



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

قسم : الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية والخلوية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Contribution à l'étude des potentialités antimicrobiennes de *Globularia alypum L.*

Présenté par : DARBANE Soulef

Le : 28/06/2025

OUADFEL Nada

Jury d'évaluation :

Président du jury : BOUKHALFA H. (MCB - UConstantine 1 FM).

Rapporteur : KACEM CHAOUCHE N. (Professeur- UConstantine 1 FM).

Co rapporteur : MANSOUR M. (Docteur La MyBAM - UConstantine 1 FM).

Examinateur : MOUSSAOUI S. (MCB - UConstantine 1 FM).

Année universitaire
2024 - 2025

Remerciements

Nous remercions avant tout Allah le Tout-Puissant de nous avoir dotés de la volonté et des capacités pour finaliser ce travail. Sa bienveillance a été notre plus grand soutien.

Nous adressons nos vifs remerciements à Monsieur KACEM CHAOUCHE Noreddine, Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Frères Mentouri Constantine 1, pour sa patience dans les moments de doute, pour son écoute qui nous a permis d'avancer, et pour ses conseils qui ont toujours éclairé notre réflexion.

Nos remerciements sont adressés également aux membres du jury : BOUKHALFA.H (MCB) pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury et MOUSAOUI.S (MCB) pour nous avoir fait l'honneur d'examiner ce mémoire.

Nos sincères remerciements à Monsieur MANSOUR Mehdi Membre de LaMYBAM, pour ses efforts, son soutien, ses conseils et toute l'attention qu'il nous a portée.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à Monsieur DJEKKOUN Abdelhamid, Directeur du Centre de Recherche en Sciences Pharmaceutiques (CRSP), et aux ingénieurs Madame LABED Amira, Monsieur YOUSFI Bilel, et Monsieur TALHI Hocine Zakaria, dont la participation a été essentielle à l'accomplissement de ce travail.

Nous remercions chaleureusement Madame BELLACHIA Afaf, doctorante, pour ses précieux conseils, son orientation et son soutien constant.

Un grand merci à Madame SAMIRA l'ingénieur du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMYBAM) pour son aide et son soutien technique.

Nous exprimons également notre gratitude à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail, en premier lieu, à mes chers parents, les plus précieux à mon cœur. Ils représentent pour moi un modèle d'amour, de tendresse, d'affection, de sacrifices... et m'ont aidée à devenir ce que je suis. Que Dieu les garde.

À mes très chères sœurs, pour leur présence et leurs encouragements constants.

À toute ma famille.

À mes amies, chacune à son nom.

À Nada, ma binôme, pour son engagement, son soutien constant et la belle collaboration tout au long de ce travail.

À tous ceux qui ont consacré leur temps, leur patience et leurs conseils, surtout dans les moments difficiles.

Soulef ❤

Dédicaces

À mes piliers, ma source inépuisable de force et d'amour :

À ma mère et mon père, pour leur soutien inconditionnel, leurs sacrifices et leurs encouragements constants qui ont illuminé mon parcours.

À ma chère grand-mère Warda, dont la tendresse et les prières ont bercé mon cœur et apaisé mes doutes. Ta présence douce est un trésor silencieux dans ma vie.

À ma sœur Khaoula, ma confidente et mon amie, dont la présence m'est précieuse à chaque instant, ainsi qu'à mes cousines, dont l'affection et le soutien illuminent ma vie.

À mes frères, Khalil et Abdou, pour leur présence et les moments de partage qui ont ponctué mon parcours.

À mes tantes et oncles, pour leur intérêt et leurs encouragements.

À Mes copines, pour leurs aides morales et leurs encouragements

À ma binôme Soulef avec qui j'ai partagé les joies et les difficultés au suivi de notre travail.

À toute personne qui occupe une place dans mon cœur

Nada ♥

Liste des abréviations

ATCC :	American Type Culture Collection
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
E Eth :	Extrait Ethanolique
E Hx :	Extrait Hexanique
GN :	Gélose nutritive
MH :	Gélose Mueller-Hinton
NCCLS :	National Committee for Clinical Laboratory Standard
OGA :	Oxytetracycline Glucose Agar
O.M.S :	Organisation mondiale de la santé
SM :	Solution Mère
YPG :	Yeast-extract-Peptone-Glucose-Agar

Liste des figures

Figure 1 : Photographie de l'aspect morphologique de <i>Globularia alypum</i> (Bock., 2013).....	5
Figure 2 : Répartition mondiale de la plante <i>G. alypum L.</i> (Rameau <i>et al.</i> , 2008).....	6
Figure 3 : Classification schématique des polyphénols (Beconcini <i>et al.</i> , 2020).	7
Figure 4 : Localisation de la willaya de Béjaïa en Algérie, site de récolte de <i>G. alypum</i>	16
Figure 5 : Poudres végétales de <i>G. alypum</i> : (A) fleurs ; (B) feuilles.	17
Figure 6 : (A) : Evaporateur rotatif ; (B) : Lyophilisateur	18
Figure 7 : Produits lyophilisés : (A) fleurs ; (B) feuilles	19
Figure 8 : Extraction par Soxhlet	20
Figure 9 : Plan général de la partie expérimental.....	21
Figure 10 : Présentation graphique des rendements d'extrait Eth et Hx des feuilles.....	27
Figure 11 : Extraits obtenus après évaporation : (A) extrait de macération ; (B) extrait de soxhlet.....	28
Figure 12 : Présentation graphique des rendements d'extrait Eth et Hx des fleurs.	29
Figure 13 : Activité antimicrobienne de l'extrait hydro-éthanoliques par la technique de diffusion sur gélose par disques : (A) <i>E. coli</i> ; (B) <i>S. aureus</i> ; (C) <i>B. subtilis subsp .spizizenii</i> ; (D) <i>C. albicans</i> ; (E) <i>Fusarium sp.</i>	31
Figure 14 : Activité antimicrobienne de l'extrait hydro-éthanolique des feuilles de <i>G. alypum</i> par la technique des trous : (A) <i>E. coli</i> ; (B) <i>B. subtilis subsp .spizizenii</i> ; (C) <i>S. aureus</i> ; (D) <i>C. albicans</i> ; (E) <i>Fusarium sp.</i>	34
Figure 15 : Activité antimicrobienne de l'extrait hydro-éthanolique des fleurs de <i>G. alypum</i> par la technique des trous : (A) <i>S. aureus</i> ; (B) <i>B. subtilis subsp .spizizenii</i> ; (C) <i>C. albicans</i>	35
Figure 16 : Activité antimicrobienne de l'extrait hexanique par la technique des trous : (A) <i>S. aureus</i> ; (B) <i>B. subtilis subsp .spizizenii</i> ; (C) <i>C. albicans</i>	37
Figure 17 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'extrait hydro-éthanolique de <i>G. alypum</i> sur deux souches : (A) <i>C. albicans</i> ; (B) <i>B. subtilis subsp .pizizenii</i>	38
Figure 18 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait hydro-éthanolique de <i>G. alypum</i> contre <i>S. aureus</i>	39

Liste des tableaux

Tableau 1: Taxonomie de <i>G. alypum L</i> (Bock., 2013).....	5
Tableau 2: Travaux antérieurs consacrés à l'étude de la plante <i>G. alypum L</i>	9
Tableau 3: Préparation des dilutions pour le teste antimicrobienne	23
Tableau 4 : Rendement de l'extraction (feuilles)	27
Tableau 5 : Rendement de l'extraction (fleurs)	29
Tableau 6 : Activité antimicrobienne de l'extrait hydro-éthanolique de <i>G. alypum</i> évaluée par la technique de diffusion sur gélose par disques.	30
Tableau 7 : Activité antimicrobienne de l'extrait hydro-éthanolique de <i>G. alypum</i> évaluée par la technique de diffusion en puits.	33
Tableau 8 : Activité antimicrobienne d'extrait hexanique des feuilles de <i>G. alypum</i> exprimée par les diamètres des zones d'inhibition en mm.	36
Tableau 9: Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait hydro-éthanolique de <i>G. alypum</i> vis-à-vis de <i>B. subtilis subsp. spizizenii</i> , <i>S. aureus</i> et <i>C. albicans</i>	38

Table des matières

Introduction.....	1
1. Revue Bibliographique	3
1.1 Présentation de la plante étudiée.....	3
1.1.1 Description Botanique	3
1.1.2 Genre <i>Globularia</i>	3
1.1.3 <i>Globularia alypum L.</i>	4
1.1.4 Taxonomie et caractères botaniques	4
1.1.5 Position systématique	5
1.1.6 Etymologie	6
1.1.7 Distribution géographique.....	6
1.2 Métabolites secondaires des plantes.....	6
1.2.1 Polyphénols	7
1.2.2 Flavonoïdes	7
1.2.3 Tanins	8
1.3 Activités biologiques de <i>G. alypum L.</i>	8
1.4 Propriétés thérapeutiques de <i>G. alypum</i>	10
1.5 Toxicité de la plante	10
1.6 Activité antibactérienne	10
1.6.1 Généralités.....	10
1.6.2 Bactéries.....	11

1.6.2.1	Bactéries utilisées dans les tests antibactériens.....	11
1.6.3	Mode d'action des agents antibactériens	12
1.6.4	Nature de l'activité antibactérienne	13
1.7	Activité antifongique.....	13
1.7.1	Généralités.....	13
1.7.2	Champignons.....	13
1.7.2.1	Champignons utilisées dans les tests antifongique	14
1.7.3	Mécanisme d'action antifongique	14
2.	Matériel et méthodes.....	16
2.1	Récolte du matériel végétal.....	16
2.2	Etude phytochimique de la plante de l'espèce <i>G. alypum</i>	17
2.2.1	Préparation de la poudre végétale	17
2.2.2	Méthode d'extraction	17
2.2.2.1	Extraction par macération (solide - liquide).....	18
2.2.2.2	Récupération des extraits secs.....	19
2.2.2.3	Extraction au soxhlet (Extraction à chaud).....	19
2.3	Détermination du rendement d'extraction	20
2.4	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne	22
2.4.1	Milieux de culture utilisés	22
2.4.2	Réactivation des souches bactériennes et fongiques	22
2.4.3	Préparation des bactéries.....	22

2.4.4	Préparation de milieu de culture	22
2.4.5	Ensemencement.....	23
2.4.6	Préparation des disques	23
2.4.7	Préparation de l'extraits	23
2.4.8	Préparation des dilutions	23
2.5	La technique de diffusion sur gélose par disques	24
2.6	Technique des puits.....	24
2.7	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	25
2.7.1	Mode opératoire	25
3.	Résultats et discussion.....	27
3.1	Rendement de l'extraction	27
3.2	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des extraits de <i>G. alypum</i>	29
3.2.1	Activité antimicrobienne de l'extrait hydro-éthanolique	30
3.2.1.1	Technique de diffusion sur gélose par disques.....	30
3.2.1.2	Technique des puits.....	33
3.2.2	Activité antimicrobienne de l'extrait hexanique	36
3.3	Détermination de la concentration minimale inhibitrice	37
4.	Conclusion et Perspectives	41
5.	Abstract.....	43
.6	الملخص.....	44

Introduction

Introduction

Depuis l'Antiquité, les plantes médicinales sont reconnues pour leurs vertus thérapeutiques et ont été largement utilisées dans le traitement de diverses pathologies. Bien que la médecine moderne et les médicaments de synthèse aient considérablement progressé et démontré leur efficacité face à de nombreuses affections, une partie de la population continue de recourir aux remèdes traditionnels. Ce choix s'explique notamment par la perception d'effets secondaires moindres associés aux traitements d'origine naturelle (Asraoui *et al.*, 2021).

La propagation généralisée, et souvent excessive, des agents antibactériens a involontairement accéléré l'évolution de souches bactériennes multirésistantes. Ce phénomène représente un défi considérable, rendant la découverte de nouveaux agents bioactifs primordiale pour lutter contre ces bactéries résistantes. À cet égard, les produits naturels issus des plantes offrent une voie particulièrement prometteuse pour le développement de solutions antibactériennes innovantes (Shanab *et al.*, 2021).

L'Algérie, forte d'une biodiversité floristique exceptionnelle, constitue un véritable réservoir phylogénétique, avec près de 4 000 espèces et sous-espèces de plantes vasculaires. Malgré ce potentiel, l'étude de sa flore médicinale reste encore limitée, puisque seulement 146 espèces végétales sont répertoriées comme médicinales (Hamel *et al.*, 2018).

D'après l'OMS, dans plusieurs pays en développement d'Asie, d'Afrique et d'Amérique latine, environ 80 % de la population, notamment en zone rurale, a recours à la médecine traditionnelle. Cela s'explique principalement par sa proximité, son accessibilité financière et, surtout, par l'insuffisance de l'accès aux soins de la médecine moderne (Zeggwagh *et al.*, 2013). Actuellement, environ 25 à 30 % de tous les médicaments disponibles pour le traitement des maladies sont dérivés de produits naturels (issus de plantes, d'animaux, de bactéries ou de champignons), ou sont des dérivés de ces derniers (Nabavi *et al.*, 2015).

Parmi ces plantes médicinales, la plante *Globularia alypum* est sélectionnée dans ce travail. Cette plante est particulièrement intéressante car elle est riche en minéraux et en antioxydants, notamment des composés phénoliques. Elle possède des propriétés anti-inflammatoires, antidiabétiques et antibactériennes, et est également utilisée pour traiter les maladies gastro-intestinales (Khelifi *et al.*, 2011).

A cet effet, l'objectif est d'évaluer l'activité antimicrobienne *in vitro* de *Globularia alypum*. Plusieurs points sont pris en compte pour cette étude en l'occurrence :

- Préparation de deux extraits : un extrait hydro-éthanolique obtenu à partir des feuilles et des fleurs et un extrait hexanique obtenu à partir des feuilles.
- Mise en évidence de l'activité antimicrobienne et ceci par l'utilisation de deux techniques : la technique de diffusion sur gélose par disques et la technique des puits.
- Evaluation quantitative de l'activité antimicrobienne par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).

*Revue
Bibliographique*

1. Revue Bibliographique

1.1 Présentation de la plante étudiée

1.1.1 Description Botanique

Plantes ligneuses telles que les arbustes, les sous-arbrisseaux ou les herbes vivaces. Feuilles simples, disposées en alternance, coriaces et dépourvues de stipules. Généralement, l'inflorescence prend la forme d'un capitule entouré par un involucre, mais elle peut parfois se présenter sous forme d'épi (Poskea). Les fleurs, portées par des bractées, sont zygomorphes ou presque actinomorphes, bisexuées et hypogynes. Le calice présente cinq lobes aigus, tandis que la corolle, sympétale, est généralement bleue et bilabiée. On trouve quatre étamines fixées au tube de la corolle, dont deux plus longues, avec des anthères réniformes à deux loges fusionnées. L'ovaire, supérieur et uniloculaire, contient un ovule anatrophe pendante et est souvent entouré d'un disque ou de glandes. Le fruit, petit et indéhiscent, reste enfermé dans le calice persistant. La graine renferme un embryon allongé et droit, avec un endosperme peu abondant. (Wagenitz, 2004).

1.1.2 Genre *Globularia*

Globularia est un petit genre d'angiospermes comprenant principalement des plantes vivaces à feuillage persistant, parfois des sous-arbrisseaux, typiques des régions chaudes et tempérées d'Europe, en particulier du bassin méditerranéen. Ces espèces se distinguent notamment par leurs fleurs bleues formant des capitules globulaires caractéristiques, souvent terminaux, mais parfois aussi axillaires. Les plantes herbacées du genre présentent des feuilles basales pétiolées, généralement plus longues que celles insérées sur la tige. Ces feuilles, entières (rarement dentées), alternées, obovées ou spatulées, sont dépourvues de stipules. Les premières classifications exhaustives du genre, proposées par Schwarz, distinguaient entre 22 et 25 taxons répartis en neuf sections. Bien que cette structuration ait été révisée par divers auteurs par la suite, la classification actuellement acceptée repose sur huit sections principales — *Lytanthus*, *Polycephalium*, *Carradoria*, *Hellenion*, *Globularia*, *Alypum*, *Empetron* et *Gymnocladium* — définies à partir de critères morphologiques, cytologiques, écologiques et biogéographiques (Hazler *et al.*, 2016).

