

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : *Mycologie et Biotechnologie Fongique*

Intitulé :

**Etude phytochimique et activités biologiques d'une plante
saharienne de la famille des Cistaceae**

Présenté par : Benkahoul Lotfi.

Le 21/06/2023

Chaib Nousseiba.

Mekhloufi Djihene.

Jury d'évaluation :

Président : Meziani Meriem (MCB) (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadreur : Belaouira Randa (MCB) (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur : Mennana Imen (MCB) (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Année universitaire
2022 – 2023**

Remerciements

Tout d'abord, louange à Allah le Tout-Puissant de nous avoir donné la force de mener à bien cette recherche.

Nous tenons à exprimer notre gratitude, notre appréciation et notre respect envers notre chère enseignante et superviseure, BELAOUIRA Randa, pour son aide, son soutien et ses conseils pour mener à bien ce travail.

Nous remercions également tous les membres du jury pour leur gentillesse et leur précieuse évaluation de notre humble travail de recherche.

Un grand remerciement pour Mr. SEGHIRI Ramdane, responsable du laboratoire de l'Unité de recherche VAREN-BIOMOL qui nous a ouvert les portes de son laboratoire durant notre stage.

Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements à Mr. Hicham et Mme Nawal pour la gentillesse, l'aide, les conseils et le temps qu'il nous a consacré durant tout le travail.

Toutes nos gratitudes doivent aller également au « Mr. BENSOUICI Chawki », « Mr. DEBI Ali » et Mme. IKHLEF Assia pour leur accueil au sein de leurs laboratoires (contrôle de qualité, antifongique, bactériologie) au niveau du CRBT et d'avoir mis à notre disposition tout le matériel qui s'y trouve.

Nous tenons à remercier très chaleureusement « Mme. ABDELAZIZ Wided » pour son accueil et ces conseils pendant notre travail au niveau de laboratoire de Microbiologie Université 1 Constantine.

Enfin, un merci spécial à nos familles et à nos amis bien-aimés pour leur encouragement et leur soutien moral.



Dédicace

Avec gratitude et le soutien d'Allah le Majestueux, qui m'a accordé patience, courage et santé, j'ai pu accomplir humblement ce travail.

En ce moment, le stylo trace ses derniers mots qui sont une dédicace pour exprimer mon respect, mon amour éternel et ma gratitude envers mes chers parents qui m'ont toujours encouragé et motivé tout au long de mes études.

Pour tous les sacrifices consentis pour mon éducation et mon bien-être, je souhaite que vos bénédictions m'accompagnent toujours. Que Dieu vous protège et vous garde en bonne santé.

À ma chère sœur, Safa tu as toujours été là pour m'encourager et me motiver à poursuivre mes rêves. Tu m'as soutenu dans toutes mes entreprises.

À tous les enseignants qui m'ont enseigné, en particulier BELAOUIRA Randa, ABDELAZIZ Wided, MEZIANI meriem, BENKAHOUL malika, MEGHNOUS ouissem et d'autres professeurs qualifiés. Merci beaucoup pour votre appréciation et votre respect.

À tous mes amis et à toutes les personnes qui me sont chères.

À mes camarades du Département de Mycologie et biotechnologie fongique de la promo 2018, dirigée par Nousseiba et Djihene, ainsi Bey dounia et bien d'autres. À mes amis proches Badis, Louai, Waill et Seaif.

À toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce projet, je dédie ce travail. Ces années passées avec vous, empreintes de plaisir et d'amour, ont été ponctuées de quelques différences insignifiantes. Actuellement, mon stylo se trouve en marge de la page des souvenirs que nous avons partagés à l'université. Que puis-je dire, les yeux remplis de larmes de séparation et de nostalgie, souhaitant se revoir. Vous êtes les meilleurs et les plus merveilleux. Vous resterez toujours dans mon cœur...

BENKAHOUL ABDERRAHMEN LOTFI CHOUKRI



Dédicace

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé
le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère
qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et
soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.*

*A mon cher père qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes
études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.*

A mes soeurs et frères

A toute ma famille, proche ou éloignée

A mes amis Djihene et Lotfi, merci pour notre fructueuse coopération et amitié.

Nousseiba





Dédicace

A mes plus grands soutien et sources d'inspiration, je dédie ce travail avec tout mon amour et ma reconnaissance infinis.

A ma mère qui a toujours été mon part d'attachement et ma boussole, merci pour ton amour inconditionnel, ton découvouement et ton soutien inébranlable. Tu as été la lumière qui a éclairé mon chemin dans les moments sombre et tu as toujours cru en moi, meme lorsque je doutais.

A mon père qui m'a appris l'importance du travail acharné, de la persévérance et de l'honnéteté, je suis reconnaissante pour tes conseils avisés et ton soutien sans faille. Tu m'as inspiré à viser plus haut et à poursuivre mes rêves. Je te suis infiniment reconnaissante pour ton soutien indéfectible, ta confiance en moi et ton amour.

A ma grande mère qui fait une partie très importante dans ma vie merci beaucoup pour tout ce que tu as fait pour moi jusqu'à aujourd'hui je t'aime beaucoup.

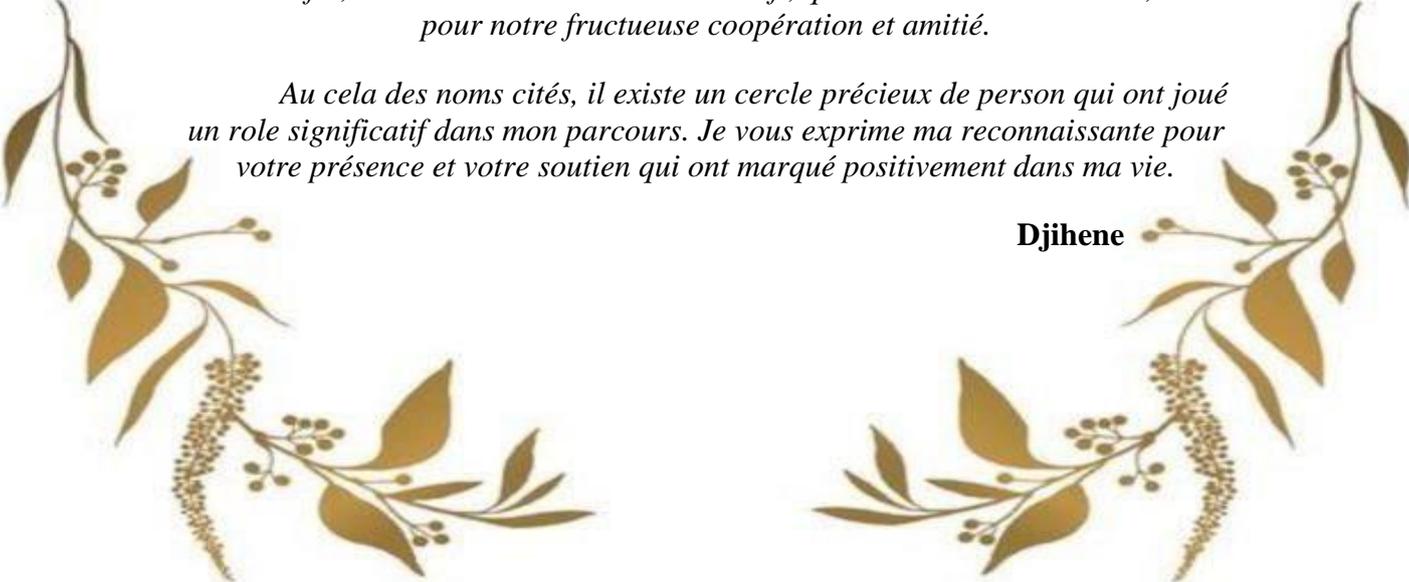
A ma belle sœur et mon frère qui sont aussi mes meilleurs amies, merci pour votre soutien constant, votre humour contagieux et votre présence réconfortante. Vous êtes ma source de joie et de bonheur, et je suis fière de vous avoir dans ma vie.

A mes très chères amies qui ont été mes piliers dans les moments difficiles et mes partenaires de fête dans les moments de joie, merci pour votre amitié s'incère, votre amour incondittionnel.

Enfin, à mes binômes Nousseiba et Lotfi, qui sont devenus mes amis, merci pour notre fructueuse coopération et amitié.

Au cela des noms cités, il existe un cercle précieux de person qui ont joué un role significatif dans mon parcours. Je vous exprime ma reconnaissante pour votre présence et votre soutien qui ont marqué positivement dans ma vie.

Djihene



Résumé

La plante qu'on va étudier dans ce manuscrit appartient au genre d'*Helianthemum* de la famille des Cistaceae. C'est une plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle. Les travaux qu'on va présenter dans ce mémoire ont pour objectif l'étude phytochimie (extraction par ultrasons, screening phytochimique, dosage des flavonoïdes et polyphénols et le test CCM). On va réaliser aussi une étude pharmacologique (activité antioxydante, antibactérienne et antifongique). Les tests de screening phytochimique ont révélé la présence de plusieurs métabolites secondaires dans notre plante tel que : les flavonoïdes, les saponosides, les sucres, les tanins, les alcaloïdes, les terpènes, les stérols et les anthraquinones. La teneur en polyphénols a montré que l'extrait MeOH présente la plus forte concentration en polyphénols avec 282,4 µg EAG/mg de PS. La teneur en flavonoïdes totaux montre également que cet extrait a enregistré la valeur la plus élevée avec 853,01 µg EQ/mg de PS. Les résultats de l'activité antioxydante par le test ABTS ont indiqué que l'extrait MeOH présente l'activité la plus élevée avec une IC₅₀ de 11,42±0,70 µg/ml. L'évaluation de l'activité antibactérienne révèle que l'extrait MeOH a été le plus puissant sur les deux types de souches bactériennes testées : *E. Coli* et *S. aureus* avec une zone d'inhibition de 11 et 12 mm respectivement avec la concentration de 50 mg/ml d'extrait. Les résultats obtenus avec le test antifongique ont révélé une activité considérable des trois extraits de plante contre la souche fongique *fusarium oxysporum*. On distingue que l'extrait MeOH présente toujours l'activité la plus élevée à la concentration de 100 mg/ml avec un taux d'inhibition de 10,52%.

Mots –clés : Cistaceae, *Helianthemum*, les flavonoïdes, activité antioxydante, activité antibactérienne, activité antifongique.

الملخص

ينتمي النبات الذي سنقوم بدراسته في هذه المخطوطة إلى جنس الهليانثيموم من عائلة سيستاسيا. إنه نبات يستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي. يهدف العمل الذي سنقدمه في هذه الرسالة إلى دراسة الكيمياء النباتية (الاستخراج بالموجات فوق الصوتية، والفحص الكيميائي النباتي، وجرعة الفلافونويد والبوليفينول واختبار CCM). سنقوم أيضًا بإجراء دراسة دوائية (نشاط مضاد للأكسدة ومضاد للبكتيريا ومضاد للفطريات). كشفت اختبارات الفحص الكيميائي النباتي عن وجود العديد من المستقلبات الثانوية في نباتنا مثل: الفلافونويد، والصابونوزيدات، والسكريات، والعفص، والقلويدات، والتربينات، والستيروول، والأنثراكينون. أظهر محتوى البوليفينول أن مستخلص MeOH يحتوي على أعلى تركيز من مادة البوليفينول مع 282.4 ميكروغرام EAG / mg PS. يظهر محتوى الفلافونويد الكلي أيضًا أن هذا المستخلص سجل أعلى قيمة بـ 853.01 ميكروغرام EQ / mg PS. أشارت نتائج نشاط مضادات الأكسدة بواسطة اختبار ABTS إلى أن مستخلص MeOH يظهر أعلى فعالية مع تركيز IC بنسبة 0.70 ± 11.42 ميكروغرام / ملو. كشف تقييم النشاط المضاد للبكتيريا أن مستخلص MeOH كان الأقوى على نوعي السلالات البكتيرية المختبرة بكتريا *E. Coli* و *S. aureus* مع منطقة تثبيط 11 و 12 مم على التوالي بتركيز 50 مجم / مل من المستخلص. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها باختبار مضاد الفطريات نشاطًا كبيرًا للمستخلصات النباتية الثلاثة ضد السلالة الفطرية *Fusarium oxysporum*. من المميز أن مستخلص MeOH يقدم دائمًا أعلى نشاط بتركيز 100 مجم / مل مع معدل تثبيط يبلغ 10.52٪.

الكلمات المفتاحية: سيستاسيا، الهليانثيموم، مركبات الفلافونويد، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للجراثيم، نشاط مضاد للفطريات.

Abstract

The plant that we are going to study in this manuscript belongs to the genus of *Helianthemum* of the Cistaceae family. It is a plant widely used in traditional medicine. The work that we will present in this dissertation aims to study phytochemistry (ultrasound extraction, phytochemical screening, dosage of flavonoids and polyphenols and the CCM test). We will also carry out a pharmacological study (antioxidant, antibacterial and antifungal activity). Phytochemical screening tests revealed the presence of several secondary metabolites in our plant such as flavonoids, saponosides, sugars, tannins, alkaloids, terpenes, sterols and anthraquinones. The polyphenol content showed that the MeOH extract has the highest polyphenol concentration with 282.4 µg EAG/mg PS. The total flavonoid content also shows that this extract recorded the highest value with 853.01 µg EQ/mg PS. The results of the antioxidant activity by the ABTS test indicated that the MeOH extract exhibits the highest activity with an IC₅₀ of 11.42±0.70 µg/ml. The evaluation of the antibacterial activity reveals that the MeOH extract was the most potent on the two types of bacterial strains tested: *E. Coli* and *S. aureus* with an inhibition zone of 11 and 12 mm respectively with the concentration of 50 mg/ml of extract. The results obtained with the antifungal test revealed considerable activity of the three plant extracts against the fungal strain *Fusarium oxysporum*. It is distinguished that the MeOH extract always presents the highest activity at the concentration of 100 mg/ml with an inhibition rate of 10.52%.

Keywords: Cistaceae, *Helianthemum*, flavonoids, antioxidant activity, antibacterial activity, antifungal activity.

Table des matières

Introduction générale

Chapitre I Généralités sur la plante et les métabolites secondaires

I.1. Plantes médicinales.....	4
I.2. La phytothérapie.....	4
I.3. La famille des Cistaceae	4
I.3.1. Généralités.....	4
I.3.2. La position systématique	5
I.3.3. Description botanique	6
I.3.4. La répartition géographique.....	6
I.3.5. Propriétés biologiques	7
I.3.6. Utilisations traditionnelles	7
I.3.7. L'étude chimique	8
I.4. Présentation du genre <i>Helianthemum</i>	10
I.4.1. Généralités.....	10
I.4.2. Position systématique	10
I.4.3. Description botanique du genre <i>Helianthemum</i>	11
I.4.4. Répartition géographique	12
I.4.5. <i>Helianthemum</i> en médecine traditionnelle.....	12
I.4.6. Etude chimique antérieurs.....	13
I.4.7. Etude biologique antérieurs.....	14
I.5. Les métabolites secondaires	14
I.5.1. Définition	14
I.5.2. La classification des métabolites secondaires	14
I.5.2.1. Les composés phénoliques	15
I.5.2.1.1 Définition	15
I.5.2.1.2. La structure chimique	15
I.5.2.1.3 La classification des polyphénols	15

Chapitre II Les Activités Biologiques

II.1. Le stress oxydatif	18
--------------------------------	----

II.1.1. Définition	18
II.1.2. Les radicaux libres	18
II .2. Les Antioxydants	19
II.2.1. Les différents systèmes d'antioxydant.....	19
II.3. Activité antibactérienne	23
II.4. Activité antifongique	25

Chapitre III Matériel et Méthodes

III. Matériel Et Méthodes.....	27
III.1. Matériel	27

Chapitre IV Résultats et Discussions

IV.1. Introduction.....	44
IV.2. Rendement de l'extraction	44
IV.3. Description des profils chromatographiques par CCM	45
IV.4. Analyse phytochimique qualitative : Screening phytochimique.....	46
IV.5. Analyse phytochimique quantitative : le dosage des polyphénols totaux et des flavonoides	49
IV.6. Activité antibactérienne	57
IV.7. Activité antifongique.....	61
<i>Conclusion</i>	68
<i>Références Bibliographiques</i>	70

Liste des Figures

Numéro	Titre	Page
Figure 1	Quelques plantes de la famille des Cistaceae	05
Figure 2	Quelques structures chimiques des composés issus du genre de la famille des Cistaceae	09
Figure 3	Quelques espèces du genre Helianthemum.	10
Figure 4	Des photos réelles de la plante qu'on a étudiée du genre Helianthemum	11
Figure 5	Quelques structures chimiques des composés issus du genre Helianthemum	13
Figure 6	Squelette de base des polyphénols	15
Figure 7	Structure d'un flavonoïde	16
Figure 8	Structure d'un acide phénolique	16
Figure 9	Quelques exemples d'antioxydants naturels	18
Figure 10	Présentation de plusieurs sources de la vitamine C	21
Figure 11	Présentation de plusieurs sources de la vitamine E	21
Figure 12	Présentation de différentes sources des polyphénols	22
Figure 13	Présentation de différentes sources des caroténoïdes	23
Figure 14	Photo réelle de la souche <i>E. Coli</i>	24
Figure 15	Photo réelle de la souche <i>S. aureus</i>	24
Figure 16	Photo réelle de la souche <i>F. oxysporum</i>	25
Figure 17	Lieu de la récolte de la plante	28
Figure 18	Les étapes qu'on a effectuées pour l'extraction de la plante	31
Figure 19	Protocole expérimentale phytochimique et pharmacologique de la plante	32
Figure 20	Protocole de la préparation d'acide gallique	35

Figure 21	Protocole de la préparation d'extraits	36
Figure 22	Protocole de la préparation de la quercétine	37
Figure 23	Protocole de la préparation d'extraits	37
Figure 24	Capture du radical $ABTS^{\bullet+}$ par un antioxydant à donneur d'hydrogène	38
Figure 25	Les différentes étapes qu'on a effectuées pour le test de l'activité antibactérienne	42
Figure 26	Les différentes étapes de préparation de l'activité antifongique	42
Figure 27	Rendement calculé des extraits de notre plante.	45
Figure 28	Révélation de la plaque CCM des extraits $CHCl_3$, AcOEt et MeOH sous lampe UV 365 nm.	46
Figure 29	Résultat de la CCM des extraits après révélation par l'anisaldéhyde.	46
Figure 30	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	50
Figure 31	Teneur en polyphénols totaux des trois extraits étudiés	50
Figure 32	Courbe d'étalonnage de la quercétine	51
Figure 33	Teneur en flavonoïdes totaux des trois extraits étudiés	52
Figure 34	La plaque de dosage de l'activité du piégeage du radical cation $ABTS^{\bullet+}$ des trois extraits	54
Figure 35	La plaque de dosage de l'activité du piégeage du radical cation $ABTS^{\bullet+}$ de l'extrait méthanolique	54
Figure36	Les Valeurs des IC_{50} de piégeage du radical $ABTS^{\bullet+}$ des trois extraits avec les standards	55

Figure 37	Effet des extraits sur la souche bactérien <i>E. coli</i> testée en fonction de concentration 50mg/ml	61
Figure 38	Effet des extraits sur la souche bactérien <i>S. aureus</i> testés en fonction de la concentration 50 mg/ml	61
Figure 39	Taux d'inhibition en fonction de la concentration 100 mg/ml des extraits CHCl ₃ , AcOEt et MeOH.	65

Liste des Tableaux

Numéro	Titre	Page
Tableau01	Activités biologiques de différentes espèces de la famille des Cistaceae	7
Tableau02	L'utilisation traditionnelle de certaines espèces de la famille des Cistaceae	8
Tableau03	Les composés chimiques isolés à partir de différents genres de la famille des Cistaceae	9
Tableau04	Quelques composés chimiques issus des espèces du genre Helianthemum	13
Tableau05	Activités biologiques de différentes espèces du genre Helianthemum	14
Tableau06	La composition et la quantité nécessaire de réactifs (ABTS)	38
Tableau07	La composition et la quantité nécessaire de réactifs (BHA, BHT)	39
Tableau08	Les résultats de rendement des extraits qu'on a obtenu par extraction aux ultrasons	45
Tableau09	Les résultats obtenus du screening phytochimique de la plante des Cistaceae	49
Tableau10	Les résultats obtenus du screening phytochimique de la plante des Cistaceae (la suite du tableau 9)	50
Tableau11	Analyse de % d'Inhibition de l'ABTS	55
Tableau12	Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits sur la souche <i>E. coli</i> .	57
Tableau13	Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits sur la souche <i>E. coli</i> (la suite)	58
Tableau14	Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits sur la souche <i>S. aureus</i> .	59
Tableau15	Résultats de l'activité antifongique des trois extraits de plante	63
Tableau16	Résultats de l'activité antifongique des extraits (la suite)	64

Liste des abréviations

% PI : Le pourcentage d'inhibition.

µl /ml : Microlitres par millilitres.

ABTS : Acide 2, 2'-azinobis 3-ethylbenzo-triazoline-6-sulphonate.

AC : Absorbance du contrôle.

AcOEt : Acétate d'éthyle.

AlCl₃ : Trichloride d'aluminium.

APG IV : Angiosperm Phylogeny Group.

AT : Absorbance du test effectué.

BHA : Bêta Hydroxy Acide (Acide Salicylique).

BHT : Butylated Hydroxytoluene.

C : Concentration.

C₁₅H₁₀O₇ : Quercétine d'hydraté.

C₇H₅O₆ : Acide Gallique.

CCM : Chromatographie sur Couche Mince.

CHCl₃ : Chloroforme.

CRBT : Centre de Recherche de Biotechnologie, Université 2 Abdelhamid Mehri.

Cu, Zn-SOD : Les superoxydes dismutases intracellulaires de cuivre et de zinc.

CuSO₄ : Sulfate de cuivre

DMSO : Solution de diméthyle sulfoxyde

DROs : Espèces réactives de l'oxygène.***E.coli*** : *Escherichia coli*.

ERA : Espèces réactives de l'azote.

ERO : Espèces réactives de l'oxygène.

F. oxysporum : *Fusarium oxysporum*.

FCR: Folin-Ciocalteu.

FeCl: Ferric chloride.

H : Helianthemum.

H₂O : L'eau oxygénée.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

H₂SO₄ : L'acide sulfurique.

H₃PMo₁₂O₄₀ : L'acide phosphomolybdique.

