendant 24 h **(Fig.4**), ensuite a été filtré sur du coton hydrophile puis sur du papier filtre wattman N°1 **(Fig. 5,6)**.

A la fin récupérer le filtrat dans un flacon **(Fig.7)**.



Figure 3: Extraction des composes phénoliques de *Ruta chalpensis* et *Thym* à partir de l'eau distillée et l'éthanol.



Figure 4: Filtration sur coton



Figure 5: Filtration sur papier filtre

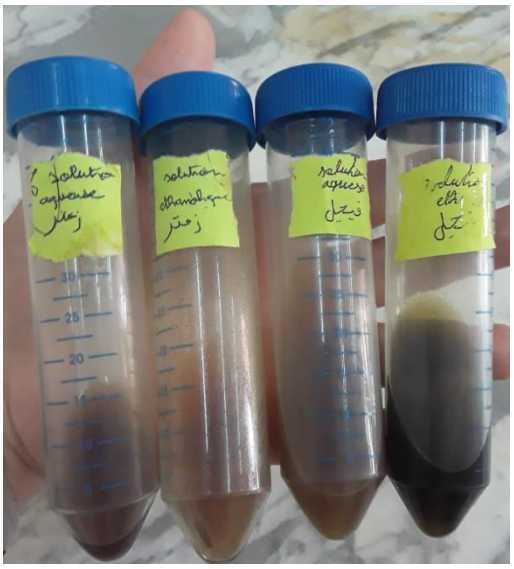


Figure 6: Extrait des polyphénols

c. Centrifugation

Placez l'extrait dans les tubes du l'appareil de centrifugeuse, Les tubes opposés sont remplis avec le même volume de l'extrait, puis fermez l'appareil et réglez-la à la vitesse de 4100 rpm pendant 15 minutes (**Fig. 7**).



Figure 7: Appareil de centrifugation

III.3.4. Détermination du rendement de chaque extrait

Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant évaporation) **[2]**.

$$R\% = (Me / Mv) * 100$$

R%: Rendement en %.

Me : Masse d'extraite sec.

Mv : Masse de la matière végétale.

III.3.5. Dosage

III.3.5.1. Dosage des composés phénoliques totaux

a. Principe

Le réactif utilisé est le réactif de «Folin-Ciocalteu»; c'est un Mélange de complexes des acides phosphotungstène (H3PW12O40) et phosphomolybdène (H3PMo12O40) de couleur jaune.

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif, elle entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu qui absorbe à 760 nm, le dosage de PPT est effectué par la comparaison de l'absorbance observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue.

b. Protocole

Le protocole utilisé par Singleton et Rossi (1965) **[3]**, avec une légère modification.

Les composés phénoliques totaux sont dosés de la manière suivante, 0,05 mL de l'extrait de plante est introduit dans un éprouvette de 5 mL , puis dilué jusqu'à 2,5 mL avec de l'eau distillée, On prend 0,2 mL de ce dernier dans plusieurs tubes à essais et on additionne 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu 10% (v/v) dilué (10fois) et ajouter immédiatement au milieu, en suite le mélange est agité et incubé pondant 5 min et à la fin 0,8 mL d'une solution de Na_2CO_3 à 75% (m /v) est additionné au mélange.

Le mélange obtenu est agité et incubé dans une étuve à une température de 40 C^o pendant environ 5 minutes à l'abri de la lumière. L'absorbance est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 760 nm contre un témoin.

Notons qu'une droite d'étalonnage est préalablement réalisée avant l'analyse avec de l'acide gallique dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (E GA/g Ms).

La quantité des phénols totaux est calculée par l'équation suivante :

$$[PPT]=c.\ k.\ v\ /m$$

[PPT]: contenu total des polyphénols (mg E, AG /g Ms).

c : concentration d'acide gallique (mg/mL).

v : volume de l'extrait (mL).

K : facteur de dilution

m : masse de l'extrait pure de plante (g).

III.3.5.2. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)

a. Principe

Les réactifs utilisés sont: les solutions incolores de chlorure d'aluminium $AlCl_3$ 10% (v /v). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par ces réactifs, elle entraîne la formation d'un complexe brunâtre qui absorbe à 430 nm. La comparaison de l'absorbance observée à celle obtenue par un étalon de rétine de concentration connue permet d'évaluer la teneur totale en flavonoïdes, suivante la méthode de Orak et al (2012) **[4]**.

b. Protocole

Un volume de 1mL de chaque échantillon est ajouté à 1ml d'une solution éthanolique de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) à 2%. Après incubation à température ambiante pendant 30 min, l'absorbance est lue à 430nm.

Une courbe d'étalonnage (y = a x) est établie séparément par la retine (50-200 mg/mL) pour calculer la concentration des flavonoïdes dans chaque extrait.

Les résultats obtenus du dosage sont exprimés en milligramme équivalent de retine (ER) par gramme Matière sèche (mg ER/g Ms).

Le taux des flavonoïdes contenant dans l'extrait de la plante est calculé selon l'équation suivante :

$$[PVT]=c.\ k.\ v\ /m$$

[PVT]: la quantité des flavonoïdes (mg E R /g Ms).

c : concentration de retine (mg/mL)

v : volume de l'extrait (mL)

K : facteur de dilution

m : masse de l'extrait pur de plante (g).

III.3.5. Analyse spectrophotométrique UV-visible

III.3.5.1. Spectrophotométrie

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert.

La densité optique des solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier.

Lorsqu'une lumière d'intensité passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité de la lumière transmise est donc inférieure à. L'absorbance de la solution est définie comme suit :

$$\mathbf{A= \log_{10} I_o/I}$$

$$\mathbf{A=-logT}$$

Avec T (transmittancé) =

$$\mathbf{T=I /I_o}$$

L'absorbance est une valeur positive, sans unité. Elle est d'autant plus grande que L'intensité transmise est faible.

III.3.5.2. Domaine UV-visible de la spectrophotométrie

Un soluté coloré ou chromophore absorbe la lumière visible (longueurs d'onde comprises entre 400 et 800 nm). On parle de spectrophotocolorimétrie ou plus simplement de colorimétrie. Certaines solutions absorbent dans l'ultraviolet (longueurs d'onde inférieures à 380 nm), on parle alors de spectrophotométrie UV.

Le principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre UV est illustré dans la figure suivante :

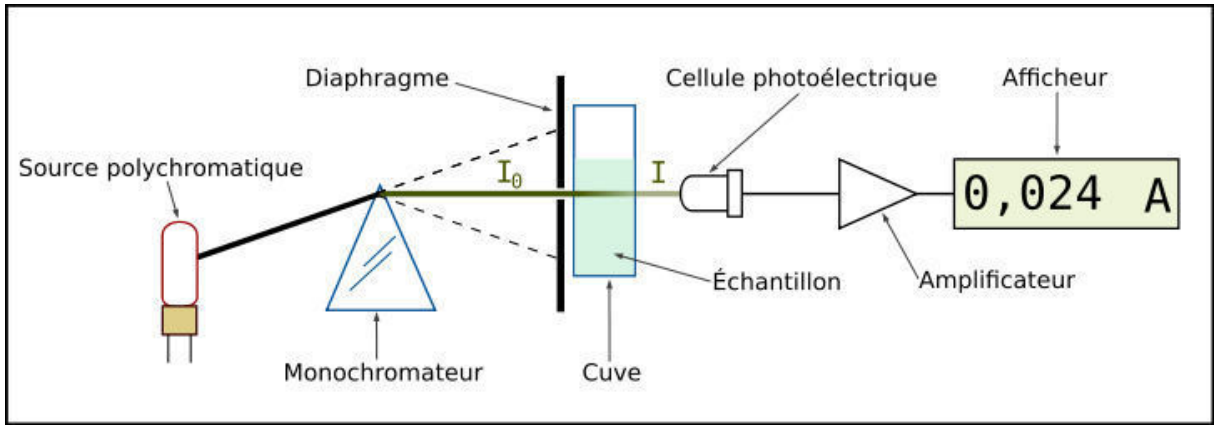


Figure 8: Principe du spectrophotomètre UV-visible monofaisceau

Un spectrophotomètre mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée. Un dispositif monochromateur permet de générer, à partir d'une source de lumière visible ou ultraviolette, une lumière monochromatique, dont la longueur d'onde est choisie par

L'utilisateur. La lumière monochromatique incidente d'intensité traverse alors une cuve contenant la solution étudiée, et l'appareil mesure l'intensité de la lumière transmise. La valeur affichée par le spectrophotomètre est l'absorbance à la longueur d'onde étudiée.

Le spectrophotomètre peut être utilisé pour mesurer de manière instantanée une absorbance à une longueur d'onde donnée ou pour produire un spectre d'absorbance (spectrophotomètre à balayage). Dans ce dernier cas, le dispositif monochromateur décrit en un temps court l'ensemble des longueurs d'onde comprises entre deux valeurs choisies.



Figure 9: Spectrophotométrie UV

III.3.6. Tests biologiques

III.3.6. 1. Test d'activité antibactérienne

D'après la littérature, les composés phénoliques sont doués d'un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. À partir de là, on a testé nos produits isolés et extraits du *Thym* et de la *Ruta chalpensis* en présence de différentes souches bactériennes, pathogènes, pour mettre en évidence et évaluer cette propriété des différents extraits.

III.3.6.2. Méthodes de diffusion

a- Principe

Cette méthode permet la mise en évidence de l'effet antibactérien des composés testés sur des bactéries, ainsi que la détermination de la résistance et la sensibilité de ces souches vis-à-vis les polyphénols testés.

Le principe de cette technique est le même que celui du test d'antibiogramme, dont les disques sont chargés d'antibiotiques et déposés à la surface des milieux de cultures solides et ensemencés par des espèces bactériennes bien déterminées.

