N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

MEMOIRE

Présenté pour obtenir le Grade de

MASTER

Filière : Chimie
Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Par

BELGAID SADJIA **CHIKHOUN LOUIZA**

Thème

ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE ET ANTIFONGIQUE DES EXTRAITS DU PHLOMIS BOVEI DE NOE -PREPARATION D'UNE FORME PHARMACEUTIQUE-

Soutenu le 03/10/2013, devant le jury composé de :

Mr.	**MEZIANE Smail**	**MCA - UMMTO**	**Président**
Mme.	**BELMAHDI Lila**	**MAA -UMMTO**	**Examinatrice**
Mme.	**IRATNI Ghenima**	**MAA -UMMTO**	**Examinatrice**
Mme.	**FERNANE Farida**	**MCA - UMMTO**	**Promoteur**
Mr.	**MEDDOUR Rachid**	**MCA - UMMTO**	**Co-Promoteur**

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire pédagogique de Chimie Pharmaceutique du département de Chimie de la faculté des Sciences à l'UMMTO. Sous la proposition et la direction de Madame FERNANE Farida et Monsieur MEDDOUR Rachid.

Nous remercions vivement notre enseignante et promotrice Mme Fernane Farida, Maitre de Conférences (A) pour les connaissances qu'elle nous a transmis durant notre formation en chimie pharmaceutique.
Nous la remercions également pour ses critiques, ses orientations, ses conseils et corrections qu'elle nous a prodigué durant la conduite de ce travail.

Nous remercions également Monsieur Rachid MEDDOUR, Maitre de Conférences A au département Agronomie de la faculté des sciences Biologiques et Agronomiques pour ses conseils et sa bienveillance. Qu'il soit assuré de notre profonde gratitude pour nous avoir guidé et aidé tout au long de la rédaction de ce présent mémoire.

Nous remercions Mr Smail Meziane, Maitre de Conférences A au département de Chimie pour avoir accepté de présider le jury de notre

Nous remercions également Mme Lila Belmahdi Maitre Assistante(A) au département de Chimie ainsi que Mme Ghenima IRATNI Maitre Assistante(A) au département de Biologie(UMMTO) pour l'honneur qu'elles nous ont fait en acceptant de juger ce modeste travail.

Nous tenons également à remercier ***Dr Farida HAOUCHINE*** *la responsable du laboratoire microbiologie «C.H.U-Nedir Mohamed-Tizi Ouzou» pour nous avoir permis l'accès au laboratoire et mis à notre disposition le nécessaire pour la conduite de nos expériences. Nous remercions également toute l'équipe exerçant dans ce laboratoire pour toute l'aide prodiguée afin de mener à terme nos expériences.*

Un grand merci à ***Mme Landri Nabila****, surveillante médicale en Hémato Pédiatrie «C.H.U-Nedir Mohamed-Tizi Ouzou» pour l'aide qu'elle nous a fourni, ainsi que pour ses conseils et ses encouragements.*

Nous voudrions aussi remercier très chaleureusement nos familles pour le soutien moral et financier.

Enfin, nous exprimons notre gratitude à tous nos enseignants qui nous ont formé, du primaire jusqu'à nos jours.

Merci

Dédicace

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

A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma ***mère*** *qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour tous les sacrifices qu'elle me contente, toute la confiance qu'elle m'accorde tout l'amour dont elle m'entoure*

A mon honorable ***père****, qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, qui représente pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cesser de m'encourager*
A ma grand-mère

Que dieu les gardes et les protèges

A mes chers frères ***Juba*** *&* ***Idir***
A ma très chère sœur ***Dyhia*** *et sa petite famille surtout le petit* ***yazid***

A mon cher époux ***Ahmed*** *les mots ne peuvent résumer ma reconnaissance et mon amour à*
ton égard ainsi qu'à ma belle famille ***Bessad****.*

A tous mes camarades du Master chimie pharmaceutique.

A tous ceux qui me sont chers.