H₃PW₁₂O₄₀ : L'acide phosphotungstique.

HCl : L'acide chlorhydrique.

HO· : Radicaux hydroxyles.

HOCL : L'acide hypochloreux.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice 50.

K₂S₂O₈ : Le persulfate de potassium.

Le spectre UV : La spectrophotométrie Ultra-violet-visible.

MeOH : Méthanol.

Mg/ml : Microgramme par millilitres.

Mn-SOD : Les superoxydes dismutases manganèse.

NaCO₃ : Le bicarbonate de sodium.

NaOH : L'hydroxyde de sodium.

NO : L'oxyde nitrique.

O₂ : L'oxygène singulet.

O₂^{•-} : Le superoxyde.

ONOO⁻ : Peroxynitrite.

PDA : La gélose dextrosée à la pomme de terre.

PH : Potentiel hydrogène.

RO₂[•] : Réactivité de radicaux libres peroxydes.

ROS : Espèces réactives de l'oxygène.

S. aureus : *Staphylococcus aureus*.

SOD : Les superoxydes dismutases.

USA : United States of America.

V/V : Volume/Volume.

Introduction

générale

Depuis l'antiquité, les plantes médicinales ont été utilisées pour soulager et guérir les maladies humaines. En réalité, leur capacité thérapeutique provient des composés naturels bioactifs présents dans ces plantes, connus sous le nom de "métabolites secondaires". Ces métabolites sont ensuite accumulés dans divers organes de la plante, parfois même dans des cellules spécialisées. [1].

Les plantes renferment une grande diversité de substances biologiquement actives qui ont un impact significatif sur la santé humaine. Elles peuvent offrir une gamme variée de propriétés, à la fois médicinales pour certaines affections cutanées et protectrices pour la peau, notamment grâce à leurs effets antioxydants, antimicrobiens et antifongique.

L'Algérie possède une richesse de plantes médicinales qui sont utilisées dans différents domaines tels que la médecine, la pharmacie, la cosmétique et l'agroalimentaire, en raison de leurs propriétés thérapeutiques. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la recherche sur les plantes médicinales, et notre choix se porte sur notre plante qui appartient à la famille des Cistaceae. Cette plante est largement utilisée dans la médecine traditionnelle pour traiter les maladies respiratoires, les affections de la peau, les infections des voies urinaires et les douleurs menstruelles, etc. Diverses études biologiques sur cette plante ont montré qu'elle possède une activité antioxydante et antibactérienne remarquable.

Jusqu'à récemment et même aujourd'hui, des remèdes traditionnels à base de plantes ont été utilisés sans connaître les raisons de leurs bienfaits. En effet, il est encore difficile d'identifier les molécules responsables de ces effets bénéfiques, bien que certaines études sur des animaux aient attribué certains effets pharmacologiques à des composés tels que les alcaloïdes et leurs dérivés, les terpènes, les stéroïdes et les composés polyphénoliques [2].

Les composés phytochimiques d'intérêt thérapeutique peuvent être dérivés de nombreuses parties des plantes telles que l'écorce, les feuilles, les fleurs, les racines, les grains, etc. avec une teneur différente. Ces composés biologiquement actifs peuvent être isolés des plantes par des méthodes traditionnelles, à savoir la macération, la décoction, l'infusion etc. ils peuvent également isolés par des techniques modernes physicochimiques et biologiques [3].

Notre étude se concentre sur l'analyse phytochimique de notre plante et l'évaluation de son activité biologique tel que l'activité antioxydante, antibactérienne et antifongique.

Ce manuscrit est divisé en deux parties :

La première partie : c'est la partie théorique qui se compose de deux chapitres :

- Le premier chapitre renferme la présentation de la famille des Cistaceae, présentation du genre *Helianthemum* et les métabolites secondaires.
- Le second chapitre apporte les activités biologiques telles que l'activité antioxydante, l'activité antibactérienne et l'activité antifongique.

La deuxième partie : Est la partie expérimentale qui se divise en deux chapitres :

- Le premier chapitre de ce travail se concentre sur les matériaux et les méthodes utilisés. Il aborde spécifiquement l'étude phytochimique des extraits provenant de notre plante. Cette étude met l'accent sur la quantification les composés phénoliques et flavonoïdes, ainsi que sur l'évaluation de leur activité antioxydante, antibactérienne et antifongique.
- Le deuxième chapitre consiste à une discussion détaillée des résultats obtenus. Les résultats de l'étude phytochimique ainsi que l'évaluation de l'activité biologique seront analysés et interprétés. Les implications des résultats seront discutées en relation avec la littérature existante et les objectifs de l'étude. Des éclaircissements supplémentaires, des comparaisons et des interprétations des données seront abordés dans ce chapitre. Et nous terminerons ce travail par une conclusion générale.

Chapitre I

*Généralités sur la plante et
les métabolites secondaires*

I.1. Plantes médicinales

Depuis des millénaires, les plantes médicinales sont utilisées à travers le monde pour leurs propriétés thérapeutiques. Elles renferment une diversité de composés chimiques actifs tels que des alcaloïdes, des flavonoïdes et des terpénoïdes, qui leur confèrent des vertus curatives bénéfiques pour la santé humaine. Depuis l'Antiquité, ces connaissances sur les plantes médicinales se sont transmises de génération en génération, constituant ainsi les fondements des systèmes de médecine traditionnelle [4].

I.2. La phytothérapie

La phytothérapie est une forme de médecine traditionnelle qui se concentre sur l'utilisation thérapeutique des plantes médicinales pour prévenir et traiter diverses affections. Elle repose sur l'utilisation des extraits de plantes, tels que les feuilles, les fleurs, les racines ou les écorces, pour leurs propriétés curatives. [5].

I.3. La famille des Cistaceae

I.3.1. Généralités

Les Cistaceae comprennent environ 170 espèces de plantes réparties en 8 genres (Cistus, Halimium, Fumana, Tuberaria, Helianthemum, Lechea, Hudsonia et Crocanthemum) [6]. Les membres de cette famille sont principalement des plantes herbacées ou des arbustes à feuilles persistantes [7]. Elles sont largement distribuées dans les régions tempérées et subtropicales du monde entier, mais elles sont particulièrement abondantes dans la région méditerranéenne [8]. Les Cistaceae ont des fleurs solitaires, actinomorphes et hermaphrodites, avec cinq sépales, cinq pétales et de nombreuses étamines [9]. Elles ont une grande importance écologique en raison de leur rôle dans la stabilisation du sol, la rétention d'eau et la conservation de la biodiversité [10].



Cistus ladanifer [11] *Helianthemum nummularium* [12] *fumana ericoides* [13]

Figure 1 : Quelques plantes de la famille des Cistaceae

I.3.2. La position systématique

Selon le système de classification APG IV (Angiosperm Phylogeny Group), la famille des Cistaceae est classée dans l'ordre des Malvales, sous-classe des Rosidae, super-ordre des Rosanae, clade des fabidées, et clade des eurosides [14]. L'analyse phylogénétique moléculaire confirme la position des Cistaceae au sein des Malvales [15]. Cette famille est également étroitement apparentée aux autres familles de Malvales, telles que les Malvaceae, les Bombacaceae, les Sterculiaceae et les Tiliaceae [16]. En outre, une étude récente a révélé que la famille des Cistaceae se divise en deux sous-familles, les Cistaceae et les Helianthematoideae [17].

- **Règne :** Plantae (plantes)
- **Sous-règne :** Tracheobionta (plantes vasculaires)
- **Division :** Magnoliophyta (plantes à fleurs)
- **Classe :** Magnoliopsida (dicotylédones)
- **Sous-classe :** Rosidae
- **Ordre :** Malvales
- **Famille :** Cistaceae
- **Sous-familles :** Cistoidae / Dircaeioideae
- **Genres :** Cistus / Fumana / Halimium / Helianthemum / Hudsonia / Lechea / Tuberaria / Xeranthemum [18].

I.3.3. Description botanique

La famille des Cistaceae est une famille de plantes à fleurs qui comprend environ 170 espèces réparties en 8 genres différents. Les membres de cette famille sont caractérisés par des feuilles alternes simples et entières, ainsi que des fleurs à symétrie radiale avec des pétales froissés ou ridés. Les Cistaceae sont également connues pour leur capacité à résister à des conditions environnementales difficiles telles que la sécheresse, les températures élevées et les sols pauvres [19].

Les Cistaceae sont des plantes ligneuses, généralement des arbustes ou des sous-arbrisseaux, rarement des plantes herbacées [20]. Les feuilles sont simples, alternes, souvent sessiles et entières. Elles peuvent être couvertes de poils glandulaires [21]. Les fleurs sont solitaires ou groupées en cymes, souvent grandes et vistuleuses. Elles ont généralement 5 sépales, 5 pétales et de nombreuses étamines. Les anthères sont souvent basifixes. Les fruits sont des capsules ou des siliques [22].

Les plantes de cette famille sont largement répandus dans les régions tempérées et subtropicales du monde, avec une grande diversité en Europe et en Amérique du Nord. Certaines espèces sont adaptées à des environnements arides et peuvent tolérer des sols pauvres en nutriments [23].

Les Cistaceae ont des utilisations diverses, comme plantes ornementales, plantes médicinales ou comme source de tanins [24].

I.3.4. La répartition géographique

La famille des Cistaceae est répartie dans les régions tempérées et subtropicales du monde, avec une concentration particulière dans le bassin méditerranéen et l'Afrique du Sud [25].

Les genres *Cistus* et *Halimium* sont principalement représentés en Europe, avec environ 25 espèces chacun. [26]. Le genre *Fumana* est également présent en Europe, avec environ 15 espèces, mais aussi en Afrique du Nord et au Moyen-Orient. [27]. Le genre *Helianthemum* est largement répandu dans les régions tempérées et subtropicales du monde, avec environ 110 espèces. Les espèces les plus communes sont présentes en Europe et en Amérique du Nord. [28]. Le genre *Hudsonia* est endémique d'Amérique du Nord, avec seulement 2 espèces. [29]. Le genre *Lechea* est également endémique

d'Amérique du Nord, avec environ 25 espèces. [30]. Le genre *Tuberaria* est principalement présent en Europe, avec environ 10 espèces. [31]. Le genre *Xolantha* est endémique d'Amérique du Sud, avec seulement 1 espèce. [32].

I.3.5. Propriétés biologiques

Les plantes de la famille des Cistaceae ont des propriétés médicinales bien établies dans la médecine traditionnelle de nombreuses cultures. Elles ont été utilisées pour traiter diverses affections, notamment les infections respiratoires, les troubles gastro-intestinaux, les douleurs menstruelles, les plaies et les troubles cutanés. (Voir le Tableau 1) [33].

Tableau 1 : Activités biologiques de différentes espèces de la famille des Cistaceae

Espèces	Activités biologiques	Partie de la plante étudiée	Références bibliographiques
Cistus Ladanifer	Activité antioxydante	Feuilles	[34]
Cistus Monspeliensis	Activité anti inflammatoire	Feuilles	[35]
Cistus Salviifolius	Activité antioxydante	Feuilles	[36]
Fumana Thymifolia	Activité antimicrobienne	Parties aériennes	[37]
Halimium Halimifolium	Activité anti tumorale	Parties aériennes	[38]
Helianthemum Kahiricum	Activité anti inflammatoire	Parties aériennes	[39]

I.3.6. Utilisations traditionnelles

Les plantes de la famille des Cistaceae ont été utilisées traditionnellement pour leurs propriétés médicinales, notamment pour traiter les infections respiratoires, les douleurs menstruelles, les troubles gastro-intestinaux et les problèmes de peau. Certaines espèces ont également été utilisées comme colorants pour les textiles et les aliments. En outre, certaines espèces des Cistaceae ont été utilisées comme nourriture, notamment dans les régions méditerranéennes, où les fleurs et les feuilles de certaines espèces sont utilisées pour préparer des boissons et des infusions [40]. Voici quelques exemples d'utilisations traditionnelles des Cistaceae : (Voir le Tableau 2)

Tableau 2 : L'utilisation traditionnelle de certaines espèces de la famille des Cistaceae

Nom de la plante	Utilisations traditionnelles
<i>Cistus Monspeliensis</i>	Traitement des maladies respiratoires telles que la toux et l'asthme. Elle a également été utilisée pour traiter les ulcères et les plaies [41].
<i>Cistus Salviifolius</i>	Traitement des affections de la peau telles que les brûlures et les éruptions cutanées. Elle a également été utilisée comme diurétique et pour soulager les douleurs menstruelles [42].
<i>Cistus Villosus</i>	Traitement des infections des voies urinaires et les douleurs menstruelles. Elle a également été utilisée comme diurétique et pour stimuler le système immunitaire [43].

I.3.7. L'étude chimique

L'étude chimique de la famille des Cistaceae a révélé la présence d'un large éventail de composés bioactifs intéressants trouvés dans diverses parties de la plante, y compris les feuilles, les fleurs et les racines. [44]. Cette étude a également montré que les composés bioactifs trouvés dans les plantes des Cistaceae ont de nombreuses propriétés bénéfiques pour la santé humaine, notamment des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et anticancéreuses [45]. La famille des Cistaceae est connue pour sa richesse en composés bioactifs. Les études chimiques ont montré que cette famille de plantes contient une variété de composés, notamment des acides phénoliques, des flavonoïdes, des terpènes et des iridoïdes. [46].

- **Les acides phénoliques** : Cette famille de composés est courante dans la famille des Cistaceae et présente des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses. [47].
- **Les flavonoïdes** : Ces composés sont largement répandus dans cette famille, ils ont des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancéreuses et antivirales. [48].
- **Les terpènes** : Cette catégorie de métabolites secondaires est également est riche en propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. [49].
- **Les iridoïdes** : Ces composés sont moins fréquents dans la famille des Cistaceae, mais présentent des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antivirales. (**Voir le Tableau 3**) [50].

Tableau 3 : Les composés chimiques isolés à partir de différents genres de la famille des Cistaceae.

Genres	Composés Chimiques isolés	Partie de la Plante Étudiée	Référence Bibliographique
Cistus	Quercétine (1) Kaempférol (2) Myricétine (3)	Feuilles, Fleurs	[51]
Halimium	Kaempférol (2) Quercétine (1)	Feuilles, Fleurs	[52]
Tuberaria	Apigénine (4) Kaempférol (2) Quercétine (1)	Feuilles, Fleurs	[53]
Fumana	Apigénine (4) Quercétine (2)	Parties Aériennes	[54]
.Helianthemum	Kaempférol (2) Quercétine (1)	Feuilles, Fleurs	[55]

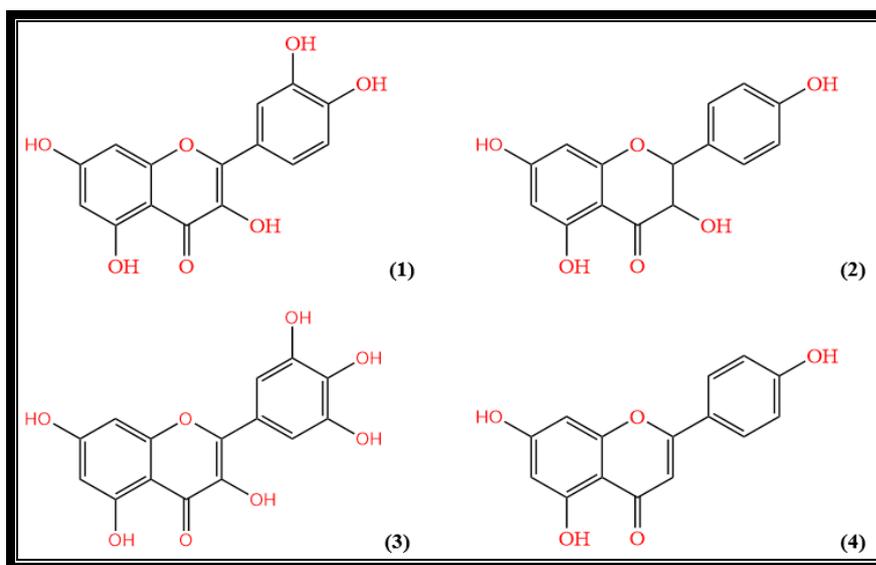


Figure 2 : Quelques structures chimiques des composés issus de plusieurs genres appartenant à la famille des Cistaceae

I.4. Présentation du genre *Helianthemum*

I.4.1. Généralités

Le genre *Helianthemum* est une lignée monophylétique avec environ 136 espèces et sous-espèces caractérisées par une taxonomie complexe et une remarquable diversité d'histoire de vie et de traits fonctionnels [56]. Originaire du Miocène, le genre s'est diversifié au cours du Pliocène et du Pléistocène donnant naissance à trois grandes lignées rayonnantes, l'une diversifiée à travers les régions saharo-arabe et irano-touranienne (sect. *Eriocarpum*), les deux autres diversifiées autour du bassin méditerranéen et de l'euro sibérien [57].

Au sein de ces lignées, il est remarquable qu'actuellement la plupart des espèces ont des aires de répartition restreintes ou sont endémiques à de très petites régions, alors que seules certaines espèces ont de grandes aires de répartition géographique (par exemple, *H. apenninum*, *H. cinereum*, *H. kahiricum*, *H. ledifolium*, *H. lippii*, *H. nummularium*, *H. oelandicum*, *H. salicifolium* ou *H. stipulatum*) [58].



H. salicifolium [59].

H. apenninum [60].

H. lippii [61].

Figure 3 : Quelques espèces du genre *Helianthemum*

I.4.2. Position systématique

Ce genre est limité à l'Ancien Monde, se compose d'environ 136 espèces et sous-espèces trouvées du Cap Verde à l'Asie centrale dans une variété d'habitats (xérophytes, méditerranéen, tempéré, alpin) qui montrent une vie remarquable histoire et diversité des traits fonctionnels. Il comprend des thérophytes et des plantes ligneuses-fruticuleuses et suffruticeuses dont l'élévation et les systèmes d'accouplement varient de la cléistogamie à l'auto-incompatibilité avec différents niveaux d'allofécondation [62].

Il est également à noter que seules certaines espèces d'*Helianthemum* ont de grandes aires de répartition géographique (par exemple, *H. apenninum* Mill., *H. cinereum* Pers., *H. kahiricum* Delile, *H. ledifolium* (L.) Mill., *H. lippii* (L.) Dum.Cours., *H. nummularium* Mill., *H. oelandicum* (L.) DC., *H. salicifolium* (L.) Mill., ou *H. stipulatum* C. Chr.) Alors que la plupart ont des aires de répartition restreintes ou sont endémiques à de très petites régions [63].

Bien que la division taxonomique des espèces soumises à des discussions systématiques telles que *H. apenninum*, *H. nummularium*, *H. marifolium*, *H. cinereum* ou *H. oelandicum* en espèces et sous-espèces ait été largement critiquée parce que les caractères diagnostiques ne sont pas stables mais corrélée aux conditions écologiques dans la plupart des cas [64].

- **Classification du genre *Helianthemum***

- **Règne** : Plantae
- **Embranchement** : Tracheophyta ; Magnoliophyta
- **Classe** : Magnoliopsida
- **Ordre** : Malvales ; Violales
- **Famille** : Cistaceae
- **Genre** : *Helianthemum*

I.4.3. Description botanique du genre *Helianthemum*

L'*Helianthemum* est un genre appartenant à la famille des Cistaceae qui contient plus de 110 espèces qui se répartissent en majorité dans le bassin méditerranéen, encore assez bien représenté dans le Sahara septentrional. Les *Helianthemum* sont des arbustes souvent très petits, à feuilles opposées ou rarement alternes à fleurs jaunes ou jaunâtre portant 5 sépales dont deux plus petits, un ovaire formé de 3 carpelles soudés et coiffé d'un style unique coudé [65].



Figure 4 : Des photos réelles de la plante qu'on a étudiée du genre *Helianthemum*.

I .4.4. Répartition géographique

Le genre *Helianthemum* (Cistaceae) constitue un excellent modèle biologique pour étudier l'impact des changements géo climatiques et des changements de niche environnementale sur les origines de la diversité des espèces dans les lignées végétales méditerranéennes.

Helianthemum est une lignée monophylétique paléarctique, principalement réparties dans le bassin méditerranéen, mais avec plusieurs espèces réparties dans des zones adjacentes non méditerranéennes telles que la Macaronésie, l'Europe centrale et septentrionale, la Corne de l'Afrique et l'Asie centrale.

Remarquablement, les espèces d'*Helianthemum* prospèrent dans des conditions environnementales assez disparates, des broussailles arides et semi-arides à la végétation subalpine sur une variété de substrats rocheux tels que le calcaire, la dolomite, le schiste, le gypse, les sols salins, volcaniques et sablonneux [66].

Phylogénétiquement, chaque espèce d'*Helianthemum* appartient à l'un des trois principaux clades constituant le genre, qui correspondent principalement à ses trois plus grandes sections taxonomiques *Eriocarpum*, *Pseudocistus* et *Helianthemum*. De plus, chacune de ces sections représente une évolution [67].

I .4.5. *Helianthemum* en médecine traditionnelle

Les taxons d'*Helianthemum* ont été traditionnellement utilisés comme remède naturel dans la médecine populaire par les habitants d'Espagne et des Amériques. Les

taxons sont des sous-arbustes à feuilles persistantes ou semi-persistantes qui sont largement distribués dans les régions tempérées et subtropicales de l'hémisphère nord, avec le centre de diversité dans la région méditerranéenne.

Les feuilles et les fleurs de différents taxons d'*Helianthemum* sont traditionnellement utilisées comme remèdes anti-inflammatoires, antiulcérogènes, cicatrisants, antiparasitaires, antimicrobiens, analgésiques, cytotoxiques et vasodilatateurs [68].

Ces plantes sont ingérées sous forme de décoctions et de tisanes pour les problèmes gastro-intestinaux. Ils sont également transformés en cataplasmes et pommades et appliqués directement sur les plaies infectées ou les brûlures [69].