L'antibiotique commence à diffuser dés son application sur le milieu de culture, et pour favoriser la croissance bactérienne, ces boites sont incubées dans l'étuve pendant 24 heures ou plus selon la bactérie.

L'effet d'antibiotique sur la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une zone appelée « zone d'inhibition » dépourvue des bactéries.

Le même principe a été suivi dans notre étude.

La figure suivante représente le principe de la méthode de diffusion par disque :

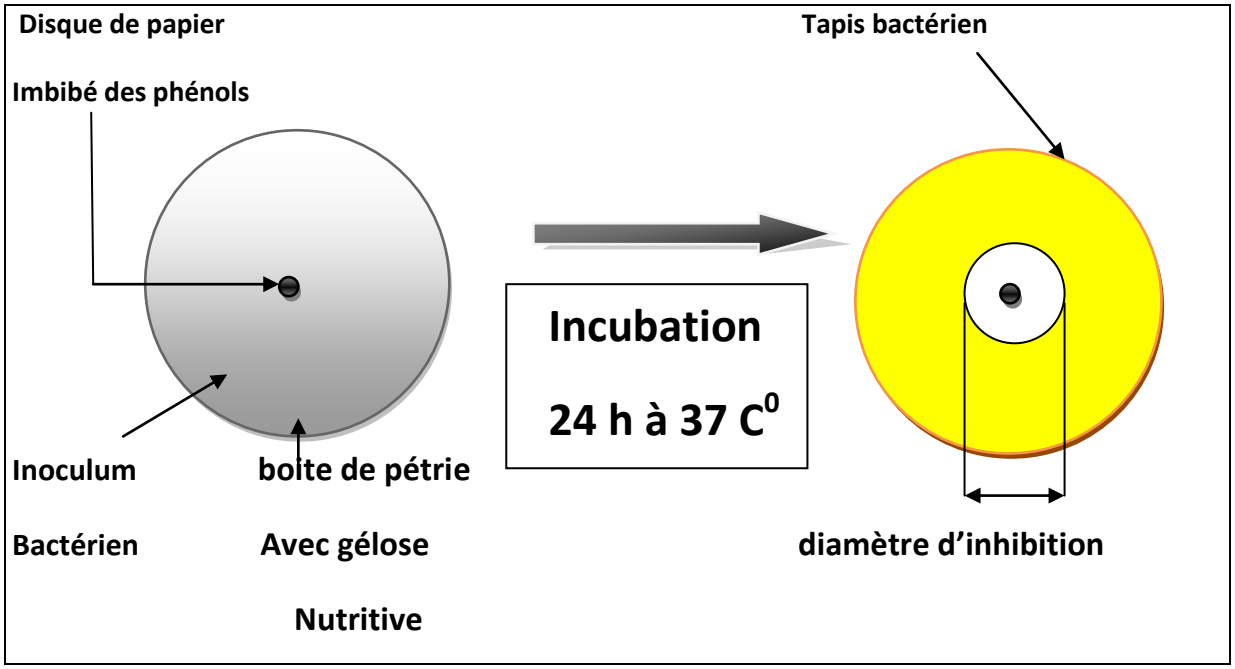


Figure 10 : Principe de la méthode de diffusion par disque **[5]**

- Les essais ont été effectués en plusieurs reprises.
- La boite de contrôle, réalisée pour chaque expérience, est une boite ensemencée dont le disque déposé au centre de la gélose n'est pas imbibé d'extrait végétale.

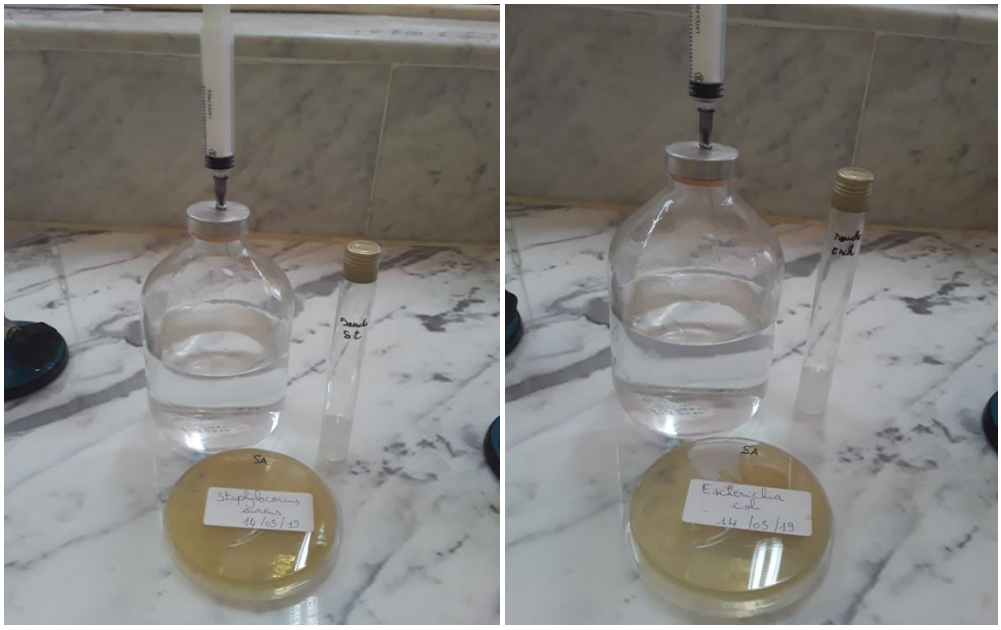
b- Protocole

1. Souches de test

On a choisi de travailler sur 2 espèces pathogènes qui sont ; le *Staphylococcus aureus* (bactérie à gram positif), et *Escherichia coli* (bactérie à gram négatif). Ces espèces sont procurées par le service de SAIDAL de la wilaya de Médéa.

2. Préparation de l'inoculum

- Réaliser une suspension bactérienne à partir de culture jeune de bactéries (18-24h), prélever quelques colonies isolées et incorporer dans 5 ml d'eau physiologique.
- Agiter et homogénéiser la suspension manuellement.
- 12 tubes correspondant aux 2 souches utilisées ont été préparés



A ***B***

Figure 11: Préparation de la suspension bactérienne

3. *Préparation des milieux de culture*

- ✓ Liquéfier les milieux de culture gélosés dans un bain marie à 120°C et garder la surfusion dans une étuve à 45°C (**Fig.12**).
- ✓ Sous hotte à flux laminaire, verser aseptiquement les milieux de culture gélosés sur les boites de pétrie en raison d'épaisseur 4mm de boite pétrie.
- ✓ Laisser refroidir et solidifier à température ambiante et conserver dans des conditions évitant toute modification de leur composition.



Figure 12: Milieux de culture dans une boite de pétrie

4. Ensemencement %

- ❖ Imbiber aseptiquement un écouvillon avec la suspension bactérienne.
- ❖ Essorer l'écouvillon en pressant fermement et entourant sur la paroi interne du tube, afin de décharger du sur plus de suspension.
- ❖ Ensemencer aseptiquement une boite de Pétrie en frottant délicatement l'écouvillon sur la surface de la gélose en stries serrées, répéter l'opération trois fois, en entourant la boite à 60°C de façon à croiser les stries, finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose **(Fig. 13)**.

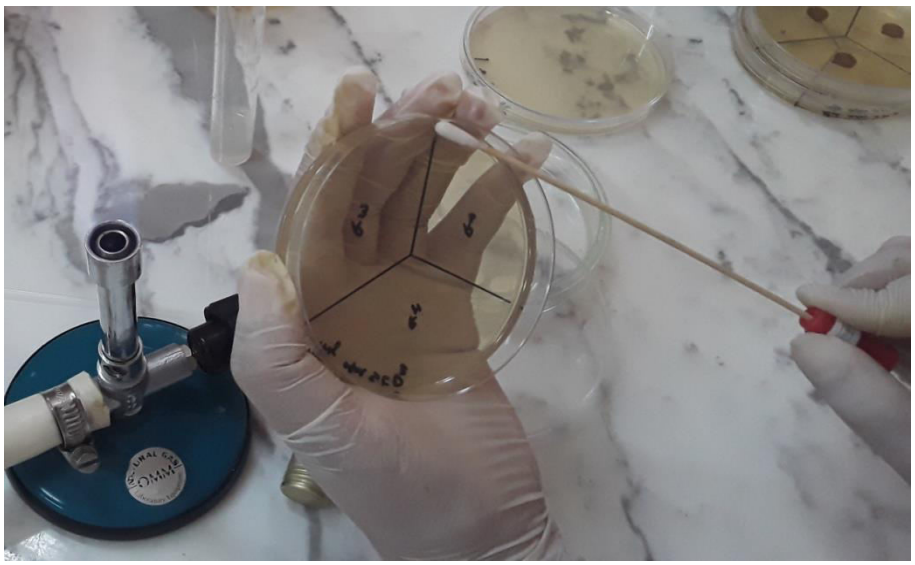


Figure13: Ensemencement

5. Dépôt des disques

- Prélever aseptiquement un disque stérile de 9 mm avec une pince stérile.
- Mettre en contact le bout de disque avec polyphénols pure, qui va être absorbée par le disque par capillarité.
- Déposer le disque ainsi imbibé de polyphénols « à la surface de la gélose, au centre de la boite de Pétrie.
- Incuber les boites à 37°C durant 24 h.