Le genre *Globularia* (famille : Globulariaceae) englobe des plantes pouvant être herbacées, chamaephytes ou arbustives. Elles représentent une précieuse source de composés phénoliques (Skim *et al.*, 1999).

En Algérie, deux espèces appartiennent au genre *Globularia* (Globulariaceae). L'une est une espèce endémique : *Globularia eriocephala* (Pomel) ; l'autre, *Globularia alypum* L. (Quézel & Santa, 1963).

1.1.3 *Globularia alypum* L.

L'espèce de globulaire la plus répandue est *Globularia vulgaris*, communément appelée globulaire vulgaire. Dans les régions montagneuses calcaires, on observe fréquemment *Globularia cordifolia*, ou globulaire à feuilles en cœur. Quant à *Globularia alypum*, également connue sous le nom de globulaire buissonnante ou « turbith », elle est particulièrement présente dans le sud de la France. Son nom vernaculaire provient d'un emprunt à l'arabe, lui-même désignant une plante purgative indienne, *Operculina turpethum*. L'épithète spécifique *alypum* trouve son origine dans le grec *alypios*, signifiant « qui soulage la douleur », en référence aux vertus médicinales supposées de la plante, bien que celle-ci soit en réalité légèrement toxique. Dans l'Antiquité, ce terme était attribué à une plante non clairement identifiée (Couplan, 2012).

Globularia alypum L. également appelée globulaire, est une plante typique de la famille des Globulariaceae, qui comprend deux genres : *Globularia* et *Poskea*. On y compte environ trente espèces réparties à travers l'Europe et l'Afrique du Nord (Quézel & Santa, 1963).

1.1.4 Taxonomie et caractères botaniques

Globularia alypum L. (figure 1), est un arbuste vivace et ramifié, typique de la région méditerranéenne, atteignant une hauteur de 30 à 60 cm. Il possède des feuilles alternes, coriaces et de petite taille (10 à 13 mm de long sur 2 à 3 mm de large). Ses fleurs, regroupées en capitules plus ou moins sphériques, sont entourées de bractées.

Les fleurs présentent une corolle bilabiée, dont la partie supérieure est souvent atrophiée et bilobée, tandis que la partie inférieure est trilobée. Elles sont typiquement de couleur bleue et comportent quatre étamines.

Les feuilles, coriaces et persistantes, sont disposées de manière dispersée sur les branches. Elles sont ovales ou oblongues, atténuées par de courts pétioles, glauques, et réparties le long des tiges fortement ramifiées, formant un buisson généralement érigé (Paris, 1946 ; Malinvaud, 2014).



Figure 1 : Photographie de l'aspect morphologique de *Globularia alypum* (Bock., 2013).

1.1.5 Position systématique

La classification de l'espèce *G. alypum L* est indiquée dans le tableau 1 :

Tableau 1: Taxonomie de *G. alypum L* (Bock., 2013)

Règne	Végétal
Sous règne	Eucaryotes
Embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Astérides
Ordre	Lamiales
Famille	Globulariaceae
Genre	<i>Globularia</i>
Espèce	<i>Globularia alypum L</i>

1.1.6 Etymologie

Le nom du *Globularia* prend plusieurs noms en Algérie Tasselgha, Verga, Chelgha (Bouabdelli *et al.*, 2012), en Tunisie : Zriga (Khelifi *et al.*, 2011).

Noms arabes / arabes dialectales : Ayn lerneb, Chebra, Sannâ baladi, Alûbun, Aynûn, Hallab rwa, Masriga, Zerga, Zriga, Zouitna (Mohand Aït Y., 2006 ; Hammiche *et al.*, 2013 ; Leclerc *et al.*, 1874).

1.1.7 Distribution géographique

L'espèce *G. alypum L.* est présente exclusivement dans la région méditerranéenne. Elle priviliege les sites secs situés le long du littoral méditerranéen. On la trouve dans les pays du Maghreb ainsi que dans plusieurs pays du sud de l'Europe, et même dans certains environnements arides d'Asie centrale. En Afrique du Nord, elle est présente notamment en Algérie et au Maroc, jusqu'au Sahara (Rameau *et al.*, 2008).

La répartition mondiale de cette plante est illustrée à la figure (2).



Figure 2 : Répartition mondiale de la plante *G. alypum L.* (Rameau *et al.*, 2008).

1.2 Métabolites secondaires des plantes

Les métabolites secondaires des plantes sont des substances chimiques qui, bien que non essentielles à la croissance, au développement ou à la reproduction de la plante, jouent un rôle crucial dans ses interactions avec l'environnement. Ils la protègent notamment contre les herbivores et les agents pathogènes. Leur intérêt a récemment augmenté en raison de leurs applications en tant que médicaments, biopesticides et additifs alimentaires (Rafińska *et al.*, 2017).

Parmi les métabolites secondaires identifiés, on compte notamment : les polyphénols, les flavonoïdes et les tannins.

1.2.1 Polyphénols

Les polyphénols sont des substances biologiquement actives présentes dans les végétaux ou produits en tant que métabolites secondaires. On les trouve dans les fruits, les légumes, les noix et leurs dérivés, et ils possèdent des activités antioxydantes et anti-inflammatoires. Plus de 8 000 structures ont été découvertes (Waksmundzka-Hajnos & Sherma, 2011), allant de molécules simples, telles que les acides phénoliques, à des substances extrêmement polymérisées comme les tanins.

Les polyphénols se caractérisent par la présence d'au moins un noyau benzénique directement lié à au moins un groupe hydroxyle, qu'il soit libre ou engagé dans une autre fonction (éther, ester, hétéroside). Ils sont communément subdivisés en plusieurs classes : acides phénoliques (dérivés de l'acide benzoïque ou cinnamique), coumarines, stilbènes, flavonoïdes, lignanes, lignines et tanins (Boubekri, 2014). Les différentes classes de ces composés sont représentées sur la figure (3).

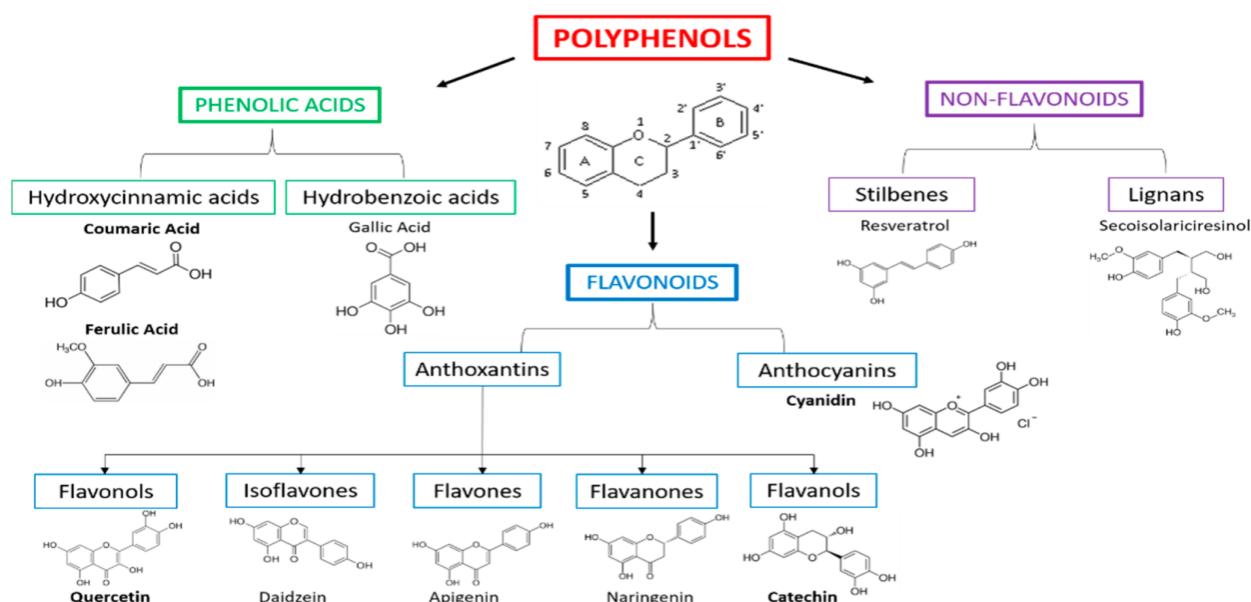


Figure 3 : Classification schématique des polyphénols (Beconcini *et al.*, 2020).

1.2.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus abondant de composés phénoliques végétaux, représentant plus de la moitié des 8 000 composés phénoliques naturels. Les flavonoïdes les plus courants comprennent les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavanols (catechines),

les isoflavones, les flavanonols et les anthocyanidines. Parmi eux, les flavones et les flavonols se distinguent par leur abondance et leur diversité structurelle (Ajila *et al.*, 2011).

Ces composés possèdent une structure de base constituée de 15 atomes de carbone, formée de deux noyaux benzéniques (A et B) reliés par une chaîne à trois atomes de carbone (C3), généralement cyclisée en un hétérocycle oxygéné appelé cycle C. Les différents types de flavonoïdes se distinguent par la position des groupements substituants sur les noyaux A et B, ainsi que par la nature du cycle C (Kraza, 2020).

Les flavonoïdes sont largement connus pour leurs propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, antiallergiques et anti-inflammatoires (Park *et al.*, 2008).

1.2.3 Tanins

Les tanins constituent une catégorie de polyphénols de grande masse moléculaire. Ces composés, fortement hydroxylés, ont la capacité de s'associer aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives pour former des complexes insolubles. Ce phénomène a pour conséquence de réduire l'efficacité de la digestion des aliments (Bouchouka, 2016).

Les tanins naturels sont classés, selon leur structure chimique, en deux groupes principaux : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Khalifi *et al.*, 2011).

1.3 Activités biologiques de *G. alypum L*

Glubularia alypum L. est une plante médicinale largement étudiée pour ses nombreuses propriétés pharmacologiques. Divers extraits obtenus à partir de ses différents organes, notamment les feuilles, les fleurs, les racines et la partie aérienne, ont démontré une activité biologique significative. Le tableau 2 récapitule les principales activités biologiques de *G. alypum*, telles que documentées dans la littérature scientifique.

Tableau 2: Travaux antérieurs consacrés à l'étude de la plante *G. alypum L.*

Activités biologiques	Organes végétaux	Références
Antimicrobien	Partie aérienne	(Krimat <i>et al.</i> , 2014).
	Feuilles	(Khantouche & Abderabba, 2018).
Anti-inflammatoire	Partie aérienne	(Boutemak <i>et al.</i> , 2015).
	Feuilles	(Ghlissi <i>et al.</i> , 2016).
Antioxydante	Fleurs	(Amessis <i>et al.</i> , 2014).
	Partie aérienne	(Djeridane <i>et al.</i> , 2006).
	Feuilles	(Touaibia <i>et al.</i> , 2016).
	Fleurs	(Amessis <i>et al.</i> , 2014).
Antidiabétique	Racines	(Rached <i>et al.</i> , 2010).
	Feuilles	(Hachi <i>et al.</i> , 2016).
Anticancéreuse	Feuilles	(Friščić <i>et al.</i> , 2022).

1.4 Propriétés thérapeutiques de *G. alypum*

Cette plante, utilisée en médecine traditionnelle principalement comme diurétique et pour traiter la constipation chronique (Hajji, 2020), est également employée pour l'inflammation du côlon chez l'humain (Hajji, 2021), ainsi que pour les affections cardiovasculaires et rénales (Ben Mansour *et al.*, 2012). De plus, elle est décrite comme possédant des propriétés antileucémiques, immunosuppressives, antiulcérées, hypoglycémiantes, antioxydantes, myorelaxantes et spasmolytiques (Fehri, 2012).

1.5 Toxicité de la plante

Une étude menée sur des souris albinos a montré que l'extrait aqueux de *G. alypum* n'a provoqué aucune mortalité jusqu'à une dose de 10 000 mg/kg de poids corporel. La dose létale médiane (DL₅₀) est considérée comme supérieure à 5 000 mg/kg, ce qui indique une faible toxicité aiguë (Shanab & Auzi, 2022).

Par ailleurs, des recherches antérieures ont révélé qu'un traitement de 30 jours consécutifs par voie intra gastrique avec un extrait hydro-éthanolique des feuilles de *G. alypum* (provenant de Jordanie), administré à la dose de 800 mg/kg chez des rates gravides, a entraîné une diminution du nombre de fœtus viables. En conséquence, les auteurs ont émis l'hypothèse que cet extrait présente une certaine toxicité pouvant affecter la reproduction chez les femelles (Elbetieha *et al.*, 2000)

1.6 Activité antibactérienne

1.6.1 Généralités

L'avènement des antibiotiques au siècle dernier a marqué une révolution thérapeutique, diminuant significativement le fardeau de mortalité et de morbidité associé aux infections. Cependant, un usage inadéquat et non maîtrisé a paradoxalement favorisé l'émergence de bactéries résistantes. Ces pathogènes ont développé des mécanismes sophistiqués, tels que la modification des sites cibles, l'efflux actif des médicaments et la dégradation enzymatique, leur conférant une résistance intrinsèque aux traitements antibiotiques (Gupta & Birdi, 2017).

La résistance bactérienne aux antibiotiques s'établit par le développement de multiples mécanismes. Parmi ceux-ci figurent la production d'enzymes capables d'inactiver les agents antimicrobiens, la modification de la structure des cibles d'action, la substitution de ces cibles,

l'altération de la perméabilité membranaire aux antibiotiques, la formation de biofilms protecteurs et l'activation de mécanismes d'efflux actif (Lemaoui *et al.*, 2017).

1.6.2 Bactéries

Les bactéries sont des organismes unicellulaires procaryotes, c'est-à-dire qu'elles ne possèdent ni noyau défini ni organites membraneux. Leur matériel génétique est contenu dans un chromosome circulaire unique situé dans une région appelée nucléoïde. Elles mesurent généralement entre 0,2 et 10 micromètres. Les bactéries présentent une grande diversité morphologique : formes sphériques (coques), en bâtonnets (bacilles), en spirales (spirilles) ou en virgules (vibrios). Elles peuvent être mobiles grâce à des flagelles, ou immobiles. Ces micro-organismes se reproduisent principalement par division binaire, un processus asexué rapide permettant une croissance exponentielle dans des conditions favorables. Certaines bactéries possèdent également la capacité de former des endospores, des structures résistantes leur permettant de survivre à des conditions extrêmes. Les bactéries sont omniprésentes dans la nature et remplissent des fonctions écologiques essentielles, notamment dans la décomposition de la matière organique, la fixation de l'azote atmosphérique (ex. : Rhizobium dans les nodules racinaires des légumineuses) et la symbiose avec d'autres organismes (ex. : microbiote intestinal humain). Certaines bactéries sont pathogènes et peuvent causer des maladies chez l'homme, les animaux ou les plantes (ex. : *Mycobacterium tuberculosis*, *E. coli* pathogène) (Madigan *et al.*, 2018).

1.6.2.1 Bactéries utilisées dans les tests antibactériens

- *Bacillus subtilis*

C'est une bactérie Gram-positive, en forme de bâtonnet, aérobie (avec des preuves qu'elle peut être anaérobie facultative), et mobile grâce à ses flagelles périthriches. Elle est largement répandue dans l'environnement, notamment dans le sol et le tractus gastro-intestinal des ruminants et des humains. Une caractéristique remarquable de *B. subtilis* est sa capacité à former des endospores très résistantes aux conditions environnementales défavorables (chaleur, sécheresse, agents chimiques, etc.), lui permettant de survivre pendant de longues périodes (Zhang *et al.*, 2025).

- *Staphylococcus aureus*

C'est un coccus à Gram positif, de la famille des Staphylococcaceae, anaérobie facultatif, également connu sous le nom de « staphylocoque doré ». Il provoque des infections cutanées, des infections du système nerveux central, des infections des voies urinaires. Elle est responsable de nombreuses infections, à la fois par la prolifération de la bactérie elle-même et par la libération de toxines spécifiques provoquant des infections toxiniques. Elle se présente généralement sous forme de coques sphériques d'environ 1 µm de diamètre, localisées principalement dans les fosses nasales et sur la peau des individus en bonne santé (Gulzar & Zehra, 2018).