I.4.6. Etude chimique antérieurs

Dans cette partie on va analyser la composition chimique de quelques espèces du genre *Hélianthemum* (**Tableau 4**)

Tableau 4 : Quelques composés chimiques issus des espèces du genre *Helianthemum*

Espèces	Nom des composés	Référence
<i>H. glomeratum</i> ,	Quercétine (1) Kaempférol (2)	[70]
<i>H. alypoides</i> , <i>H. hirtum</i> , <i>H. asperum</i>	Acide gallique (5)	[71]
<i>H. alypoides</i>	Les éllagitanins	[72]
<i>H. italicum</i> , <i>H. kahiricum</i> et <i>H. lippii</i>	Carvacrol (6) Thymol	[73-74]
<i>H. sessiliflorum</i>	Alpha-pinène (7)	[75]
<i>H. nummularium</i> subsp. <i>grandiflorum</i>	Le bêta-caryophyllène L'alpha-humulène	[75]

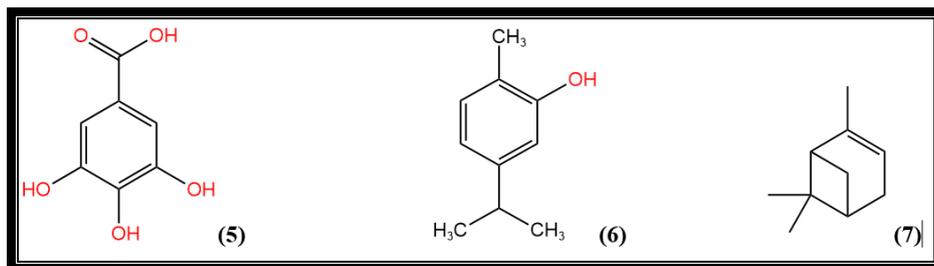


Figure 5 : Quelques structures chimiques des composés issus du genre *Helianthemum*

I .4.7. Etude biologique antérieurs

Cette étude a porté sur l'évaluation de l'activité biologique de quelques espèces du genre Hélianthemum (**Tableau 5**)

Tableau 5 : Activités biologiques de différentes espèces du genre Helianthemum

Espèces	Activités biologiques	Références
<i>H. virgatum</i>	Analgésique	[76]
<i>H. alypoides</i>	Phyto-inhibitrice	[77]
<i>H. syriacum</i>	Antioxydante	[78-79]
<i>H. hirtum</i>	Antimicrobienne	[78-79]
<i>H. glomeratum</i>	Anti-protazoaire Antibactérienne Anti-giardiale	[78-79]
<i>H. kahiricum</i> <i>H. sessiliflorum</i> <i>H. nummularium</i> <i>H. lippii</i>	Antioxydante Antimicrobienne Antiparasitaire	[74]

I .5. Les métabolites secondaires

I .5. 1. Définition

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes. Exercent cependant une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement [80]. Ils assurent des fonctions clés dans la résistance aux contraintes biotiques (phytopathogènes, herbivores, etc.) et abiotiques (UV, température...etc.). Environ un tiers des médicaments actuellement sur le marché contiennent au moins une matière végétale [81]. D'un point de vue agronomique, le rôle de ces composés dans la protection des cultures est connu (résistance aux maladies fongiques, aux infections bactériennes, à certains insecte) [82].

I .5. 2. La classification des métabolites secondaires

Il existe actuellement plus de 100000 métabolites secondaires identifiés, Ils appartiennent à trois grandes familles : les polyphénols (acides phénoliques, flavonoïdes, anthocyanidines, tanins, quinones), les terpènes et les alcaloïdes [83].

I .5. 2.1. Les composés phénoliques

I .5.2.1.1 Définition

Les polyphénols sont des composés phytochimiques largement répandus dans les plantes, qui sont caractérisés par la présence de plusieurs groupes phénoliques dans leur structure. (10). Ces composés sont présents dans toutes les parties de la plante, mais avec une distribution quantitative différente entre les différents tissus. Ils ont été étudiés pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancéreuses, neuroprotectrices, cardio-protectrices [84].

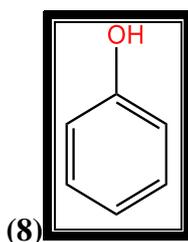


Figure 6 : squelette de base des polyphénols

I .5.2.1.2. La structure chimique

On désigne un vaste ensemble de substances qui possèdent un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles. Plusieurs milliers d'entre eux ont été décrits et caractérisés chez les végétaux grâce aux progrès des techniques d'analyse.

Ils peuvent être regroupés en plusieurs classes ; elles se présentent sous formes solubles ainsi que des formes plus ou moins solubles (tannins). Par contre, les formes insolubles (lignines et à des macromolécules glucidiques) [85].

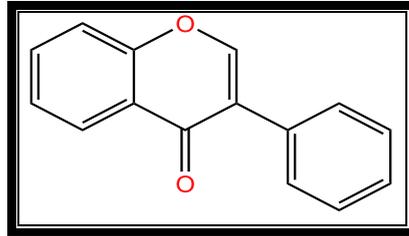
I .5.2.1.3 La classification des polyphénols

Le terme couvre un groupe très vaste de composants chimiques. Ces composés peuvent être classés de plusieurs façons. Harborne et Simmonds par exemple, ont classé ces composés selon le nombre d'atomes de carbone [86]. Les principales classes de composants phénoliques sont : les acides phénoliques, les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines [86].

- **Les Flavonoïdes**

C'est le plus grand groupe de phénols végétaux, ce sont des composés de faible poids moléculaire liés généralement aux molécules de sucre. Les flavonoïdes sont

regroupés en anthocyanes et anthoxanthines. Les anthocyanes sont des molécules de pigment rouge, bleu et violet, par contre les anthoxanthines qui comprennent les flavonols, les flavones, les flavanols et les isoflavones, sont des molécules incolores ou blanches à jaunes [87].

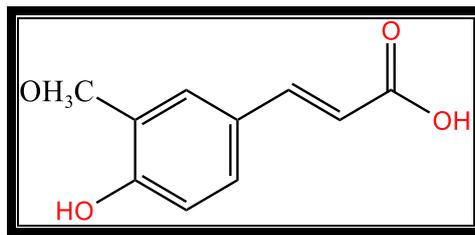


(9)

Figure 7 : Structure d'un flavonoïde

• Acides phénoliques

Les acides phénoliques (10) comprennent les acides hydroxy benzoïque et hydroxy cinnamique.



(10)

Figure 8 : Structure d'un acide phénolique.

Chapitre II

Les Activités Biologiques

II.1. Le stress oxydatif

II.1.1. Définition

Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les capacités de défense antioxydante de l'organisme. Produits de façon continue et élevée, les ERO sont à l'origine d'un stress oxydant avec modifications irréversibles de lipides, de protéines et d'acides nucléiques. Le stress oxydant a été incriminé dans le vieillissement et la physiopathologie de nombreuses maladies, comme le cancer avec un défaut d'élimination de cellules cancéreuses, les maladies cardiovasculaires avec une atteinte de la paroi des vaisseaux sanguins, et les maladies inflammatoires car les ERO sont des acteurs essentiels dans la défense non liée aux anticorps. Pour se protéger du stress oxydant, les organismes ont développé un arsenal d'antioxydants, avec des enzymes (superoxyde-dismutase, catalase et glutathion-peroxydase), des vitamines (A, E et C) ainsi que certaines molécules dont ce n'est pas la fonction principale (acide urique, bilirubine et mélatonine) [88].



Figure 9 : Quelques exemples d'antioxydants naturels [89], [90].

II.1.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des agents oxydants avec un ou plusieurs électrons non appariés dans la coque la plus externe, ce qui les rend très réactifs et instables vis-à-vis des substrats biologiques. Elles peuvent être classées en deux catégories : les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces réactives de l'azote (ERA). Les ROS sont les radicaux libres les plus courants dans le corps. [91].

Actuellement, les radicaux libres les plus courants comprennent des types tels que les radicaux hydroxyles (HO^{\bullet}), le superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et l'oxyde nitrique (NO) ainsi que d'autres

molécules non radicalaires, si aucune paire d'électrons supplémentaires n'est présente, qui peuvent conduire à la formation de radicaux libres. C'est le cas par exemple du peroxyde d'azote (ONOO^-), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de l'acide hypochloreux (HOCl) et de l'oxygène singulet (O_2). [92]

II .2. Les Antioxydants

L'activité antioxydante se réfère à la capacité d'une substance à neutraliser ou à réduire les dommages causés par les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène dans l'organisme. Les antioxydants agissent en protégeant les cellules contre le stress oxydatif, qui est associé à diverses maladies et au processus de vieillissement. [93]

II.2.1. Les différents systèmes d'antioxydant

Le système antioxydant est réparti en deux groupes exogène et endogène ce dernier lui-même est divisé en deux groupes enzymatiques et non-enzymatique

II.2.1.1. Système antioxydant endogène enzymatique

➤ Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloprotéines responsables de la dismutation spontanée du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène [94]. Elles sont de trois types :

- Une SOD intracellulaire de cuivre et de zinc (Cu, Zn-SOD), localisée dans le cytoplasme et dans l'espace inter membranaire mitochondrial ; Il exerce une action antioxydante importante dans l'espace inter membranaire mitochondrial [94].
- Une autre SOD à cuivre et à zinc est extracellulaire principalement dans la matrice extracellulaire des tissus et à un degré moindre dans les liquides extracellulaires des tissus (plasma, lymphe) [94].
- Une SOD à manganèse (Mn-SOD) qui est située à la fois dans la matrice et au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. [94]

➤ La catalase

La catalase est une enzyme hémérique composée de quatre chaînes polypeptidiques. Son site catalytique permet d'éliminer le peroxyde d'hydrogène, présent en fortes concentrations. Son activité est particulièrement abondante dans les globules rouges, le foie et les reins. [94]

➤ La glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase est une enzyme dépendante du sélénium qui a une forte affinité pour le peroxyde d'hydrogène ; elle permet donc l'élimination du peroxyde d'hydrogène. [94]

II.2.1.2. Le système antioxydant endogène non enzymatique

Ils existent de nombreux agents réducteurs endogènes impliqués dans la défense de l'organisme contre les DROs (Les espèces réactives de l'oxygène), les plus importants étant le glutathion, la bilirubine, l'acide urique, le coenzyme Q, les œstrogènes, la mélanine, la mélatonine et l'acide lipoïque. [95]

➤ Le Glutathion

Le glutathion est un tri peptide composé de trois acides aminés qui agit comme un antioxydant en neutralisant les radicaux libres et en régénérant d'autres antioxydants tels que la vitamine C et la vitamine E. [96]

Les niveaux de glutathion peuvent être réduits en raison de divers facteurs, tels que le vieillissement, le stress oxydatif, l'exposition à des toxines environnementales et les maladies chroniques. [97]

➤ L'acide urique

Présent sous forme urate à pH physiologique, possède des propriétés antioxydantes in vitro contre les HO[•] et RO₂[•] tout comme la bilirubine, les mélanines et la mélatonine. [98]

II.2.1.3. Le système antioxydant exogène non enzymatique

Les antioxydants chimiques exogènes, comprennent principalement les vitamines C et E, les caroténoïdes et des composés phénoliques. [99]

➤ La vitamine C

La vitamine C agit comme un donneur d'électrons, réduisant ainsi les radicaux libres et les transformant en formes moins réactives [100]. La vitamine C peut régénérer d'autres antioxydants tels que la vitamine E et le glutathion [101]. Une analyse publiée dans le British Journal of Nutrition a suggéré que la supplémentation en vitamine C peut réduire les niveaux de marqueurs de stress oxydatif dans le sang. [102]



Figure 10 : Présentation de plusieurs sources de la vitamine C [103].

➤ La vitamine E

La vitamine E est un antioxydant liposoluble qui protège les membranes cellulaires contre les dommages oxydatifs en piégeant les radicaux libres lipidiques [104]. La vitamine E peut également régénérer d'autres antioxydants tels que la vitamine C et le glutathion [105]. La carence en vitamine E peut causer des dommages oxydatifs aux membranes cellulaires et conduire à des maladies telles que la neuropathie, l'anémie et la myopathie. [106]



Figure 11 : Présentation de plusieurs sources de la vitamine E [107]

➤ Les polyphénols

Les polyphénols sont des composés phytochimiques présents dans une variété de plantes, qui agissent comme des antioxydants en neutralisant les radicaux libres et en protégeant les cellules contre les dommages oxydatifs [108]. Ils sont capables de se lier aux métaux lourds et aux toxines environnementales, ce qui peut aider à réduire leur absorption dans le corps [109]. Les polyphénols ont également des effets anti-inflammatoires et peuvent aider à réduire le risque de maladies inflammatoires chroniques telles que les maladies cardiovasculaires et le cancer [110]. Des études ont montré que ce type de métabolite secondaire peut améliorer la fonction endothéliale, qui est essentielle pour la santé cardiovasculaire, et peut également aider à réduire la pression artérielle [111]. Les sources alimentaires des polyphénols comprennent les fruits, les légumes, les herbes et les épices, ainsi que les boissons comme le thé, le café et le vin rouge. [112]

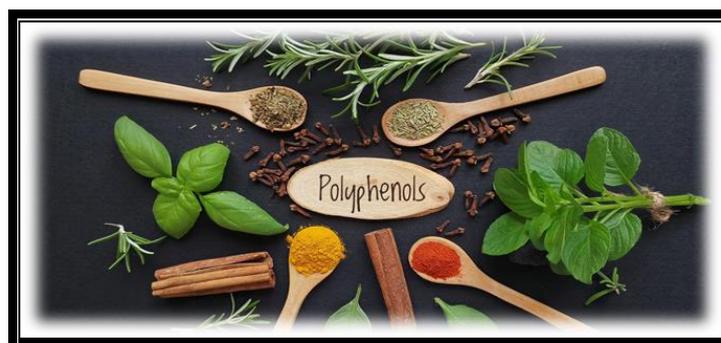


Figure 12 : Présentation de différentes sources des polyphénols [113]

➤ Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments naturels présents dans une variété de plantes, qui agissent comme des antioxydants en neutralisant les radicaux libres et en protégeant les cellules contre les dommages oxydatifs. [114]. Elles ont des effets bénéfiques sur la santé oculaire, en particulier la lutéine et la zéaxanthine, qui sont présentes dans la rétine de l'œil et aident à protéger contre les dommages causés par la lumière bleue [115]. Les caroténoïdes ont également des effets bénéfiques sur la santé cardiovasculaire, en particulier le bêta-carotène, qui peut aider à réduire le risque de maladies cardiovasculaires. [116]. On peut les trouver dans les fruits et les légumes de couleur vive, tels que les carottes, les épinards, les patates douces, les poivrons rouges, les mangues et les melons [117]. Les caroténoïdes doivent être consommés avec des graisses alimentaires pour être absorbés efficacement par le corps. [118]



Figure 13 : Présentation de différentes sources des caroténoïdes [119]

II.3. Activité antibactérienne

II.3.1. Définition

Désigne toute substance utilisée pour détruire les micro-organismes ou empêcher leur croissance, y compris les agents antibactériens. Ces agents : les antibiotiques sont utilisés depuis des décennies pour traiter les maladies infectieuses et prévenir l'infection.

Le mode d'action de ces agents contre les bactéries peut être : Bactériostatique, lorsqu'un inhibiteur bactériostatique ou biocide : lorsque cette substance détruit complètement les bactéries [120].

II.3.2. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances chimiques d'origine naturelle ou synthétique qui ont la capacité d'inhiber la croissance ou de tuer des micro-organismes tels que les bactéries, ils sont utilisés pour prévenir et traiter les infections bactériennes chez les humains et les animaux [121].

II.3.3. Les souches bactériennes testées

II.3.3.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie Gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae les bacilles ne sont pas enfermés et mobiles par des cils péritriches, elle est positive pour l'indole et aussi pour le lactose et oxydase négative [122], anaérobie facultatif, 2-4µm de long et environ 0,6 µm de diamètre [123].

E. coli est un résident normal des intestins des humains et des animaux à sang chaud, cette bactérie joue un rôle utile dans l'intestin en participant, entre autres, à synthèse

de vitamines. Cependant, certaines souches spécifiques d'*E. coli* expriment une haute pathogénicité [124].

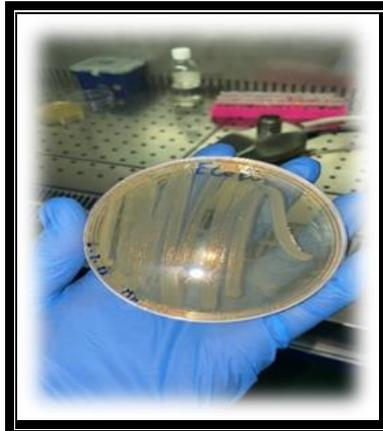


Figure 14 : Photo réelle de la souche *E. Coli*

II.3.3.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus Gram positif, isolé ou regroupé en dicocci ou en grappes avec en forme de raisin, 0,8 - 1 μ de diamètre, immobile, non sporulant, résistant aux maladies antibiotiques staphylococcique, catalase positive et oxydase négative [125].

S. aureus est un appendice de la peau et des muqueuses des humains et des animaux (nez, gorge, intestins), elle est trouvée sur la muqueuse nasale d'environ un tiers des sujets normal. Étant éliminée dans le milieu extérieur, cette bactérie peut survivre longtemps dans environnement, staphylocoque résistant aux antibiotiques [126].

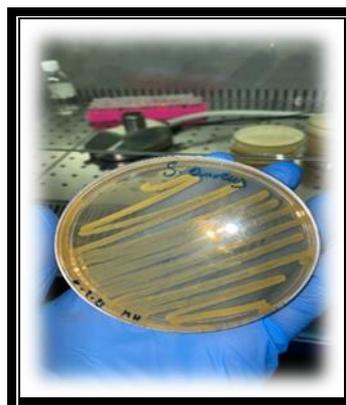


Figure 15 : Photo réelle de la souche *S. aureus*.

II.4. Activité antifongique

II.4.1. Définition

L'activité antifongique désigne la capacité d'une substance ou d'un agent à inhiber la croissance ou à détruire les champignons, il s'agit d'une propriété importante dans la recherche de traitements efficaces contre les infections fongiques [127].

II.4.2. L'Antifongique

Les antifongiques sont des substances ou des médicaments utilisés pour prévenir, traiter ou éliminer les infections fongiques, ils agissent en inhibant la croissance des champignons responsables de ces infections ou en les tuant directement [128].

II.4.3. La souche fongique testés

II.4.3.1. *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum est commune dans le monde entier, et est la plus commune de toutes les Fusaria et la plus diversifiée en termes de morphologie, même dans une forme spécialisée ou une race [129]. Il peut représenter 70% isolats de fusarium du sol [130], c'est un saprophyte qui joue un rôle très important dans phytopathologie. Il est responsable de dégâts importants sur de nombreuses cultures, comme que les cultures florales (œillets, primevères), les légumes de serre (tomates, melons, concombres), palmeraies, bananeraies, cotonniers et liniers [131]. L'infection provoque des symptômes de pourriture des racines et des maladies affectant système vasculaire de la plante.

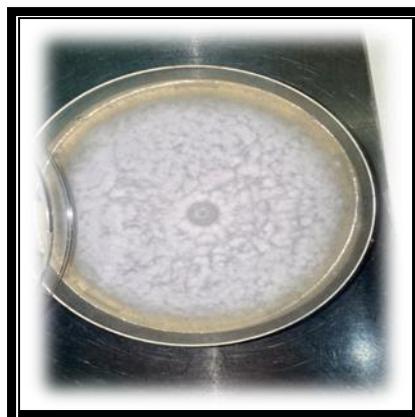


Figure 16 : Photo réelle de la souche *F. oxysporum*

Chapitre III

Matériel et Méthodes

III. Matériel Et Méthodes

Ce chapitre comporte deux parties :

Partie 1 : Extraction du matériel végétal, analyse phytochimique qualitative (screening biologique) et quantitatif (dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes).

Partie 2 : Tests biologiques :

- Evaluation de l'activité antioxydante des extraits obtenus par la méthode ABTS.
- Evaluation de l'activité antibactérienne en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé par antibiogramme (méthode des disques) contre deux souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*).
- Evaluation de l'activité antifongique contre *fusarium oxysporum*.

Notre travail de recherche a été réalisé au sein de l'Unité de recherche **VAREN-BIOMOL (Université des Frères Mentouri Constantine 1)**. Notre travail a été en collaboration avec le laboratoire d'Antifongique, le laboratoire d'Antibactérienne et le laboratoire de contrôle de qualité (**Centre de Recherche de Biotechnologie, Université 2 Abdelhamid Mehri**) ainsi que le laboratoire de microbiologie de l'Université Constantine 1.

III.1. Matériel

III.1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal a été cueilli à **Oued Djedida (Bechar) dans le sud-ouest de l'Algérie**, latitude : 31 ° 38'5.86 ", longitude : -1 ° 44'43.62".



Figure 17 : Lieu de la récolte de la plante [132]

III.1.2. Matériels de laboratoire

- Spectrophotomètre UV-visible
- Evaporateur rotatif de type Rotavapor
- Etuve
- Bain marie
- Balance analytique
- Vortex
- Ultrasons
- Agitateur magnétique
- Lampe UV
- Verreries et petits matériels : Entonnoir, Erlenmeyers, Flacons en verre de 250 ml, Eprouvettes graduées, Tubes à essais, Pipette et micropipette (de 1000 μ l, de 100 μ l et de 10 μ l), Ballon 250 ml, Cuve en verre, microplaques, Plaque CCM, Spatule.

III.1.3. Réactifs

III.1.3.1. Solvants et réactifs

- Éther de pétrole
- Chloroforme
- Acétate d'éthyle
- Méthanol

- Éthanol
- Acide chlorhydrique (HCl) concentré
- Magnésium métallique
- Bicarbonate de sodium
- Réactif de Fehling
- FeCl₃
- Réactif de Wagner (10g d'iode + 10 g d'iodure de Potassium)
- Lieberman-Burchard (5 ml d'anhydride acétique et 20 ml d'acide sulfurique)
- NaOH
- Sulfate de cuivre (CuSO₄)
- Anhydride acétique
- Copeaux de magnésium
- Folin-Ciocalteu (FCR)
- Na₂CO₃
- Trichloride d'aluminium AlCl₃
- Solution de diméthyle sulfoxyde DMSO
- Eau distillée
- La gélose Mueller-Hinton.
- Antibiotique
- La gélose dextrosée à la pomme de terre PDA
- Acide 2,2'-azinobis 3-ethylbenzo-triazoline-6-sulphonate ABTS

III.1.3.2. Solutions standards utilisées

- Acide Gallique C₇H₅O₆.
- Quercétine d'hydraté C₁₅H₁₀O₇.
- BHA et BHT

III.2. Méthodes

III.2.1. Étude phytochimique

III.2.1.1. Analyses spectrales

➤ La spectrophotométrie UV-visible

Le spectre UV est un graphique qui montre comment une substance absorbe ou transmet la lumière ultraviolette à différentes longueurs d'onde. Il permet d'analyser les interactions entre la lumière et les molécules, ainsi que de détecter la présence ou de mesurer la concentration de certains composés [133].