Sadjia BELGAID

Dédicace

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

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

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

A mon cher époux ***farouk*** *les mots ne peuvent résumer ma reconnaissance et mon amour à ton égard.*

A ma très chère sœur Samira

Ames frères ***: Lyes****,* ***Smail*** *et* ***Juba***

A ma belle famille ***Ourrad****.*

A mes amis

Louiza CHIKHOUN

Résumé

Le *Phlomis Bovei de Noé* (*Lamiaceae*) est une plante endémique de la flore algérienne très utilisée en Algérie pour ses vertus médicinales. Le Phlomis Bovei de Noé dont ses extraits avec différents solvants ont fait l'objet de cette étude, elle a été récoltée à Ait Ouabane (Tizi Ouzou) et a été identifiée par le département d'Agronomie de la faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'UMMTO en tant que *Phlomis Bovei de Noé.* L'huile essentielle extraite par hydrodistillation des feuilles et tiges du Phlomis Bovei présentait un rendement très faible de l'ordre de 0.0125%. Les tests phytochimiques effectués sur les extraits alcooliques (éthanolique et méthanolique) et les extraits aqueux et frais ont permis à partir d'un criblage phytochimique de rendre compte de la présence des tanins, des saponosides, des Alcaloïdes bases, des Acides gras et des Huiles volatiles.

L'étude de l'activité des différents extraits, issue des feuilles et tiges, sur des souches bactériennes (*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus et proteus mirabilus*) et fongiques (*Condida albiacans*) a montré que le pouvoir antimicrobien des extraits éthanoliques était très important et se caractérisait par une action bactéricide contre ces bactéries et fongicide sur la levure. Cette activité était plus importante sur les bactéries que sur les levures. A l'issue de ces résultats, un essai de formulation d'une crème à base de l'extrait éthanolique a été préparé en vue d'un traitement contre une infection bactérienne.

Cette crème a montré une activité antibactérienne comparable à celle commercialisée sous le nom ACIFUDAL.

Mots clés : Lamiacées, Phlomis Bovei, extrait, activité antibactérienne, activité antifongique.

Abstract

Phlomis Bovei is an endemic plant of the Algerian's flora, widely used in Algeria for its medicinal properties. Phlomis Bovei of Noah whose its extracts with different solvents, has been the subject of this study, it was collected with Has Ouabane (Tizi Ouzou) and was identified by the department of Agronomy of the Biological and Agronomic Faculty of Science of the UMMTO as Phlomis Bovei of Noah. The essential oil extracted by hydrodistillation from the sheets and stems Phlomis Bovei presented a very weak output of about 0.0125%. The tests phytochimic carried out on the alcoholic extracts (ethanolic and methanolic) and the aqueous and fresh extracts made it possible starting from a phytochimic sifting to give an account of the presence of tannins, saponosides, Alkaloids bases, Fatty-acids and volatile Oils.

The study of the activity of the various extracts, resulting from the sheets and stems, on bacterial strains (Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus and proteus mirabilus) and fungic (Condida albiacans) showed that the antimicrobic capacity of the extracts ethanolic was very important and was characterized by a bactericidal action against these bacteria and fungicide on yeast. This activity was more important on the bacteria than on yeasts. At the conclusion of these results, a test of formulation of a cream containing the extract ethanolic was prepared for a treatment against a bacterial infection.

This cream showed a antibactérienne activity comparable with that marketed under name ACIFUDAL.

Key words: Lamiacées, Phlomis Bovei, extract, antibactérienne activity, antifongic activity.

Sommaire

Liste des abréviations et symboles

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale 1

Partie Bibliographique

Chapitre I : Généralités

1. Plantes médicinales 2

1.1. Définition 2

1.2. Utilisation des plantes médicinales 2

2. Huiles essentielles 2

2.1. Définition 2

2.2. Localisation des huiles essentielles 2

2.3. Composition chimique des huiles essentielles 3

2.4. Facteurs influençant la composition des huiles essentielles 3

2.5. Procédés d'obtention des huiles essentielles 3

2.5.1. Expression à froid 3

2.5.2. Distillation 4

2.6. Techniques d'analyse des huiles essentielles 4

3. Les extraits 5

3.1. Les extraits fluides 5

3.2. Les extraits mous ou fermes 5

3.3. Les extraits secs 5

Chapitre II : Présentation du matériel végétal

1. Aperçu sur la famille des Lamiacées 6

1.1. Généralités 6

1.2. Caractéristiques botaniques 6

1.3. Classification de la famille des Lamiacées 6

1.4. Utilisations traditionnelles des Lamiacées 7

2. Genre Phlomis et l'espèce Phlomis Bovei de Noé 8

2.1. Description botanique du genre Phlomis 8
2.2. Espèce Phlomis Bovei de Noé.....8
2.3. Description 9
2.4 Classification 9
2.5. Distribution.....9
2. 6. Synonyme.....10
2.7. Nom vernaculaire 10
2.8. Utilisations traditionnelles 10