- *Escherichia coli*

C'est une bactérie en forme de bâtonnet (bacille), à Gram négatif, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Non sporulée et anaérobie facultative, *E. coli* est également une espèce bactérienne commensale aérobie fréquente du microbiome digestif. Bien qu'habituellement inoffensive, elle peut devenir un pathogène majeur chez l'homme. Elle est responsable d'infections intestinales telles que les gastro-entérites et les toxi-infections alimentaires, ainsi que de pathologies extra-intestinales, notamment les infections urinaires, respiratoires et rénales, les syndromes hémolytiques et urémiques, les bactériémies et les méningites néonatales (Basavaraju & Gunashree, 2022 ; Basmaci & Cohen, 2018).

1.6.3 Mode d'action des agents antibactériens

Le mode d'action fondamental des antibiotiques réside dans le blocage sélectif d'une étape vitale pour le maintien ou la multiplication des micro-organismes. Généralement, la cible de l'antibiotique est un mécanisme spécifique aux bactéries, absent chez les eucaryotes et particulièrement chez l'humain. De ce fait, l'antibiotique vise idéalement à éradiquer ou à stopper la prolifération bactérienne sans affecter les cellules de l'individu traité (Batraud., 2017).

Il existe deux catégories d'antibiotiques :

- Les antibiotiques à effet bactériostatique qui inhibent la croissance bactérienne en ralentissant puis arrêtant la multiplication.

- Les antibiotiques bactéricides, qui lysent les bactéries, peuvent s'avérer bactériostatiques à une concentration plus faible, alors qu'ils sont bactéricides à une certaine concentration. (Boulahbal, 2002).

1.6.4 Nature de l'activité antibactérienne

Il existe deux types d'effets principaux concernant l'activité antibactérienne.

- Une activité létale : est dite bactéricide si elle entraîne la destruction des bactéries dans des conditions déterminées.
- Une inhibition de la croissance (bactériostatique) : correspond à une inhibition passagère de la prolifération des bactéries. L'activité biologique d'un extrait végétal dépend directement de sa composition chimique et des groupes fonctionnels des composés majoritaires (Dorman, 2000).

1.7 Activité antifongique

1.7.1 Généralités

L'activité antifongique correspond à la capacité d'une substance à inhiber ou détruire les champignons pathogènes. Elle repose sur plusieurs mécanismes, comme l'altération de la membrane fongique ou l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire. Les mycoses, souvent difficiles à traiter à cause de la similarité entre cellules fongiques et humaines, motivent la recherche de nouveaux agents antifongiques, notamment d'origine naturelle. De nombreux extraits végétaux ont ainsi montré une efficacité contre des champignons tels que *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* ou *Trichophyton rubrum* (Koehn & Carter, 2005).

1.7.2 Champignons

Les champignons sont des organismes eucaryotes, c'est-à-dire qu'ils possèdent un noyau défini et des organites membraneux. Leur matériel génétique est contenu dans plusieurs chromosomes linéaires situés dans le noyau. Ils peuvent être unicellulaires (comme les levures) ou pluricellulaires (comme les moisissures et les champignons supérieurs). Ces organismes se reproduisent par des processus sexués ou asexués, produisant des spores qui assurent leur dispersion et leur survie dans des conditions variées. Les champignons jouent un rôle écologique fondamental en tant que décomposeurs de matière organique, participant au recyclage des éléments nutritifs. Ils peuvent former des symbioses mutualistes (ex. : mycorhizes

avec les racines des plantes) ou être pathogènes pour les plantes (ex. *Fusarium*), les animaux, et parfois l'homme (ex. *C. albicans*) (Deacon, 2006).

1.7.2.1 Champignons utilisés dans les tests antifongique

- *Candida albicans*

Candida albicans est un champignon de type levure appartenant à la famille des Saccharomycetaceae. Présente naturellement dans la flore commensale humaine, notamment au niveau des muqueuses buccales, gastro-intestinales et génitales, cette levure opportuniste peut devenir pathogène en cas de déséquilibre du microbiote ou d'immunodépression. Elle est alors responsable de candidoses, qui peuvent être superficielles ou systémiques, comme la candidose sanguine. *C. albicans* se distingue par son polymorphisme morphologique (levure, pseudohyphe, hyphe vraie) et par divers facteurs de virulence tels que la formation de biofilms, la sécrétion d'enzymes hydrolytiques et sa capacité d'adhésion aux cellules hôtes. Sa résistance croissante aux antifongiques, en particulier en milieu hospitalier, en fait un agent pathogène préoccupant (Berman, 2012 ; Mayer *et al.*, 2013).

- *Fusarium*

Fusarium est une moisissure filamentueuse pathogène appartenant à la famille des Nectriaceae, caractérisée par un mycélium blanc à rosâtre, dense et cotonneux, ainsi que par la production de macroconidies cloisonnées. Présent largement dans l'environnement notamment dans les sols, les plantes et les débris végétaux. Ce genre fongique est bien connu pour son rôle phytopathogène, causant des maladies graves chez les cultures agricoles, telle que la fusariose du blé. Certaines espèces comme *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* et *Fusarium verticillioides* sont également responsables d'infections opportunistes chez l'homme, touchant surtout les individus immunodéprimés. En plus de son impact pathogène, *Fusarium* est capable de produire des mycotoxines dangereuses (fumonisines, trichothécènes), contaminant les cultures et représentant un risque pour la santé humaine et animale (Hlaiem *et al.*, 2021).

1.7.3 Mécanisme d'action antifongique

Peu d'études ont élucidé le mécanisme d'action antifongique des molécules issues de produits naturels. Cependant, l'eucalyptol (ou 1,8-cinéole) est une exception notable. Ce composé a provoqué des altérations morphologiques chez *Aspergillus spp.*, en réduisant la formation de

conidies, en dégradant la membrane plasmique et en entraînant une rupture de la membrane cellulaire, puis la dégénérescence de la paroi fongique. On retrouve l'eucalyptol dans les huiles essentielles de plusieurs plantes, notamment *Hyptis suaveolens*, *Hyssopus officinalis* subsp. *pilifer*, *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula luisieri*, *Salvia ringens* et *Origanum majorana*. Par ailleurs, l'effet synergique entre les différents composés d'une huile essentielle est souvent observé et peut expliquer une activité antifongique supérieure. Par exemple, des *Candida* spp. résistantes au fluconazole se sont montrées plus sensibles à l'huile essentielle d'*Hyssopus officinalis* entière qu'à ses composés majeurs pris individuellement (cis-pinocamphone et β -pinène). La fenchone et le cis- β -ocymène ont démontré une efficacité remarquable contre un large éventail d'espèces fongiques, incluant *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp. et les dermatophytes (*Trichophyton* spp., *Microsporum* spp., et *Epidermophyton floccosum*). Ces composés exercent une pression métabolique intense sur les champignons, conduisant à leur mort cellulaire (Waller *et al.*, 2017).

Matériel et méthodes

2. Matériel et méthodes

Le choix de la plante, *G. alypum*, repose sur sa large utilisation en médecine traditionnelle, sa disponibilité ainsi que la présence de molécules bioactives telles que les polyphénols et les flavonoïdes, motivant l'extraction de ses composés bioactifs et l'évaluation de son activité antimicrobienne. Pour ce faire, la présente étude de l'activité antimicrobienne de *G. alypum L.* a été réalisée au sein du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université Constantine 1, frères Mentouri et au niveau du centre de Recherche en Sciences Pharmaceutiques (CRSP).

Les souches microbiennes testées ont été fournies gracieusement par le laboratoire de Mycologie, biotechnologie et de l'activité microbienne. Il s'agit de trois bactéries à Gram+ et Gram- : *Bacillus subtilis subsp .spizizenii* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739), une levure : *Candida albicans* (ATCC 10231) et une moisissure (*Fusarium sp*) (Annexe 2).

2.1 Récolte du matériel végétal

L'étude a été faite sur les parties feuilles et fleures de l'espèce *G. alypum L.* Les échantillons ont été récoltés durant le mois de février 2025, dans les monts de Babour à Béjaïa.

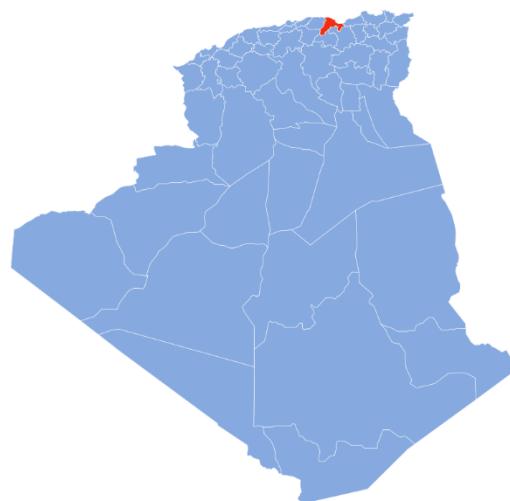


Figure 4 : Localisation de la wilaya de Béjaïa en Algérie, site de récolte de *G. alypum*.

2.2 Etude phytochimique de la plante de l'espèce *G. alypum*

2.2.1 Préparation de la poudre végétale

Les parties fraîches de la plante, à savoir les feuilles et les fleurs, ont d'abord été mises à sécher à l'air libre, à l'ombre et à température ambiante pendant environ deux semaines. Cependant, ayant constaté une exposition à l'humidité, elles ont ensuite été placées à l'étuve pour accélérer le séchage. Une fois, suffisamment sèches, les feuilles et les fleurs ont été broyées séparément à l'aide d'un moulin électrique de type Bosch (220-240 V) jusqu'à l'obtention de poudres fines. Les poudres obtenues ont été tamisées à l'aide d'un tamis de 200 µm afin d'obtenir des particules très fines facilitant l'extraction (figure 05). Le produit a été pesé avec une balance électronique. Les échantillons broyés ont été placés dans des bocaux en verre hermétiquement clos et conservés à température ambiante.

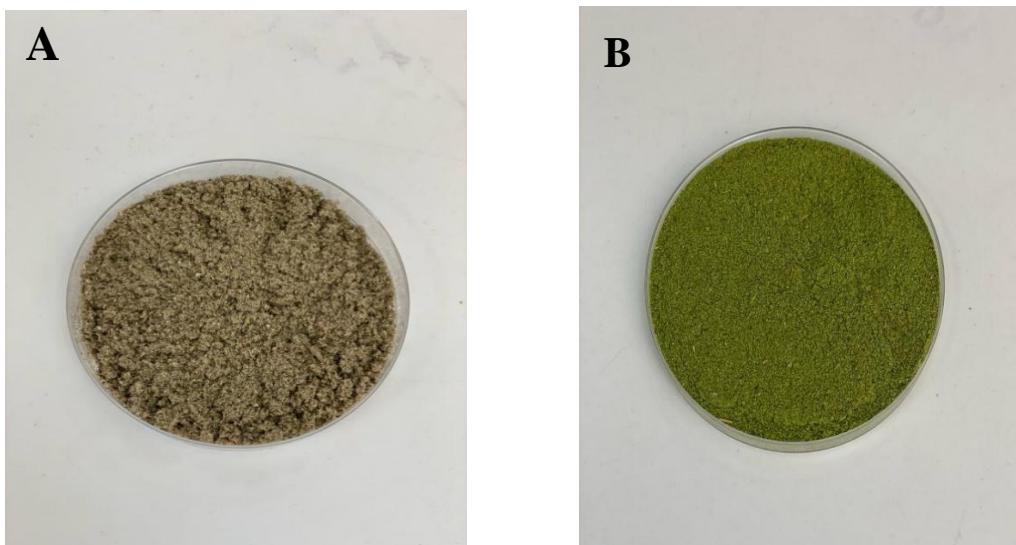


Figure 5 : Poudres végétales de *G. alypum* : (A) fleurs ; (B) feuilles.

2.2.2 Méthode d'extraction

La préparation des extraits a été menée au niveau de laboratoire de phytothérapeutiques molécules du CRSP (Centre de Recherche en Sciences Pharmaceutiques).

2.2.2.1 Extraction par macération (solide - liquide)

L'extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes de la matière végétale a été effectuée par macération dans du l'éthanol aqueux. Cette méthode repose sur le protocole établi par (Touabia & Chaouch, 2014), avec quelques modifications.

Pour ce faire, 100 g des parties aériennes (feuilles et fleurs) de la plante, *G. alypum L* sous forme de poudre, ont été mis dans un bécher, contenant un mélange solvant : (éthanol : eau) (70 :30), puis laissé en macération pendant 48h. Cette action a été répétée une seconde fois pour s'assurer d'une extraction complète des métabolites. Par la suite, les extraits hydro-alcooliques ont subi une filtration séquentielle à travers une compresse de gaze puis sur un papier filtre Whatman. Les deux filtrats ont été combinés pour obtenir l'extrait hydro-éthanolique brut, qui a, ensuite, été concentré par évaporation sous vide à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (R-210, Büchi) (figure 6 A). Afin d'obtenir le lyophilisat, le filtrat a été soumis à une congélation rapide à -80°C pendant une durée de 24 heures, en formant une fine couche de 20 ml dans des cristallisoirs de 15 cm de diamètre. La lyophilisation a ensuite été réalisée à l'aide d'un lyophilisateur (BIOBASE) (figure 6 B).



Figure 6 : (A) : Evaporateur rotatif ; (B) : Lyophilisateur.

2.2.2.2 Récupération des extraits secs

Le produit sec (figure 7) ainsi obtenu a été réparti dans des flacons en verre teinté, fermés hermétiquement pour assurer sa stabilité, et stocké à une température de 4°C au réfrigérateur.

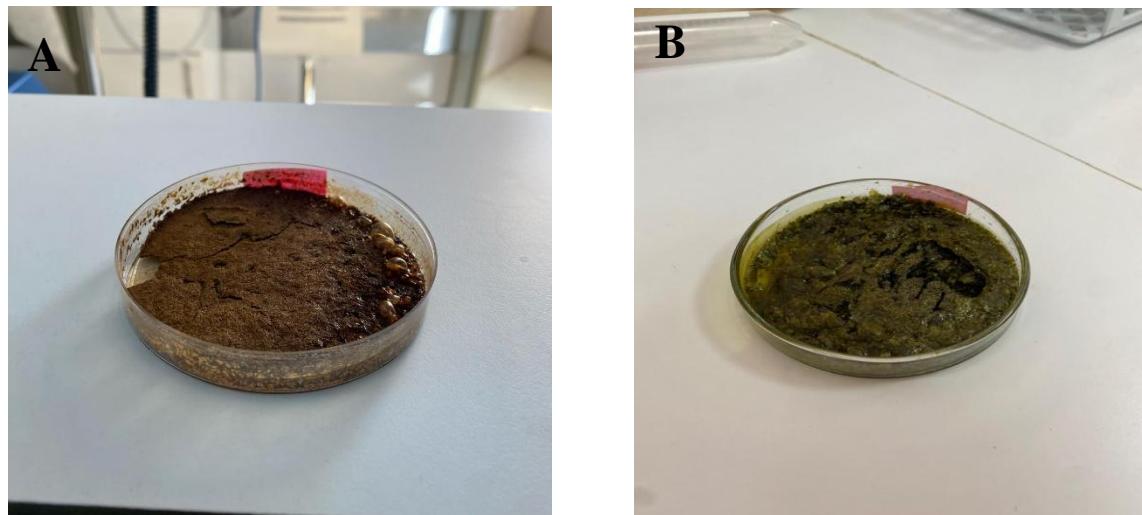


Figure 7 : Produits lyophilisés : (A) fleurs ; (B) feuilles

2.2.2.3 Extraction au soxhlet (Extraction à chaud)

Cette méthode a suivi le protocole établi par (Penchev, 2010), avec quelques modifications.

L'extraction par Soxhlet (figure 8) représente une méthode simple pour l'extraction solide-liquide. Pour ce faire, dans un ballon de 1000 ml à fond rond préalablement pesé (P1), 400 ml de solvant d'extraction (Hexane) ont été mis. Sur la partie supérieure du dispositif et dans une cartouche en papier filtre perméable aux solvants, il a été mis 100 grammes de matière végétale sèche pour les feuilles et 50 grammes pour les fleurs (les fleurs et les feuilles ont été traitées séparément). Le ballon est chauffé (température 30 °C), la vapeur du solvant sera condensée au niveau du réfrigérant et elle sera réceptionnée sous forme de goûtes sur le matériel végétal ce qui permettra d'extraire la matière végétale. Cette technique repose, en effet, sur un cycle fermé d'extraction comprenant plusieurs étapes : ébullition, vaporisation, condensation et extraction. Lorsque le niveau du solvant d'extraction atteint le sommet du siphon, la solution retombe dans le ballon à travers le tube de siphonage pour se concentrer. Plusieurs cycles sont effectués jusqu'à ce que le solvant devienne clair. Après refroidissement, l'extrait collecté dans le solvant est récupéré.