III.2.1.2. Analyses chromatographiques

➤ Chromatographie sur Couche Mince

Pour avoir une idée de la composition chimique de notre extrait, nous avons effectué un criblage phytochimique par CCM. C'est une technique d'analytique utilisée dans la séparation et l'identification des métabolites. Elle est principalement basée sur le phénomène d'adsorption et s'applique aux molécules biologiques pures, aux extraits et aux échantillons. La séparation est accomplie en déplaçant des molécules à travers la phase stationnaire dans un solvant ou un mélange de solvants appropriés (phase mobile) [134].

III.2.1.3. Méthodes d'extractions

III.2.1.3.1. Extraction de la plante

On a coupé notre plante et on l'a broyé à l'aide d'un broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre fine (500g) pour la préparation des extraits alcooliques. On a effectué des extractions solide-liquide successive avec des solvants de polarité croissante. A chaque extraction on a mis la poudre de plante en contact avec le solvant dans un bocal en verre bien fermé, on a effectué une extraction par bain à ultrasons à température ambiante pendant 30 minutes. Cette technique a été développée par les enseignants de l'Unité de recherche VAREN-BIOMOL.

On a commencé l'extraction par l'éther de pétrole (750ml), cette étape a pour but d'éliminer la chlorophylle. On a continué avec le chloroforme (250 ml, 3 fois) dont le but est d'extraire les molécules apolaires tels que les alcaloïdes et les terpènes, par la suite on a utilisé l'acétate d'éthyle (250 ml, 3 fois) pour extraire les acides phénoliques et les flavonoïdes aglycones et mono-glycosides, à la fin on a terminé notre extraction par le méthanol (300 ml, 4 fois) pour avoir les flavonoïdes glycosylés. On a effectué plusieurs répétitions pour avoir le maximum de métabolites secondaires. On a récupéré chaque extrait alcoolique seul après filtration du mélange à l'aide d'un papier filtre N°01. Par la suite on a effectué une évaporation à sec des phases organiques à l'aide de la rotavap, ce qui nous a

permis d'avoir les masses suivantes : 0,1303 g pour l'extrait éther de pétrole ; 1,3279 g d'extrait chloroformique ; 7,382 g pour l'extrait AcOEt et 5,7039 g pour l'extrait méthanolique. Donc on a récupéré 4 extraits à la fin de ce processus : l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le méthanol. Le schéma suivant montre notre processus d'extraction solide-liquide :

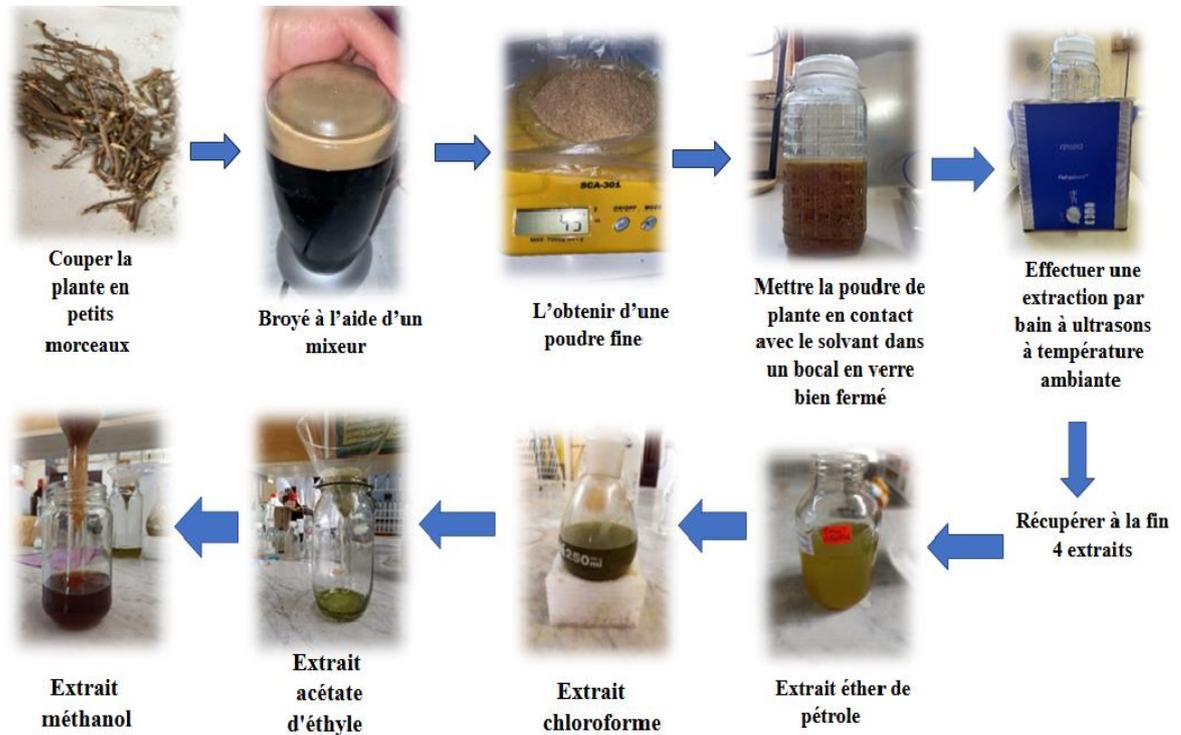


Figure 18 : Les étapes qu'on a effectuées pour l'extraction de la plante.

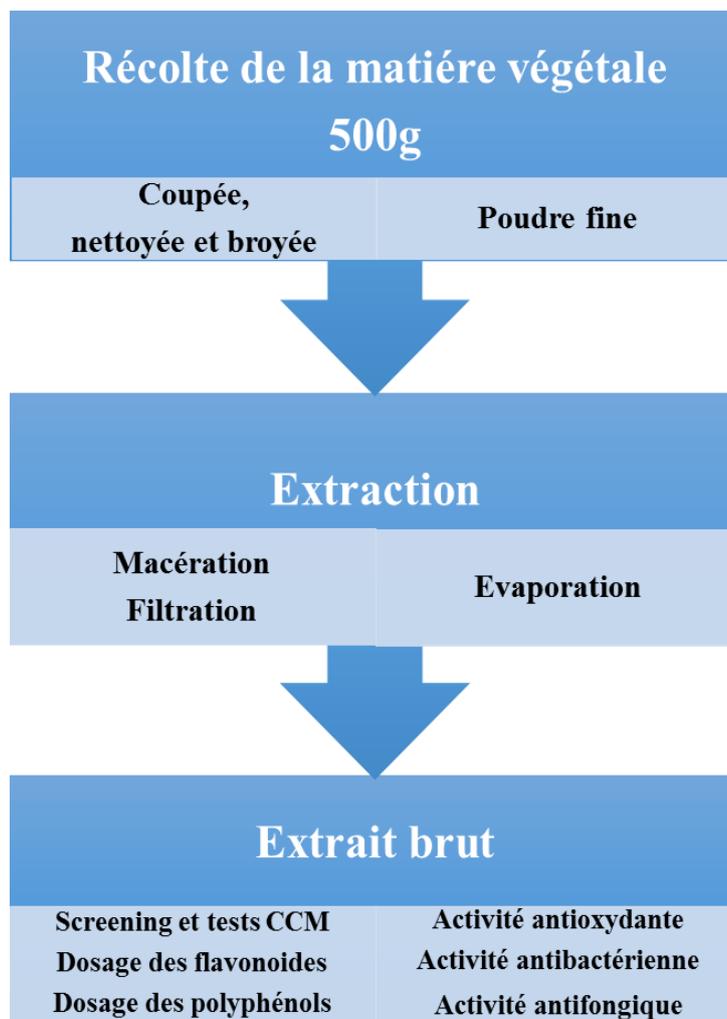


Figure 19 : Protocole expérimentale phytochimique et pharmacologique de la plante.

III.2.1.4. Le Screening phytochimique

C'est un ensemble des méthodes et des techniques de préparation et d'analyse des substances naturelles de la plante. Le but final de l'étude des plantes médicinales est souvent d'isoler un ou plusieurs constituants responsables de l'activité de la plante. De ce point de vue, les techniques générales de screening chimique peuvent être d'un grand secours. Ces techniques permettent de déceler, la présence des produits appartenant à des classes de composés physiologiquement actifs notamment les huiles essentielles, les stéroïdes et triterpènes, les caroténoïdes, les alcaloïdes, les coumarines, les flavones aglycones, les stéroïdes, les flavones glycosides, les tannins et les saponosides. Le nombre de ces classes est important et il ne peut être vérifié la présence de chacune qu'avec le screening chimique [135].

➤ Test des flavonoïdes

On a mélangé quelques milligrammes de chaque extrait dissout / dans 1 ml d'éthanol 95% avec quelques gouttes de l'acide chlorhydrique (HCl) concentré et 0,5 g du Magnésium métallique. On a laissé agir pendant 2 à 3 minutes. L'apparition d'une couleur rose ou magenta indique la présence des flavonoïdes [136]. **(Avec modification)**.

➤ Test des saponosides

On a dissous quelques milligrammes de chaque extrait dans 1 ml d'eau et quelques milligrammes de bicarbonate de sodium placés dans un tube à essai, on a agité vigoureusement, et on a laissé reposer le tube pendant 10 minutes, la persistance de mousse après 10 minutes indique la présence des saponosides [137]. **(Avec modification)**.

➤ Test des sucres

D'une manière générale, le terme sucre est souvent utilisé pour désigner les et glucides ; par exemple, le glucose est qualifié de « sucre simple » et l'amidon de « sucre complexe ». Dans un tube à essai, on a ajouté 1 ml du réactif de Fehling à 1 ml de l'extrait dissout dans 1 ml de Méthanol. On a incubé le mélange pendant 8 minutes dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des sucres [138]. **(Avec modification)**.

➤ Test des tanins

On a ajouté à 1 ml de chaque filtrat, quelque goutte de solution de FeCl diluée à 5% dans l'éthanol 90%. L'apparition d'une coloration verte indique la présence des tanins [139]. **(Avec modification)**.

➤ Test des alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été caractérisés à partir des réactifs de Wagner. On a mis quelques milligrammes de chaque extrait dans 5 ml de HCl (1,5%), puis on a filtré. On a utilisé le filtrat pour la détection des alcaloïdes. Le Réactif de Wagner (on a dissout 1,78 d'iode + 2 g d'iodure de Potassium dans 5 ml d'eau et on a complété avec de l'eau jusqu'à 100 ml de solution). On a ajouté quelques millilitres de ce réactif au filtrat. L'apparition d'un précipité brun indique la présence des alcaloïdes [140]. **(Avec modification)**.

➤ Test des terpènes

La mise en évidence des terpènes est fondée selon la réaction de Lieberman-Burchard. On a additionné à chaque extrait 0,5 ml chloroforme et 0,5ml d'anhydride acétique, après dissolution, on a transféré les solutions dans des tubes à essai auxquels on a ajouté 1 ml d'acide sulfurique concentré. La réaction est effectuée à froid. La formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet, avec coloration de la couche du surnageant de vert ou de violet, traduit la présence des terpènes [141]. **(Avec modification).**

➤ Test des stérols (test de Salkowski)

La détection des stérols est fondée selon la réaction de Salkowski, On a additionné quelques milligrammes de chaque extrait à 2 ml de Chloroforme et 2 ml d'acide sulfurique(H_2SO_4) concentré. On a secoué le mélange et on a laissé reposer pendant quelques minutes. L'apparition de la couleur rouge dans la couche chloroforme indique la présence des stérols [142]. **(Avec modification).**

➤ Test des anthraquinones

On a dissous quelques milligrammes de chaque extrait dans 1 ml de mélange éther de pétrole/chloroforme (1:1, v/v). On a traité la solution obtenue avec 1 ml de soude NaOH (10%). L'apparition de la couleur rouge indique la présence des anthraquinones [143]. **(Avec modification).**

➤ Test des protéines

On a mis quelques mg d'extrait dans l'eau et on a ajouté 1ml de sulfate de cuivre ($CuSO_4$) 4%, si la couleur violet clair à rose apparait cela indique la présence de protéine [144]. **(Avec modification).**

III.2.1.5. Dosage**✓ Dosage des polyphénols**

La détermination des composés phénoliques a été réalisée par le Folin– Ciocalteu [145]. Ce réactif est un acide jaune constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation du phénol, en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène [146]. Le pic

d'absorption à 760 nm est proportionnel à la quantité des polyphénols présents dans les extraits de la plante [147].

- **Les extraits :** On a préparé trois solutions de 1mg/ml (le solvant de dissolution MeOH/eau) comme suit :

1- On a pesé 1mg de chaque extrait (CHCL₃, AcOEt et MeOH).

2- A l'aide de la micropipette on a prélevé 500 µL de MeOH + 500 µL d'eau et la mettre dans chaque tube.

3- On a fermé les tubes avec leurs bouchons et on a bien agité les solutions.

- **L'acide gallique :** On a préparé une gamme de concentration (le solvant de dissolution MeOH/eau) comme suit : 20/90/150/210/270/300/500 µg/ml.

- **Les Blancs**

Le blanc négatif Eau/MeOH (1ml/1ml).

Le blanc positif Eau/MeOH + FCR + NaCO₃.

- **La solution de Na₂CO₃ (20 %) :** On a dissous 3,75 de Na₂CO₃ dans 50 ml d'H₂O.
- **La solution de FCR (1N) :** On a mis 6 ml de FCR dans 60 ml d'H₂O.

- **Le protocole**

✓ **L'acide gallique :**

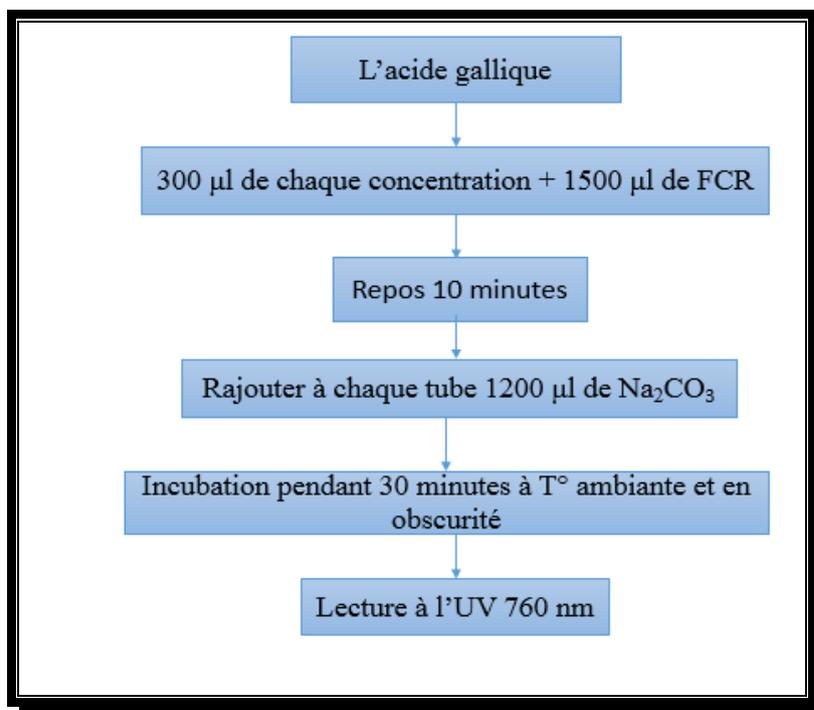


Figure 20 : Protocole de la préparation d'acide gallique

✓ Les extraits :

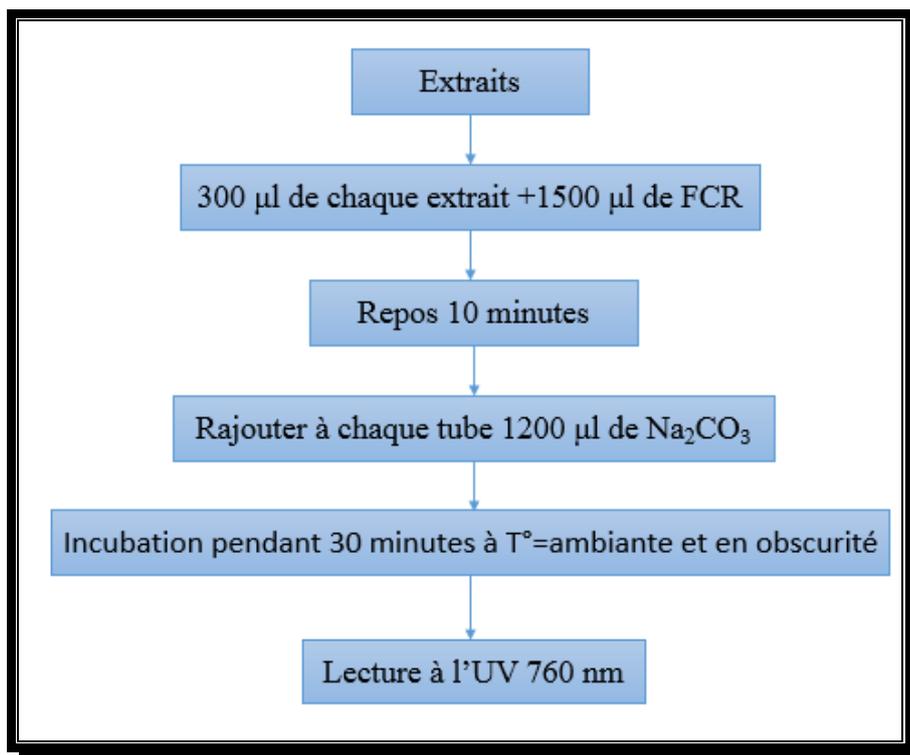


Figure 21 : Protocole de la préparation des extraits

✓ Dosage des flavonoïdes

Détermination des flavonoïdes par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) [148]. Cette méthode est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits de plante. L' AlCl_3 forme un complexe jaune avec les flavonoïdes, qui sera absorbé dans le visible à 430 nm.

- **Les extraits** : La même méthode qu'on a utilisée auparavant dans le dosage des polyphénols.
- **La Quercetine** : On a préparé une gamme de concentration (le solvant de dissolution MeOH/eau) comme suit : 12/36/60/84/108/120/300 µg/ml.
- **Les blancs**

Le blanc négatif Eau/MeOH (1ml/1ml).

Le blanc positif Eau/MeOH + AlCl_3 .

- **La solution d' AlCl_3 (2 %)** : On a dissous 1mg d' AlCl_3 dans 50 ml d' H_2O .

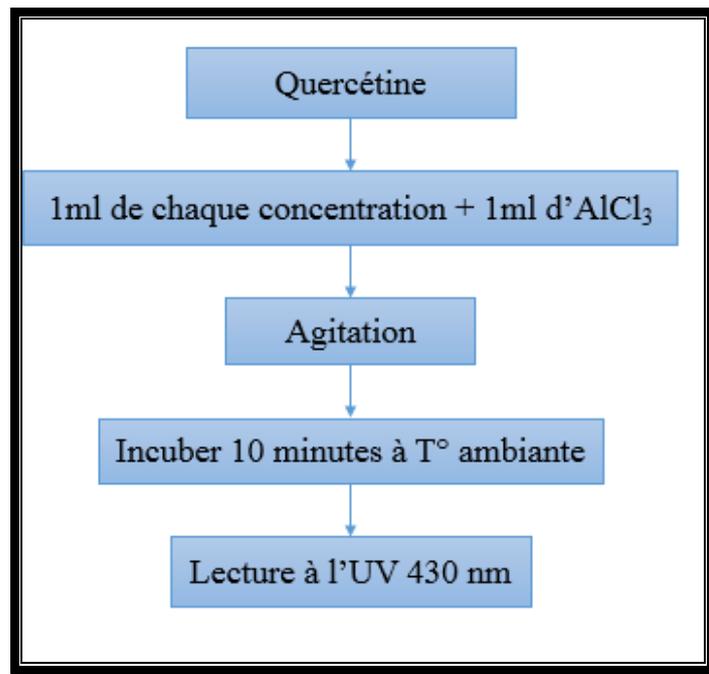


Figure 22 : Protocole de la préparation de la quercétine

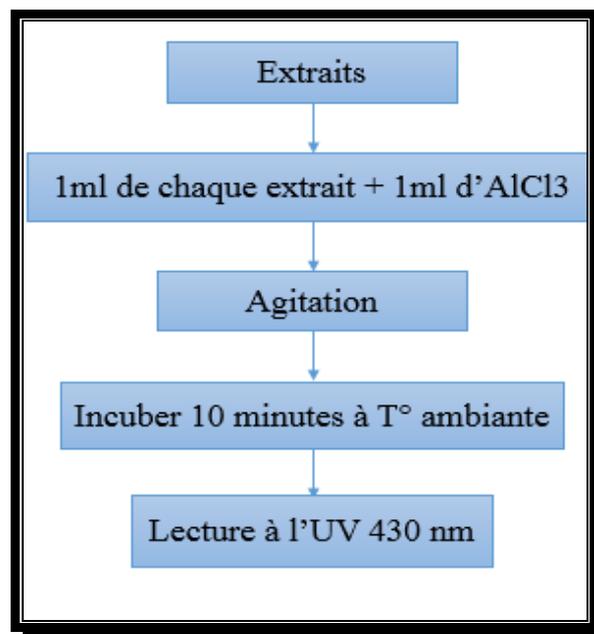


Figure 23 : Protocole de la préparation d'extraits.

III.2.2. Étude biologique

III.2.2.1. Activité antioxydante

Les mesures des activités biologiques ont été effectuées au laboratoire de Contrôle de Qualité du CRBt de Constantine en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits de la marque Perkin Elmer (USA), équipé de son logiciel EnSpire. Pour ce test, on a utilisé la méthode de piégeage de radical de l'ABTS.

Le test de piégeage du radical ABTS

✓ Principe

Cette méthode repose sur le transfert de protons et la capacité des composés à capturer le radical-cationique $ABTS^{\bullet+}$ (l'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), Ces composés présentent un spectre d'absorption dans la région visible, avec un pic d'absorption à 734 nm. Lorsqu'il réagit avec le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$), l'ABTS forme le radical chromophore $ABTS^{\bullet+}$, qui présente une couleur bleue à verte. L'ajout d'un antioxydant réduit ce radical, provoquant ainsi la décoloration du mélange par transfert d'électrons pour rétablir l'ABTS incolore [149] (**Figure 24**).