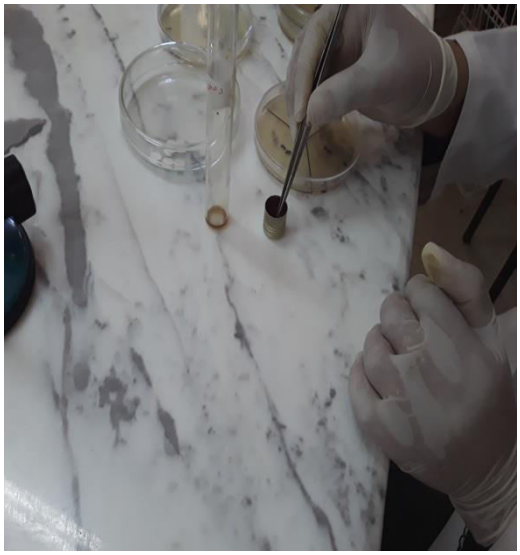


Figure14 : Disque en contact de Polyphénols purs

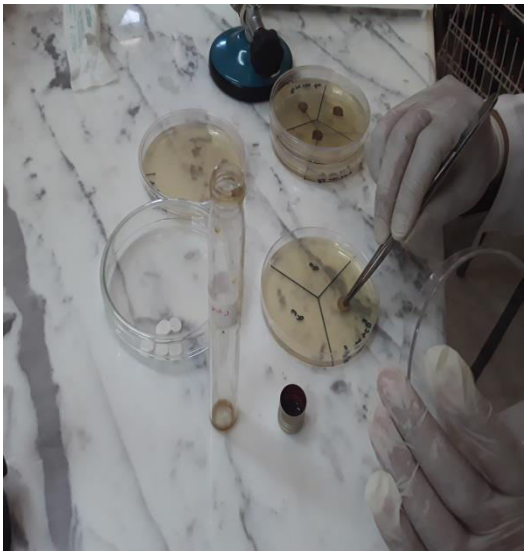


Figure 15: Disque au centre de la gélose

6. Lecture des résultats

L'activité antibactérienne de polyphénols est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition formée autour de chaque disque où aucune croissance n'est observée. L'importance des diamètres des zones reflète l'impact de polyphénols sur les souches testées **[6,7]**.

Les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité **[8,9]**:

- (-) souche résistante (D < 8 mm)
- (+) souche sensible (9mm ≤ D ≤ 14mm)
- (+ +) souche très sensible (15mm ≤ D ≤ 19 mm)
- (+ + +) souche extrêmement sensible (D >20 mm)

Références bibliographiques

[1] Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Arab, L., El Ajjouri, M. et Chaouch, A. **2010**. Composition chimique et activité antimicrobienne des huilles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Dest.) Benth. Du Maroc. *Biotechnol. Agron. Environ.,* vol. 14(1) .

[2] Mohammedi Z. **(2005)**. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. *Thèse de Magistère.* Université Abou Bakr Belkaïd, Tlemcen.

[3] Singleton V.L., Rossi J.L., **1965**. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, vol 16, p.144–158

[4] Orak H.H., Yagar H., Isbilir S.S., **2012**. Comparison of antioxidant activities of juice, peel, seed of pomegranate (*Punica granatum* L.) and inter-relationships with total phenolic, Tannin, anthocyanins and flavonoids contents. Food Science and Biotechnology, vol 21, p. 373-387. Doi: https://doi.org/10.1007/s10068-012-0049-60. Consulter le: 22/04/2019

[5] Medjekane M., **(2017)**. *Prévalence de l'infection à Helicobacter pylori et son inhibition par des molécules bioactives.* Thèse de Doctorat, Nutrition humaine, Université Hassiba Benbouali de Chlef.

[6] Cheurfa M., **(2015)**. *Intérêt des biomolécules d'origine végétale sur la santé*. Thèse de doctorat LMD, sciences alimentaires et nutrition, Université Hassiba BEN BOUALI – Chlef.

[7] Abdelli W., **(2017)**. *Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de Juniperus phoenicea et de Thymus vulgaris.* Thèse de doctorat 3ième cycle LMD, Microbiologie Appliquée, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.

[8] Zeghib A., **(2013)**. *Etude phytochimique et activités antioxydante, antiproliférative, antibactérienne et antivirale d'extraits et d'huiles essentielles de quatre espèces endémiques du genre Thymus.* Thèse de doctorat en sciences, chimie organique, Université de Constantine.

[9] Raymond M., **(2005).** L'aromathérapie chez le nourrisson et le petit enfant. Thèse de Doctorat, Pharmacie, Université de Nantes.

Chapitre VI

Résultats et discussions

IV.1. Taux d'humidité

Le test d'humidité à été réalisé dans le but d'estimer la teneur en eau de la partie aérienne de *Ruta chalepensis et Thym*, Cela permettra de calculer le rendement d'extraction en composés phénoliques.

L'analyse des deux échantillons des plantes utilisées pour le test a révélé un taux d'humidité important égale à **86.56% ± 0.14%** pour le *Ruta chalpensis* et **83.2% ± 0.1%** pour le *Thym* est représenté dans la figure 1.

Donc, nos résultats indique que plus de la moitié du poids de la plante fraiche est constituée en eau et la teneur dans le *Ruta chalpensis* est plus élevée que celle du *Thym*.

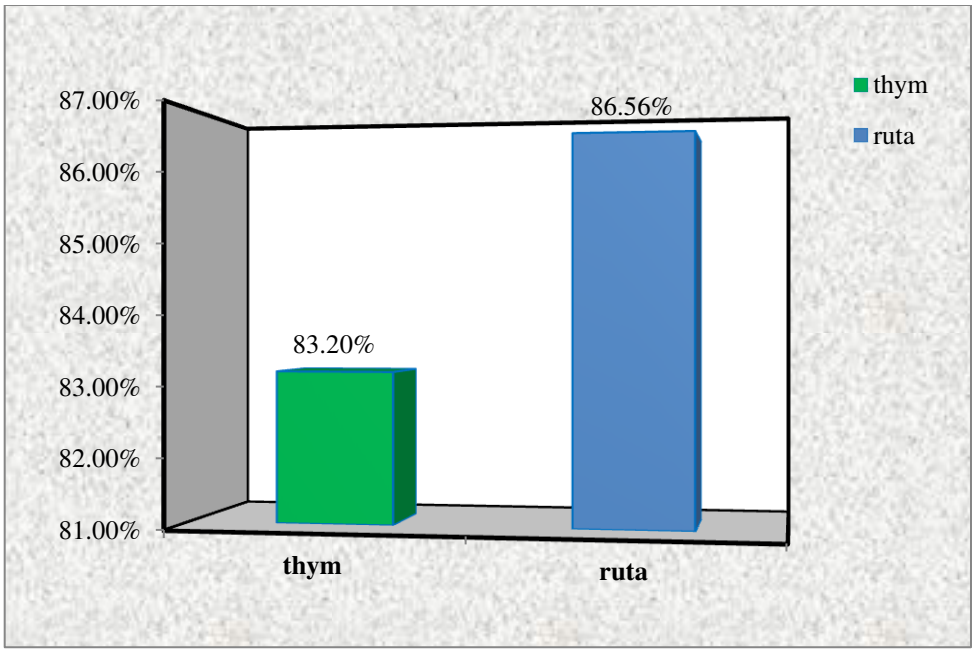


Figure 16: Teneur en eau de la partie aérienne de *Ruta chalepensis* et *Thym*.

IV.2. Rendement d'extraction en polyphénol

Dans cette étude, le rendement (l'extrait sec, obtenu après évaporation, contenant les flavonoïdes et les composés phénoliques) à été déterminé par rapport à 5 g de la matière végétale (broyat ou feuilles sèches).

Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant évaporation).

Les résultats de cette manipulation sont représentés dans la **fig. 17**.

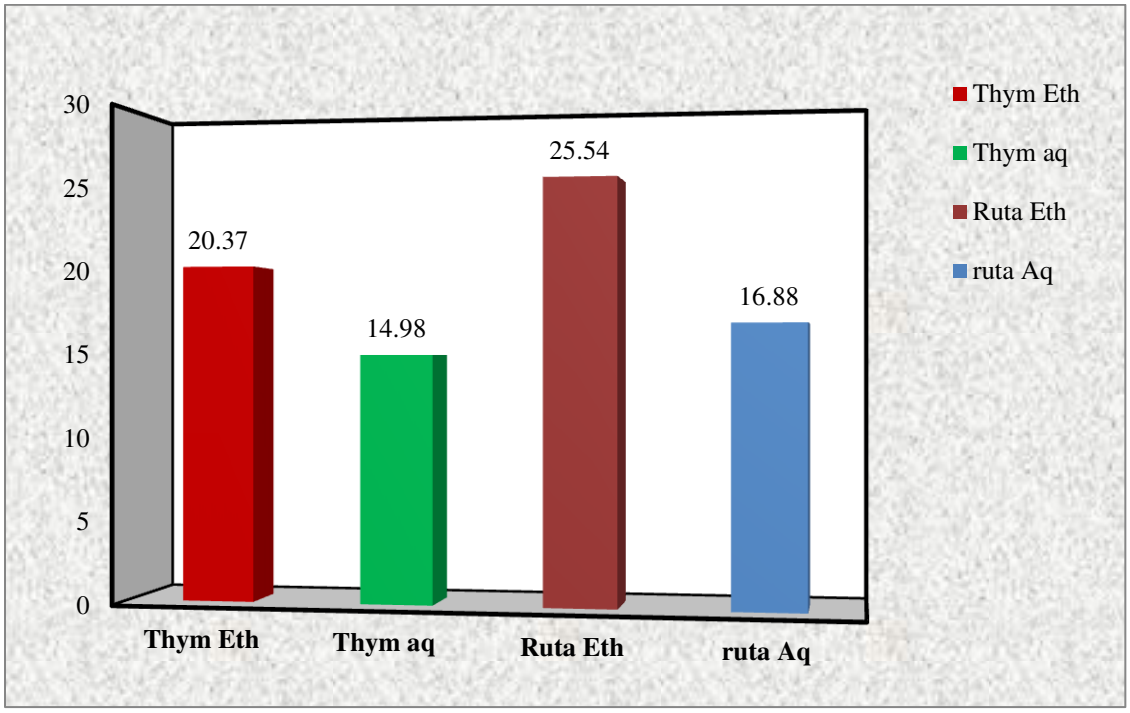


Figure 17: Rendement de composés phénoliques de l'extrait éthanolique et aqueux de *Ruta chalpensis* et de *Thym*.