Le filtrat des parties aériennes (feuilles et fleurs) a été évaporé à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (R-210, Büchi) pour obtenir un extrait brut. Cet extrait a ensuite été pesé pour déterminer son poids (P2) (Penchev, 2010).

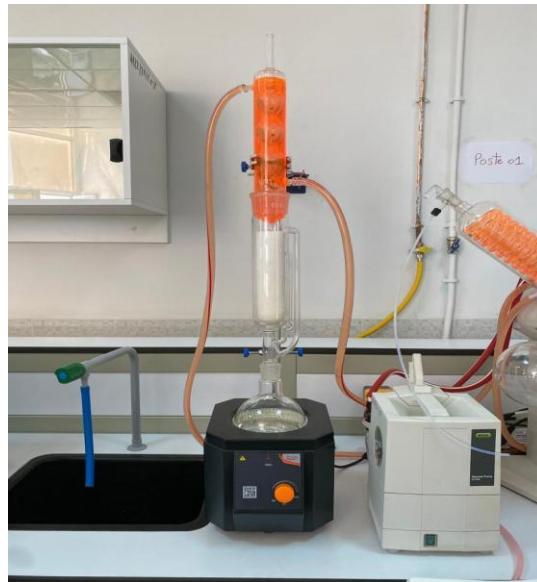


Figure 8 : Extraction par Soxhlet

2.3 Détermination du rendement d'extraction

Le rendement d'une extraction est une mesure quantitative de l'efficacité du processus, représentant la fraction de la masse de la poudre végétale initiale qui est récupérée sous forme d'extrait sec. Il est exprimé en pourcentage et calculé à l'aide de la formule :

$$R (\%) = (PS / PP) \times 100\%$$

Où ;

PS : poids de l'extrait sec en gramme (g),

PP : poids de la poudre en gramme (g)

Le schéma suivant résume les différentes étapes du protocole (figure 9).

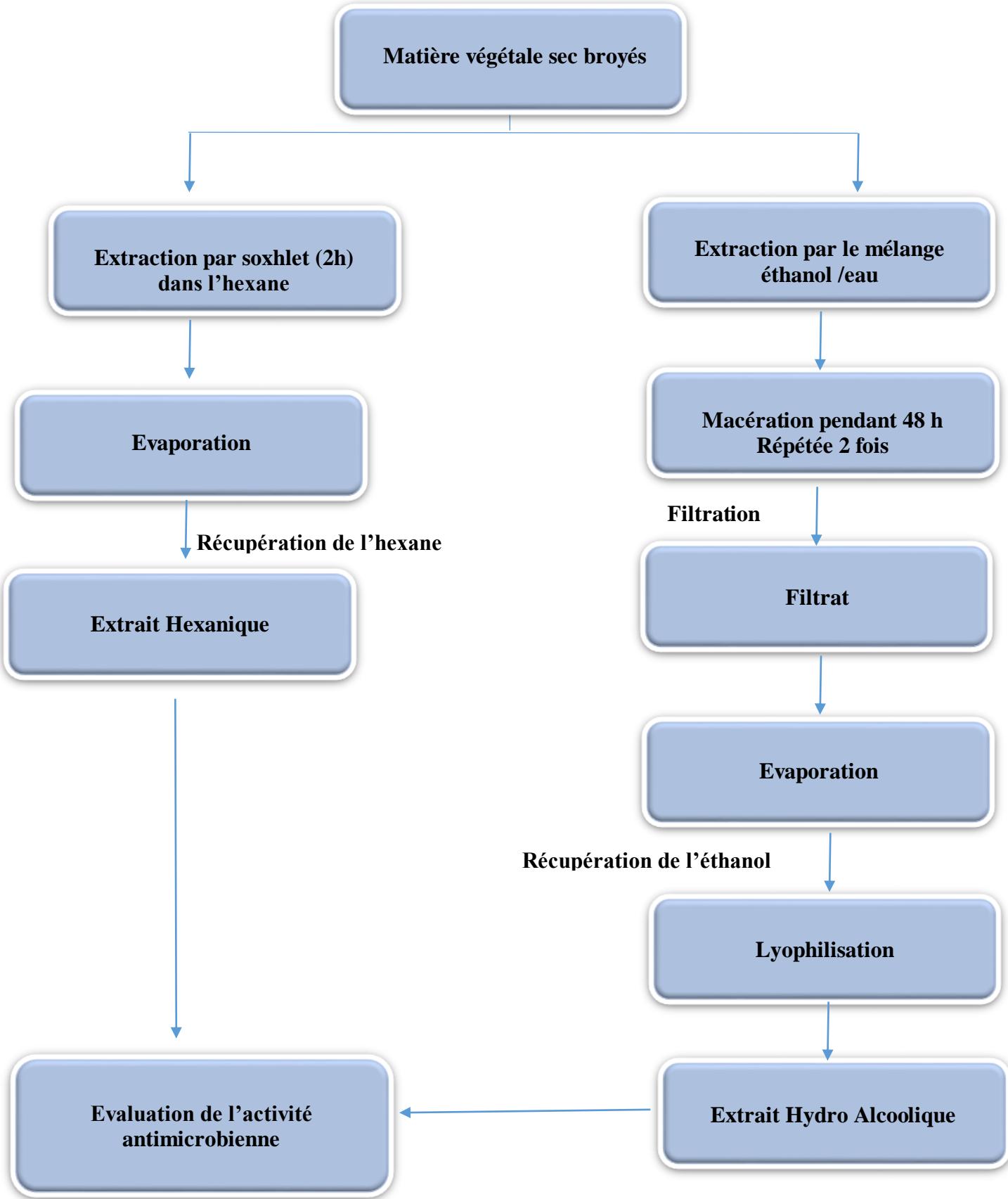


Figure 9 : Plan général de la partie expérimental.

2.4 Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des différents extraits de *G. alypum L.*, deux techniques qualitatives distinctes ont été utilisées : la technique de diffusion sur gélose utilisant des disques de papier Whatman et la technique des puits en milieu gélosé.

2.4.1 Milieux de culture utilisés

- **Gélose nutritive** : un milieu d'isolement non sélectif enrichie d'éléments nutritifs essentiels utilisé pour la croissance d'une grande variété de bactéries.
- **Chapman** : un milieu de culture sélectif et différentiel. Il est principalement conçu pour l'isolement et l'identification des staphylocoques, en particulier les staphylocoques pathogènes comme *S. aureus*.
- **Gélose de Mueller Hinton** : un milieu de référence pour l'évaluation de la sensibilité des micro-organismes aux antibiotiques et à d'autres substances présentant une activité antibactérienne.
- **OGA** : un milieu de culture sélectif couramment utilisé en microbiologie pour la recherche et le dénombrement des levures et des moisissures.
- **YPG** : un milieu de culture spécifiquement conçu pour la croissance des levures (Annexe 1).

2.4.2 Réactivation des souches bactériennes et fongiques

A partir des souches conservées, les bactéries sont ensemencées par stries à l'aide d'une anse de platine sur des boites de Pétri contenant les milieux spécifiques (GN, OGA et Chapman) et incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C pour les bactéries, de 24 à 72 heures à 30°C pour la levure et de 7 jours à 30° C pour la moisissure.

2.4.3 Préparation des bactéries

Les tests antibactériens ont été réalisés à partir des cultures bactériennes jeunes (18 à 24 heures), en phase de croissance exponentielle. L'opacité de la suspension bactérienne dans l'eau physiologique (0,9% NaCl) stérile, doit être équivalente à 0,5 McFarland, de concentration bactérienne estimée à environ 10⁸ UFC/ml (Khribch *et al.*, 2018).

2.4.4 Préparation de milieu de culture

Les milieux standards utilisés sont la gélose de Muller Hilton (MH) pour les bactéries et le

milieu OGA pour *C. albicans* et *Fusarium sp*. Le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri. Les boîtes ensuite disposées sur une surface plane afin d'assurer une bonne uniformisation de la surface de la gélose avant sa solidification. Avant d'être utilisées, ces dernières nécessitent un séchage de 30 minutes à température ambiante autour du bec Bunsen pour sa stabilisation.

2.4.5 Ensemencement

Après l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum, la bactérie a été ensemencée dans des boîtes de Pétri à l'aide d'un écouvillon stérile imbibé de la suspension bactérienne préalablement préparée. L'écouvillon a été passé sur toute la surface de la gélose en effectuant des stries serrées de haut en bas, dans un mouvement de zigzag en effectuant des touchés sur les bords de la boîte.

2.4.6 Préparation des disques

Des disques de papier wattman de 6 mm de diamètre, stérilisés à 120°C pendant 20 min à l'autoclave ont été utilisés.

2.4.7 Préparation de l'extraits

On a prélevé 0,7g de la poudre *Globularia*, auquel on a ajouté 1 ml de DMSO à 10 % (v/v) (Abu-Hijleh *et al.*, 2018). Le mélange est agité pendant 15 min. L'extrait obtenu est conservé au réfrigérateur.

2.4.8 Préparation des dilutions

À partir d'une solution mère de 700 mg/ml des extraits (Feuilles et Fleurs), une série de dilution a été préparée (tableau 3), puis filtrée à l'aide de filtres à seringue (0,22 µm).

Tableau 3: Préparation des dilutions pour le test antimicrobien

SM	700mg/ml
C1=1 /2	350mg/ ml
C2=1/4	175mg /ml

2.5 La technique de diffusion sur gélose par disques

La sensibilité antimicrobienne a été évaluée en utilisant la méthode de diffusion sur gélose. Cette technique a été réalisée selon le protocole de Taghzouti *et al.*, (2016), avec quelques modifications.

L'extrait de *G. alypum* a été dissous dans une solution de DMSO à 10 % (v/v) pour obtenir des concentrations de 175, 350 et 700 mg/ml. Les solutions ont été stérilisées par filtration à l'aide de filtres à seringue de 0,22 µm. Le DMSO a été préalablement testé contre toutes les souches bactériennes utilisées et n'a montré aucune activité antibactérienne.

Un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne a servi à ensemencer uniformément toute la surface de la boîte de gélose MH selon la technique du NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standard*). Après séchage de la surface (environ 5 min), des disques de 6 mm de diamètre du papier Whatman stériles ont été imbibés avec 30 µl des extraits à tester, laissés sécher à l'air libre et ont été déposés sur la surface des boîtes. La même méthode a été appliquée pour la levure et la moisissure.

Des témoins imbibés seulement par le DMSO stérile ont été utilisés comme contrôle négatifs. Chaque concentration a été testée en triple dans la même boîte.

L'ensemble des boîtes de Pétri a été conservé à 4 °C pendant 2 heures afin de favoriser la diffusion de l'extrait dans le milieu. Par la suite, les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures pour les bactéries, et à 30 °C pendant 48 heures pour la levure et la moisissure. Les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne ont ensuite été mesurés en millimètres à l'aide d'une règle millimétrée (Taghzouti *et al.*, 2016).

2.6 Technique des trous

Cette technique a été effectuée pour évaluer la sensibilité des bactéries, selon la méthodologie de Agban *et al.*, (2020) avec quelque modification.

Des boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller-Hinton et le milieu OGA sont préparées avec les bactéries et les champignons testés respectivement. L'ensemencement a été réalisé par écouvillonnage. Après un séchage de 5 min, la gélose est perforée avec le bout supérieur de la pipette Pasteur stérile. Les trous ensuite ont été remplis par un volume de 50 µl des extraits à différentes concentrations. En effet, trois trous ont été remplis avec 50 µl des extraits à des concentrations de 700, 350 et 175 mg/ml, tandis que le quatrième a reçu 50 µl de DMSO comme témoin négatif. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 4 °C dans un réfrigérateur pendant 2 heures, afin de permettre une pré-diffusion des substances bioactives. Elles ont ensuite été placées dans une étuve à 30 °C pendant 48 heures pour la levure et la moisissure, et à 37 °C

pendant 18 à 24 heures pour les bactéries. L'effet inhibiteur a été visualisé par la formation d'une auréole claire autour des trous. La quantification de cet effet a été réalisée par la mesure du diamètre de ces zones d'inhibition.

L'interprétation se fait selon les critères de Haied *et al.* (2015).

$\emptyset < 10 \text{ mm}$: aucune activité inhibitrice détectée (-)

$10 \text{ mm} \leq \emptyset < 16 \text{ mm}$: activité inhibitrice modérée (+)

$16 \text{ mm} \leq \emptyset < 25 \text{ mm}$: activité inhibitrice marquée (++)

$\emptyset \geq 25 \text{ mm}$: activité inhibitrice très élevée (+++).

2.7 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus faible concentration d'une substance testée capable d'inhiber toute croissance bactérienne visible d'une souche donnée après une incubation de 18 heures dans un milieu de culture spécifique. Elle constitue l'approche la plus couramment employée pour évaluer, *in vitro*, l'activité bactériostatique d'une nouvelle molécule antibactérienne (Carryn., 2013).

2.7.1 Mode opératoire

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée par la méthode des trous en milieu solide, afin d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'extrait des feuilles de *G. alypum* préparé à l'aide de DMSO à 10 %. Pour la levure *C. albicans*, le milieu YPG (Yeast-extract-Peptone-Glucose-Agar) a été utilisé, tandis que pour les deux souches bactériennes (*B. subtilis subsp. spizizenii* et *S. aureus*), la gélose Mueller-Hinton a été employée.

Pour ce faire un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne a servi à ensemencer uniformément toute la surface des boîtes. Après un séchage de 5 min, la gélose est perforée avec une pipette Pasteur stérile. Deux trous ont été remplis avec 50 µl des extraits, tandis que le troisième a été rempli par 50 µl de DMSO. Pour *C. albicans* et *B. subtilis subsp. spizizenii*, deux concentrations ont été utilisées : 100 mg/mL et 50 mg/mL. En revanche, pour *S. aureus*, une gamme plus large de dilutions a été testée : 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL et 2,5 mg/mL, les boîtes de Pétri ont été, ensuite, placées au réfrigérateur à 4°C pendant 2 heures afin de favoriser la pré-diffusion des substances bioactives dans le milieu gélosé. Par la suite, les boîtes ont été transférées dans une étuve : celles contenant les

levures (*C. albicans*) ont été incubées à 30°C pendant 48 heures, tandis que celles ensemencées avec les souches bactériennes (*B. subtilis* subsp. *spizizenii* et *S. aureus*) ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. Les diamètres des zones d'inhibition autour des puits ont été mesurés en millimètres près. La CMI a été définie comme la plus faible concentration de l'extrait ne présentant aucune croissance microbienne visible autour du puits.

Résultats et discussion

3. Résultats et discussion

Ce travail consiste à déterminer l'activité antimicrobienne des extraits de différentes parties de *G. alypum L* sur cinq souches microbiennes fournies par le Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM) comme il a été mentionné dans la rubrique matériel et méthodes.

3.1 Rendement de l'extraction

Les rendements en pourcentage des extractions faites sur les feuilles de *G. alypum L*. sont révélés dans les tableaux (4) et (5) et par les figures (10,11 et 12).

Tableau 4 : Rendement de l'extraction (feuilles).

Méthodes d'extraction	Extrait	Aspect	Couleur	Teneur %
Extraction par macération	Éthanol	Liquide visqueux	Vert foncé	33
Extraction au soxhlet	Hexane	Solide résineux	Jaune verdâtre	2,59

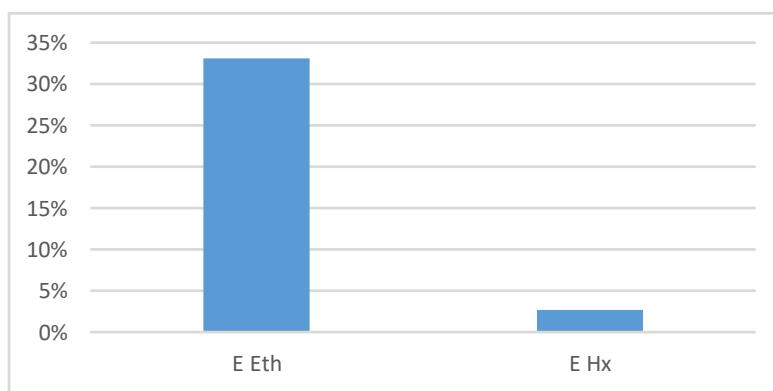


Figure 10 : Présentation graphique des rendements d'extrait Eth et Hx des feuilles.