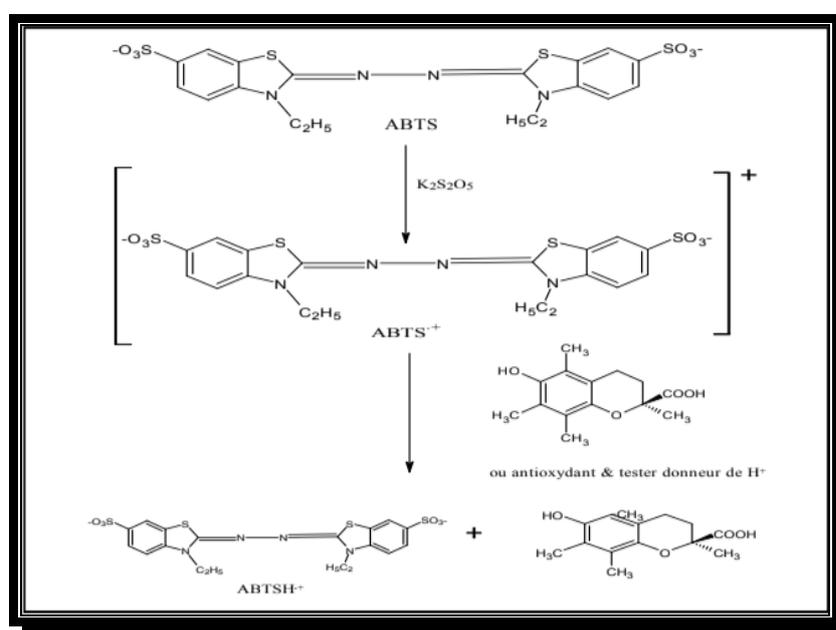


Figure 24 : Capture du radical $ABTS^{\bullet+}$ par un antioxydant à donneur d'hydrogène [150].

✓ Mode opératoire et procédure

Le radical $ABTS^{\bullet+}$ est généré par l'oxydation de l'ABTS en présence de persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$). [151].

Tableau 6 : La composition et la quantité nécessaire du réactif (ABTS)

Réactifs	Compositions	Quantités
ABTS^{•+} (7mM)	ABTS	19,2 mg
	H ₂ O	5 ml
	K ₂ S ₂ O ₈ (2,45mM)	3,3 ml
	H ₂ O	5 ml

On a conservé le mélange réactionnel à l'obscurité et à température ambiante pendant 16 heures. Ensuite, on a ajouté 160 µl de la solution d'ABTS⁺ obtenue à 40 µl de différentes concentrations des extraits de plante.

Pour l'extrait, on a dissous 1 milligramme d'extrait dans un volume de 1 ml de DMSO et on a fait sept dilutions pour les extraits AcOEt et CHCl₃ (4mg/ml, 2mg/ml, 1mg/ml, 0,5ml/mg, 0,25mg/ml, 0,125mg/ml et 0,0625mg/ml). Concernant l'extrait méthanolique, on a fait quatorze dilutions (0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0,125mg/ml, 0,0625mg/ml, 0,0325mg/ml, 0,0156mg/ml et 0,007 mg/ml) car il est très riche en flavonoïdes et acides phénoliques qui ont un caractère antioxydant très puissant. On a fait une incubation de 10 minutes, et on a mesuré l'absorbance à une longueur d'onde de 734 nm (Cela a été après un test préliminaire pour l'extrait MeOH). On a utilisé le DMSO comme contrôle négatif. On a réalisé le même protocole des extraits, ça veut dire qu'au lieu de mettre l'extrait on a mis du DMSO. On a utilisé comme contrôle positif un antioxydant standard, le BHA et le BHT.

Tableau 7 : La composition et la quantité nécessaire de réactifs (BHA, BHT)

Réactifs	Compositions	Quantités
BHA	BHA DMSO	0,5 mg 1 ml
BHT	BHT DMSO	0,5 mg 1 ml

On a mesuré l'absorbance de cette solution dans les mêmes conditions que les échantillons, pour chaque concentration. On a effectué trois répétitions pour chaque mesure pour assurer la précision et la reproductibilité des résultats.

✓Le pourcentage d'inhibition

On a mesuré la décroissance de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre, puis on a calculé le pourcentage d'inhibition (% PI) en utilisant la formule suivante :

$$I\% = [(AC-AT) / AC] * 100$$

AC : Absorbance du contrôle ; AT : Absorbance du test effectué.

L'IC₅₀ correspond à la quantité d'antioxydant requise pour réduire de 50% la quantité initiale d'ABTS. L'IC₅₀ est exprimée en µg/ml d'extrait végétal, on l'a calculé à

partir de l'équation de la droite moyenne du pourcentage d'ABTS résiduel en fonction de la concentration d'antioxydant. L'extrait le plus fort en activité anti radicalaire est celle qui présente la valeur la plus basse d'IC₅₀.

III.2.2.2. Activité antibactérienne

On a préparé une gamme de concentration des extraits CHCl₃, AcOEt et MeOH comme suit : [0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 50 ; 100 ; 150] mg/ml, le solvant de dilution a été le DMSO (un solvant inerte).

Le test de susceptibilité a été effectué selon la méthode de diffusion des disques [152] [153] [154].

• Souches de test

On a choisi de travailler sur 2 espèces pathogènes qui sont : le *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922 (bactéries à gram négatif et positif).

• Repiquage des espèces bactériennes

Dans des conditions stériles, on a prélevé une colonie isolée et représentative de la souche à l'aide d'une pipette pasteur stérile ou d'un ensemenceur. Par la suite on l'a étalé en stries sur une nouvelle boîte de milieu de culture, on les a cultivés après dans l'étuve à 37°C pendant 24h. Si les nouvelles cultures obtenues sont représentatives de celle reçues initialement, il est possible de les utiliser pour la préparation de l'inoculum.

• Préparation des milieux de culture

On a coulé le milieu de culture gélosé (Muller Hinton) en fusion dans les boîtes de Pétri de façon à obtenir une épaisseur de 3 mm pour les boîtes d'un diamètre de 90 mm. On a laissé refroidir et solidifier le milieu gélosé en plaçant les boîtes avec les couvercles en place sur une surface fraîche et horizontale ou sous une hotte à flux laminaire.

• Ensemencement par écouvillonnage

Selon la méthode de Kirby-Bauer, à partir de l'inoculum standardisé pour ensemen-
cer la boîte :

- On a plongé un écouvillon stérile, non toxique dans la suspension.

- On l'a essoré doucement sur les parois.
- On aensemencé la boîte à l'aide de l'écouvillon afin d'obtenir une culture de colonies Confluentes.

• Préparation des disques

On a préparé des disques de 6 mm de diamètre par de papier wattman N°3. On les a mis dans un autoclave pendant 20 minutes à 120°C. On a imprégné ces disques stériles imbibés de concentrations croissantes d'extraits (150 ; 100 ; 50 ; 4 ; 2 ; 1 ; 0,75 ; 0,5 ; 0,25 mg/ml), à l'aide d'une pince, sur la surface du milieu gélose Miller Hinlton. On a incubé les boîtes de Pétri pendant 24 heures à 37°C.

On a déterminé l'activité antibactérienne de nos extraits en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition et on l'a comparé avec celle de DMSO comme contrôle négatif et d'un antibiotique comme contrôle positif. (**Figure 25**)



Figure 25 : Les différentes étapes qu'on a effectuées pour le test de l'activité antibactérienne.

III.2.2.3. Activité antifongique

- ✓ La même gamme de concentrations utilisées auparavant dans l'activité antibactérienne.
- ✓ On a effectué les mêmes étapes précédentes avec des souches fongiques. On a choisi de travailler avec la souche de *Fusarium oxysporum*. On a utilisé le milieu de culture PDA qui est une gélose dextrosée à la pomme de terre (en abrégé « PDA », pour Potato dextrose agar), c'est un milieu de culture microbiologique courant produit à base d'infusion de pomme de terre et de dextrose, ce milieu est favorable pour la croissance des champignons phyto – pathogènes).

- ✓ On a réactivé la souche pendant 7 jours à une température de 28°C avant le test.
- ✓ Avant l'utilisation de la gélose, on l'a liquéfié (fondre) dans un four à microonde pendant 30 min, puis on a coulé le milieu dans des boîtes de Pétri.
- ✓ On a déterminé l'inhibition de la croissance mycélienne par la méthode des disques de 5 mm de diamètre stérilisés, ces disques de jeune colonie de culture de la souche, et on les a placés au centre de la boîte Pétri sur PDA en utilisant le dessous stérile de la pipette pasteur.
- A l'aide d'une micropipette on a mis 40 µl/ml de chaque concentration d'extraits sur le disque, avec le DMSO comme contrôle négatif.
- On a incubé les boîtes à température ambiante pendant 48h.
- On a déterminé l'activité antifongique en mesurant à l'aide de la règle le diamètre de la zone d'inhibition et on l'a comparé avec celle du contrôle négatif [155]. (Figure 26).



Figure 26 : Les différentes étapes de préparation de l'activité antifongique

Chapitre IV

Résultats et Discussions

IV.1. Introduction

Dans cette partie du manuscrit, on va étudier les résultats obtenus des tests qu'on a effectués sur les extraits de notre plante. On a obtenu ces extraits par la méthode des ultrasons citée dans le chapitre précédant. On va montrer le rendement obtenu à travers cette technique d'extraction. Par la suite on va montrer les résultats des tests biologiques.

IV.2. Rendement de l'extraction

Ce rendement concerne l'extrait sec qui est obtenu après évaporation du solvant. L'objectif de cette opération est de montrer si cette technique donne une bonne quantité en matière de l'extrait. On a calculé ce rendement selon la formule suivante :

$$R \% = (PEB/PMV) \times 100$$

R : Rendement en %.

PEB : Poids de l'extrait brut (g).

PMV : Poids de matière végétale (g) [156].

Les résultats de cette opération sont présentés dans le **Tableau 8** :

Tableau 8 : Les résultats de rendement des extraits qu'on a obtenu par extraction aux ultrasons.

Matériel végétal	Extraits	Poids des extraits (g)	Rendement %
500 g	Ether de pétrole	0,1303 g	0,026%
	Chloroforme	1,3279g	0,260%
	Acétate d'éthyle	7,382 g	1,46%
	Méthanol	5,7039 g	1,14%

Les résultats qu'on a obtenus, ont montré que le rendement des extraits se diffère d'un extrait à l'autre. On distingue que l'extrait AcOEt présente le rendement le plus élevé avec

1,46%, suivi par l'extrait MeOH de 1,14%, par la suite le CHCl_3 avec 0,26%, et enfin l'extrait éther de pétrole qui a présenté le rendement le plus faible avec 0,03%. On va présenter ces résultats dans la **Figure 27**.

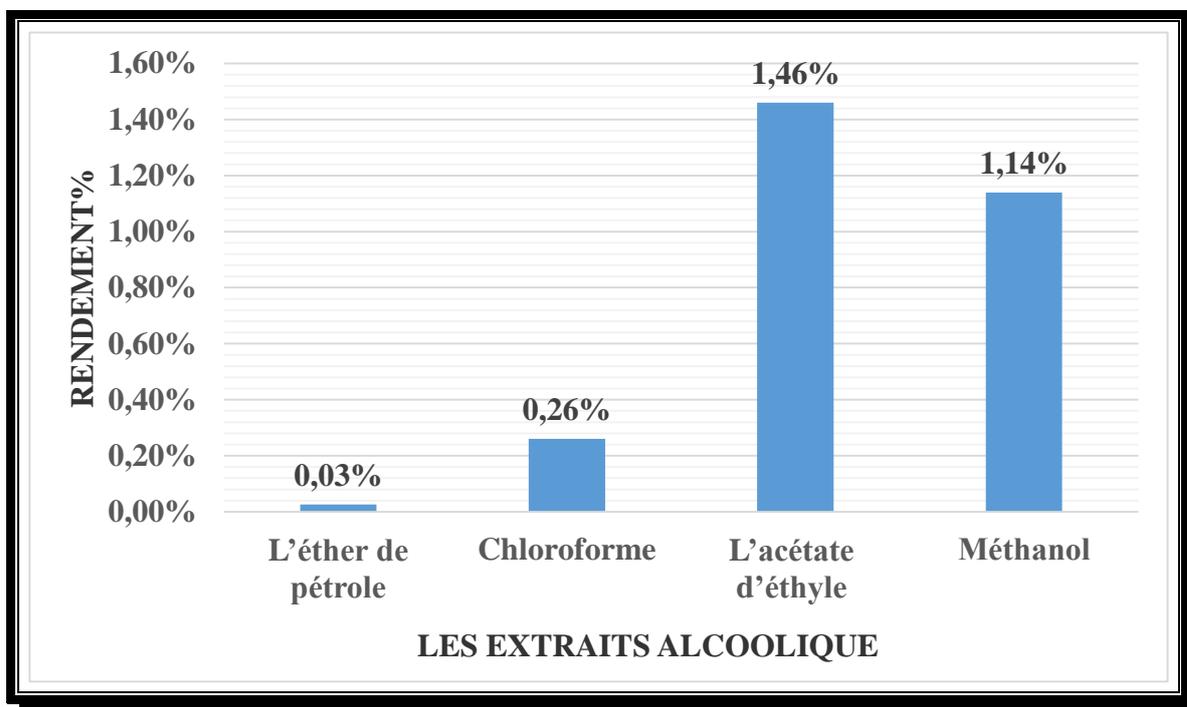


Figure 27 : Rendements calculé des extraits de notre plante.

On peut dire que les solvants polaires donnent un meilleur rendement que les solvants apolaires, puisque les solvants polaires ont la capacité de se diffuser à l'intérieur de la poudre végétale, pour accéder à la matrice végétale et récupérer autant de métabolites que possible. Alors que les solvants apolaires non miscibles avec l'eau, n'ont pas une grande capacité à extraire ces molécules. Cela s'explique par la présence d'eau dans les tissus végétaux qui les empêche à faire dissoudre ces métabolites secondaires [157].

IV.3. Description des profils chromatographiques par CCM

Pour l'analyse qualitative de nos extraits CHCl_3 , AcOEt et MeOH de la plante Cistaceae. On a utilisé la chromatographie sur couche mince (CCM). C'est l'une des méthodes classiques de séparation et de purification des molécules à partir d'un extrait de plante ; cette technique est assez simple à faire, peu coûteuse et disponible au laboratoire.

On a utilisé un système d'éluion de polarité différente qui est le $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (9,5:0,5). On a choisi ce système après plusieurs tests, il nous a donné le meilleur résultat en matière

de séparation des taches. Les résultats qu'on a obtenus sont présentés dans les figures (Figure 28, Figure 29) :



Figure 28 : Révélation de la plaque CCM des extraits CHCl₃, AcOEt et MeOH sous lampe UV 365 nm



Figure 29 : Résultat de la CCM des extraits après révélation par l'anis-aldéhyde.

Après révélation par la lampe UV 365 nm, on remarque la présence de plusieurs tâches dans les trois extraits, cela confirme la présence de plusieurs métabolites secondaires dans nos extraits.

On remarque qu'il y a pas mal de taches qui ont le même Rf (la distance entre le point d'injection et la fin de l'élution), cela s'explique par la ressemblance de la composition chimique entre les trois extraits.

On remarque la présence d'une tache en rouge dans les trois extraits, cette couleur indique la présence de la chlorophylle qui est souvent présente dans les plantes.

On observe également la présence d'une tache en bleu dans les trois extraits, cette couleur indique probablement la présence des acides phénoliques. On confirme cette hypothèse par la révélation de la plaque par l'anisaldéhyde. Une couleur bleu foncé est apparue après cette opération ce qui confirme la présence des acides phénoliques.

IV.4. Analyse phytochimique qualitative : Screening phytochimique

Ce test est préliminaire, il va nous donner une idée générale sur la composition chimique de nos extraits. Les résultats qu'on a obtenus sont illustrés dans le tableau 9, sachant que :

- : Test négatif

+ : Test faiblement positif

++ : Test moyennement positif

+++ : Test fortement positif

Tableau 9 : Les résultats obtenus du screening phytochimique de la plante des Cistaceae

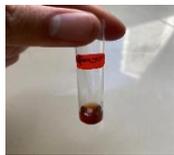
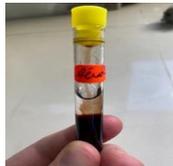
Métabolites secondaires	Observation attendu	Résultats observés C ₆ H ₁₄	Résultats observés CHCl ₃	Résultats observés AcOEt	Résultats observés MeOH	Observations obtenue
Test des flavonoïdes	L'apparition d'une couleur magenta	-	-	+	++	
Test des saponosides	Une hauteur de mousse persistante	-	-	+++	-	
Test des sucres	L'apparition d'un précipité rouge brique	-	-	+	++	
Test des tanins	L'apparition d'une coloration verte	+++	++	-	-	
Test des alcaloïdes	L'apparition d'un précipité brun	-	++	-	-	
Test des terpènes	La formation d'un anneau rouge brunâtre	-	++	-	-	

Tableau 10 : Les résultats obtenus du screening phytochimique de la plante des Cistaceae
(la suite du tableau 9)

Métabolites secondaires	Observation attendue	Résultat observé C ₆ H ₁₄	Résultat observé CHCl ₃	Résultat observé AcOEt	Résultat observé MeOH	Observations obtenue
Test des stérols	L'apparition de la couleur rouge	-	++	+	-	
Test des anthraquinones	L'apparition de la couleur rouge	-	+	+	-	
Test des protéines	L'absence de la couleur violet clair et le rose	-	-	-	-	

Les résultats de screening qu'on a obtenus indiquent que les extraits de notre plante sont riches en métabolites secondaires de différentes classes tel que : les flavonoïdes, les saponosides, les sucres, les tanins, les alcaloïdes, les terpènes, les stérols et les anthraquinones. On remarque une absence totale des protéines dans cette plante.

IV.5. Analyse phytochimique quantitative : le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

IV.5. 1. Teneur en polyphénols totaux

Pour la détermination de la teneur en polyphénols totaux de nos extraits, on a utilisé la méthode de Folin-Ciocalteu. Une coloration bleue est obtenue, cette coloration varie en fonction de la concentration de l'extrait de la plante en composé phénolique.

La courbe d'étalonnage établie à l'aide de différente concentration de l'acide gallique, nous a permis d'estimer la teneur en composés phénoliques à l'aide de l'équation de la regression linéaire. La quantité en polyphénols de chaque extrait (**Figure 31**) a été calculé à l'aide de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Figure 30**), elle est exprimée

en équivalent microgramme d'équivalent acide gallique par milligramme de matière sèche ($\mu\text{g EAG}/\text{mg de PS}$) et déterminé par l'équation de type $y = ax + b$ ($R^2 = 0,9852$)

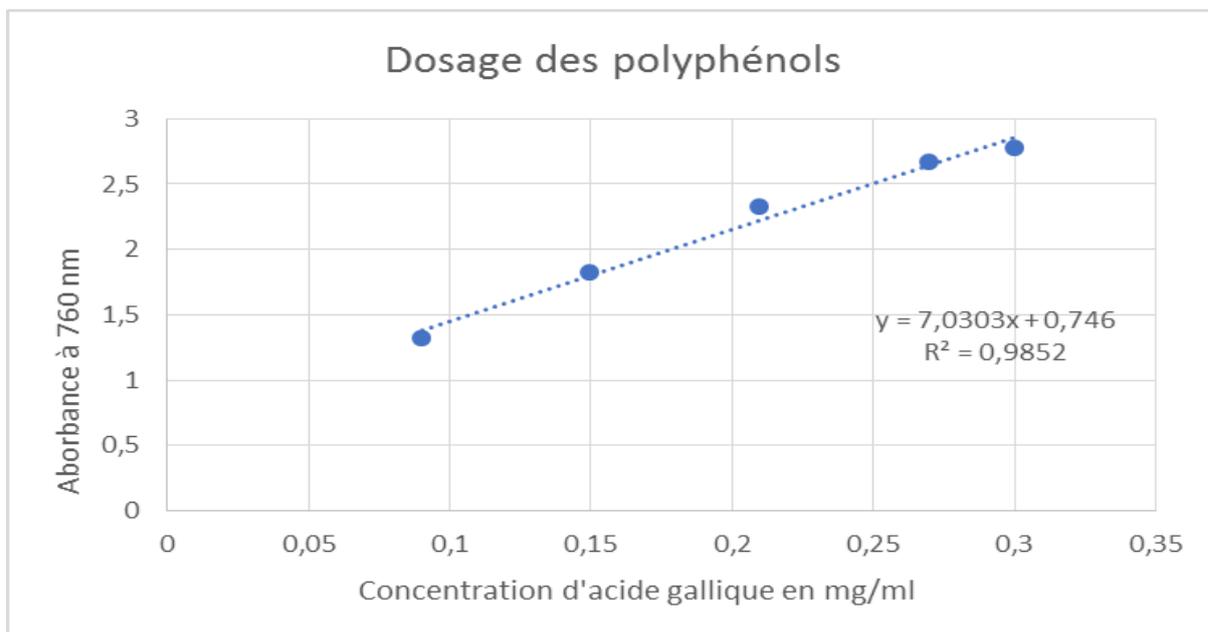


Figure 30 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

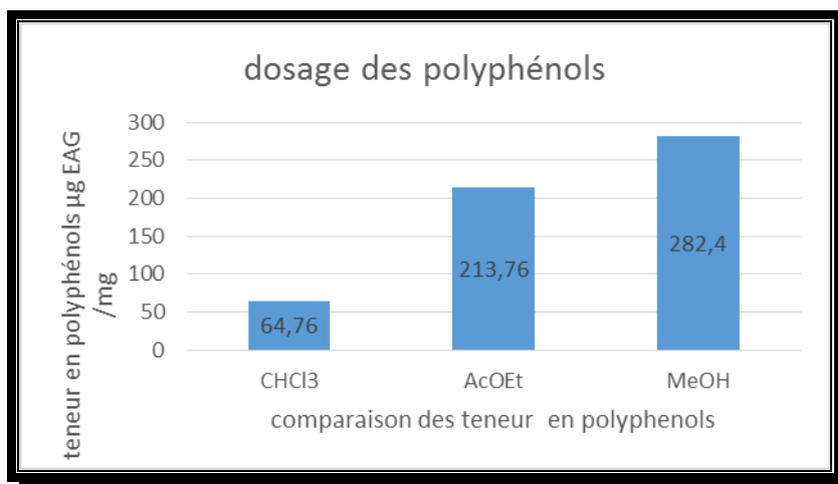


Figure 31 : Teneur en polyphénols totaux des trois extraits étudiés

D'après nos résultats (**Figure 31**), on distingue que les teneurs en composés phénoliques varient considérablement entre les extraits étudiés.