D'après les résultats obtenus, on déduit que :

Le rendement en polyphénols dans le Thym est significatif dans l'extrait éthanolique jusqu'à 20.37±0.3315%, alors que le rendement dans l'extrait aqueux atteint 14.98±0.095%.

Donc, le rendement des polyphénols dans l'extrait éthanolique est supérieur au rendement dans l'extrait aqueux de Thym.

Le rendement en polyphénols dans le Ruta chalpensis dans l'extrait éthanolique de l'ordre de 25.54±0.498% et dans l'extrait aqueux de l'ordre de 16.88±0.423%.

Nous constatons que, le rendement des polyphénols dans l'extrait éthanolique est supérieur au rendement dans l'extrait aqueux de *Ruta chalpensis* .

De tout cela Nous concluons que le rendement en polyphénols est plus élevé dans l'extrait éthanolique que dans l'extrait aqueux pour les deux plantes étudiées.

Selon les résultats illustrés ci-dessus, on distingue que les espèces de *Ruta chalpensis* sont riches en phénols par rapport à *Thym* qui a présenté le rendement le plus faible.

IV.3. Dosage

VI.3.1. Courbe d'étalonnage pour le dosage de polyphénols totaux (PPT)

a. Milieux d'extrait aqueux

Cette courbe est établie en utilisant l'acide gallique comme référence et les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg E Ga/ g Ms).

La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation R^2 = 0,98 **(fig.18)**.

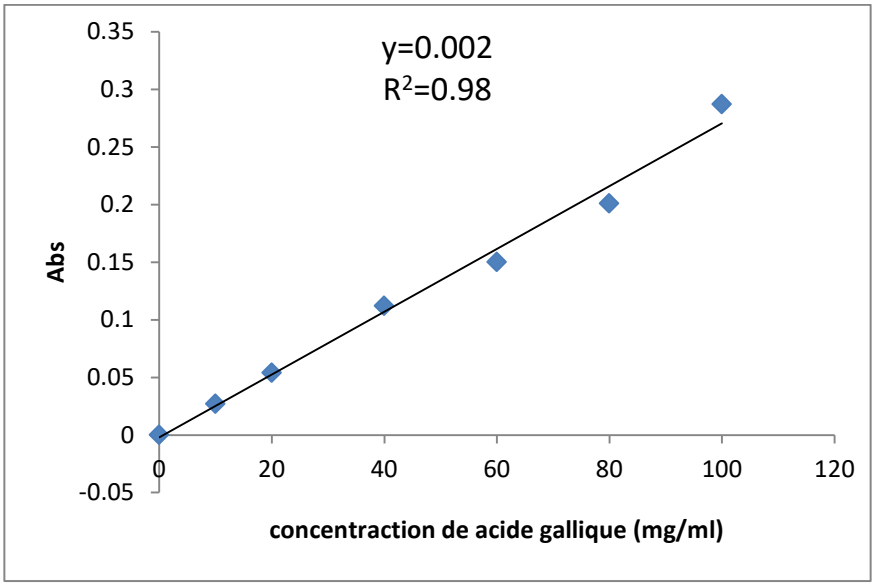


Figure 18: Courbe d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques totaux par l'extrait aqueux.

b. Milieux l'extrait éthanolique

La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation R^2 = 0,989 **(fig.19)**.

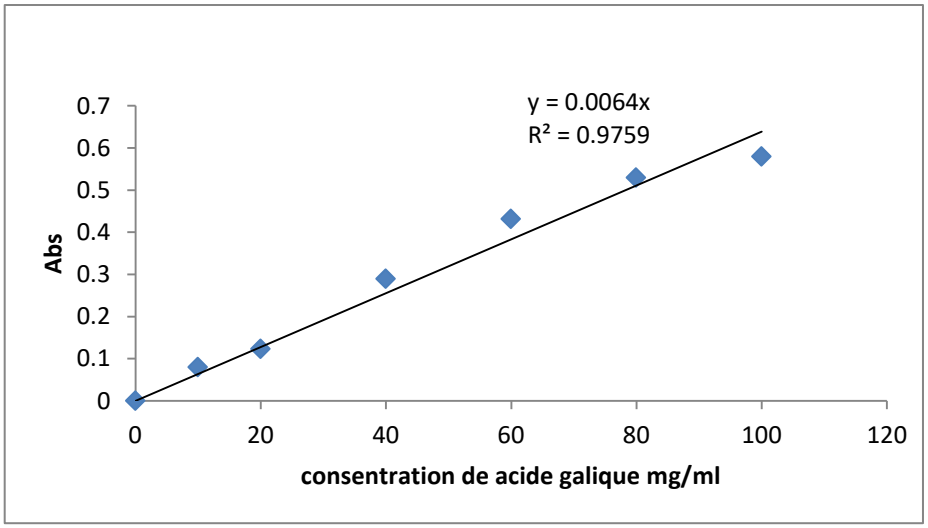


Figure19: Courbe d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques totaux par l'extrait éthanolique.

IV.3.2. Teneur en composés phénoliques totaux

Les résultats sont rassemblés dans l'histogramme **06** afin de faire une comparaison entre la composition polyphénolique de l'extrait aqueux et ethanolique. L'histogramme représente les teneurs en Polyphénols totaux (PPT) exprimées en mg équivalent acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg GAE/g) et en (mg EAG/l) de la matière fraiche, en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (y = 0.002, R^2 = 0.99) pour l'extrait aqueux **(Fig.20)**, et (y=0.006, R^2=0.9750) pour l'extrait ethanolique.

Les résultats de dosage des polyphénols totaux sont illustrés dans la figure suivante :

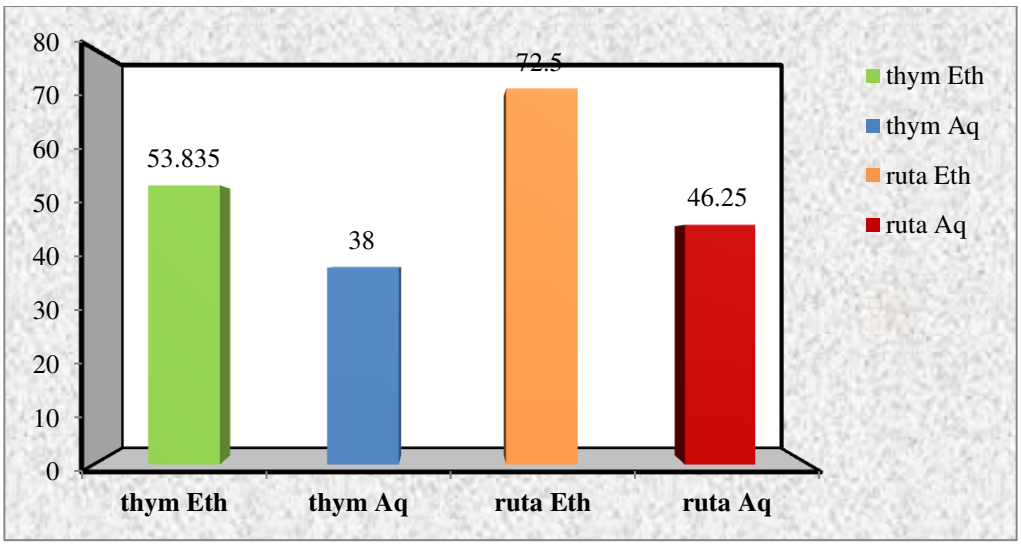


Figure20: Teneur en composés phénoliques totaux

A partir des résultats obtenus, nous avons observé des teneurs variées en polyphénol dans les différents extraits de *Thym* et l'extrait de *Ruta chalpensis.*

La teneur en polyphénol est la plus importante a été enregistrée pour l'extrait éthanolique avec une valeur de l'ordre de 53.835 mg ER/g alors que le contenu était minimal pour l'extrait aqueux (38 mg ER/g) dans le Thym.

La teneur en flavonoïdes la plus importante a été enregistrée pour l'extrait éthanolique avec une valeur de l'ordre de 72.5 mg ER/g alors que le contenu était minimal pour l'extrait aqueux (46.25 mg ER /g) dans le *Ruta chalpensis*.

En dernier nous concluons que la teneur en polyphénol est plus élevée dans l'extrait éthanolique que dans l'extrait aqueux pour les deux plantes étudiées.

Selon les résultats illustrés ci-dessus, on distingue que les espèces de *Ruta chalpensis* sont riches en polyphénole par rapport à *Thym* qui a présenté la plus faible teneur.

IV.3.2. Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux (FVT)

Le composé de référence utilisé pour l'établissement de cette courbe est la retine.

La courbe est établie avec un coefficient de corrélation R^2= 0,98 **(fig.21)**. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent retine par gramme de matière sèche (mg ER/g Ms).