La macération a été effectuée sur 100 g de poudre de feuilles avec de l'éthanol, un solvant polaire capable d'extraire une large gamme de composés bioactifs, notamment les polyphénols, flavonoïdes, tanins, alcaloïdes, et autres métabolites secondaires polaires. Le rendement obtenu est de 33 %, ce qui est significativement plus élevé que celui de l'extraction par Soxhlet.

L'extraction par Soxhlet avec l'hexane comme solvant a été réalisée sur 60 g de poudre de feuilles de *G. alypum*. Le rendement obtenu est de **2,59 %**. Ce rendement relativement faible peut s'expliquer par la nature non polaire de l'hexane, qui extrait principalement les composés lipophiles comme les huiles essentielles, les cires, et certains pigments (caroténoïdes, chlorophylle, etc.). Cela suggère que la plante contient une quantité modérée de ces composés lipophiles, ce qui est cohérent avec sa composition connue dans la littérature.

Selon une étude menée par Touaibia & Chaouch. (2016) le rendement de l'extrait hydro-éthanolique obtenu par macération était de 30,40 %, un résultat inférieur à celui que nous avons observé dans notre étude. En revanche, leur rendement obtenu par extraction au Soxhlet atteignait 43,50 %, ce qui est supérieur à nos résultats.

Par ailleurs Khlifi *et al.* (2011) ont obtenu à partir des extraits de *G. alypum* originaire de Tunisie un rendement de 37% avec le méthanol.

Le rendement de l'extraction est influencé par plusieurs facteurs, notamment la polarité, la solubilité, la nature et la concentration du solvant, la température et la durée d'extraction (Safdar *et al.*, 2017). De plus, la saison de la récolte, la durée et les conditions de stockage ont également un impact sur ce rendement (Liu *et al.*, 2015).

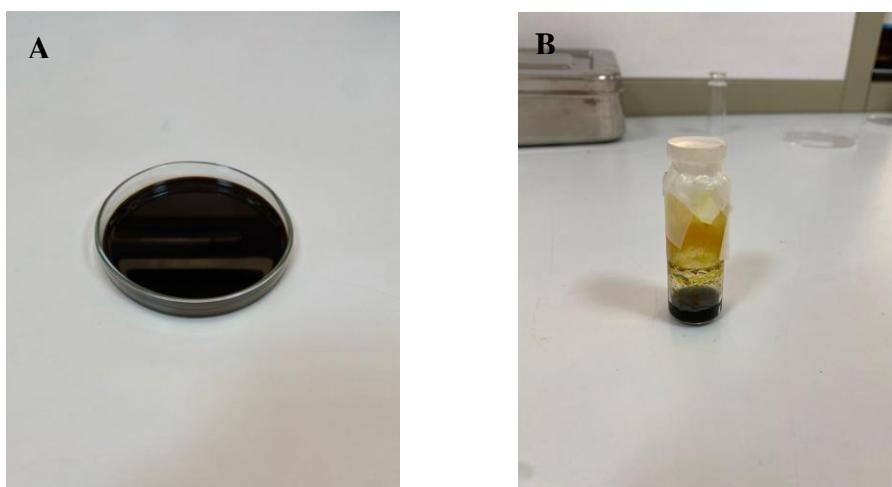


Figure 11 : Extraits obtenus après évaporation : (A) extrait de macération ; (B) extrait de soxhlet.

Les rendements en pourcentage des extractions faites sur les fleurs de *G. alypum L.* sont récapitulés dans le tableau (5) et révélés par la figure (12).

Tableau 5 : Rendement de l'extraction (fleurs)

Méthodes d'extraction	Extrait	Aspect	Couleur	Teneur %
Extraction par macération	Éthanol	Liquide visqueux	Marron foncé	27,6
Extraction au soxhlet	Hexane	Liquide résineux	Jaune brunâtre	4,594

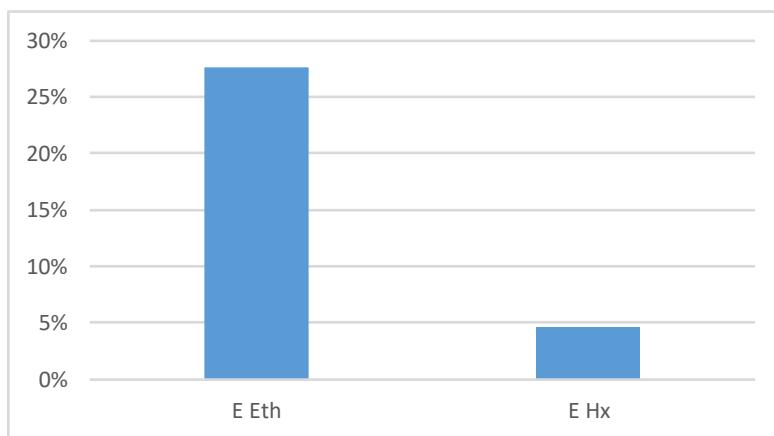


Figure 12 : Présentation graphique des rendements d'extrait Eth et Hx des fleurs.

Ces résultats (tableau 5 et figure 12) confirment, comme cela a été observé précédemment pour les feuilles, la supériorité de la macération à l'éthanol en termes de rendement d'extraction pour les fleurs de *G. alypum*. Le rendement de 27,6 % obtenu avec l'éthanol est significativement plus élevé que celui obtenu avec l'hexane, qui n'est que de 4,594 %.

3.2 Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des extraits de *G. alypum*

L'étude présentée ici porte sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de *G. alypum*. Pour ce faire, deux techniques ont été utilisées : la technique de diffusion sur gélose par disques et la technique des puits. Ces deux approches reposent sur la diffusion des principes actifs des extraits dans un milieu gélosé contenant les microorganismes à tester. Elles permettent à la fois une visualisation qualitative et une évaluation quantitative de l'inhibition de la croissance microbienne. Cette évaluation se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (zones claires) qui se forment autour des points d'application des extraits Eth et Hx.

3.2.1 Activité antimicrobienne de l'extrait hydro-éthanolique

3.2.1.1 Technique de diffusion sur gélose par disques

L'activité antimicrobienne des extraits hydro-éthanoliques des feuilles de *G. alypum* a été évaluée par la technique de diffusion sur gélose par disques sur cinq souches microbiennes, comprenant trois bactéries : *E. coli*, *B. subtilis subsp .spizizenii* et *S. aureus*, ainsi que deux champignons: *Candida albicans* et *Fusarium sp*. Trois concentrations ont été testées : 700 mg/mL, 350 mg/mL et 175 mg/mL. Les résultats des diamètres des zones d'inhibition (en mm) sont présentés dans le tableau (6) et révélés par la figure (13).

Tableau 6 : Activité antimicrobienne de l'extrait hydro-éthanolique de *G. alypum* évaluée par la technique de diffusion sur gélose par disques.

Souches	Concentration de l'extrait (mg/ml)	Diamètre d'inhibition (mm)	DMSO témoin négatif
<i>E. coli</i>	700	10	(-)
	350	0	
	175	0	
<i>B. subtilis subsp .spizizenii</i>	700	0	(-)
	350	0	
	175	0	
<i>S. aureus</i>	700	26	(-)
	350	24	
	175	22	
<i>C. albicans</i>	700	0	(-)
	350	0	
	175	0	
<i>Fusarium sp</i>	700	0	(-)
	350	0	
	175	0	

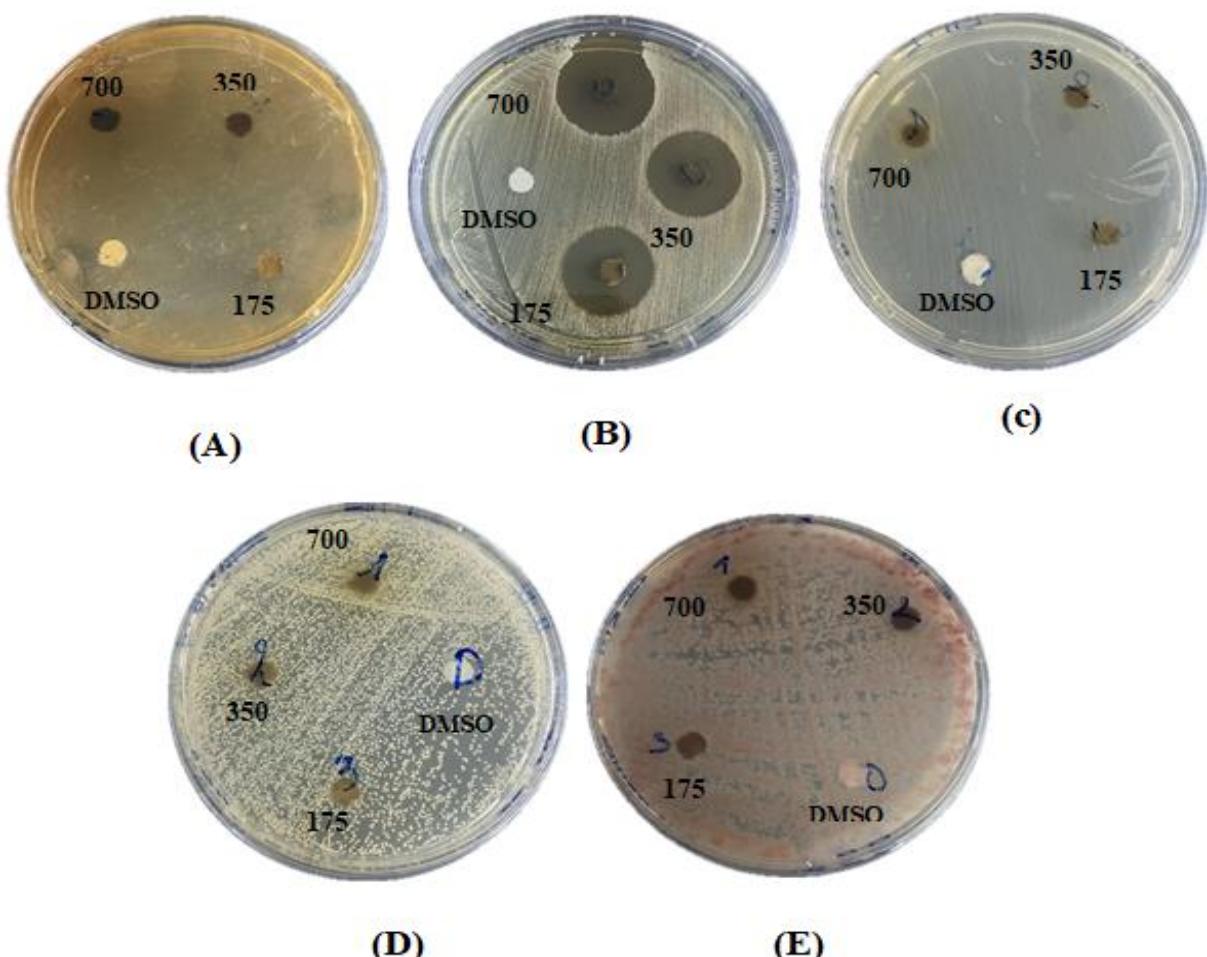


Figure 13 : Activité antimicrobienne de l'extrait hydro-éthanolique par la technique de diffusion sur gélose par disques : **(A)** *E. coli* ; **(B)** *S. aureus* ; **(C)** *B. subtilis* subsp. *spizizenii* ; **(D)** *C. albicans* ; **(E)** *Fusarium* sp.

L'extrait de *G. alypum* n'a montré aucune activité inhibitrice contre *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *C. albicans* et *Fusarium* sp, quelle que soit la concentration testée. En revanche, une activité antimicrobienne a été observée pour deux des cinq souches testées :

- *E. coli* : Une zone d'inhibition de 10 mm a été enregistrée uniquement à la concentration la plus élevée (700 mg/mL).
- *S. aureus* : Cette souche a montré la plus grande sensibilité aux extraits. Les diamètres des zones d'inhibition ont été estimés à 26 mm pour la concentration 700 mg/ml, à 24 mm pour la concentration 350 mg/ml et enfin à 22 mm pour la concentration 175 mg/ml.

Ces résultats révèlent une activité antimicrobienne spécifique et ciblée des extraits hydro-éthanoliques de *G. alypum*. Parmi les cinq souches testées, seule *S. aureus* a montré une forte sensibilité à l'extrait. L'augmentation progressive du diamètre d'inhibition en fonction de la concentration témoigne d'une efficacité potentielle de l'extrait contre les bactéries de forme cocci.

À l'inverse, *B. subtilis subsp .spizizenii*, bien qu'étant également une bactérie Gram positif, n'a présenté aucune zone d'inhibition, ce qui suggère une spécificité d'action de certains composés présents dans l'extrait vis-à-vis de *S. aureus*.

Pour *E. coli*, une souche à Gram négatif, seule la concentration la plus élevée (700 mg/mL) a provoqué une inhibition modérée de 10 mm ce qui indique une activité limitée de l'extrait vis-à-vis des bactéries à Gram négatif, dont la paroi cellulaire plus complexe peut réduire la perméabilité aux agents antimicrobiens.

Concernant les champignons testés (*C. albicans* et *Fusarium sp*), aucun effet inhibiteur n'a été observé, quelle que soit la concentration utilisée. Ces résultats suggèrent une absence d'activité antifongique de l'extrait dans les conditions expérimentales appliquées.

Le contrôle négatif (DMSO 10%) n'a montré aucun effet inhibiteur sur l'ensemble des souches microbiennes testées.

Les résultats obtenus corroborent ceux de l'étude de Taghzouti *et al.* (2016), dans laquelle les extraits méthanoliques et à l'acétate d'éthyle de *G. alypum* : ont montré une activité contre *S. aureus* et *B. subsp*, mais aucune inhibition contre *E. coli* et *C. albicans*.

Nos résultats sont également en accord avec ceux de Khantouche & Abderabba. (2018) qui ont utilisé un extrait hydro-éthanolique de *G. alypum*. Leur étude a mis en évidence une activité antibactérienne contre *S. aureus* avec une zone d'inhibition de 23 mm, ce qui est comparable à notre valeur de 26 mm. Ces résultats confirment la forte sensibilité de cette souche aux extraits de la plante.

En revanche, *E. coli* n'a montré aucune inhibition dans leur étude, tandis que l'extrait hydro-éthanolique a induit une inhibition modérée (10 mm) à la concentration la plus élevée. Cette différence pourrait s'expliquer par l'effet synergique de l'eau et de l'éthanol, facilitant une meilleure extraction de certains composés bioactifs.

3.2.1.2 Technique des puits

L'activité antimicrobienne des extraits de *G. alypum*, provenant des feuilles et des fleurs, a été évaluée par la technique des puits. Les diamètres des zones d'inhibition (mm) pour chaque extrait et souche microbienne sont révélés dans le tableau (7) et les figures (14,15).

Tableau 7 : Activité antimicrobienne de l'extrait hydro-éthanolique de *G. alypum* évaluée par la technique de diffusion en puits.