Chapitre III : Polyphénols et activité biologique

1. Polyphénols 11
1.1. Définition des polyphénols 11
1.2. Classification des polyphénols 11
1.2.1. Les acides phénols 11
1.2.2. Les flavonoïdes.....11
1.2.3. Les anthocyanes.....11
1.2.4. Les tanins.....12
1.2.5. Les saponines.....12
2. Activité antimicrobienne.....12
3. Activités biologiques des extraits.....13
4. Formes pharmaceutiques et voies d'administration des extraits 13

Partie expérimentale

Chapitre IV : Matériels et méthodes

1. Matériel végétal.....13
1.1. Evaluation du taux d'humidité du matériel végétal.....13
2. Procédé d'extraction d'huile essentielle 13
2.1. Montage 13
2.2. Mode opératoire.....14
2.3. Evaluation du rendement en HE 15
2.4. Tests organoleptiques 15
3. Etude phytochimique de la plante fraîche.....15
3.1. Expression à froid.....15
3.1.1. Paramètres physicochimiques 15
3.1.2. Tests phytochimiques.....17

4. Etude phytochimique de la plante sèche.....17
4.1. Extraction par l'eau.....17
4.1.1. Paramètres physicochimiques.....17
4.1.2. Tests phytochimiques.....18
4.2. Extraction par éthanol.....18
4.2.1. Paramètres physicochimiques.....18
4.2.2. Tests phytochimiques.....18
4.3. Extraction par méthanol.....19
4.3.1. Paramètres physicochimiques.....19
4.3.2. Tests phytochimiques.....19
4.4. Extraction par l'éther diéthylique.....19
5. Extraction des composés phénoliques.....20
5.1 .Préparation des extraits bruts aqueux.....20
5.2. Préparation des extraits bruts méthanoliques.....20
5.3. Préparation des extraits bruts éthanoliques.....20
5.4. Préparation des extraits frais.....21
6. Dosage des composées phénoliques.....21
7. Pouvoir antimicrobien des différents extraits des feuilles et tiges de l'espèce végétale Phlomis Bovei de Noé.....21
7.1. Activité antibactérienne des extraits.....22
7.1.1. Souches bactériennes utilisées.....22
7.1.2. Milieux de culture utilisés.....22
7.1.3. Méthode de diffusion en milieu gélosé.....22
7.1.3.1. Préparation de l'inoculum bactérien.....22
7.1.3.2. Protocole expérimental.....22
7.2. Activité antifongique.....23
7.2.1. Souches fongiques.....23
7.2.2. Milieux de culture.....23
7.2.3. Méthode de diffusion en milieu gélosé.....23
7.3. Détermination de la concentration minimale d'inhibition CMI des différents extraits des deux organes (feuilles et tiges) de la plante étudiée.....23
8. Forme pharmaceutique.....24
8.1. Contrôle de la matière première.....24
8.2. Préparation de la formulation pharmaceutique.....25

8.3. Contrôle de l'activité antibactérienne de la crème préparée 25

Chapitre V : Résultats et discussions

1. Le taux d'humidité.....26
2. Rendement en huile essentielle 27
3. Paramètres physico-chimiques des extraits.....28
4. Composition chimique des extraits 29
5. Extraction des composés phénoliques 30
6. Dosage des polyphénols.....31
7. Résultats des tests microbiologiques 32
7.1. Pouvoir antimicrobien des extraits 32
7.1.1. Pouvoir antibactérien des extraits 32
7.1.2. Pouvoir antifongique des extraits 34
7.2. Détermination de la CMI 35
8. Résultats de la formulation 38
8.1. Contrôle de la matière première 38
8.2. Contrôle du pH et tests visuels sur la crème formulée 38
8.3. Tests microbiologiques 39
Conclusion 40

Références bibliographiques
Glossaire
Annexes

Liste des abréviations et symboles

AFNOR : Association Française de Normalisation

APG : Angiosperme **P**hylogeny **G**roup

C.H.U : Centre Hospilalo-Universitaire

Com : Commerciale

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

D : Diamètre

EURL-DEP.DIS-PHARM :Dépositeur-Distributeur-Produits Pharmaceutique

H_i % : Teneur en humidité de l'échantillon i (i variable de 1 à n)