D'après l'histogramme, l'extrait MeOH présente la teneur en polyphénols totaux la plus élevée avec $282,4 \mu\text{g EAG}/\text{mg de PS}$ suivie par l'extrait AcOEt avec $213,76 \mu\text{g EAG}/\text{mg de PS}$ et enfin l'extrait CHCl₃ qui présente la teneur la plus faible avec $64,76 \mu\text{g EAG}/\text{mg de PS}$.

Ces résultats peuvent être expliqués par la polarité des solvants utilisés (MeOH et AcOEt), car les polyphénols sont des molécules polaires et cela aide à les faire dissoudre par ces deux solvants polaires également. On confirme cette hypothèse en voyant le taux en polyphénols moyennement faible par rapport aux deux autres extraits dans l'extrait CHCl_3 (le CHCl_3 est un solvant peu polaire). Donc on déduit que la teneur en polyphénols totaux dans les extraits dépend de la polarité du solvant utilisé dans l'extraction [158].

IV.5.2. Teneurs en flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) en utilisant la quercétine comme étalon. La teneur en flavonoïdes de chaque extrait (**Figure 33**) a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage (**Figure 32**) établie à l'aide de différentes concentrations de quercétine, exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme de matière végétale sèche ($\mu\text{g EQ/mg}$ de PS), et déterminée par l'équation de type : $y = ax + b$, sachant que $R^2 = 0,9675$.

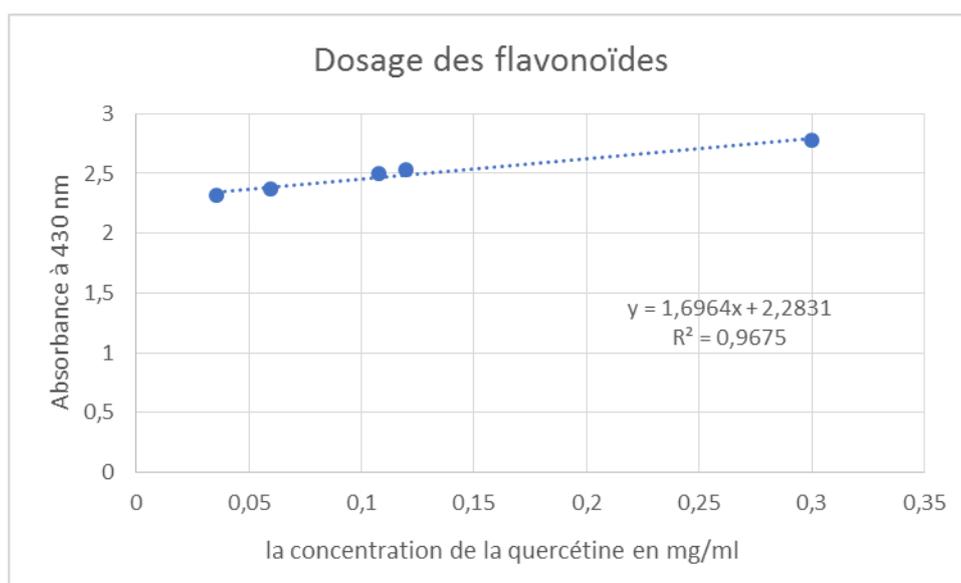


Figure 32 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

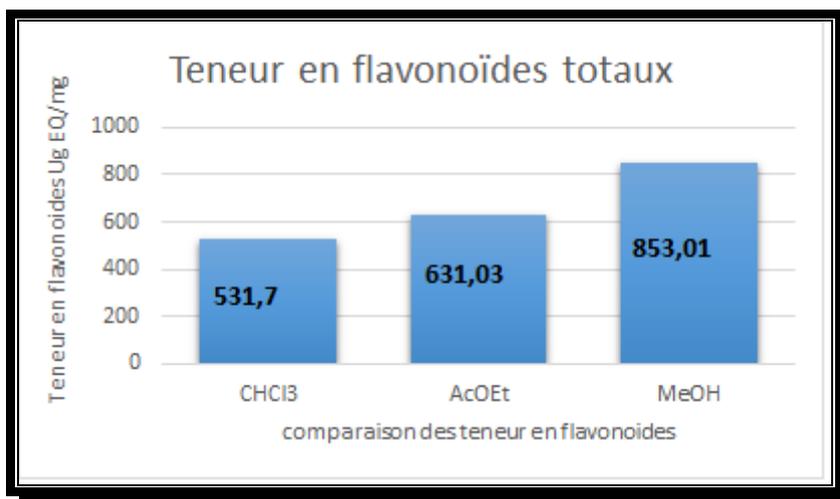


Figure 33 : Teneur en flavonoïdes totaux des trois extraits étudiés

Les résultats qu'on a obtenus (**Figure 33**), montrent que l'extrait MeOH présente la teneur en flavonoïdes la plus élevée avec 853,01 µgEQ/mgPS par rapport aux deux autres extraits CHCl₃ et AcOEt (531,7 et 631,03 µgEQ/mgPS respectivement).

Ces résultats indiquent que les teneurs en flavonoïdes totaux varient considérablement en fonctions du solvant d'extraction de l'échantillon. Ces résultats confirment les résultats qu'on a obtenus dans le dosage des polyphénols totaux.

La concentration des flavonoïdes dans les extraits de la plante est liée à la solubilité qui dépend non seulement de la polarité du solvant d'extraction mais aussi du nombre et de la position des groupements hydroxyles libres, au poids moléculaire et de la glycosylation [159].

IV.5.3. Activité antioxydante

Pour estimer l'activité antioxydante de nos trois extraits CHCl₃, AcOEt et MeOH, on s'est basé sur le test ABTS, qui est un test très connu dans la détermination de cette activité. Cette dernière est exprimée en IC₅₀ qui est une valeur qui exprime la concentration de l'extrait nécessaire pour diminuer l'absorbance de l'ABTS de 50 %.

L'IC₅₀ est déterminée graphiquement à partir de la courbe d'étalonnage (équation de la régression linéaire). L'efficacité est estimée à partir de l'activité de BHA et de BHT comme références standards. L'extrait qui aura l'IC₅₀ la plus faible sera l'extrait le plus actif.

Dans ce test (piégeage du radical cation $ABTS^{•+}$), l'antioxydant réagit avec l' $ABTS^{•+}$ de couleur bleu/vert par transfert d'électrons pour redonner l' $ABTSH^+$ incolore. Cette transformation a été suivie par la mesure de l'absorbance et la détermination de la concentration inhibitrice des différents extraits en comparaison avec les standards BHA et BHT. Les résultats obtenus sont illustrés ci-dessous (**Figure 34**) :



Figure 34 : La plaque de dosage de l'activité du piégeage du radical cation ABTS^{•+} des trois extraits

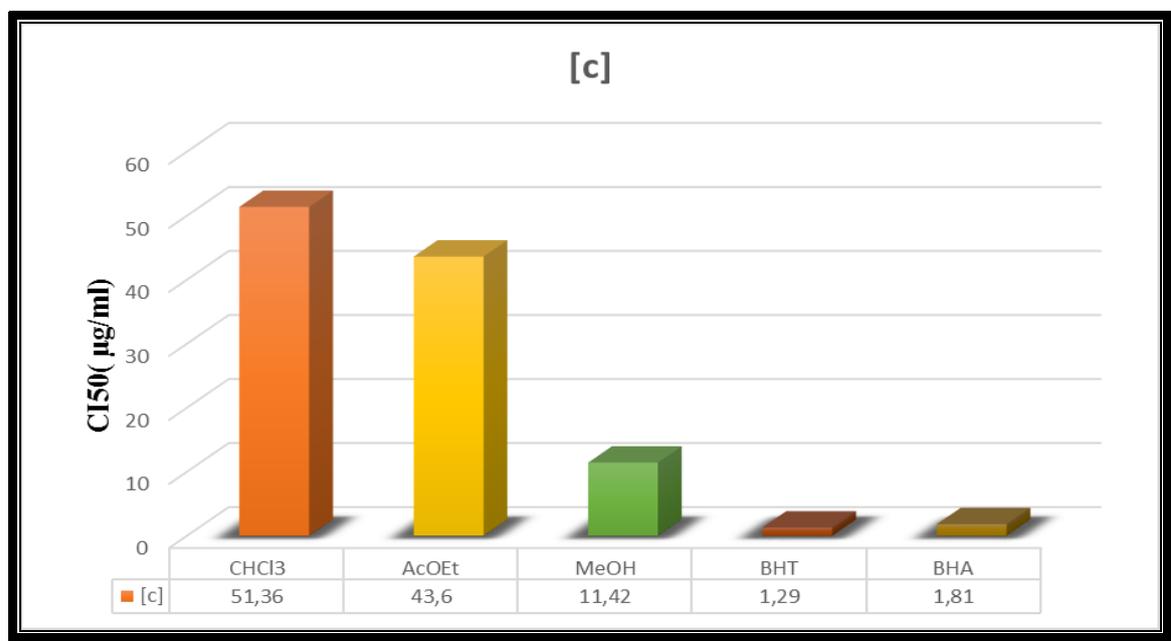


Figure 35 : La plaque de dosage de l'activité du piégeage du radical cation ABTS^{•+} de l'extrait méthanolique

Analyse de pourcentage d'inhibition (IC₅₀) de l'ABTS

Extraits	<Analyse de % d'Inhibition de l'ABTS							IC ₅₀ µg/mL
	6,25µg	12,5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	
CHCl₃	22,33 ± 1,98	29,85 ± 0,35	44,64 ± 2,21	93,68 ± 0,62	91,40 ± 0,76	79,31 ± 3,94 Saturation	60,02 ± 2,71 Saturation	51,36 ± 0,70
	12,18 ± 1,63	32,81 ± 4,51	54,92 ± 2,80	79,10 ± 3,66	81,93 ± 0,81	65,33 ± 13,12 Saturation	42,22 ± 17,69 Saturation	43,60 ± 1,38
MeOH	0,78125 µg	1,5625 µg	3,125 µg	6,25 µg	12,50 µg	25 µg	50 µg	IC ₅₀ µg/mL
	-	10,84 ± 5,64	20,38 ± 3,35	30,26 ± 1,12	54,58 ± 3,23	79,24 ± 2,80	91,27 ± 0,91	11,42 ± 0,70
standard	3,125 µg	6,25 µg	12,5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC ₅₀ µg/mL
BHT	59,22 ± 0,59	78,55 ± 3,43	90,36 ± 0,00	92,18 ± 1,27	93,37 ± 0,86	94,87 ± 0,87	96,68 ± 0,39	1,29 ± 0,30
	83,42 ± 4,09	93,52 ± 0,09	93,58 ± 0,09	93,63 ± 0,16	93,63 ± 0,95	94,20 ± 0,90	95,39 ± 2,62	1,81 ± 0,10

Tableau 11 : Analyse de % d'Inhibition de l'ABTS

Figure36 : Les Valeurs des IC₅₀ de piégeage du radical ABTS^{•+} des trois extraits avec les standards

Les résultats dans la **Figure 36** montre que l'extrait MeOH présente la plus forte activité de piégeage de radical libre ABTS^{•+} avec la valeur la plus faible d'IC₅₀ (11,42±0,70 µg/ml), c'est une valeur très proche de celles des standards BHA (1,81±0,10 µg/ml) et le BHT (1,29±0,30 µg/ml). Les deux autres extraits AcOEt et CHCl₃ présentent une activité plus au moins faible par rapport à l'extrait MeOH avec une IC₅₀ de 43,60±1,38 et 51,36±0,70 µg/ml respectivement.

On confirme nos résultats par des travaux antérieurs portés sur le test antiradicalaire de huit espèces du genre *Helianthemum* (de la famille des Cistaceae) ; leurs résultats montrent que l'extrait méthanolique présente également une activité antiradicalaire élevée. On distingue aussi que notre extrait montre une activité nettement supérieure à celle obtenus avec ces huit genres testés (IC₅₀ oscillant entre 18,11 et 102,15 µg/ml) [160].

On distingue que l'extrait MeOH a fortement réduit le radical ABTS^{•+}, cela est dû à sa forte teneur en flavonoïdes (**Figure33**) et en composés phénoliques totaux (**Figure31**). Ces résultats complètent et confirment les résultats du dosage obtenus précédemment.

Plusieurs études antérieures ont montré la relation entre la structure des flavonoides et des polyphénols et l'activité de piégeage des radicaux libres. Cette activité dépend du cycle aromatique et la conjugaison entre ce cycle et la double liaison dans la structure des polyphénols ainsi que le nombre et la position du groupement hydroxyles sur le cycle aromatique des flavonoides [161]. Cela explique les résultats qu'on a obtenus.

IV.6. Activité antibactérienne

On a utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé pour l'évaluation de l'activité antibactérienne de nos trois extraits CHCl₃, AcOEt et MeOH (le solvant de dilution est le DMSO), on a utilisé l'antibiogramme (méthode des disques) contre deux souches bactériennes (*Escherichia coli* (*E. coli*)) et (*Staphylococcus aureus*). Cette méthode implique la préparation de disques en papier imbibés de l'extrait, qui sont ensuite placés sur une plaque de culture bactérienne. On a évalué l'activité des extraits en observant l'apparition d'une zone d'inhibition de croissance bactérienne autour du disque.

On a utilisé la Pénicilline et SFB (sélénite acide sodium) comme des antibiotiques de référence pour comparer l'activité antibactérienne des extraits (témoin positif). L'effet de nos antibiotiques permet d'établir une référence quant à l'inhibition de la croissance bactérienne.

On a utilisé le diméthylsulfoxyde (DMSO) comme témoin négatif, c'est-à-dire pour évaluer l'absence d'effet antibactérien de cette substance sur les souches testées.

Après 24 heures d'incubation, les diamètres des zones d'inhibitions obtenus avec les différents extraits sont regroupés dans les **tableaux 12, 13 et 14**. Ces résultats représentent la moyenne de deux mesures. L'effet bactériostatique se manifeste par la formation d'une zone d'inhibition autour du disque de papier contenant l'extrait étudié. Le diamètre de la zone d'inhibition varie d'une bactérie à une autre ainsi que d'un extrait à un autre. Comme rapporté dans la littérature, les zones d'inhibition supérieures à 10 mm sont considérées comme un test positif [162] et une action est dite bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 12 mm [163].

Tableau 12 : Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits sur la souche *E. coli*.

Extraits	Concentration (mg/ml)	Zone d'inhibitions (mm)	Zone d'inhibition DMSO (mm)	Zone d'inhibition Pénicilline (mm)	Zones d'inhibition obtenue
CHCl₃	0,25	0	0	3	
	0,50	0			
	1	0			
	2	0			
	4	0			
AcOEt	0,25	0	0	3	
	0,50	0			
	1	0			
	2	0			
	4	0			
MeOH	0,25	0	0	3	
	0,50	0			
	1	0			
	2	0			
	4	0			

Tableau 13 : Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits sur la souche *E. coli* (la suite)

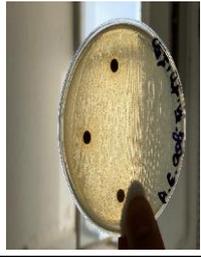
Extraits	Concentration (mg/ml)	Zone d'inhibition (mm)	Zone d'inhibition DMSO (mm)	Zone d'inhibition SDF (mm)	Zones d'inhibition obtenue
CHCl₃	50	10	0	5	
	100	11			
	150	12,50			
AcOEt	50	11,50	0	5	
	100	12			
	150	13			
MeOH	50	12	0	5	
	100	13			
	150	15			

Tableau 14 : Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits sur la souche *S.aureus*.

Extraits	Concentration (mg/ml)	Zone d'inhibition (mm)	Zone d'inhibition DMSO (mm)	Zone d'inhibition SDF (mm)	Zones d'inhibition obtenue
CHCl₃	50	7	0	4	
	100	8			
	150	9			
AcOEt	50	9	0	4	
	100	9,2			
	150	9,5			
MeOH	50	11	0	4	
	100	12			
	150	16			

Notre travail a été en deux parties comme suit :

- On a réalisé la 1^{ère} partie au Laboratoire de Microbiologie au CRBT, on a testé nos extraits sur la souche *E.Coli* qui est la seule souche disponible au niveau du centre. On a fait un test préliminaire pour avoir une idée sur la concentration la plus faible avec laquelle on aura un effet positif ; on a choisi la gamme de concentrations [0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 et 4 mg/ml] (**Tableau 12**).
- On a réalisé la 2^{ème} partie au Laboratoire de Microbiologie à l'Université de Constantine 1, cette fois ci on a testé nos extraits sur deux souches *E.Coli* et *S.aureus*. On a choisi la gamme de concentrations suivante : 50 ; 100 et 150 mg/ml (**Tableau 13 et 14**).

Les résultats qu'on a obtenu montrent que nos extraits ont une activité inhibitrice sur les deux souches *E. coli* et *Staphylococcus aureus* avec des concentrations de (50, 100 et 150 mg/ml). On ne trouve aucun effet sur la souche *E. coli* avec les concentrations (0,25 ; 0,50 ; 1 ; 2 et 4 mg/ml).

Dans les **tableaux 13 et 14**, on observe que les trois extraits présentent un effet sur les deux types de souches avec les concentrations : 50, 100 et 150 mg/ml. On distingue une forte réponse sur la souche *E.Coli* qu'avec la *S.aureus*. On prend l'exemple des extraits CHCl_3 et AcOEt , on remarque qu'ils ont un effet positif uniquement sur l'*E.Coli* avec une zone d'inhibition qui varie entre 10 et 13 mm), par contre sur la *S.aureus* ils présentent un petit effet qui est inférieur à 10 mm (cela pour les 3 concentrations 50, 100 et 150 mg/ml) et d'après la littérature on ne peut pas le considérer comme un effet positif car il est inférieur à 10 mm (avec une zone d'inhibition qui varie entre 7 et 9,5 mm).

Si on prend les résultats présentés dans le **tableau 13**, on remarque que l'extrait MeOH a un effet positif très élevé sur l'*E.Coli* avec un diamètre qui varie entre 12 et 15 mm par rapport aux extraits CHCl_3 et AcOEt avec un diamètre qui varie entre 10 et 13 mm pour les 3 concentrations étudiées. On distingue la même chose avec la *S.aureus* (**Tableau 14**) ou l'extrait MeOH a un effet très puissant par rapport aux deux autres extraits (un diamètre de 11-16 mm pour le MeOH et de 7-9,5 mm pour le CHCl_3 et l' AcOEt).

On confirme nos résultats avec des études antérieures sur la plante *Marrubium deserti* De Node de la famille des Lamiacées. Ils ont trouvé un effet très puissant avec l'extrait MeOH sur les deux types de souche [164].

Des études récentes ont montrés que l'extrait MeOH peut inhiber la croissance de la bactérie en altérant sa membrane cellulaire, en perturbant son métabolisme ou en inhibant la synthèse de certaines enzymes essentielles. Dans le cas de la *Staphylococcus aureus* les flavonoïdes présents dans l'extrait MeOH peuvent être responsables de l'effet inhibiteur sur cette bactérie en ciblant les sortases, qui sont des enzymes situées dans la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif et qui jouent un rôle clé dans la formation des protéines de surface, telles que les adhésines et les internalines [165].

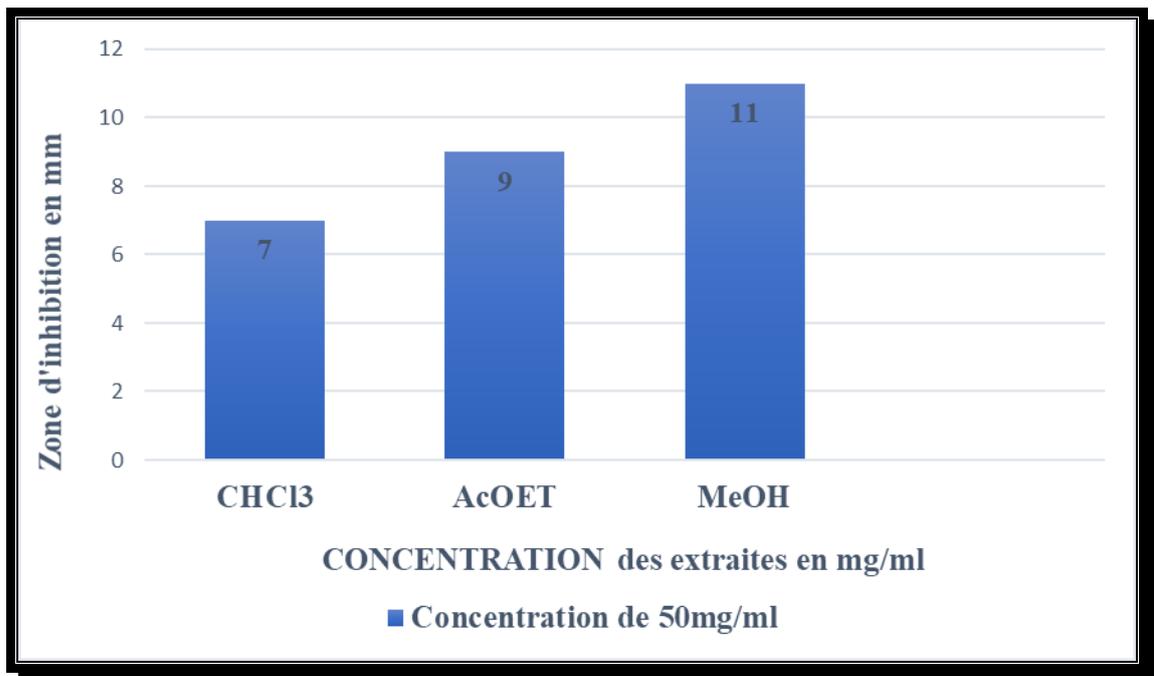


Figure 37 : Effet des extraits sur la souche bactérien *E. coli* testée en fonction de concentration 50mg/ml.