Souches	Feuilles			Fleurs		
	Concentration de l'extrait (mg/ml)	Diamètre d'inhibition (mm)	DMSO	Concentration de l'extrait (mg/ml)	Diamètre d'inhibition (mm)	DMSO
<i>E. coli</i>	700	10	(-)	700	0	(-)
	350	6		350	0	
	175	0		175	0	
<i>B. subtilis</i> <i>subsp. spizizenii</i>	700	16	(-)	700	0	(-)
	350	11		350	0	
	175	10		175	0	
<i>S. aureus</i>	700	51	(-)	700	0	(-)
	350	44		350	0	
	175	40		175	0	
<i>C. albicans</i>	700	17	(-)	700	0	(-)
	350	16		350	0	
	175	10		175	0	
<i>Fusarium sp</i>	700	21	(-)	700	0	(-)
	350	15		350	0	
	175	10		175	0	

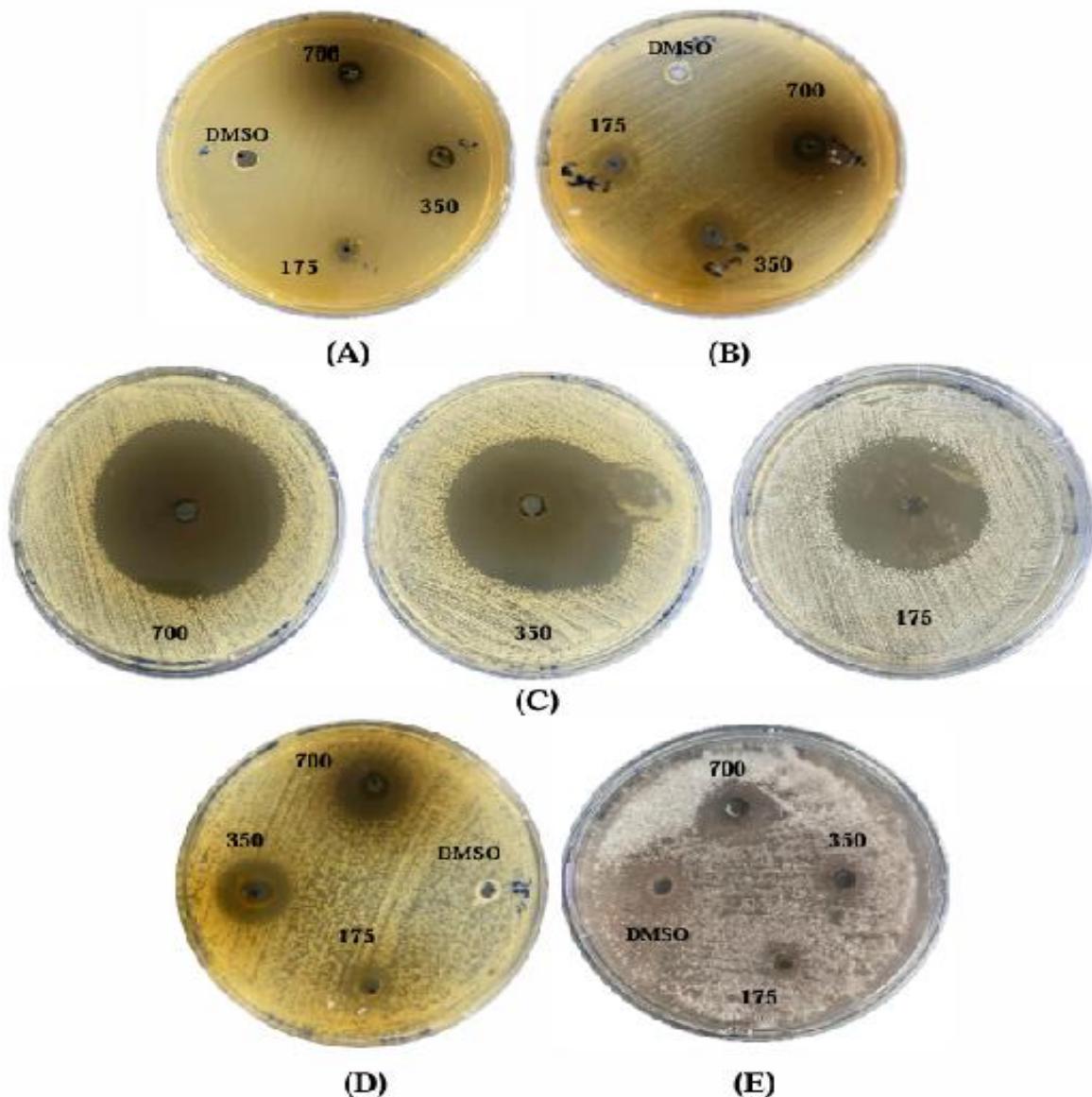


Figure 14 : Activité antimicrobienne de l'extrait hydro-éthanolique des feuilles de *G. alypum* par la technique des puits : (A) *E. coli* ; (B) *B. subtilis* subsp. *spizizenii* ; (C) *S. aureus* ; (D) *C. albicans* ; (E) *Fusarium* sp.

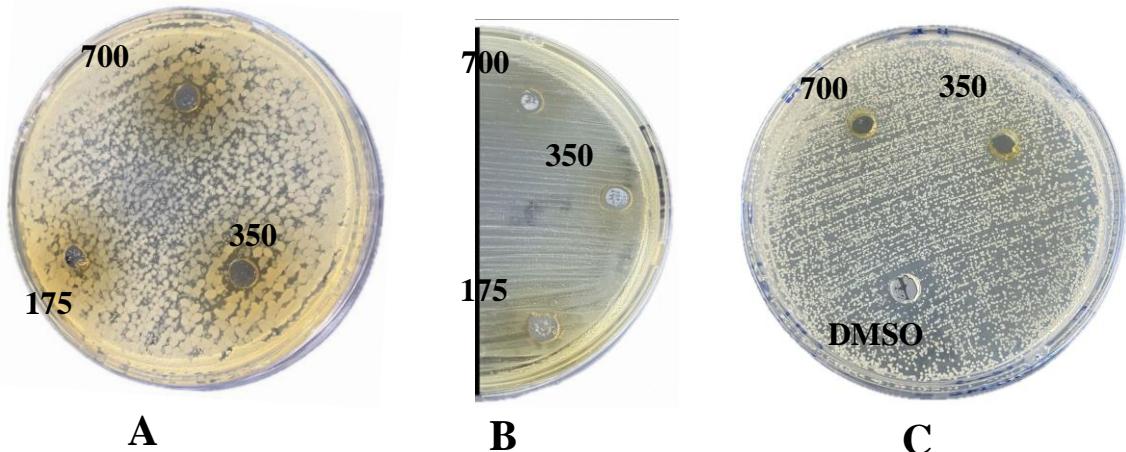


Figure 15 : Activité antimicrobienne de l'extrait hydro-éthanolique des fleurs de *G. alypum* par la technique des puits : (A) *S. aureus* ; (B) *B. subtilis* subsp. *spizizenii* ; (C) *C. albicans*.

Les résultats montrent une absence totale d'activité antimicrobienne pour l'extrait issu des fleurs, quelle que soit la concentration testée. Aucune zone d'inhibition n'a été observée ni pour les souches bactériennes ni pour les souches fongiques. Cette absence de réponse suggère que les composés bioactifs potentiellement responsables de l'effet antimicrobien sont soit absents, soit présents en concentrations trop faibles dans les fleurs de *G. alypum*.

En revanche l'extrait des feuilles, a présenté une activité antimicrobienne significative sur l'ensemble des souches testées, à l'exception d'*E. Coli* à la plus faible concentration.

E. coli a montré une sensibilité modérée à l'extrait hydro-éthanolique : la zone d'inhibition était de 10 mm à 700 mg/mL, 6 mm à 350 mg/mL, et nulle à 175 mg/mL. Ces résultats confirment la faible sensibilité des bactéries à Gram négatif, en raison de leur membrane externe lipopolysaccharidique qui limite la pénétration des agents antimicrobiens.

B. subtilis subsp. *spizizenii* (Gram positif) a présenté une inhibition modérée, avec une réponse légèrement croissante en fonction la concentration.

S. aureus a été la souche la plus sensible, avec des zones d'inhibition très importantes, atteignant 51 mm à la concentration maximale. Cette forte sensibilité pourrait être liée à la structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif, ainsi qu'à une interaction spécifique entre certains composés actifs de l'extrait.

Enfin, *C. albicans* et *Fusarium* sp, ont également montré une sensibilité importante, en particulier à la concentration de 700 mg/mL avec des zones d'inhibition de 17 mm et 21 mm respectivement.

Les résultats s'accordent avec les observations de Yuva & Mekhoukh. (2023) qui ont démontré que l'extrait hydro-éthanolique des feuilles de *G. alypum* présente une activité antimicrobienne plus marquée contre les bactéries et levures Gram-positif que contre les Gram-négatif. En effet, plusieurs études soutiennent que les bactéries à Gram positif sont généralement plus sensibles aux agents antimicrobiens que les Gram négatif.

Cette différence de sensibilité est attribuée à la structure de la paroi cellulaire : les bactéries Gram négatif, comme *E. coli*, possèdent une membrane externe riche en lipopolysaccharides, qui constitue une barrière qui limite la pénétration des composés antimicrobiens. À l'inverse, les souches à Gram positif ne disposent pas de cette protection, ce qui les rend plus vulnérables.

En conclusion à cette partie il est à signaler que la technique des puits est plus avantageuse que la technique de diffusion sur gélose par disques. Ce résultat peut s'expliquer par l'adhérence des substances actives des extraits à la matière du papier whatman ce qui empêche leur libération dans la gélose.

3.2.2 Activité antimicrobienne de l'extrait hexanique

L'activité antimicrobienne de l'extrait hexanique été étudiée sur deux souches bactériennes et une levure. Cette activité a été quantifiée en fonction de différentes concentrations testées, et les résultats de ces expérimentations sont détaillés dans le tableau (8) et la figure (16).

Tableau 8 : Activité antimicrobienne d'extrait hexanique des feuilles de *G. alypum* exprimée par les diamètres des zones d'inhibition en mm.

Souches	Concentration de l'extrait (mg/ml)	Diamètre d'inhibition	DMSO témoin négatif
<i>S. aureus</i>	200	15	(-)
	100	13	
<i>B. subtilis</i> <i>subsp .spizizenii</i>	200	0	(-)
	100	0	
<i>C. albicans</i>	200	0	(-)
	100	0	

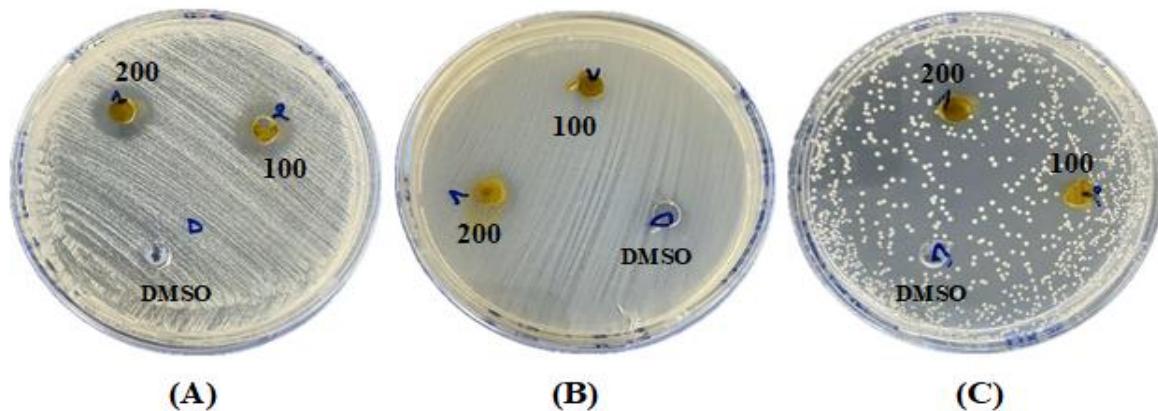


Figure 16 : Activité antimicrobienne de l'extrait hexanique par la technique des puits : (A) *S. aureus* ; (B) *B. subtilis* subsp. *spizizenii* ; (C) *C. albicans*.

Les résultats montrent que l'extrait hexanique des feuilles de *G. alypum*, présente une activité antimicrobienne notable contre *S. aureus*, comme en témoignent les diamètres d'inhibition de 15 mm obtenus à la concentration de 200 mg/mL et de 13 mm à 100 mg/mL. Cependant, aucune activité n'a été observée contre la bactérie *B. subtilis* subsp. *spizizenii* ni contre la levure *C. albicans* aux concentrations testées.

L'activité antimicrobienne d'EHx varie en fonction de l'espèce végétale, de la préparation de l'extrait, du solvant et de la sensibilité bactérienne. Nos résultats indiquent que *S. aureus* est la souche la plus sensible, ce qui pourrait s'expliquer par la structure moins complexe de sa paroi cellulaire comparée à celle des bactéries à Gram négatif, dont la membrane externe constitue une barrière à la pénétration des agents antimicrobiens.

Nos résultats sont en accords avec ceux rapportés par Nouir *et al.* (2023) qui ont montré qu'un extrait hydro-éthanolique des feuilles de *G. alypum*, obtenu par extraction au Soxhlet, présentait une activité antibactérienne significative contre *S. aureus*. De même, Friščić *et al.* (2022) ont rapporté qu'un extrait méthanolique présentait une activité inhibitrice notable contre *S. aureus*, avec une zone d'inhibition maximale de 25 mm, ainsi qu'une faible activité inhibitrice contre *B. subtilis*.

3.3 Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Les résultats de la CMI de l'extrait hydro-éthanolique de *G. alypum* vis-à-vis les différentes souches sont révélées dans le tableau (9) et par les figures (17,18).

Tableau 9: Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait hydro-éthanolique de *G. alypum* vis-à-vis de *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *S. aureus* et *C. albicans*.

Souches	Concentration de l'extrait (mg/ml)	Diamètres d'inhibition (mm)	CMI (mg/ml)	DMSO témoin négatif	
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	100	0	175	(-)	
	50	0			
	25	0			
<i>S. aureus</i>	100	36	5		
	50	31			
	25	20			
	10	17			
	5	11			
	2,5	0			
<i>C. albicans</i>	100	0	175	(-)	
	50	0			
	25	0			

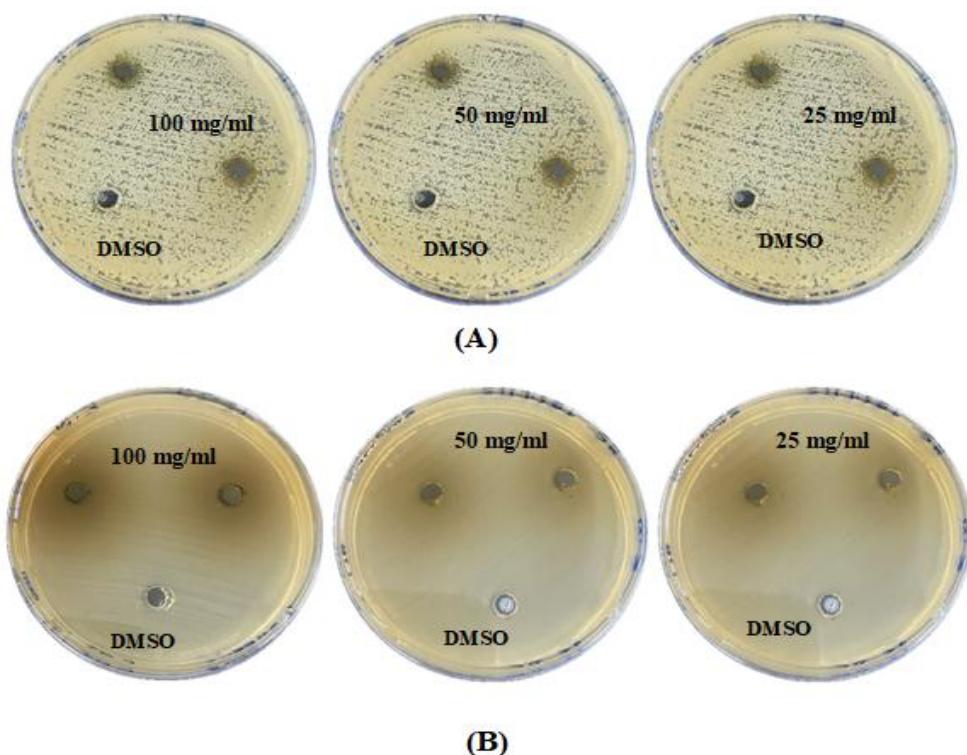


Figure 17 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'extrait hydro-éthanolique de *G. alypum* sur deux souches : (A) *C. albicans* ; (B) *B. subtilis* subsp. *spizizenii*.