H% : Teneur en eau

H.E : Huile essentielle

I_A : Indice d'acide

I_E : Indice d'ester

I_P : Indice de peroxyde

I_R : Indice de réfraction

Is : Indice de saponification

MH : Mueller Hinton

M_{HE} : Masse de l'huile essentielle extraite

m_{pv} : Masse du pycnomètre vide

M_s : Masse sèche du matériel végétal

MS : Matière sèche

N : Normalité de la solution

P.B.de Noé : Phlomis Bovei de Noé

P_1(½) : Préparation 1 de l'extrait éthanolique de P.B.de Noé avec une dilution de 1/2

P_2(¼) Préparation 2 de l'extrait éthanolique de P.B.de Noé avec une dilution 1/4

pH : Potentiel hydrogène.

R_{HE} : rendement en huile essentielle.

t : température

Ta : température ambiante.

UV : Ultraviolet

V : volume

V/V : Volume à volume

Liste des figures

Figure 1 : Présentation des parties aériennes de Phlomis Bovei de Noé.....8

Figure 2 : Zones de répartition de P. Bovei (en vert) 10

Figure 3 : Montage d'hydrodistilation utilisé 14

Figure 4 : Evaporateur rotatif de type HEIDOLPH 14

Figure 5 : Teneur en eau et en matière sèche des tiges de Phlomis Bovei de Noé 26

Figure 6 : Teneur en eau et en matière sèche des feuilles de Phlomis Bovei de Noé.....27

Figure 7 : Rendement en huile essentielle de Phlomis Bovei de Noé de différentes régions 28

Figure 8 : Zones d'inhibition des différents extraits des feuilles de Phlomis Bovei de Noé relatives aux différentes souches bactériennes testées. 32

Figure 9 : Zones d'inhibition des différents extraits des tiges de Phlomis Bovei de Noé relatives aux différentes souches bactériennes testées.....33

Figure 10: Zones d'inhibition des différents extraits de Phlomis Bovei de Noé relatives à la souche fongique testée (C.albicans).....34

Figure 11: Activité antibactérienne des préparations à base de l'extrait éthanolique de Phlomis Bovei de Noé et Acifudal® sur Staphylococcus aureus 39

Liste des tableaux

Tableau 1 : Ancienne Classification des Lamiacées. 7
Tableau 2 : Classification selon l'APG 7

Tableau 3 : Classification de l'Espèce Phlomis Bovei de Noé 9

Tableau 4 : Pesés des feuilles et des tiges de Phlomis Bovei de Noé 26

Tableau 5 : Données physico-chimiques des différents extraits Phlomis Bovei de Noé..... 28

Tableau 6 : Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans les deux parties de la plante étudiée 29

Tableau 7 : Les rendements en extraits obtenus à partir des extraits des parties de la Plante..... 30

Tableau 8 : Teneur en composé phénoliques de la substance étudiée 31

Tableau 9 : Valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition des différents extraits des feuilles et des tiges de Phlomis Bovei de Noé relatives aux différentes souches bactériennes testées..... 33

Tableau 10 : Valeurs des diamètres de la zone d'inhibition des différents extraits de Phlomis Bovei de Noé relatives à la souche fongique testée (C.albicans) 35

Tableau 11 : Valeurs de la CMI 37

Tableau 12 : Apparence des excipients 38

Tableau 13 : Apparence de l'extrait éthanolique 38

Tableau 14 : Résultats des tests organoleptiques et pH de la crème formulée 38

Tableau 15 : Valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition de l'Acifudal® ainsi que les préparations à base de l'extrait éthanolique de Phlomis Bovei de Noé 39

Introduction

Depuis l'antiquité, l'homme utilise les plantes qui poussent autour de lui pour se nourrir et se soigner. Il est temps de redécouvrir ces végétaux trop longtemps oubliés, dont nous pouvons mettre à profit les multiples vertus dans notre vie quotidienne. Durant des siècles, nos ancêtres ont accumulé un véritable savoir sur les vertus médicinales des plantes.

Aujourd'hui les plantes jouent encore un rôle très important dans les traditions médicales et la vie des habitants de cette région du monde, mais les règles de leur utilisation manquent parfois de rigueur et ne tiennent pas compte des nouvelles exigences de la thérapie moderne. L'approfondissement des connaissances des plantes de ces pays est capital, afin de rationaliser leurs utilisations

En effet, le règne végétal est une source jugée inépuisable de molécules pouvant présenter un intérêt thérapeutique. Dans ce contexte, une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude des métabolites secondaires qui constituent souvent des principes actifs des plantes médicinales et l'évaluation de la valeur thérapeutique de ces métabolites sur laquelle l'industrie pharmaceutique s'appuie largement pour le développement de nouveaux médicaments.