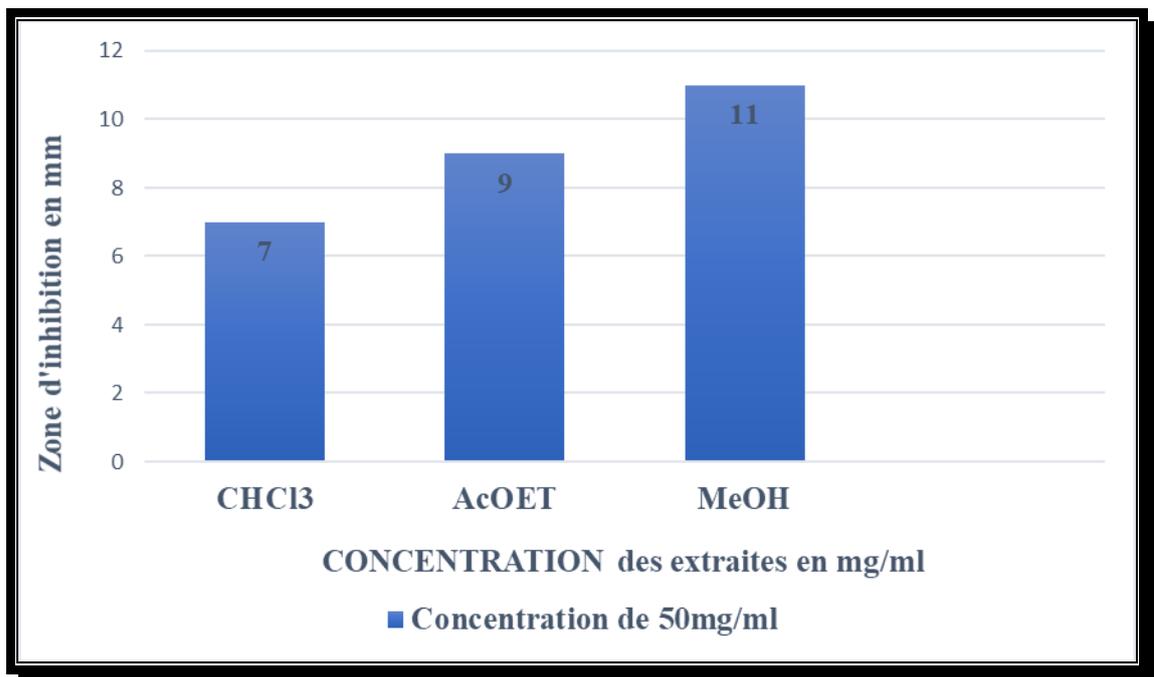


Figure 38 : Effet des extraits sur la souche bactérien *S. aureus* testés en fonction de la concentration 50 mg/ml.

IV.7. Activité antifongique

On a évalué l'activité antifongique de nos extraits CHCl₃, AcOEt et MeOH contre une seule souche de champignon *Fusarium oxysporum*. On a utilisé la méthode des

disques, l'action de la souche traduit par l'apparition d'une zone inhibitrice autour du disque imbibé d'extrait, le diamètre de la zone d'inhibition varie d'un extrait à l'autre.

La gamme de concentration des extraits qu'on a testé a été : [0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 50 ; 100 ; 150] mg/ml. On a utilisé le diméthylsulfoxyde (DMSO) comme témoin négatif (pour évaluer l'absence d'effet antifongique de la substance contre la souche testée).

Après 48 h d'incubation, les résultats de la sensibilité du *Fusarium oxysporum* aux extraits sont regroupés dans les **tableaux 15 et 16**, les valeurs indiquées sont la moyenne de trois mesures.

Nous avons déterminé le diamètre de la souche fongique en présence des extraits. L'effet antifongique est déterminé par la mesure du taux d'inhibition de la croissance diamétrale comme rapporté dans la littérature, selon les régions inhibitrices en utilisant la formule suivante :

- ✓ **Taux d'inhibition % ≤ 0** est considéré comme résultat négatif.
- ✓ **Taux d'inhibition % > 0** est considéré comme résultat positif.

$$\text{Taux d'inhibition \%} = \frac{\text{moyenne du témoin négatif} - \text{moyenne de l'extrait}}{\text{moyenne du témoin négatif}} \times 100$$

Tableau 15 : Résultats de l'activité antifongique des trois extraits de plante.

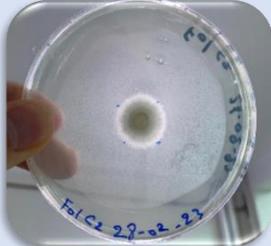
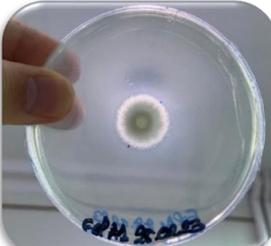
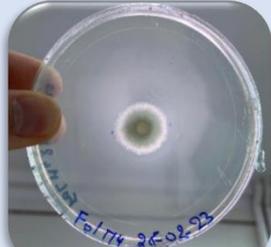
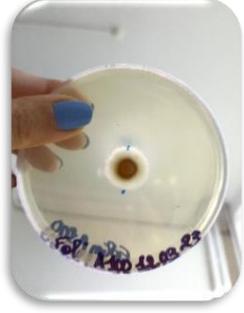
Extraits	Concentration (mg/ml)	Zone d'inhibition (mm)	Taux d'inhibition (%)	Zones d'inhibitions obtenues
CHCl ₃	4	1,77	-36,15	
	2	1,70	-30,76	
	1	1,62	-24,61	
	0,5	1,72	-32,30	
	0,25	1,65	-26,92	
	DMSO	1,30	0	
AcOEt	4	1,33	-2,30	
	2	1,65	-26,92	
	1	1,42	-9,23	
	0,5	1,52	-16,92	
	0,25	1,75	-34,61	
	DMSO	1,30	0	
MeOH	4	1,55	-19,23	
	2	1,52	-16,92	
	1	1,52	-16,92	
	0,5	1,60	-23,07	
	0,25	1,57	-20,76	
	DMSO	1,30	0	

Tableau 16 : Résultats de l'activité antifongique des extraits (la suite).

Extraits	Concentration (mg/ml)	Zone d'inhibition (mm)	Taux d'inhibition (%)	Zones d'inhibitions obtenues
CHCl₃	150	1,80	10,52	
	100	1,70	8,94	
	50	1,73	5,26	
	DMSO	1,90	0	
AcOEt	150	1,83	3,68	
	100	1,86	2,10	
	50	1,90	0	
	DMSO	1,90	0	
MeOH	150	1,63	14,21	
	100	1,70	10,52	
	50	1,86	2,10	
	DMSO	1,90	0	

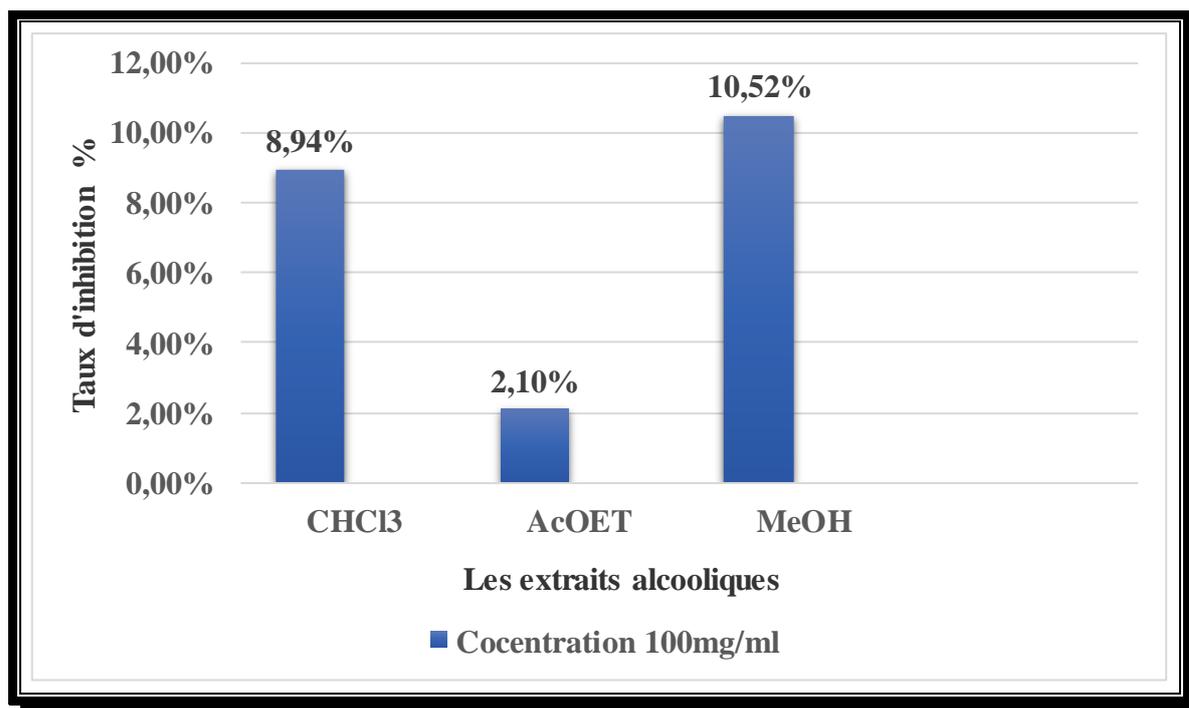


Figure 39 : Taux d'inhibition en fonction de la concentration 100 mg/ml des extraits CHCl₃, AcOEt et MeOH.

D'après le **tableau 15** les résultats montrent clairement qu'il n'y a pas un effet avec les concentrations : 0,25 ; 0,50 ; 1 ; 2 et 4 mg/ml, cela est dû probablement aux faibles concentrations des extraits testés.

Dans le **tableau 16**, les résultats montrent clairement que les trois extraits ont un effet significatif avec les concentrations : 50 ; 100 et 150 mg/ml.

La **figure 39** montre le taux d'inhibition des extraits alcooliques en fonction de la concentration à **100 mg/ml**, on remarque qu'il y a un effet antifongique. L'effet le plus élevé étant marqué dans l'extrait MeOH avec un taux d'inhibition de **10,52%**, suivi de l'extrait CHCl₃ qui a également montré une activité antifongique importante avec un taux d'inhibition de **8,94%**. On remarque que l'extrait AcOEt présente l'activité la plus faible avec un taux d'inhibition de **2,10 %**.

Les résultats qu'on a obtenus dans l'étude quantitative et qualitative précédente indiquent que notre plante Cistaceae riche en métabolites secondaires en quantités importantes tels que les flavonoïdes, les saponines, les tanins, les alcaloïdes, les terpènes, les stérols et anthraquinones. Des études antérieures ont montré que les terpènes, les stérols et les composés phénoliques se sont avérés être deux types de métabolites secondaires qui

forment des agents chimiques de contrôle contre les agents pathogènes tels que les bactéries et les champignons [166]. D'autres ont prouvés que les tanins et les flavonoïdes sont connus pour inhiber la croissance de nombreux micro-organismes, y compris les bactéries et les champignons [167]. On trouve également dans la littérature que les anthraquinones ont notamment des propriétés antifongiques [168].

Conclusion

L'intérêt de l'étude des plantes médicinales a augmenté vu de leurs utilisations dans le traitement de nombreuses maladies, car les plantes médicinales sont une pharmacie naturelle des substances bioactives, utilisés pour traiter naturellement toute une variété de maladies. Elles contiennent des métabolites secondaires avec des effets biologiques différents. En comparaison aux médicaments qui contiennent des substances actives produites chimiquement en laboratoire et qui peuvent être nocives et parfois agressifs sur notre corps.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à effectuer des travaux d'étude phytochimique et biologique d'*Helianthemum* appartenant à la famille des Cistaceae, en commençant par des analyses qualitatives et quantitatives jusqu'à l'étude de l'activité biologique.

Sur le plan phytochimique, les résultats montrent une composition riche et variée en métabolites secondaires tel que les flavonoïdes, les tannins et les alcaloïdes, saponosides, les terpènes, les stérols et les anthraquinones.

L'analyse quantitative des phénols totaux et des flavonoïdes nous a permis de confirmer que notre plante contient des quantités importantes en composés phénoliques et flavonoides.

La capacité anti-radicalaire des extraits CHCl₃, AcOEt et MeOH de notre plante a été déterminée par la méthode ABTS dans laquelle les résultats montrent que ces extraits ont une activité significative, donc ces plantes contiennent des molécules appelées agents antioxydants.

Au cours de cette étude nous avons réalisé deux tests antimicrobien et fongique vis-à-vis deux souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*) et la souche fongique (*fusarium oxysporum*). Les résultats de ces activités montrent clairement que les substances naturelles sont capables d'inhiber la croissance bactérienne et fongique.

Au final, tous ces résultats ont ouvert la perspective de l'utilisation de cette plante pour diverses utilisations et ce n'est que la première étape dans le domaine de la recherche sur substances biologiquement actives d'origine naturelle. Des tests supplémentaires seront nécessaires pour pouvoir confirmer les activités mises en évidence.

Références

Bibliographiques

Références Bibliographiques

- [1] Boudjouref., M. (2018). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Thèse de doctorat.
- [2] Bahorun., T. 1997. Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. AMAS. Food and Agriculture Research Council, Réduit, Mauritius, 83-94.
- [3] Ouedraogo., S. Yoda., J. Traore., T. K., Nitiema., M. Sombie., B. C. Diawara., H. Z. Semde., R. (2021). Production de matières premières et fabrication des médicaments à base de plantes médicinales. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 15(2) : 750-772.
- [4] Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E. (2012). *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Elsevier Health Sciences.
- [5] Mills, S., Bone, K. (2013). *Principles and Practice of Phytotherapy : Modern Herbal Medicine*
- [6] APG IV. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants : APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1) : 1-20.
- [7] Heywood, V. H., Brummitt, R. K., Culham, A., Seberg, O. (2007). *Flowering Plant Families of the World*. Eds. V. H. Heywood, R. K. Brummitt, A. Culham, & O. Seberg. Firefly Books.
- [8] Quézel, P., Barbero, M. (1996). *Méditerranée : Écologie et biogéographie des paysages*. Centre National de la Recherche Scientifique.
- [9] Raven, P. H., Evert, R. F., Eichhorn, S. E. (2005). *Biologie végétale*. De Boeck Université.
- [10] Arroyo, J., Milla, R., Delgado, J. D., Lumaret, R. (2010). The importance of Cistaceae as a resource for biodiversity. *Annals of Botany*, 105(1) : 13-19.
- [11] <https://www.jardiner-malin.fr/fiche/heliantheme-culture-entretien.html> (consulté le 20/05/2023)
- [12] <https://jardinage.ooreka.fr/plante/voir/172/ciste> (consulté le 20/05/2023)

Références Bibliographiques

- [13] https://www.florealpes.com/fiche_fumanaericoidesvera.php (consulté le 20/05/2023)
- [14] APG IV (2016). "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants : APG IV". *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181 (1) : 1–20.
- [15] Sytsma KJ, Morawetz J, Pires JC, Nepokroeff M, Conti E, Zjhra ML, Hall JC, Chase MW. (2002). "Urticalean rosids : circumscription, Rosid ancestry, and phylogenetics based on rbcL, trnL-F, and ndhF sequences". *American Journal of Botany*, 89 (9) : 1531–1546.
- [16] Chase MW, Soltis DE, Soltis PS, Rudall PJ, Fay MF, Hahn WH, Sullivan S, Joseph J, Molvray M, Kores PJ, Givnish TJ, Sytsma KJ. (2000). "Higher-level systematics of the eudicots : Malpighiales". In Wilson KL, Morrison DA. *Monocots and dicots : Systematics of the complex of flowering plants*, 371–393.
- [17] Burret, M., Gautier, L., Savolainen., V. (2020). A phylogenomic framework for Cistaceae (Malvales) uncovers hidden diversification shifts and underexplored sister clades. *American Journal of Botany*, 107 : 1–17.
- [18] Stevens, PF. (2001). Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012 [and more or less continuously updated since]. Consulté le 5 avril 2023, à l'adresse <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- [19] Médail, F., Quézel, P. (1997) Biodiversity Hotspots in the Mediterranean Basin : Setting Global Conservation Priorities. *Conservation Biology*, 11(6) : 1314-1330.
- [20] Govaerts, R., Sobral, M., Ashton, P., Barrie, F., Holst, B.K., Landrum, L.L., Lughadha, E.N., Matsumoto, K., Nicolson, D.H. (2013). World Checklist of Cistaceae. *Kew Bulletin*, 68(1) : 1-31
- [21] Wu, T. L., Zhou, L. H., Hong, D. Y. (2008). *Flora of China*. Vol. 11. Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, 260-273.
- [22] Baum, B. R. (2010). "Cistaceae." *Flora of North America*, (7) : 197-205.
- [23] Davis, P. H. (1978). "Cistaceae." *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, (7) : 50-100.

Références Bibliographiques

- [24] Hejda, M., Kucera, P., Lososova, Z., Mandak, B. (2016). Cistaceae in Cultivation. *Acta Universitatis Agriculturae and Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 64(4) : 1281-1290.
- [25] APG IV. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants : APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1) : 1-20.
- [26] Quézel, P., Santa, S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.
- [27] Contandriopoulos, J., Quézel, P. (1966). Les Cistacées du Liban.
- [28] Valdés, B., Rejdali, M., Achhal El Kadmiri, A., Jury, J. L., Montserrat, J. M. (2002). Checklist of vascular plants of N Morocco with identification keys.
- [29] Flora of North America Editorial Committee (ed.) (1993). *Flora of North America North of Mexico*.
- [30] Sorrie, B. A., Weakley, A. S. (2001). A classification of the vegetation of the Granite Outcrops and Barrens of the Piedmont and Middle Atlantic Regions.
- [31] Quézel, P., Santa, S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.
- [32] Zuloaga, F. O., Morrone, O., Belgrano, M. J. (2008). *Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur*. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis
- [33] Gómez-Caravaca, A. M., Verardo, V., Toselli, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2016). Health effects and bioactive components of the Mediterranean diet. In *Mediterranean Diet*. Springer, 47-65
- [34] Llorent-Martínez EJ., Ortega-Barrales P., Zengin G., Pérez G., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. (2017). Antioxidant and enzyme inhibitory activity of *Cistus ladanifer* phenolic-rich extracts : potential application as natural anti-tyrosinase and anti-acetylcholinesterase agents. *Industrial Crops and Products*, 108 : 698-707.

- [35] Della Loggia R., Tubaro A., Sosa S., Carrega G., Valerio L., Manzini S. (1987). Anti-inflammatory activity of benzopyrones that are inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase. *Agents and Actions*, 21(3-4) :194-197.
- [36] Jiménez-Sánchez C., Lozano-Sánchez J., Aguilera-Sáez LM., Gómez-Serranillos MP., Palomo E., Arroyo-Morales M. (2015). Polyphenol-enriched fractions from *Cistus salviifolius* : potential use as nutraceuticals, functional ingredients or natural preservatives. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1) : 628-634.
- [37] Bruni R., Medici A., Guerrini A., Pistelli L., Tomi F., Tyagi AK. (2004). Chemical composition and antimicrobial activity of *Fumana thymifolia* (L.) Spach essential oil and its components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(13) : 4477-4481.
- [38] Vlaykova T., Nedialkov P., Nikolov S., Manolov I., Kolarov I. (1996). Antitumor activity of flavonoids from *Halimium halimifolium* (L.) Willd. (Cistaceae). *Pharmazie*, 51(7) : 525-527.
- [39] Ghiulai R., Ciocarlan N., Draghici C., Ungureanu C., Negoita V., Ichim MC., Toma VA. (2015). Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative activities of *Helianthemum kahiricum* (Cistaceae). *Natural Product Research*, 29(18) : 1732-1735.
- [40] Pardo-de-Santayana, M., Tardío, J., Morales, R. (2006). The gathering and consumption of *Cistus ladanifer* L. leaves in the ethnoveterinary medicine of Castilla-La Mancha (Spain) : a century long tradition. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2(1) : 1-11.
- [41] Bennani-Kabchi N., Moutia M. (2006). Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). *Journal of Ethnopharmacology*, 106(2) : 241-6.
- [42] Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Calhella, R.C., Heleno, S.A., Martins, A., Queiroz, M.J.R.P. (2015). Chemical composition and biological activities of *Cistus salviifolius* herb infusion. *Industrial Crops and Products*, 68 : 38-45.
- [43] Loizzo MR., Tundis R., Menichini F., Conforti F., Bonesi M., Saab AM., Statti GA., Menichini F., *Cistus villosus* L. (2007). From Monti Sicani area (Sicily): ethnopharmacology, chemical composition and biological activities of a traditional medicinal plant of Mediterranean area. *Journal of ethnopharmacology*, 112(3) : 590-599.

Références Bibliographiques

- [44] Albayrak, S., Aksoy, A., Saglam, E., Sahan, Y. (2016). Phytochemical analysis of Cistaceae family : A review. *Journal of Herbal Medicine*, 6(3) : 147-157.
- [45] Pereira, OR., Silva, AM., Domingues, M. R., Cardoso, SM. (2016). Phytochemical and biological properties of Cistaceae family : a review. *Industrial Crops and Products*, 83 : 438-448.
- [46] Pereira, OR., Silva, AM., Domingues, MR., Cardoso, S. M. (2016). Phytochemical and biological properties of Cistaceae family : a review. *Industrial Crops and Products*, 83 : 438-448.
- [47] Pereira, OR., Silva, AM., Domingues, MR., Cardoso, SM. (2016). Phytochemical and biological properties of Cistaceae family : a review. *Industrial Crops and Products*, 83 : 438-448.
- [48] Albayrak, S., Aksoy, A., Saglam, E., Sahan, Y. (2016). Phytochemical analysis of Cistaceae family : A review. *Journal of Herbal Medicine*, 6(3) : 147-157.
- [49] Chahdoura, H., Zoghalmi, N., Maazoun, S., Flamini, G. (2020). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from five Cistaceae species growing wild in Tunisia. *Natural product research*, 34(4) : 547-551.
- [50] Liu, S., Li, X., Li, D. (2019). Chemical constituents and pharmacological activities of Cistaceae plants. *Journal of ethnopharmacology*, 241 : 111956.
- [51] Carvalho, M., Ferreira, PJ., Mendes, VS., Silva, RF., Domingues, VF. (2016). Cistaceae plant family : a source of bioactive secondary metabolites. *Phytochemistry reviews*, 15(3) : 581-611.
- [52] Bounatirou, S., Sari, MA., Lacoste, J., Bradesi, P. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Halimium halimifolium* (Cistaceae). *Food chemistry*, 100(2) : 774-778.
- [53] Abreu, PM., Costa, EM., Carvalho, AM., Ramos, AI. (2010). Chemical composition of the essential oil from *Tuberaria lignosa* (Sweet) Samp. Subsp. *Pungens* (Ball) Tutin and antioxidant and cytotoxic activities. *Journal of agricultural and food chemistry* : 58(2) : 668-673.