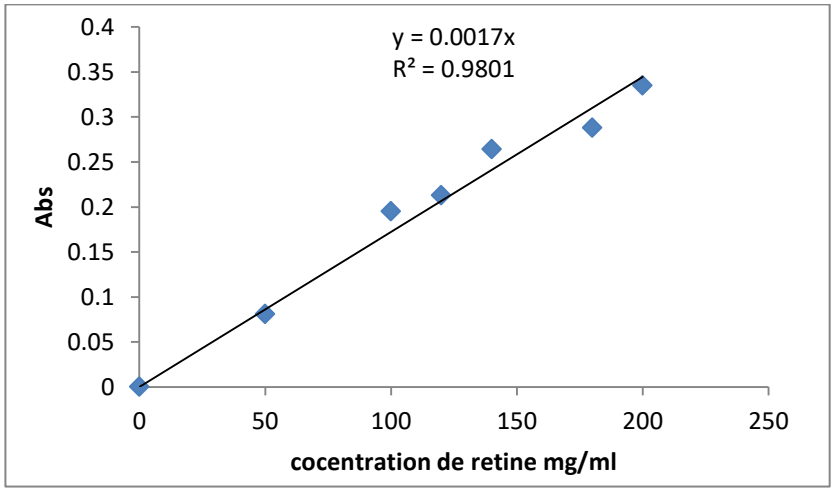


Figure 21: Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes

IV.3.2.1. Teneur en flavonoïde totaux

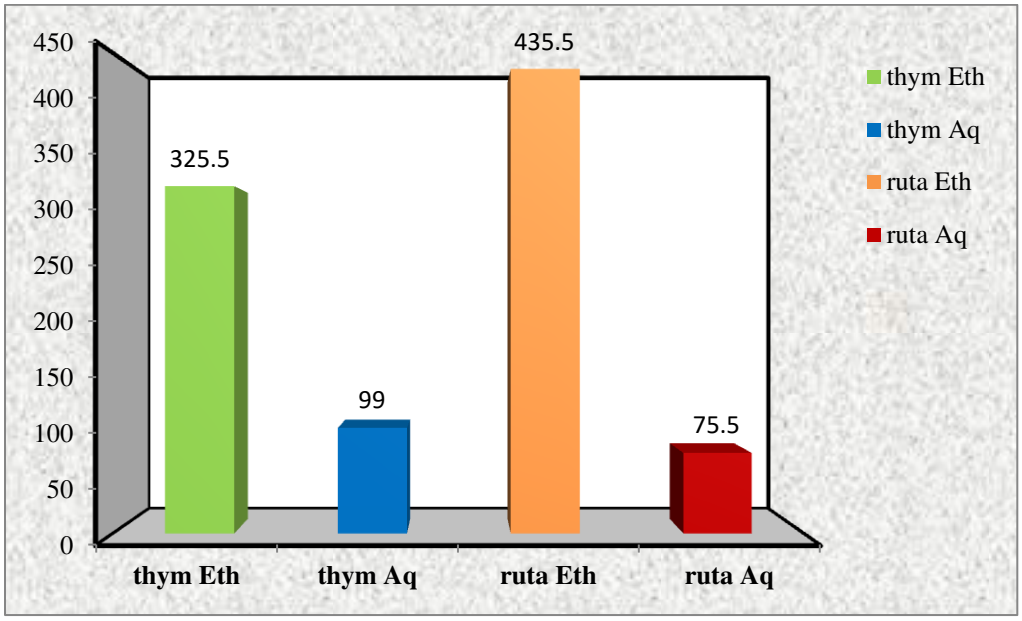


Figure 22 : Teneur en flavonoïdes (mg ER/g) des deux extraits de plante

A partir des résultats obtenus, nous avons observé des teneurs variées en flavonoïdes dans les différents extraits de *Thym* et de *Rutachalpensis.*

La teneur en flavonoïdes la plus importante a été enregistrée pour l'extrait éthanolique avec une valeur de l'ordre de 325.5 mg ER/g alors que le contenu était minimal pour l'extrait aqueux (99 mg ER/g) dans le *Thym*.

La teneur en flavonoïdes la plus importante a été enregistrée pour l'extrait éthanolique avec une valeur de l'ordre de 435.5 mg ER/g alors que le contenu était minimal pour l'extrait aqueux (75.5 mg ER /g) dans le *Rutachalpensis*.

Nous concluons que la teneur en flavonoïdes est plus élevée dans l'extrait éthanolique que dans l'extrait aqueux pour les deux plantes étudiées.

Selon les résultats obtenus, on distingue que les espèces de *Ruta chalpensis* sont riches en flavonoïdes par rapport à *Thym* qui a présenté la teneur la plus faible.

IV.4. Résultats de l'activité antibactérienne des polyphénols isolés de Thym et Ruta chalpensis:

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien des polyphénols isolés de *Thym* et de *Ruta chalpensis* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton).

L'activité antibactérienne de nos produits est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les produits phénolique à tester vis-à-vis de deux germes pathogènes d'origine hospitalière (*Escherichia coli, Staphylocaccus aureus*) après 24 heurs d'incubation à une température adéquate de 37°c.

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition révèlent qu'*Escherichia coli* apparait extrêmement sensible vis-à-vis des polyphénols testés, ces mêmes polyphénols développent des zones d'inhibition importantes vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* dont les diamètres des zones d'inhibition varient entre (10-22.7) mm pour *Escherichia coli* **(fig.24-27)**, et de (10.80-22) mm pour *Staphylococcus aureus* **(fig.29-32)**.

La sensibilité d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* traduit l'action antibactérienne des polyphénols. En fait, cette sensibilité est en relation avec le nombre des hydroxyles libres dont on constate que les polyphénols les moins hydroxylés sont les plus actifs.

Cowan (1999) **[1]** supposait que les polyphénols dépourvus des groupements hydroxyles libres ont plus d'activité antimicrobienne par rapport à ceux qui en sont pourvus, ce qui conduit à une augmentation de leur affinité chimique aux lipides membranaires, donc on peut supposer que la cible microbienne de ces polyphénols testés est la membrane cytoplasmique.

a. Bactérie à gram négative (Escherichia coli) :

Les résultats sont rassemblés dans la **(fig.23-27)** afin de faire une comparaison entre la zone d'inhibition de *Thym* et de *Ruta chalpensis* de l'ordre décroissant sur *l'Escherichia coli* :

Le *Thym* éthanolique à une forte activité antibactérienne avec de diamètre d'inhibition dans la D1 supérieur le diamètre d'inhibition de la D2 et D3 (22mm, 20.30mm et 19.60 mm).

Le Thym aqueux à une forte activité antibactérienne avec de diamètre d'inhibition dans la D1 supérieur le diamètre d'inhibition de la D2 et D3 (19.6mm, 18.2mm et 10.17 mm).

Le Ruta éthanolique à une forte activité antibactérienne avec de diamètre d'inhibition dans la D1 supérieur le diamètre d'inhibition de la D2 et D3 (17.6mm, 15.mm et 10.66 mm).

Le *Ruta aqueux* à une forte activité antibactérienne avec de diamètre d'inhibition de la D1 supérieur le diamètre d'inhibition de la D2 et D3 (15.3mm, 11.6mm et 10.33mm).

L'effet antibactérien de l'extrait éthanolique sur *Escherichia coli* indique que cette bactérie présente une résistance aux fortes concentrations.

Donc, l'extrait éthanolique est plus actif sur *Escherichia coli* par contre l'extrait aqueux.

Selon les résultats obtenus, on distingue que le *Thym* représente une fort activité antibactérienne par rapport le *Ruta* pour les bactéries à gram négatif.

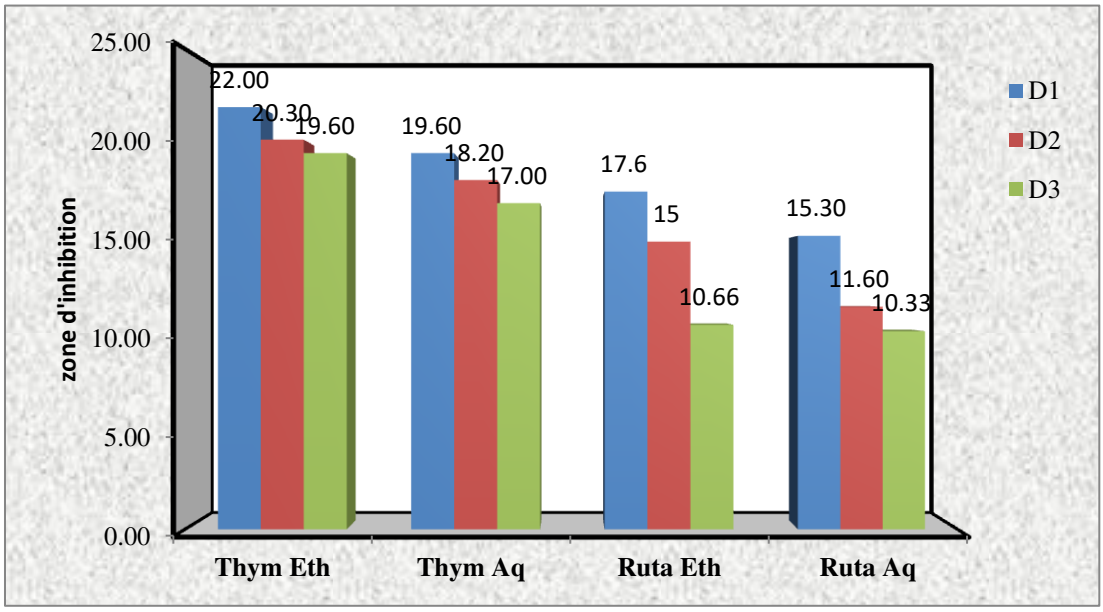


Figure 23 : Zones d'inhibition (mm) des principaux polyphénols isolés de *Thym* et de *Ruta chalpensis* vis-à-vis d'*Escherichia coli*