Le présent travail a pour objectif la caractérisation et l'étude de l'activité microbiologique des extraits du Phlomis Bovei de Noé en vue d'une forme pharmaceutique. Cette plante, de la famille des Lamiacée, est une espèce rare et endémique en Algérie. Connue sous différents noms vernaculaires desquels nous pouvons citer : *Kayat El Adjarah, Amezough guilef, Faseouan, Tarseouan, Iniji, R'ilef* et *Azaref*. Généralement utilisée en médecine traditionnelle comme cicatrisant, antidiabétique, anti diarrhéique, antimicrobien et antioxydant.

Ce mémoire comporte deux parties essentielles :

La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique regroupant des généralités sur les plantes médicinale et une description botanique de la famille de l'espèce étudiée. Un aperçu sur l'exploitation des plantes médicinales à des usages pharmaceutiques et/ou cosmétiques a été inclus à cette partie.

La deuxième partie est dédiée à la présentation du matériel et des protocoles expérimentaux utilisés pour l'extraction, la caractérisation des extraits du Phlomis Bovei, la recherche de leurs activités antimicrobiennes ainsi que leurs usages pour des essais de formule pharmaceutique. Suivi des résultats des différents tests effectués ainsi que leurs interprétations.

Partie Bibliographique

Chapitre I
Généralités

1. Plantes médicinales

1.1. Définition

Les plantes médicinales sont des plantes possédant une activité pharmacologique à usage thérapeutique. Cette activité est due à la présence d'un certain nombre de substances actives dont la plupart agissent sur l'organisme humain. Elles sont utilisées en pharmacie humaine et vétérinaire, en cosmétologie, ainsi que dans la confection des boissons, soit nature, soit en préparations galéniques, soit encore sous forme de principes actifs pour l'obtention de médicaments. **(Naghibi ;2005 , Babulka ;2007)**

1.2. Utilisation des plantes médicinales

Pendant longtemps, les plantes ont été utilisées uniquement en nature, sous forme de tisanes ou de poudres. Maintenant beaucoup sont présentées en gélules, mais il existe de nombreuses formes d'utilisation des plantes médicinales. Quelle que soit leur présentation, elles jouissent d'un regain d'intérêt largement suscité et entretenu par la publicité ainsi que par d'innombrables ouvrages de vulgarisation. **(Chabrier ; 2010).**

De plus en plus des plantes sont utilisées en mélange. Pour ces préparations, des règles de bonnes pratiques officinales ont été instaurées. De nombreux paramètres sont à respecter comme le nombre de plantes, les associations possibles, la saveur, ou encore le goût qui devra être adapté au client. L'âge du patient et son état devront également être pris en compte. **(Chabrier ; 2010)**

2. Huiles essentielles

2.1. Définition

Les huiles essentielles (HE) sont des mélanges complexes de substances odorantes et volatiles contenues dans les végétaux.

L'Association Française de Normalisation (AFNOR) définit les huiles essentielles selon leur mode d'extraction : " Ce sont des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de citrus (zeste d'agrumes) par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques ". **(AFNOR, 2000)**

2.2. Localisation des huiles essentielles

Les HE peuvent se rencontrer dans tous les organes végétaux: sommités fleuries (Menthe), écorces (cannelier), racines (vétiver), rhizomes (gingembre), fruits (Anis). (**Brueton; 1999**)

En principe, toutes les parties d'une plante contiennent des huiles essentielles, mais elles sont souvent majoritairement dans l'une d'elles.

Dans beaucoup de plantes aromatiques, les huiles essentielles sont localisées dans les poiles glandulaires qui se développent à la surfaces des feuilles et autres organes des plantes. (**Werker; 1985**).

2.3. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges très complexes de composés organiques possédant des structures et des fonctions chimiques très diverses. Elles sont reconnues par deux ou trois composants majeurs présents à des concentrations assez élevées (20-70%) comparativement aux autres. **(Bakkalia et al. 2008)**

La composition d'une huile essentielle varie au sein d'un même genre, mais aussi dans une même espèce. On parle alors de races chimiques ou chémotypes. Le chémotype indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif des huiles essentielles extraites d'une même variété botanique. Cette classification capitale permet de sélectionner les H.E. pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace. **(Gildmeister; 1919).**

2.4. Facteurs influençant la composition des huiles essentielles

Il existe beaucoup de facteurs externes pouvant influencer la composition chimique et le rendement de l'huile essentielle.