Références Bibliographiques

- [54] Mulas, M., Tramonti, M., Delogu, G., Pintus, F., Era, B. (2010). Lignans and flavonoids from *Fumana ericoides* subsp. *Ericoides*. *Phytochemistry Letters*, 3(1) : 26-29.
- [55] Machado, DG., Neves, BC., Silva, CP., Batista, LR., Machado, TB. (2018). Phytochemical and biological evaluation of *Helianthemum glomeratum* and *Helianthemum crispum*. *Natural product research*, 32(2) : 152-155.
- [56] Pereira, OR., Silva, AM., Domingues, MR., Cardoso, SM. (2016). Phytochemical and biological properties of Cistaceae family : a review. *Industrial Crops and Products*, 83 : 438-448.
- [57] Agulló., Pérez-Bañón., Crespo., Juan. (2015). Genetic diversity and differentiation in narrow versus widespread taxa of *Helianthemum* (Cistaceae) in a hotspot : The role of geographic range, habitat, and reproductive traits First published : 05 March 2019.
- [58] Aparicio, A., Martín-Hernanz, S., Parejo-Farnés, C., Arroyo, J., Lavergne, S., Yesilyurt, EB., Zhang, ML. (2017). Phylogenetic reconstruction of the genus *Helianthemum* (Cistaceae) using plastid and nuclear DNA-sequences : systematic and evolutionary inferences. *Taxon*, 66 : 868–885.
- [59] Heywood. (1968). A phylogenetic hypothesis for *Helianthemum* (Cistaceae) in the Iberian Peninsula Article. *Botanica Complutensis*.
- [60] [IPNI. International Plant Names Index. Published on the Internet http://www.ipni.org](http://www.ipni.org), [The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries and Australian National Botanic Gardens.](http://www.kew.org) (consulté le 20/05/ 2023).
- [61] <https://www.senteursduquercy.com/helianthemum-heliantheme/296-helianthemum-apenninum-heliantheme-des-apennins.html> (consulté le 20/05/ 2023).
- [62]<http://atlassahara.org/Cistaceae/Helianthemum%20lippii/Helianthemum%20lippii.html?cat=Cistaceae> (consulté le 20/05/ 2023).
- [63] Herrera J. (1992). Flower variation and breeding system in the Cistaceae. *Plant Syst. Evol*, 179 : 245 – 255.
- [64] Aparicio, A., Martín-Hernanz, S., Parejo-Farnés, C., Arroyo, J., Lavergne, S., Yesilyurt, EB., Zhang, ML., Rubio, E., Albaladejo, RG. (2017). Phylogenetic

Références Bibliographiques

reconstruction of the genus *Helianthemum* (Cistaceae) using plastid and nuclear DNA-sequences : Systematic and evolutionary inferences.

[65] Polina A., Volkova., Ivan A., Schanzer., Soubani, E., Ilya G., Meschersky., Widén, B. (2016). *Plant Systematics and Evolution* volume, 302 : 781–794

[66] Ben Abdelaziz SI., Saeed MA., Benleulmi AZ. (2015). Social media effect on sustainable products purchase. In : Kersten W, Blecker T, Ringle CM (eds) *Innovations and strategies for logistics and supply chains : technologies, business models and risk management*, 1st edn. Epubli GmbH, Berlin, 64–93.

[67] Aparicio., Martín-Hernanz. (2017). A phylogenetic hypothesis for *Helianthemum* (Cistaceae) in the Iberian Peninsula. *Botanica Complutensis*.

[68] Calzada., Alanis. (2007). Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum* taxa (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain.

[69] Verde, A., Rivera, D., Fajardo, J., Obón, C., Cebrián, F. (2008). *Guía de las plantas medicinales de Castilla-La Mancha : y otros recursos medicinales de uso tradicional*. Altaban Ediciones Albacete´.

[70] F. Clazada, R., Lupéz, M., Meckes, R., Rivera, C. (1995). Flavonoids of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. *International Journal of Pharmacognosy*, 33 : 351-352.

[71] A. R. Moraga, J. Argandona, B. Mota, J. Pérez, A. Verde, J. Fajardo, J. G. Navarro, R. C. Lopez, O. Ahrazem, L. G. Gomez. (2013). Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum* taxa (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain. *Journal of Ethnopharmacology*, 148 : 287-296.

[72] El Babili, F., Bouajila, J., Souchard, J. P., Bertrand, C., Bellvert, F., Fouraste, I., Moulis, C. (2011). *Helianthemum italicum* (Roth) G. Don from Tunisia : comparative study of its essential oil and evaluation of its biological activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1) : 256-261.

Références Bibliographiques

- [73] Bousselela, H., Dahamna, S., Moussaoui, A., Benabdallah, H., Tabti, B., Muselli, A. (2020). Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils from Four Helianthemum Species Collected from Algeria. *Chemistry & Biodiversity*, 17(2).
- [74] Sertel, S., Ersöz, T., Baykan, S. (2008). Chemical composition of the essential oils of Helianthemum sessiliflorum Pers. and Helianthemum nummularium (L.) Mill. Subsp. Grandiflorum (Scop.) Nyman from Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 20(5) : 425-428.
- [75] Barroso, FG., Martmhz, TF., Paz, T., Para, A., Alarcon, FJ. (2001). Tannin content of grazing plants of southern Spanish arid lands. *Journal of Arid Environments*, 49 : 301-314.
- [76] Alzetrini, AA., Mohamed, SA., Alsabri, SJ., Elkilany, AA., Sherif, FM., Gbaj, AM. (2009). Helianthemum virgatum has analgesic-like effect in Mice. *Libyan Journal of Medical research*, 6 : 14-15.
- [77] Gonnet, M. (1968). Propriétés phytoinhibitrices de quelques substances extraites de la colonie d'abeilles (*Apis mellifica* L.). *Anne Abeille*, 11 : 41-47.
- [78] Rivera, D., Obon, C., Inocencio, C., Heinrich, M., Verde, A., Fajardo, J., Llorach, R. (2005). The ethnobotanical study of local Mediterranean food plants as medicinal resources in southern Spain. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 56 : 97-114.
- [79] Barbosa, E., Calzada, F., Campos, R. (2006). Antigiardial activity of methanolic extracts from Helianthemum glomeratum Lag. And Rubus coriifolius Foche in suckling mice CD-1. *Journal of Ethnopharmacology*, 108 : 395-397.
- [80] Abderrazak M., Joël, R. (2007). *La botanique de A à Z*. Ed. Dunod. Paris, 177.
- [81] Newman, DJ., Cragg, GM. (2012). Naturel products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 of 2010. *Journal Natural Product*, 75 : 311-335.
- [82] Raven, H., Evert, RF., Eichhorn, SE. (2000). *Biologie végétale* (6^é èd). Paris.
- [83] Merghem, R. (2009). *Eléments de biochimie végétale* (16). Ed, Bahaeddine. Algérie.

Références Bibliographiques

- [84] Panche, AN., Diwan, AD., Chandra, SR. (2016). Flavonoids : an overview. *Journal of nutritional science*, 5 : 47
- [85] Macheix, JJ. (1996). Les composés phénoliques des végétaux : quelles perspectives à la fin du XXème siècle ? *Acta botanica gallica*, 143(6) : 473-479.
- [86] Vermerris, W., Nicholson, R. (2006). *Phenolic compound biochemistry*. Ed, Springer : U.S.A.
- [87] King A., Young G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American dietetic association*, 99 : 213-218.
- [88] Baudin, B. (2020). Stress oxydant et protections antioxydantes. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2020(522) : 22-30.
- [89] <https://www.shutterstock.com/fr/search/antioxydant> (consulté le 19/05/2023)
- [90] <https://nutriandco.com/fr/pages/antioxydants> (consulté le 19/05/2023)
- [91] Miller, JK., Brzezinska-Slebodzinska, E., Madsen, FC. (1993). Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J. Dairy. Sci*, 76 : 2812–2823.
- [92] Lykkesfeldt, J., Svendsen, O. (2007). Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet. J*, 173 : 502–511.
- [93] Halliwell, B., Gutteridge, JM. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5th edn Oxford, online edn, Oxford Academic.
- [94] Démarchez, M. (2012). *Le stress oxydant cutané - [Biologie de la peau]*.
- [95] Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, 215(2) : 213-219.
- [96] Padayatty, SJ., Levine, M. (2016). Vitamin C: The known and the unknown and Goldilocks. *Oral Diseases*, 22(6) : 463-493.
- [97] Tousoulis, D., Antoniadis, C., Vasiliadou, C., Kourtzelis, P., Trikas, A., Marinou, K., Stefanadis, C. (2013). Acute effects of different vitamin C doses on endothelial function, arterial stiffness and aortic wave reflections in healthy individuals. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(22) : 2046-2047.

Références Bibliographiques

- [98] Ashor, A. W., Lara, J., Mathers, J. C., Siervo, M. (2015). Effect of vitamin C supplementation on endothelial function and exercise-induced bronchoconstriction in COPD. *British Journal of Nutrition*, 113(2) : 244-251.
- [99] Traber, MG., Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1) : 4-15.
- [100] Azzi, A., Gysin, R., Kempna, P., Ricciarelli, R. (2004). Vitamin E: Non-antioxidant roles. *Progress in Lipid Research*, 43(2) : 111-133.
- [101] Corti, R., Flammer, AJ. (2013). Vitamin E and cardiovascular diseases. *Cardiovascular Research*, 98(1) : 5-15.
- [102] Meister, A. (1995). Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1271(1) : 35-42.
- [103] <https://www.bing.com> (consulté le 19/05/2023)
- [104] Lu, SC. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5) : 3143-3153.
- [105] Dröge, W., Breitkreutz, R. (2000). Glutathione and immune function. *Proceedings of the Nutrition Society*, 59(4) : 595-600.
- [106] Lushchak, V. I. (2012). Glutathione homeostasis and functions : Potential targets for medical interventions. *Journal of Amino Acids*, 736837.
- [107] <https://www.bing.com>
- [108] Ballatori, N., Krance, SM., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., Hammond, C. L., Zhang, Y. (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biological Chemistry*, 390(3) : 191-214.
- [109] Scalbert, A., Johnson, IT., Saltmarsh, M. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4) : 287-306.
- [110] Cao, G., Prior, RL. (1999). The antioxidant capacity of fruits : A comparison of chemical and cellular assays. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1-2) : 9-19

Références Bibliographiques

- [111] Kumar, S., Pandey, AK., Pandey, AK. (2019). Role of polyphenols in redox homeostasis and cancer prevention. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 8162738.
- [112] Fernández-Panchón, MS., Villano, D., García-Parrilla, MC. (2011). Cardiovascular effects of cocoa flavanols. In C. R. Martin (Ed.), *Cocoa and Health*, 187-205.
- [113] <https://www.bing.com>.
- [114] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols : Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5) : 727-747.
- [115] Stahl, W., Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6) : 345-351.
- [116] Landrum, JT., Bone, RA. (2001). Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1) : 28-40
- [117] Krinsky, NI. (1998). Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(6) : 185-194.
- [118] Johnson, EJ. (2002). The role of carotenoids in human health. *Nutrition in Clinical Care*, 5(2) : 56-65.
- [119] <https://www.bing.com>.
- [120] Elharas, K., Daagare, A., Mesifioui, A., Ouhssine, M. (2013). Activité antibactérienne de l'huile essentielle des inflorescences de *Laurus Nobilis* et *Lavandula Angustifolia*. *Afrique Science : Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 9(2) : 134-141.
- [121] Davies, J., Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3) : 417-433.
- [122] Anonyme. (2003). *Bactériologie*. Université de Pierre et Marie Curie, 122.
- [123] Agence national de sécurité sanitaire : ANSES. (2011). *E. coli entérohémorragiques (EHEC)*, 4.

Références Bibliographiques

- [124] Kaper, JB., Nataro, JP., Mobley, HLT. (2004). Pathogenic escherichia coli. *Microbiologie*, 2 : 123-140
- [125] Konrad, P., Rosato, AE., Grzegorz, W. (2009). Staphylococcus aureus as an infectious agent : overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta biochimica polonica*, 56(4) : 597-612.
- [126] Harris, LG., Foster, SJ., Richards, RG. (2002). An Introduction to Staphylococcus Aureus, And Techniques for Identifying and Quantifying S. Aureus adhesins in relation to adhesion to Biomaterials. *European Cells and Materials*, 4(147) : 39-60.
- [127] Cowan, MM. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4) : 564-582.
- [128] Pappas, PG., Kauffman, CA., Andes, DR., Clancy, CJ., Marr, KA., Ostrosky-Zeichner, L., Walsh, TJ. (2016). Clinical practice guideline for the management of candidiasis : update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 62(4) : 1-50
- [129] Messiaen, C M., Cassini, R. (1968). Recherche sur les Fusarioses. La systématique des Fusarium. *Ann. Épiphyties*, 19 : 87-454.
- [130] Messiaen CM., Blancard D., Rouxel F., Lafon, R. (1991). Les maladies des plantes maraichères. 3e.Ed. INRA, 183-194 : 198-201.
- [131] Nelson, PE. (1981). Life cycle and epidemiology of Fusarium oxysporum. In: Fungal wilt diseases of plants. (Mace, M.E., Bell, AA., Beckman, CH. editors), academic press ,New York, 51-80.
- [132] <https://www.google.com/maps/place/B%C3%A9char/@31.614281,-2.5403198,9z/data=!3m1!4b1!4m6!3m5!1s0xd855f5061ac9881:0x97206fd4229749af!8m2!3d31.6238098!4d-2.2162443!16zL20vMGI5NWdn> (consulté le 13/05/2023)
- [133] Silverstein, RM., Webster, FX., Kiemle, DJ. (2014). Spectrometric Identification of Organic Compounds. 8th edition, Wiley.
- [134] Amarowicz R., Troszynska A., Shahidi, F. (2005). Antioxidant activity of almond seed extract and its fractions. *J food lipids*, 12 : 344-358.

Références Bibliographiques

- [135] Franzyk, H., Jensen, S.R., Rasmussen, JH. (1998). Synthesis of Antirrhinolide, a New Lactone from Antirrhinum Majuseur. *Journal Org Chem*, 3652370.
- [136] Karumi, Y., Onyeyili, P.A., Ogugbuaja, VO. (2004). Identification of active principales of balsamina (Balsam apple) leaf extract. *Journal Medicine Sciences*, 4 : 179-182.
- [137] Benzeggouta, N. (2015). Evaluation des effets biologiques des extraits aqueux de plantes médicinales seules et combinées. Thèse de doctorat. Université Mentouri Constantine.
- [138] Yves-Alain, B., Janat, A., Mamyrbekova, B., Boua, B., Fézan, HT., Ehouan, E. (2007). Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinibenthiana* (Baill.) Herend. *AndZarucchi (Caesalpinaceae)*, *Sciences & Nature*, 4(2) : 217 – 225.
- [139] Karumi, Y., Onyeyili, PA., Ogugbuaja, VO. (2004). Identification of active principals of balsamina (Balsam apple) leaf extract. *Journal Medicine Sciences*, 4 : 179-182.
- [140] Majob, F., Kamalinejab, M., Ghaderi, N., Vahidipour, HR. (2003). Phytochemical screening of some species of Iranien plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2 : 77-82.
- [141] Kablan, BJ., Adiko, M., Abrogoua, DP. (2008). Évaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de *Kalanchoe crenata* et de *Manotes longiflora* utilisées dans les ophtalmies en Côte d'Ivoire. *Phytothérapie*, 6 : 282-288.
- [142] Khan, AM., Qureshi, RA., Ullah, F., Gilani, SA., Nosheen, A., Sahreen, S., Murad, W. (2011). Phytochemical analysis of selected medicinal plants of Margalla Hills and surroundings. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 : 6055-6060.
- [143] Thitilertdecha, N., Teerawutgulrag, A., Kilburn, JD., Rakariyatham, N. (2011). Screening of anthraquinones and flavonoids in *Cassia siamea* flower extract and its antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2059-2067.
- [144] Fadimba, MA., Raji, A., Ibrahim, MA., Ibrahim, MH., Aliero, BL. (2014). Phytochemical screening and protein profiling of *Moringa oleifera* Lam. Leaves from Northern Nigeria. *International Journal of Biosciences*, 28-37.

Références Bibliographiques

- [145] Boizot, N., Charpentier, JP. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier.
- [146] Ribéreau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris, 254.
- [147] Ghazi F., Sahraoui S. (2005). Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de dattes communes : Tantbouchet et Hamraia. Mémoire d'Ingénieur. Institute national d'agronomie. Alger, 81.
- [148] Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Vasseur J., Gazin JC., Pinkas M., Luyckx M., Gazin M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim-Forsch/drug*, 1-6.
- [149] Roginsky, V., lissi, EA. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food chemistry*, 92(2) : 235-254.
- [150] Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents : an overview. *Archives of toxicology*, 86(3) : 345-391.
- [151] Stämpfli, R., Brühwiler, P., Mourad., S. Verdejo, R., Shaffer, M. (1999). Antioxidant Activity Applying An Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic Biol Med*, 26(51) : 1231-7.
- [152] Bio-Rad. (2010). Boulevard Raymond Poincaré 92430 Marnes-la-Coquette France, 4.
- [153] Biokar-diagnostics. (2015). Guide d'utilisation des milieux : Préparation, utilisation et stockage. Rue des Quarante Mines. ZAC De Ther-Allonne-B. P, 10245 : 29.
- [154] Meddour, A., Yahia, M., Benkiki, N., et Ayachi, A. (2013). Etude de l'activité antioxydant et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du capparispinosa l. *Lebanese Science Journal*, 14(1) : 49-60.
- [155] Centre De Recherche De Biotechnologie, Université 2 Abdelhamid Mehri. (2023).

Références Bibliographiques

- [156] Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*, 331 : 372-379.
- [157] Ghedadba N., Hambaba L., Aberkane M.C., Oueld-Mokhtar S.M., Ferchan N., Bousselsela H. (2014). Évaluation de l'activité hémostatique in vitro de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubiumvulgare* L. *Algerian Journal of Natural Products*, 2(2) : 64- 74.
- [158] Marco, J.G. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 45 : 594.
- [159] Mohammedi, Z., Atik, F. (2011). Impact of solvent extraction type on total polyphénols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) Karst. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(1) : 609-615.
- [160] Asnaashari, M., Tajik, R., Khodaparast, MHH. (2015). Antioxidant activity of raspberry (*Rubus fruticosus*) leaves extract and its effect on oxidative stability of sunflower oil. *Journal of food science and technology*, 52 : 5180-5187.
- [161] Belaouira, R., Marchioni, E., Benayache, F., Benayache, S. (2018). On-line screening and identification of polyphenolic antioxidant compounds of *Convolvulus trabutianus*. *Natural Product Research*, 1478-6419.
- [162] Hassan, SW., Umar, RA., Lawal, M., Biblis, LS., Muhammed, BY., Dabai YU. (2006). Evaluation of antibacterial activity and phyto chemical analysis of root extracts of *Boxia angustifolia*. *African Journal of Biotechnology*, 5(18) : 1602-07.
- [163] Sajdiç, O. (2003). Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *Lebensm. -Wiss. U.-Technol*, 36 : 467-473.
- [164] Ghedadba, N., Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkane, MC., Bousselsela, H., Oueld-Mokhtar, SM. (2015). Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*, 13(2) : 118-129.
- [165] Cushnie TPT, Lamb AJ. (2011) Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoïds. *Internat J Antimicrob Agents*, 1–9.

Références Bibliographiques

[166] Ultee, A., Bennink, MHJ., Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 4 : 1561-1568

[167] Sepúlveda, L., Ascacio, A., Rodríguez-Herrera, R., Aguilera-Carbó, A., Aguilar, C. N. (2011). Ellagic acid : Biological properties and *European Scientific Journal* March, 15(9) : 1857–7881.

[168] Bajwa, R., Shafique, S. (2007). Appraisal of antifungal activity of *Aloe vera*. *Mycopathology*, 5 (1) : 5-9.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

Etude phytochimique et activités biologiques d'une plante saharienne de la famille des Cistaceae

Résumé :

La plante qu'on va étudier dans ce manuscrit appartient au genre d'Helianthemum de la famille des Cistaceae. C'est une plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle.

Les travaux qu'on va présenter dans ce mémoire ont pour objectif l'étude phytochimie (extraction par ultrasons, screening phytochimique, dosage des flavonoïdes et polyphénols et le test CCM). On va réaliser aussi une étude pharmacologique (activité antioxydante, antibactérienne et antifongique).

Les tests de screening phytochimique ont révélé la présence de plusieurs métabolites secondaires dans notre plante tel que : les flavonoïdes, les saponosides, les sucres, les tanins, les alcaloïdes, les terpènes, les stérols et les anthraquinones.

La teneur en polyphénols a montré que l'extrait MeOH présente la plus forte concentration en polyphénols avec 282,4 µg EAG/mg de PS. La teneur en flavonoïdes totaux montre également que cet extrait a enregistré la valeur la plus élevée avec 853,01 µg EQ/mg de PS.

Les résultats de l'activité antioxydante par le test ABTS ont indiqué que l'extrait MeOH présente l'activité la plus élevée avec une IC50 de 11,42±0,70 µg/ml.

L'évaluation de l'activité antibactérienne révèle que l'extrait MeOH a été le plus puissant sur les deux types de souches bactériennes testées : E. Coli et S. aureus avec une zone d'inhibition de 11 et 12 mm respectivement avec la concentration de 50 mg/ml d'extrait.

Les résultats obtenus avec le test antifongique ont révélé une activité considérable des trois extraits de plante contre la souche fongique fusarium oxysporum. On distingue que l'extrait MeOH présente toujours l'activité la plus élevée à la concentration de 100 mg/ml avec un taux d'inhibition de 10,52%.

Mot clés : Cistaceae, Helianthemum, les flavonoïdes, activité antioxydante, activité antibactérienne, activité antifongique.

Membre du jury :

Président : Dr. Meziani Meriem (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadreur : Dr. Belaouira Randa (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur : Dr. Mennana Imen (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Présentée par : Benkahoul Lotfi
Chaib Nousseiba
Mekhloufi Djihene

Année universitaire :
2022-2023