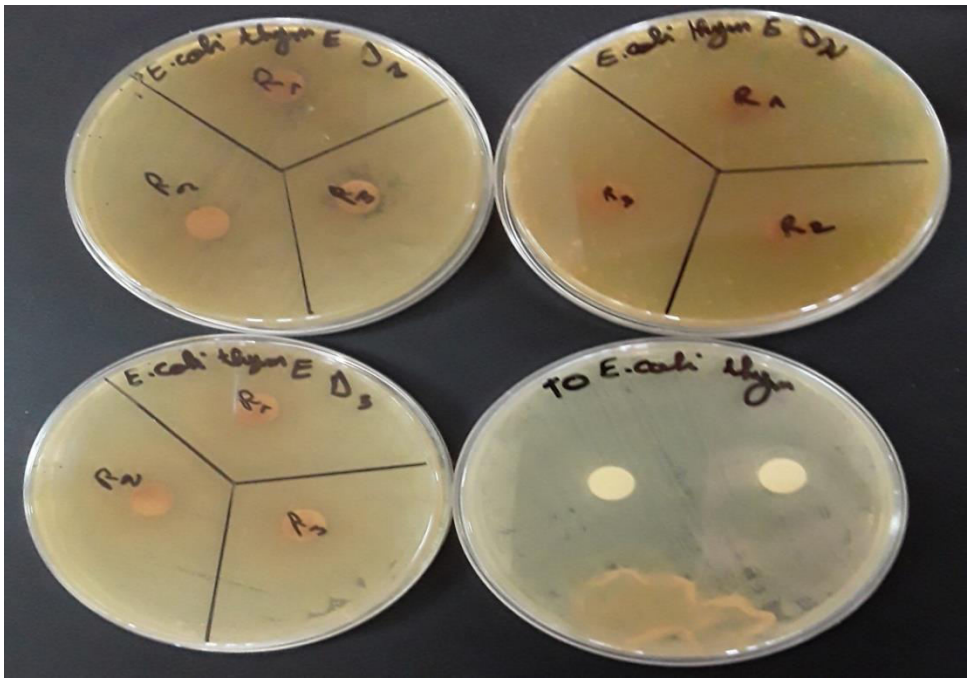


Figure 24: Zones d'inhibition (mm) d'Escherichia coli par les polyphénols testés dans le *Thym* éthanolique

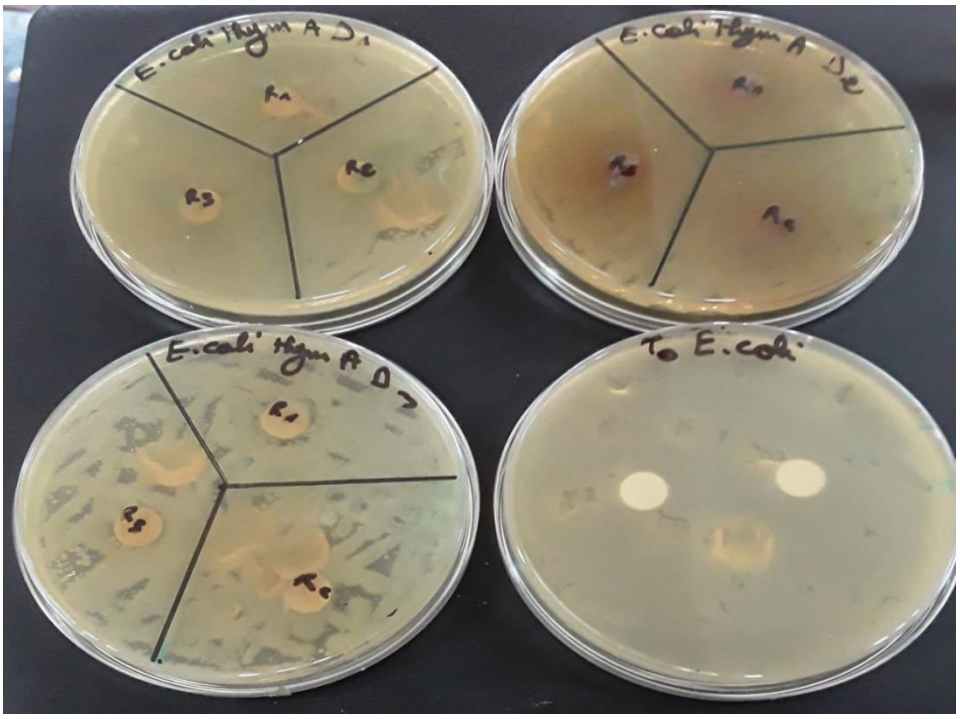


Figure 25 : Zones d'inhibition (mm) *d'Escherichia* coli par les polyphénols testés dans le *Thym* aqueux.

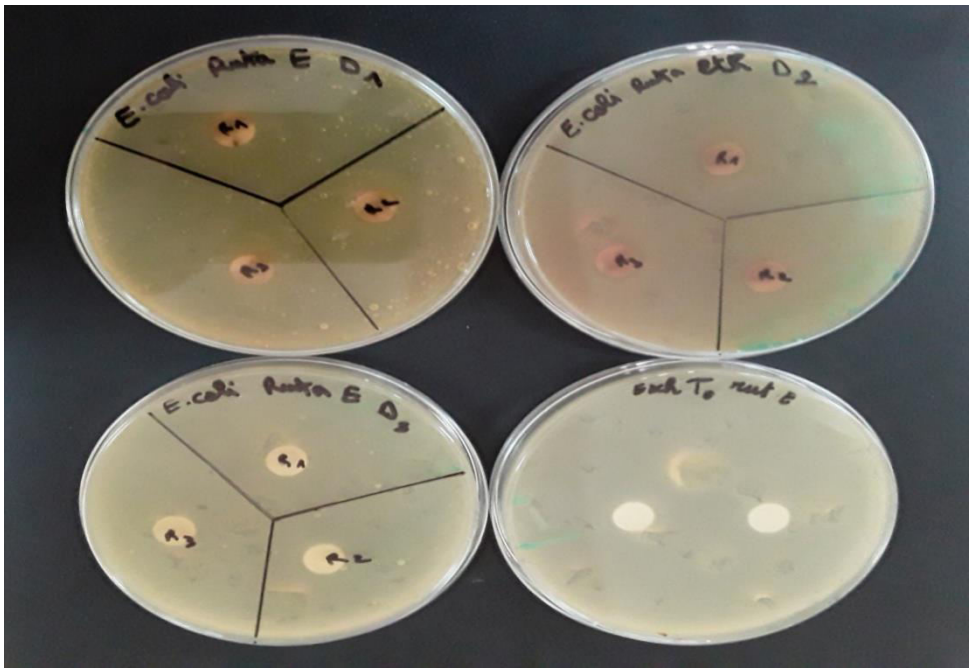


Figure 26 : Zones d'inhibition (mm) *d'Escherichia coli* par les polyphénols testés dans le *Ruta éthanolique*.

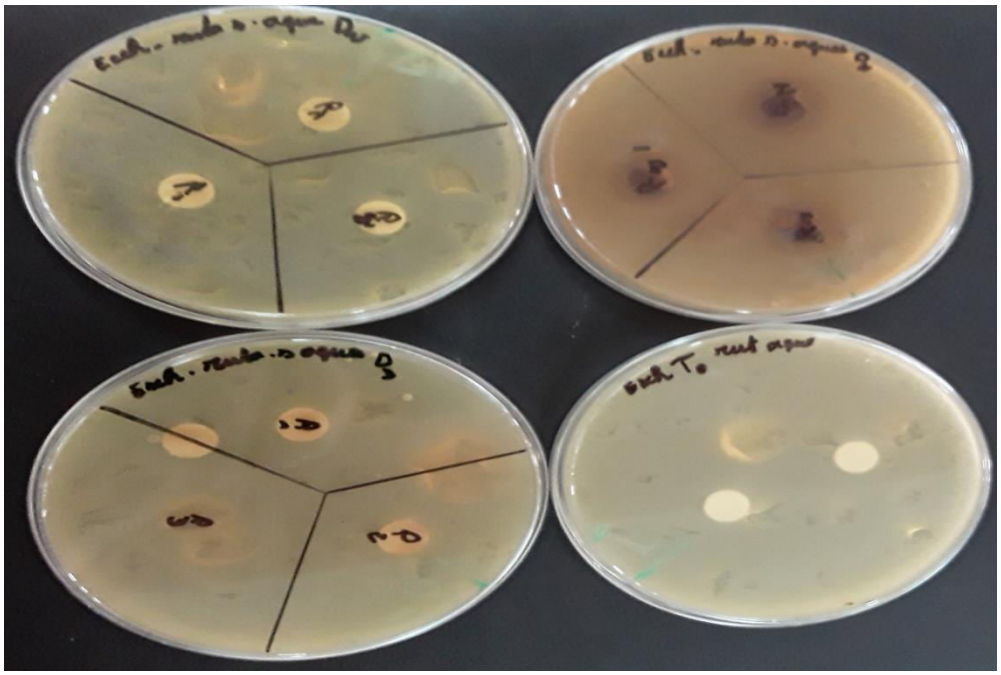


Figure 27: Zones d'inhibition (mm) *d'Escherichia coli* par les polyphénols testés dans le *Ruta* aqueux.

b. Bactérie gram positif (Staphylococcus aureus)

Les résultats sont rassemblés dans la **(fig.28-32)** .Afin de faire une comparaison entre la zone d'inhibition de *Thym* et de *Ruta chalpensis* de l'ordre décroissant sur

Staphylococcus aureus.