La température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol sont autant des facteurs d'ordre environnemental susceptibles d'exercer des modifications chimiques **(Piochon; 2008)** et aussi, l'origine géographique, la période de récolte, le séchage, le lieu de séchage, la durée de séchage, les parasites, les virus et les mauvaises herbes. **(Mohammedi; 2006)**.

2.5. Procédés d'obtention des huiles essentielles

Le procédé d'obtention d'une essence végétale intervient de façon déterminante dans la nature des produits d'extraction. Plusieurs procédés d'extraction des principes végétaux sont connus et utilisés à ce jour. **(Wang; 2008).**

L'extraction des huiles essentielles à usage pharmaceutique est une opération qui doit permettre d'obtenir des produits volatils, fragiles, de bonne qualité, sans additifs ni solvants susceptibles de nuire à la santé. Ainsi, la pharmacopée autorise deux méthodes d'extraction qui sont : l'expression et la distillation **(Bakkalia et al. ; 2008, Hussain ; 2004).**

2.5.1. Expression à froid

Le procédé d'expression à froid ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences fragiles. Ce procédé réalisé à température ambiante consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches sécrétrices d'essence afin d'en libérer leur contenu. Cette technique uniquement mécanique

limite l'oxydation car elle conserve les antioxydants naturels contenus dans la fraction non volatile. Le produit ainsi obtenu s'appelle aussi une essence car il n'a subi aucune modification chimique et reste identique au produit sécrété par la plante **(Roux, 2008).**

2.5.2. Distillation

La distillation à la vapeur d'eau est une méthode ancienne très utilisée pour extraire des huiles essentielles à partir des plantes aromatiques. Elle est simple dans son principe. **(Whish, 1996; Masango, 2004)**

- ✓ **Entrainement à la vapeur d'eau**

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée à travers laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entrainées vers le réfrigérant **(Silo *et al*. 2004)**

Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques. (**Franchomme; 1990**).

- ✓ **Hydrodistillation**

Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition.

Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et sont, en suite, récupérées dans un essencier. On obtient ainsi un mélange d'huile essentielle et d'eau qui se sépare en deux phases en raison de la différence de densité **(Silou et al. 2004)**

2.6. Techniques d'analyse des huiles essentielles

- ❖ **Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)**

La technique CPG/MS est la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles. Elle permet, dans la grande majorité des cas, de connaitre la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurelles relatives à une molécule à partir de sa fragmentation **(Carvalli; 2002).**

Le couplage CPG/MS possède plusieurs atouts : le chromatogramme en phase gazeuse permet de séparer les constituants d'un mélange et le spectromètre de masse associé permet d'obtenir le spectre de masse de chacun des constituants et bien souvent de les identifier **(Hoffmann; 2005).**

- ✓ **Principe**

Cette technique consiste à ioniser les molécules par bombardement électronique, conduisant ainsi à la formation des ions en phase gazeuse. Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil. Le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse en suite

détecté et transformé en un signal. Pour ce faire, il existe différents types de détecteurs capables de transformer un courant ionique faible à un signal mesurable.

Finalement l'ordinateur enregistre les données provenant du spectromètre de masse et les convertit en valeurs de masses et d'intensités des pics **(Carvalli; 2002)**

3. Les extraits

Les extraits sont des préparations liquides (extraits fluides et teintures), de consistance semi-solide (extraits mous ou fermes) ou solide (extraits secs), obtenues à partir de drogues végétales ou de matières animales généralement à l'état sec (**WICHTL M., ANTON R., 2003)**. Les extraits titrés sont ajustés au moyen d'une substance inerte ou en mélangeant des lots d'extraits, avec une tolérance acceptable à une teneur donnée en constituants ayant une activité thérapeutique connue. Les extraits quantifiés sont ajustés à une fourchette définie de constituants en mélangeant des lots d'extraits. Les autres extraits sont définis par leur procédé de production (état de la drogue végétale, solvant, conditions d'extraction) et leurs spécifications. **(Pharmacopée européenne 6^{em} édition)**