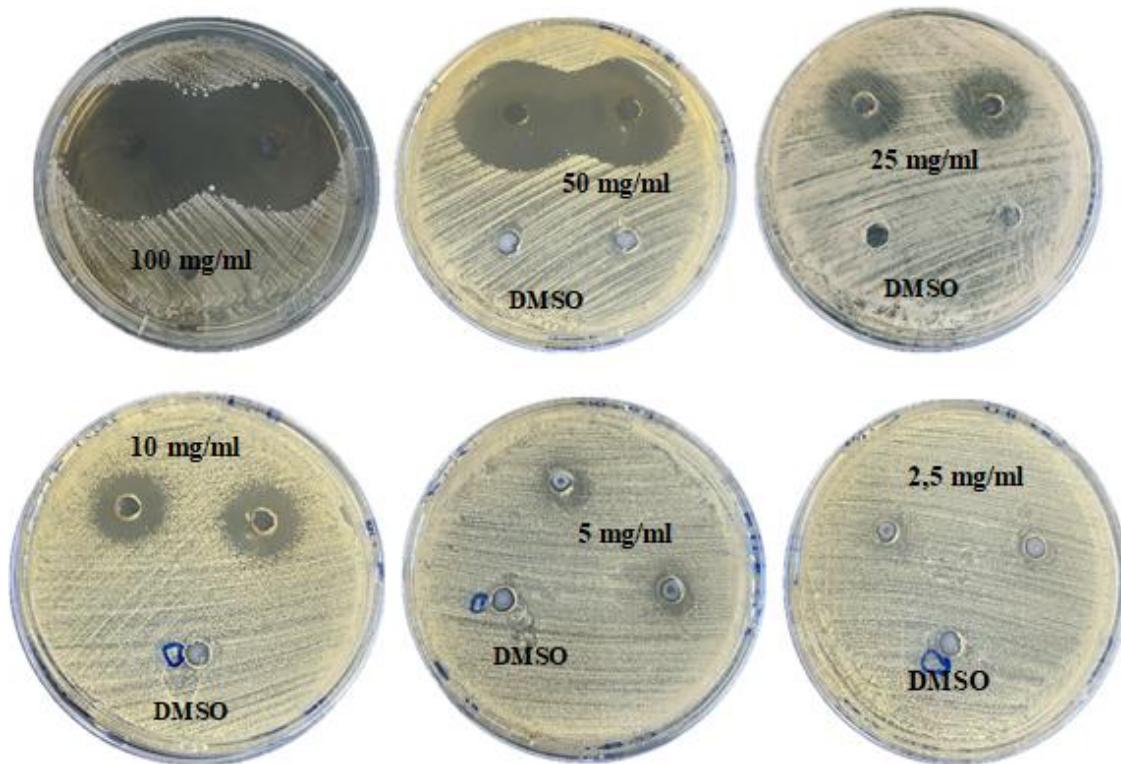


Figure 18 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait hydro-éthanolique de *G. alypum* contre *S. aureus*.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'un agent antimicrobien capable d'inhiber visiblement la croissance d'un microorganisme après incubation. Dans notre étude, la CMI de l'extrait hydro-éthanolique de *G. alypum* vis-à-vis de *S. aureus* a été estimée entre 2,5 mg/ml et 5 mg/ml, la concentration de 5 mg/ml produisant une zone d'inhibition (11 mm), tandis qu'aucune inhibition n'a été observée à 2,5 mg/ml. Ce résultat indique une efficacité remarquable de l'extrait contre cette souche, traduisant une bonne sensibilité de *S. aureus*.

En revanche, pour *C. albicans* et *B. subtilis subsp. spizizenii*, seule la concentration la plus élevée testée (175 mg/ml) a produit une zone d'inhibition (10 mm), alors que les concentrations inférieures (100, 50, 25 mg/ml) n'ont donné aucun effet. Cela suggère que la CMI, dans les conditions de notre méthode, est d'environ 175 mg/ml pour ces deux souches, ce qui reflète une activité plus faible de l'extrait à leur égard.

Ces observations confirment les tendances rapportées dans la littérature, notamment par Yuva & Mekhounkh. (2023) selon lesquelles l'extrait hydro-éthanolique de *G. alypum* est généralement plus actif contre les microorganismes Gram positifs. Cette différence de

Résultats et discussion

sensibilité pourrait être expliquée par la structure plus perméable de la paroi des bactéries Gram positives, facilitant la pénétration des composés bioactifs présents dans l'extrait.

L'activité antimicrobienne observée pourrait être attribuée à la richesse de l'extrait hydro-éthanolique de *G. alypum* en composés phénoliques et flavonoïdes, connus pour leurs effets inhibiteurs sur divers micro-organismes.

Ces composés exercent leur effet antimicrobien par divers mécanismes, notamment la chélation du fer, un élément essentiel à la croissance bactérienne, ainsi qu'une interaction directe avec la membrane cellulaire, pouvant entraîner une altération de son intégrité structurelle et une fuite des constituants intracellulaires (Funatogawa *et al.*, 2004). De tels mécanismes pourraient contribuer à l'activité inhibitrice observée, en particulier contre *S. aureus*.

Conclusion et Perspectives

4. Conclusion et Perspectives

Dans le présent travail, l'activité antimicrobienne des extraits de feuilles et de fleurs de *Globularia alypum* L., a été évaluée vis-à-vis de cinq souches microbiennes : *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739), une levure : *Candida albicans* (ATCC 10231) et une moisissure (*Fusarium sp.*).

Plusieurs méthodes d'extraction ont été utilisées et la technique de macération s'est révélée plus efficace que l'extraction par Soxhlet, offrant à la fois des rendements plus élevés et une meilleure activité antimicrobienne.

En effet, cette étude a mis en évidence que les extraits de feuilles de *G. alypum* présentent une activité antimicrobienne significative, particulièrement, vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. Cette activité a été observée de manière plus marquée en utilisant la technique des trous en comparaison avec la technique de diffusion à partir des disques, en revanche, les extraits obtenus à partir des fleurs n'ont montré aucune activité. De ce fait, il a été conclu que, l'extrait hydro-éthanolique s'est révélé plus actif que l'extrait hexanique contre les souches microbiennes testées.

Bien que l'extrait hydro-éthanolique des feuilles de *G. alypum* présente un effet inhibiteur prometteur, notamment vis-à-vis de *S. aureus* où, une faible concentration de l'extrait suffit pour inhiber la croissance de la bactérie, il convient de souligner en revanche, que des concentrations plus élevées sont nécessaires pour inhiber la croissance de *C. albicans* et de *B. subtilis* subsp. *spizizenii*.

L'ensemble des résultats obtenus met en évidence le potentiel de *G. alypum* en tant que source d'agents antimicrobiens prometteurs.

En perspective, ce travail est une étape préliminaire pour des études plus larges, plus approfondies et plus complètes, incluant :

- Compréhension de l'effet sélectif de certains extraits actifs de la plante étudiée sur la bactérie *Staphylococcus aureus*.
- L'élargissement de l'étude de l'activité antimicrobienne sur d'autres souches pathogènes.

- La mise en évidence d'autres tests biologiques (antidiabétiques, anti-inflammatoires, anticancéreux, etc.).
- La purification et l'identification des métabolites bioactifs produits par *G. alypum* L.
- L'étude des mécanismes d'action de ces métabolites et leur toxicité principalement *in vivo*. Cette démarche contribuerait à la valorisation pharmacologique de cette plante et à son intégration potentielle dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutique.

5. Abstract

This work focused on the in vitro evaluation of the antimicrobial activity of the medicinal plant *Globularia alypum L.*, widely used in traditional medicine. To achieve this, ethanolic extracts (from leaves and flowers) and hexanic extracts (from leaves) were prepared. The antimicrobial activity of these extracts was evaluated on five microbial strains: three bacteria, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739), and *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* (ATCC 6633), one yeast, *Candida albicans* (ATCC 10231), and one mold, *Fusarium* sp. Two methods were used for the evaluation: disc diffusion on agar and the well diffusion technique.

The results showed that the ethanolic extract from *Globularia alypum L.* leaves possesses interesting antimicrobial activity, especially against *Staphylococcus aureus*, with more pronounced inhibition zones observed using the well diffusion method. The disc diffusion method revealed a more targeted activity, limited to *S. aureus* and moderate against *E. coli*. In contrast, the flower extract and the hexanic extract showed little or no activity. The determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) confirmed the selective efficacy of the ethanolic extract against certain strains. These results suggest a promising therapeutic potential of this plant, particularly against Gram-positive bacteria.

Keywords: *Globularia alypum L.*, Ethanolic extract, Hexanic extracts, Antibacterial activity, MIC.

6. الملخص

تضمنت هذه الدراسة تقييماً في المختبر للنشاط المضاد للميكروبات لنبات غلوبولاريا أليبيوم إل (*Globularia alypum L.*) (Globularia alypum L.) الذي يستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي. ولهذا الغرض، تم تحضير مستخلصات إيثانولية (من الأوراق والأزهار) ومستخلصات هكسانية (من الأوراق). تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات لهذه المستخلصات على خمس سلالات ميكروبية: ثلاثة بكتيريا هي المكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538)، والإشريكية القولونية (*Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* ATCC 6633)، والعصوية الرقيقة (*Escherichia coli* ATCC 8739)، بالإضافة إلى خميرة المبيضة البيضاء (*Candida albicans* ATCC 10231)، وعفن فوزاريوم (*Fusarium sp.*). وقد تم استخدام طريقتين للتقدير: طريقة الانتشار بالأقراص على أجار، وتقدير الآثار.

أظهرت النتائج أن المستخلص الإيثانولي لأوراق نبات غلوبولاريا أليبيوم إل (*Globularia alypum L.*) يمتلك نشاطاً مثيراً للاهتمام مضاداً للميكروبات، خاصةً ضد بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*), حيث لوحظت مناطق تثبيط أكثر وضوحاً عند استخدام طريقة الآثار. بينما كشفت طريقة الأقراص عن نشاط أكثر استهدافاً، اقتصر على المكورات العنقودية الذهبية وكان معتدلاً ضد بكتيريا الإشريكية القولونية (*E. coli*). على النقيض من ذلك، أظهر مستخلص الأزهار والمستخلص الهكساني نشاطاً ضعيفاً أو معدوماً. أكدت تحديدات التركيز الأدنى المثبط (CMI) الفعالية الانتقائية للمستخلص الإيثانولي ضد بعض السلالات. تشير هذه النتائج إلى إمكانية علاجية واعدة، لا سيما ضد البكتيريا إيجابية الجرام.

الكلمات المفتاحية: *Globularia alypum L.*: مستخلص إيثانولي، مستخلصات هكسانية، نشاط مضاد للميكروبات، التركيز الأدنى (CMI).

Références bibliographiques

- Abu-Hijleh, A., Adwan, G., & Abdat, W. (2018). Biochemical and molecular evaluation of the plant *Ecballium elaterium* extract effects on *Escherichia coli*. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 19(2), 1–11.
- Agban A, Hoekou Y, Pissang P, Tchacondo T, & Batawila K. (2020). Evaluation du potentiel antimicrobien et de la toxicité des extraits de *Jatropha multifida* (Euphorbiaceae). *Journal Linn, of Applied Biosciences*, 151 : 15550-15558.
- Amessis-Ouchemoukh, N., Madani, K., Falé, P. L., Serralheiro, M. L., Araújo, M.E.M. (2014). "Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities", *Industrial Crops and Products*, V. 53, 6 - 15.
- Ajila, C., Brar, S., Verma, M., Tyagi, R., Godbout, S., & Valéro, J. (2011). Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. *Critical reviews in biotechnology*, 31(3), 227-249.
- Asraoui F., Kounnoun A, Cadi HE, Cacciola F, Majdoub YOE, Alibrando F, Mandolfino F, Dugo P, Mondello L, Louajri A. (2021). Phytochemical Investigation and Antioxidant Activity of *Globularia alypum L.* *Molecules*. 26 (3):759.
- Barhouchi, B. (2013). Synthèse des dérivés glucidiques, lipidiques et protéiques d'origine biologique et applications industrielles (Thèse de doctorat). Université Badji Mokhtar-Annaba.
- Battraud, Paul. (2017). La résistance aux antibiotiques, un mythe ou une réalité ? Lille: Université de Lille 2.
- Basavaraju M et Gunashree B S. (2022). *Escherichia coli*: An Overview of Main Characteristics dans : Marjanca Starčić Erjavec. *Escherichia coli - Old and New Insights*. IntechOpen. p. 1–21.
- Beconcini, D., Felice, F., Fabiano, A., Sarmento, B., Zambito, Y., & Di Stefano, R. (2020). Antioxidant and anti-inflammatory properties of cherry extract: nanosystems-based strategies to improve endothelial function and intestinal absorption. *Foods*, 9(2), 207.

- Bellik, Y.; Mekhoukh, N. (2023). Antioxidant and antimicrobial activities of four medicinal plants from Algeria. European Journal of Chemistry, 14 (1), 121-128.
- Ben Mansour B, Garigou B, Elloumi I, Benhadjzilan Z, Gharabigammar S, Lassoued. (2012). Investigation of Antioxydant activity of ethanolic extract of *Globularia alypum L*, Medicinal Plants Research, 4193-4199pp.
- Berman J. (2012). *Candida albicans*. Current Biology, 22 (16), p : 1-3
- Boubekri K. (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de Doctorat Recherche : Chimie. Université Mohamed Khider Biskra., 176.
- Boutemak, K., Safta, B., Ayachi, N. (2015). "Study of the Anti-Inflammatory Activity of Flavonic Extract of *Globularia alypum L.*", Acta Physica Polonica A, V. 128, n° 2B, 239 - 240
- Bock B. (2013). Base de données nomenclature de la flore de France. Tela Botanica.
- Boros B; Jakabova S; Dornyei A; Horvath G; Pluhare Z; Kilar F; Felingera A. (2010). Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography mass spectrometry in Thymus specie. Journal of Chromatography A; 1217: 7972–7980.
- Bouabdelli A, Djelloul OZ, Kaid A, Semmoud A, Addou. (2012). Antimicrobial Activity of 22 Plants Used in Urilithiasis Medicine in Western Algeria, Tropical Disease, 530-535pp.
- Bouchouka, E. (2016). Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes. (Doctoral dissertation, Université Badji Mokhtar Annaba ; 126).
- Boutemak, K., Safta, B., & Ayachi, N. (2015). Study of the Anti-Inflammatory Activity of Flavonic Extract of *Globularia alypum L*. Acta Physica Polonica A, 128(2B), B-239–B-241.
- Boulahbal F. (2002). Microbiologie SI clinique. OPU. P.173
- Carryn, (2013) : Résistance aux antibiotiques Rôle du laboratoire de bactériologie .p : 5.
- Couplan, F., 2012; "Les plantes et leurs noms: histoires insolites", QUAE, 223 p.
- Deacon, J. W. (2006). Fungal Biology. Blackwell Publishing.

Dorman, H. J. D. (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oil. *Journal of Applied Microbiology*. 88-308-316.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., "Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds", *Food Chemistry*, V. 97, n° 4, (2006), 654 - 660.

Elbetieha A., Oran A, Alkofahi A, Darmani H and Raies M.(2000) Fetotoxic potentials of *Globularia arabica* and *Globularia alypum* (Globulariaceae) in rats. *Ethnopharmacology* J. 2000;72:215-219.

Fehri, B., et al. (2012). Active spermatogenesis induced by a reiterated administration of *Globularia alypum L* . Aqueous leaf extract. *Pharmacognosy Res* 4(3): 138-147.

Friščić, M., Petlevski, R., Kosalec, I., Madunić, J., Matulić, M., Bucar, F., Hazler Pilepić, K. et Maleš, Ž., (2022). *Globularia alypum L*. and Related Species: LC-MS Profiles and Antidiabetic, Antioxidant, Anti-Inflammatory, Antibacterial and Anticancer Potential. *Pharmaceuticals*, 15(5), p.506

Funatogawa, K.; Hayashi, S.; Shimomura, H.; Yoshida, T.; Hatano, T.; Ito, H.; Hirai, Y.(2004). Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol. Immunol.* 48, 251–261.

Ghedira K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4): 162-169.

Gülçin I., Mahfus E., Hassan Y. A. E. (2012). Antioxidant activity of clove oil -- A powerful antioxidant source. *Arabian Journal of Chemistry*. 5(4): 489-499.

Gulzar M. and Zehra A. (2018). *S. aureus*: A brief review. *International Journal of Veterinary Science and Research*, 4 (1), p : 20-22

Guiraud, J.-P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Dunod, Paris. 615 p.

Gupta P D. and Birdi T J. (2017). Development of botanicals to combat antibiotic resistance. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 8 (4), p 27–266 :

Ghlissi, Z., Kallel, R., Sila, A., Harrabi, B., Atheymen, R., Zeghal, K., Bougatef, A., Sahnoun, Z., (2016). "Globularia alypum methanolic extract improves burn wound healing

process and inflammation in rats and possesses antibacterial and antioxidant activities", Biomedicine Pharmacotherapy, V. 84, n° 8, (2016), 1488 - 1495.