Le *Thym* éthanolique à une forte activité antibactérienne avec de diamètre d'inhibition de la D1 supérieur le diamètre d'inhibition de la D2 et D3 (22 .70mm, 17mm et 14 mm).

Le *Thym* aqueux à une forte activité antibactérienne avec de diamètre d'inhibition de la D1 supérieur le diamètre d'inhibition de la D2 et D3 (14.60mm, 14mm et 10.66mm).

Le Ruta éthanolique à une forte activité antibactérienne avec de diamètre d'inhibition de la D1 supérieur le diamètre d'inhibition de la D2 et D3 (20mm, 16mm et 14.70 mm).

Le *Ruta aqueux* à une forte activité antibactérienne avec de diamètre d'inhibition de la D1 supérieur le diamètre d'inhibition de la D2 et D3 (12.70mm, 11.70mm et 10.80mm).

L'effet antibactérien de l'extrait éthanolique sur *Staphylococcus aureus* indique que cette bactérie présente une résistance aux fortes concentrations.

Donc, l'extrait éthanolique est plus actif sur *Staphylococcus aureus* par contre l'extrait aqueux.

Selon les résultats obtenus, on distingue que le *Thym* représente une fort activité antibactérienne par rapport le *Ruta* pour les bactéries à gram positive.

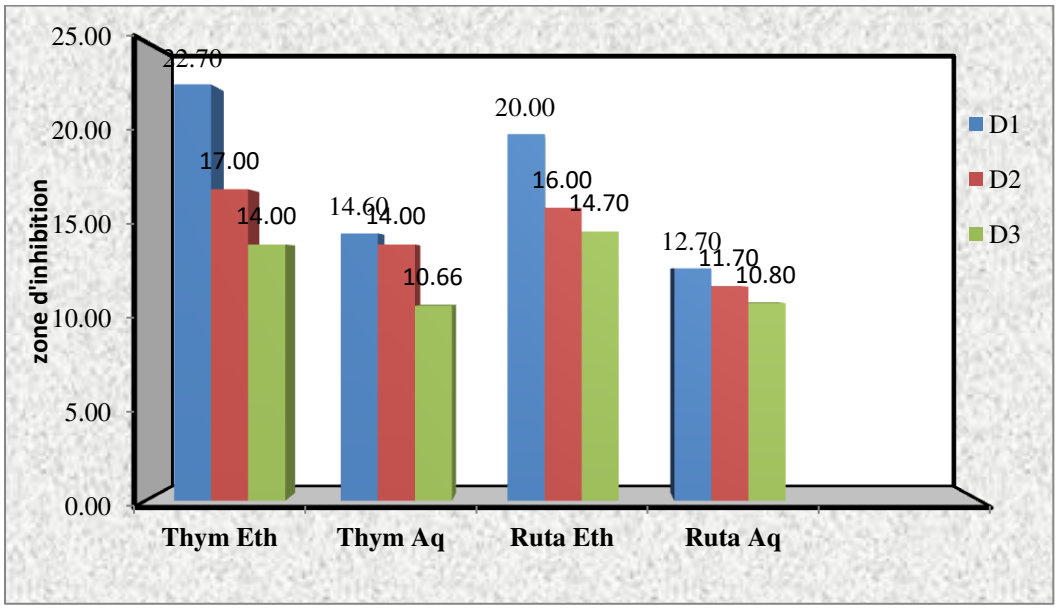


Figure 28 : Zones d'inhibition (mm) des principaux polyphénols isolés de *Thym* et de *Ruta chalpensis* vis-à-vis *Staphylococcus aureus.*

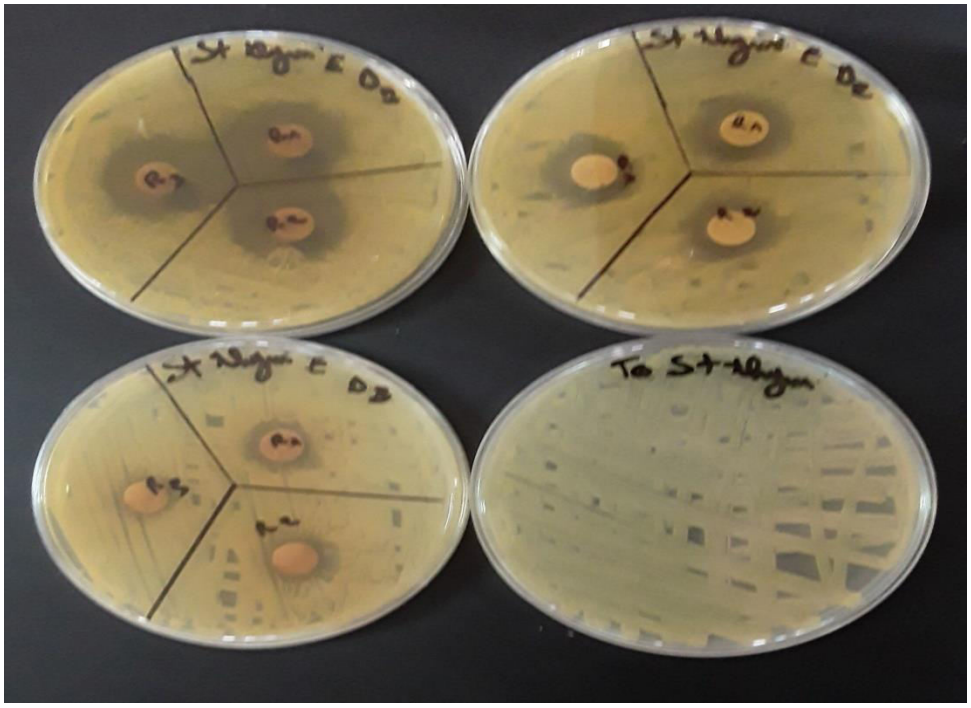


Figure 29: Zones d'inhibition (mm) *Staphylococcus aureus* par les polyphénols testés dans le *Thym* éthanolique.

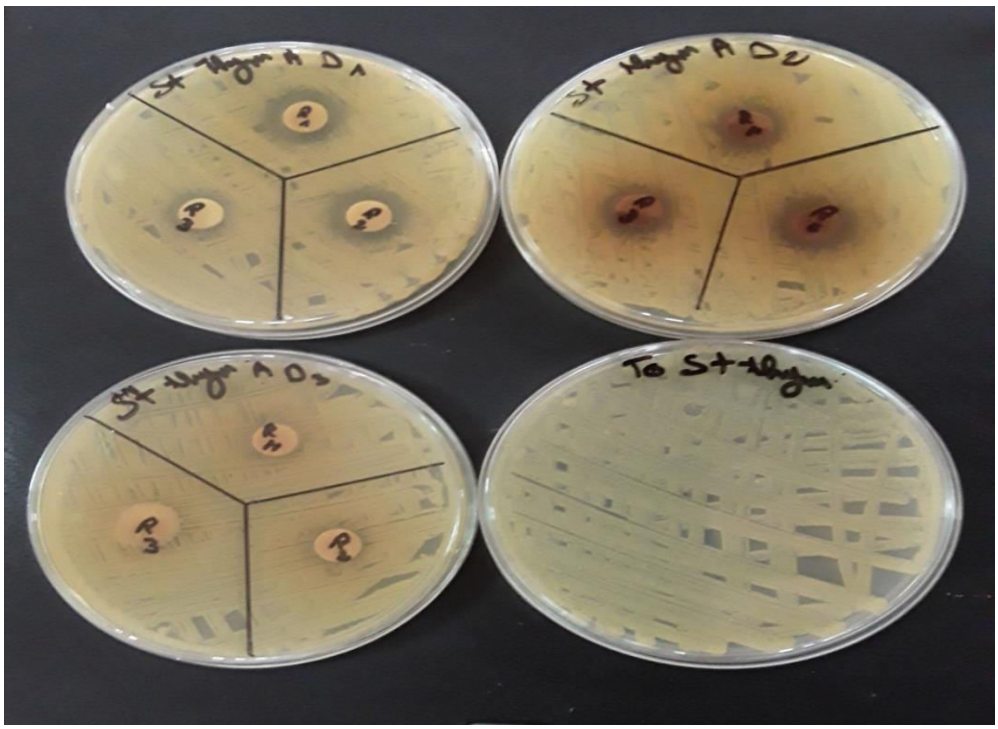


Figure 30: Zones d'inhibition (mm) *Staphylococcus aureus* par les polyphénols testés dans le *Thym* aqueux.