González-León Y., Ortega-Bernal J., Anducho-Reyes M A. and Mercado-Flores Y. (2022). *Bacillus subtilis* y Trichoderma: Características generales y su aplicación en la agricultura. Revista especializada en ciencias químico-biológicas, 25. p :14–1

Hajji, N., et al. (2020). Purgative/laxative actions of *Globularia alypum* aqueous extract on gastrointestinal-physiological function and against loperamide-induced constipation coupled to oxidative stress and inflammation in rats. *Neurogastroenterol Motil* 32(8): e13858.

Hajji, N., et al. (2021). *Globularia alypum L.* Modulates Inflammatory Markers in Human Colon and Shows a Potential Antioxidant Role in Myeloid Leukemic Cells. *Transl Med unisa* 24(1): 13-23.

Hachi, M., Ouafae, B., Hachi, T., Mohamed, E. B., Imane, B., Atmane, R., & Zidane, L. (2016). Contribution to the ethnobotanical study of antidiabetic medicinal plants of the Central Middle Atlas region (Morocco). *Lazaroa*, 37, 135–144.

Hammiche, V., Merad, R., Azzouz, M. (2013). Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. Springer, 393 p.

Hazler Pilepić, K., Friščić, M., Duran, A., Maslo, S., Garić, R., Čuljak, S. and Šutalo, K., (2016). Contribution to *Globularia* phylogeny based on nuclear ribosomal spacer and two chloroplast DNA regions. *Periodicum Biologorum*, 118(4), pp.417-424.

Haied, N., Seridi, R., Djahoudi, A., & Hadef, Y. (2015). Composition chimique et activité antibactérienne des Huiles Essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. du Nord est Algérien. *Rev. Sci. Technol., Synthèse*, 30, 33-39

Hlaiem S., Della Rocca G., Barberini S., Danti. et Ben Jamâa ML. (2021). Morphological and molecular identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Olea europaea* var. *sylvestris* decline phenomenon in Tunisia. *Plant Pathology & quarantine*, 11 (1), p : 15-22.

Khantouche Linda, Abderabba Manef. "Dosage des poly phénols et étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des différents extraits des feuilles du *Globularia alypum L.*"

IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology (IOSR-JESTFT) 12.1 (2018): 68-74.

Khlifi, M; Hamdi A; Elhayouni S; Cazaux JP; Sauchard F; Couderc J; Bouajila. (2011). Global Chemical Composition and Antioxidant and antituberculosis Activities of Various Extracts of *Globularia alypum L.*, leaves, molecules, 16, 10592-10603p. .

Khalifi Taghzouti, O., Balouiri, M., Ouedrhiri, W., Ech Chahad, A., Romane, A., & Abdellah, E. (2016). In vitro evaluation of the antioxidant and antimicrobial effects of *Globularia alypum L.* extracts. Journal of Materials and Environmental Science, 7(6), 1988–1995.

Khribch, J., Smara, N., Laghrib, F., Zrira, S., Nassik, S., El Houadfi, M., & Oukessou, M. (2018). Comparative study of the antibacterial activity of cinnamon and origan essential oils and their primary components on avian *Escherichia coli* strains. International Journal of Advanced Research, 6(9), 373–381.

Kraza, L. (2020). Évaluation de l'activité antioxydante, antimicrobienne et antidiabétique des composés phénoliques d'une plante médicinale *Globularia alypum L.* dans la région de Laghouat (Thèse de doctorat, Université Larbi Ben M'hidi Oum El-Bouaghi).

Krimat, S., Dob, T., Lamari, L., Boumeridja, S., Chelghoum, C., Metidji, H., "Antioxidant and antimicrobial activities of selected medicinal plants from Algeria", Journal of Coastal Life Medicine, V. 2, n° 6, (2014), 478 - 83.

Leclerc, L. (1874). *Rachef Er-roumouz (révélation des énigmes) d'Abd Er-Rezzaq Ed-Djezaïry*. Baillière, 396 p.

Lemaoui, C.-E., Layaida, H., Badi, A., & Foudi, N. (2017). Stratégies actuelles de lutte contre la résistance aux antibiotiques. Journal des Anti-infectieux, 19(1), 12-19.

Liu W, Liu J, Yin D, Zhao X. (2015). Influence of Ecological Factors on the production of active substances in the anti-cancer plant *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S. Ying. PLOS One, 10(4), 1-22.

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2018). *Brock Biology of Microorganisms* (15th ed.). Pearson.

- Malinvaud. (2014). Sur le noircissement des feuilles de Globulaire Turbith (*Globularia alypum L.*). Bulletin de la société botanique de France.
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128.
- Mehenni R., and Rahmouni M. (2017). Propriétés anti oxydantes d'extraits d'une plante médicinale: *Globularia alypum*. Application pharmaceutique: solution hydro alcoolique. Mémoire de fin de cycle Pour l'obtention du diplôme de Master, Département de Génie des Procédés, Université A.MIRA, BEJAIA.
- Mohand Aït Youssef. (2006). Plantes médicinales de Kabylie. Ibis Press, 349 p.
- Nouir, S., Dbeibia, A., Bouhajeb, R., Haddad, H., Khélifa, A., Achour, L., Ghardallou, M. et Zaïri, A., (2023). Phytochemical Analysis and Evaluation of the Antioxidant, Antiproliferative, Antibacterial, and Antibiofilm Effects of *Globularia alypum* (L.) Leaves. *Molecules*, 28, 4019.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., & Kolter, R. (2000). Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49-79.
- Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451(7175): 141-146.
- Paris, R. (1946). Sur le noircissement des feuilles de *Globulaire Turbith* (*Globularia Alypum L.*). Bulletin de la Société Botanique de France, 93(5-6), 159-162.
- Penchev P.I. (2010). Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions (phdthesis). Thèse de doctorat : Génie des Procédés et de l'Environnement. Toulouse., 240 p.
- Quezel, P. Et Santa, S. (1963). Nouvelle Flore de l'Algérie et de ses régions désertiques mérédionales. Tome II. Paris, Editions du Centre National de la Recherche Scientifique. In: La Terre et La Vie, Revue d'Histoire naturelle, tome 18, n°2, 1964. P. 238.
- Rached, W., Benamar, H., Bennaceur, M., Marouf, A., (2010). "Screening of the antioxidant potential of some Algerian indigenous plants", *Journal of Biological Sciences*, V. 10, n° 4, 316 - 324.

- Rafińska K., Pomastowski P., Wrona O., Górecki R. and Buszewski B. (2017). *Medicago sativa* as a source of secondary metabolites for agriculture and pharmaceutical industry. *Phytochemistry Letters*, 20, p : 1-20
- Rameau J. C., Mansion D., and Dumé G. (2008). Flore forestière française: région méditerranéenne. Forêt privée française. Paris, France.
- Safdar, M. N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K., & Sadozai, A. A. (2017). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of food and drug analysis*, 25(3), 488-500.
- Shanab, S., & Auzi, A. (2022). Evaluation of Acute Toxicity of Aqueous Extract of Libyan *Globularia Alypum* in Albino Mice. *Khalij-Libya Journal of Dental and Medical Research*, 6(1), 78–80.
- Skim, F.; Kaaya, A.; Jaouhari, J.T.; Lazrek, H.B.; Ana, M.; Elamri, H. (1999). Hypoglycemic activity of *Globularia alypum* leaves in rats. *Fitoterapia*, 70, 382-389.
- Taleb -- Dida N., Bouchenak M. (2011). *Globularia alypum* aqueous extract decreases hypertriglyceridemia and ameliorates oxidative status of the muscle, kidney, and heart in rats fed a high-fructose diet. *Nutr. Res.* 31(6): 488-495.
- Taghzouti, O. K., Balouiri, M., Ouedrhiri, W., Echchahad, A., & Romane, A. (2016). In vitro evaluation of the antioxidant and antimicrobial effects of *Globularia alypum* L. extracts. *Journal of Materials and Environmental Science*, 7(6), 1988–1995.
- Touaibia, M., Chaouch, F.Z. (2016). "Global chemical composition and antioxidative effect of the ethanol extracts prepared from *Globularia alypum* leaves", *Nature and Technology*, V. 14, n°2, (2016), 2 - 6.
- Wagenitz, G. (2004). *Globulariaceae*. In *Flowering Plants· Dicotyledons: Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae)* (pp. 159-162). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Waksmundzka-Hajnos, M. & Sherma, J. (2011). High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical ience. *Chromatographic Science Series*, 477-478.

Waller, S. B., Cleff, M. B., Serra, E. F., Silva, A. L., Gomes, A. D. R., De Mello, J. R. B., De Faria, R. O., & Meireles, M. C. A. (2017). Plants from Lamiaceae family as source of antifungal molecules in humane and veterinary medicine. *Microbial Pathogenesis*, 104, 232-237.

Zennaki S., Krouf D., Taleb -- Senouci D., Bouchenak M. (2009). *Globularia alypum L.* lyophilized methanolic extract decreases hyperglycaemia and improves antioxidant status in various tissues of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. 6(1), Article 34.

Zhang T, Gong Z, Zhou B, Rao L, Liao X. (2025). Recent progress in proteins regulating the germination of *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol*.

Annexes

Annexe 1

Milieux de culture

➤ **Milieu Mueller-Hinton**

- Agar : 17g/L
- Infusion de bœuf : 300g /L
- Hydrolysat acide de caséine : 17,5g/L
- Amidon : 1,5 g/L
- pH final : 7,3

➤ **YPG (Yeast-extract-Peptone-Glucose-Agar)**

- Extrait de levure : 10 g/L
- Peptone : 10 g/L
- Glucose : 20 g/L
- Agar : 15 – 20 g/L
- pH= 5 (Guiraud, 1998)

➤ **GN (Gélose nutritive)**

- Extrait de viande : 5 g
- Peptone : 10 g
- Chlorure de sodium : 5 g
- Gélose : 15 g
- pH = 7,2, autoclavée 20 minutes à 120°C (Guiraud, 1998)

➤ **Milieu Chapman (Mannitol Salt Agar)**

- Extrait de viande : 1 g
- Peptone : 10 g
- Extrait de levure : 1 g
- Mannitol : 10 g
- NaCl (Chlorure de sodium) : 75 g
- Rouge de phénol : 0,025 g

- Agar : 15 g
- Eau distillée : 1000 ml
- pH = 7,4

➤ **OGA (Oxytetracycline Glucose Agar)**

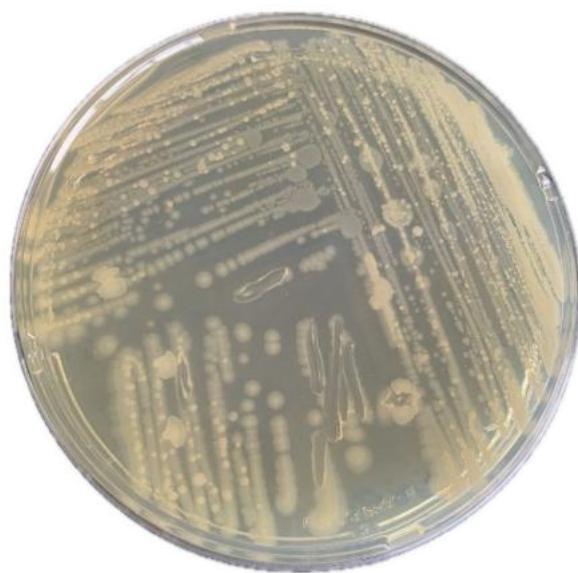
- Glucose : 10 g
- Peptone : 5 g
- Extrait de levure : 3 g
- Agar : 15 – 20 g
- Oxytétracycline : 100 mg (ajoutée après stérilisation, à 45–50°C pour ne pas l'inactiver)
- Eau distillée : 1000 ml
- pH = 6,5

Annexe 2

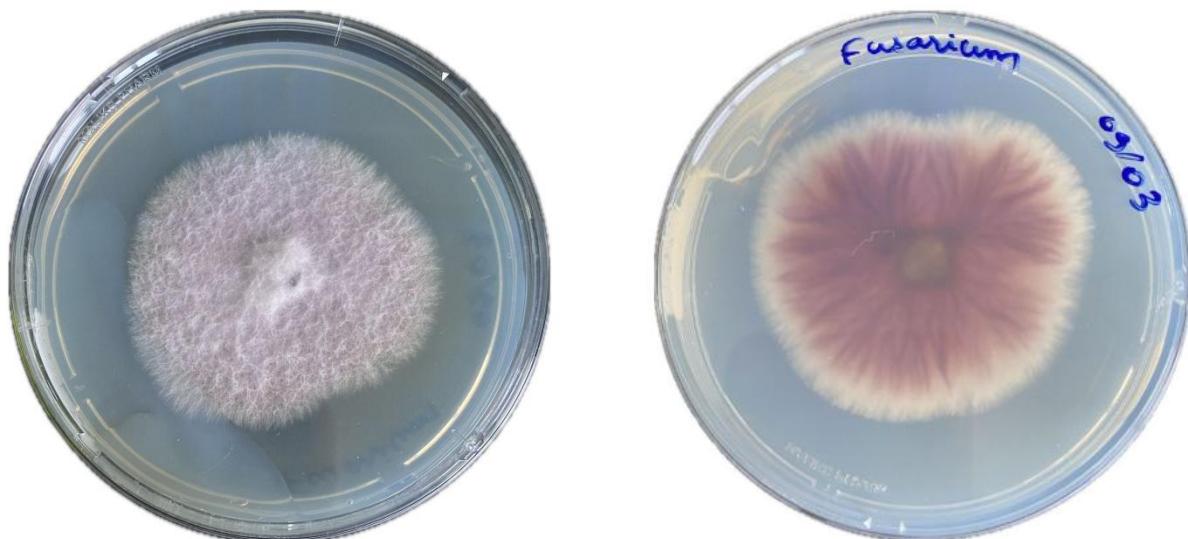
Souches microbiennes



Staphylococcus aureus (ATCC 6538).



Bacillus subtilis sub sp. *Spizizenii* (ATCC 6633).



Fusarium sp.



Candida albicans (ATCC 10231).



Escherichia coli (ATCC 8739).

Thème : Contribution à l'étude des potentialités antimicrobiennes de *Globularia alypum L.***Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie****Résumé :**

Ce travail a porté sur l'évaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de la plante *Globularia alypum L.*, largement utilisée en médecine traditionnelle. Pour ce faire, des extraits hydro-éthanoliques (à partir des feuilles et des fleurs) et hexaniques (à partir des feuilles) ont été préparés. L'activité antimicrobienne de ces extraits a été évaluée sur cinq souches microbiennes : trois bactéries *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739) et *Bacillus subtilis sub sp. Spizizenii* (ATCC 6633), une levure *Candida albicans* (ATCC 10231) et une moisissure *Fusarium sp.* En utilisant deux méthodes : la diffusion sur gélose par disques et par la technique des puits.

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait hydro-éthanolique des feuilles de *Globularia alypum L.* possède une activité antimicrobienne intéressante, surtout contre *Staphylococcus aureus*, avec des zones d'inhibition plus marquées par la méthode des puits. La méthode des disques a révélé une activité plus ciblée, limitée à *S. aureus* et modérée contre *E. coli*. En revanche, l'extrait des fleurs et l'extrait hexanique se sont révélés peu ou non actifs. La détermination des CMI a confirmé l'efficacité sélective de l'extrait hydro-éthanolique contre certaines souches. Ces résultats suggèrent un potentiel thérapeutique prometteur, en particulier contre les bactéries à Gram positif.

Mots-clés : *Globularia alypum L*, Extrait hydro-éthanolique, Extraits hexaniques, Activité antibactérienne, CMI.

Laboratoires de recherche : (LaMyBAM) Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'Activité Microbienne, (U Constantine 1 Frères Mentouri).

Président du jury : BOUKHALFA H. (MCB - UConstantine 1 FM).

Rapporteur : KACEM CHAOUCHE N. (Professeur - UConstantine 1 FM).

Co rapporteur : MANSOUR M. (Docteur LaMyBAM - UConstantine 1 FM).

Examinateur : MOUSSAOUI S. (MCB - UConstantine 1 FM).