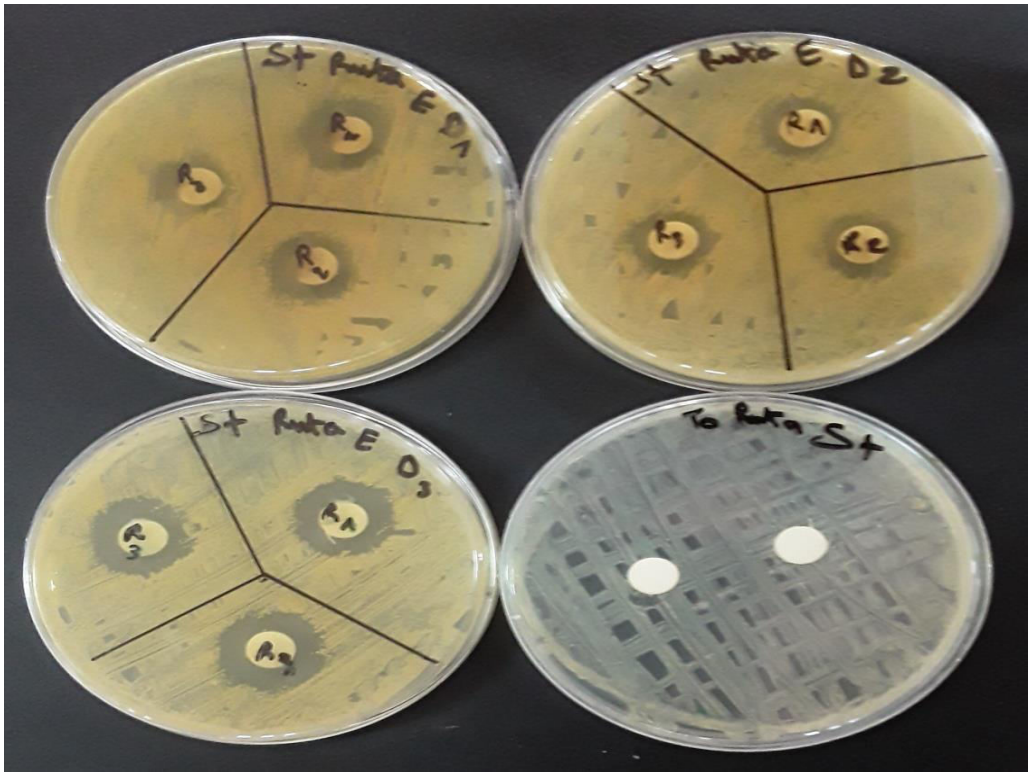


Figure 31: Zones d'inhibition (mm) *Staphylococcus aureus* par les polyphénols testés dans le *Ruta* éthanolique.

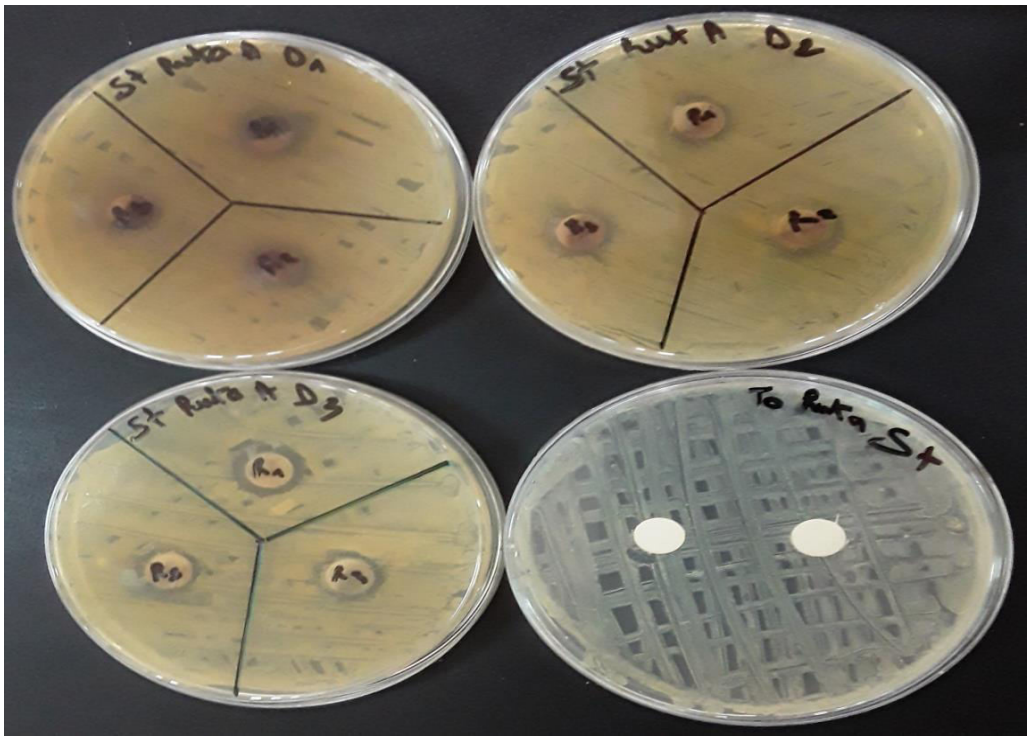


Figure32: Zones d'inhibition (mm) *Staphylococcus aureus* par les polyphénols testés dans le *Ruta aqueux*.

Donc, De tout résultat indiquent que les polyphénols du *Thym* et du *Ruta chalpensis* développent des l'effet antimécrobienne importantes vis-à-vis d'*Escherichia coli et Staphylococcus aureus.*

L'activité antibactérienne des polyphénols peut être expliquée par le mécanisme de toxicité vis-à-vis des microorganismes qui se fait soit par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires ou les enzymes, la chélation des ions métalliques, inhibition du métabolisme bactérien, la séquestration de substances nécessaires à la croissance des bactéries **[2]**.

Référence Bibliographiques

[1] Cowan M. M. **1999**. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbioloy reviews*. , 12 (4).

[2] Karou D., Dicko M. H., Simporé J., Yameogo S., Sanon S. et Traoré A. S. **2005**. Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes medicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Maitrise des procédés en vue d'améliorer la qualité des aliments, utilisation des OGM, analyse des risques en agroalimentaire. 8-11 novembre. Ouagadougou.

Conclusion Générale

CONCLUSION GENERALE

Cette étude a eu pour but de contribuer à la connaissance de *Ruta chalepensis et thym*, espèces spontanées, relativement abondante dans la région de la Wilaya de Médéa.

Une étude comparative des deux techniques d'extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes contenus dans une plante médicinale, a été réalisée. Il s'agit, en l'occurrence, de l'extraction par macération dans l'éthanol aqueux à 80% (v/v), à température ambiante, pendant 24 heures et l'extraction par aqueux, pendant 24 heures.

L'extraction des composés phénoliques à partir de la partie aérienne de la plante, a indiqué que *Ruta chalepensis et de thym (éthanolique , aqueux)* ont données des bons rendements respectifs de 20,37% et 14,98%, 25,54%, 16,88% , elles sont donc riches.

Les résultats du dosage des composés phénoliques totaux, à partir des deux extraits obtenus, ont clairement montré que l'extrait éthanolique de *Ruta et thym* possède une teneur élevée de l'ordre de 53,835 (mg EAG/g Ms) et 72,5(mg EAG/g Ms), par apport à l'extrait aqueux possède une teneur moyenne en ces composés de 38(mg EAG/g Ms) et 46,25(mg EAG/g Ms) .

Les résultats du dosage des flavonoïdes totaux ont montrés que l'extrait éthanolique de ruta et thym possède une teneur élevée de 325,5 (mg ER/g Ms) et 435,5(mg ER/g Ms), l'extrait aqueux possède une teneur moyenne en ces composés de 99(mg ER/g Ms) et 75,5(mg E/g Ms).

L'étude d'effets antibactériens des composés phénoliques extraits de *Ruta chalepensis et thym* sur l'*Escherichia coli et Staphylococcus aureuus* présentent une sensibilité très importante.

Enfin, des études toxicologiques peuvent affirmer ou rejeter la possibilité d'emploi des extraits de *Ruta chalepensis et de thym* dans les différentes industries (Agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique,…).

ملخص

النباتات الطبية هي مصدر كبير للجزيئات النشطة بيولوجيا مع العديد من الأنشطة.
الهدف من عملنا هو تثمين نباتين عطريين وطبيين ينموان تلقائيًا في منطقة ولاية المدية من خلال القياس الكمي لمحتويات المركبات الفينولية لهذين النوعين وتقييم النشاط المضاد للبكتيريا في مقتطفاتها هي روتا chalpensis و الزعتر.
مستخلص روتا chalpensis غني بالفينولات مقارنة بالزعتر الذي يحتوي على أقل عائد.
استخراج المركبات الفينولية الكلية والفلافونويدات من روتا تشالبينسيس غنية بالبوليفينول مقارنة مع الزعترالذي يحتوي على أقل محتوى.
في الختام ، يمثل الزعتر وروتا نشاطًا مضادًا قويًا للبكتيريا لبكتريا الإشريكية القولونية والمكورات العنقودية الذهبية..

الكلمات المفتاحية: روتا chalpensis ، الزعتر، مقتطف، البوليفينول ، الفلافونويد.

Résumé

Les plantes médicinales constituent une source immense de molécules bioactives, dotées de nombreuses activités.

L'objectif de notre travail est la valorisation de deux plantes aromatiques et médicinales poussant à l'état spontané dans la région de wilaya de Médéa par la quantification des teneurs en composés phénoliques de ces deux espèces et l'évaluation de l'activité antibactérienne de leurs extraits, il s'agit de *Ruta chalpensis et de thym.*

L'extrait de *Ruta chalpensis* sont riches en phénols par rapport à thymus qui a présenté le rendement le plus faible.

L'extraction des composés phénoliques totaux et flavonoïdes de Ruta chalpensis sont riches en polyphénols par rapport à thym qui a présenté la plus faible teneur.

En conclusion, Le thym et le ruta représentent une forte activité antibactérienne pour les bactéries d'*Escherichia coli et Staphylococcus aureus.*

Mots clés: Ruta Chalpensis, Thym, Extrait, polyphénols, flavonoïdes.

Abstract

Medicinal plants are a huge source of bioactive molecules with many activities.

The objective of our work is the valorization of two aromatic and medicinal plants growing spontaneously in the region of wilaya of Medea by the quantification of the contents of phenolic compounds of these two species and the evaluation of the antibacterial activity of their extracts are Ruta chalpensis and thymus.

Ruta chalpensis extract is rich in phenols compared to thymus which has the lowest yield.

The extraction of total phenolic compounds and flavonoids from Ruta chalpensis are rich in polyphenols compared with thymus which has the lowest content.

In conclusion, Thyme and ruta represent a strong antibacterial activity for the bacteria of Escherichia coli and Staphylococcus aureus.

Key words: Ruta Chalpensis, thyme, extract, polyphenols, flavonoids.