3.1. Les extraits fluides

Les extraits fluides sont des préparations liquides dont, en général, 1 partie en masse ou en volume correspond à une partie en masse de drogue végétale séchée. Ces préparations sont ajustées, si nécessaire, de façon à répondre aux exigences de la teneur en solvants, et, dans les cas appropriés, en constituants. **(Pharmacopée européenne 6^{em} édition)**

3.2. Les extraits mous ou fermes

Les extraits mous ou fermes sont des préparations semi-solides préparées par évaporation ou évaporation partielle du solvant ayant servi à leur extraction. Ils satisfont aux limites concernant le résidu sec et à l'essai limite du solvant utilisé. **(Pharmacopée européenne 6^{éme} édition)**

3.3. Les extraits secs

Les extraits secs sont des préparations solides, obtenues par évaporation du solvant ayant servi à leur production. Les extraits secs ont généralement une perte à la dessiccation ou une teneur en eau qui est au maximum de 5 % m/m. **(Pharmacopée européenne6^{em} édition)**

Chapitre II
Présentation du matériel végétal

1. Aperçu sur la famille des Lamiacées

1.1. Généralités

Les *Labiées* ou *Lamiacées* (Angiospermes, Dicotylédones) constituent une importante famille de plantes herbacées ou partiellement ligneuses, formant des arbustes (très rarement des arbres). Elles comprennent, selon les auteurs, de 233 à 263 genres **(Heywood et al., 2007)** et de 6900 à 7200 espèces **(Heywood et al., 2007 ; Grayer et al., 2003),** qui se repartissent sur tout le globe. Les *Lamiacées* constituent une famille très importante dans la flore algérienne représentée par 28 genres et 146 espèces contre 8 genres et 12 espèces décrites par **Ozenda** (1991) dans tout le Sahara.

C'est la famille des plantes aromatiques utilisées tant en cuisine qu'en parfumerie et en pharmacie également. Il s'agit d'une vaste famille, très typique du monde végétal, et qui possède une importance économique due a la production des huiles essentielles **(Guignard et al., 2001)** et de miel. La famille des Lamiacées possède une distribution cosmopolite, mais elle est très répandue dans les régions tempérées et surtout méditerranéennes. **(Guignard et al., 2004).**

1.2. Caractéristiques botaniques

Ce sont des herbes a tiges quadrangulaires souvent renflées aux nœuds et se multipliant, en une même saison, à l'aide de rejets aériens : (stolons) ou souterrains : (rhizomes).Leurs feuilles sont toujours simples et opposées sans stipules, ou verticillées. Les feuilles, velues, ont un limbe à surface réduite, épais et souvent enroulé par dessous. Elles possèdent des stomates enfonces (protection contre l'évaporation) et un hypoderme collenchymateux très développé **(N, zaabat)**

Les fleurs sont hermaphrodites, elles sont regroupées à l'aisselle des feuilles supérieures, en glomérules, eux-mêmes souvent regroupes en épis plus ou moins denses.

Les *Lamiacées* ont un épiderme très riche en poils tecteurs et en poils sécréteurs. Ces deux catégories de poils se retrouvent au niveau de tous les organes aériens **(N, zaabat)**

Ce sont des plantes à essences dont l'odeur se dégage au simple toucher .En effet, la localisation des huiles essentielles est très externe, elles se forment dans des poils à essence et se localisent sous la cuticule qui se soulève **(N, zaabat)**.

1.3. Classification de la famille des Lamiacées

En 1789, Jussieu a nommé la famille *Lamiacées*, la classification de la majorité des sous-familles a été faite par Bentham en 1876 et la révision a été présentée par Briquet en 1895. La classification de ce dernier a longtemps été la plus utilisée pour cette famille de plantes.

Tableau 1 : Ancienne Classification des Lamiacées (zaabat .N)

Embranchement	Spermaphytes (plantes à graines)
Sous embranchement	Angiospermes (plantes à ovaire)
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Gamopétales (pétales soudés)
Série	Superovariées Tétracycliques (ovairesupère, 1 seul verticalle d'étamines)
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées (Lamiaceae)

Cependant, les rapports récents de la biologie moléculaire et le développement de la systématique moléculaire basée sur l'analyse des séquences de gènes, ont bouleversé les classifications usuelles et ont proposé en 1998 une nouvelle classification ordinale des plantes (APG., 1998).

Tableau 2 : Classification selon l'APG (Angiosperm Phylogeny Group)

Régne : Plantae
Angiospermes ou Magnoliaphyta : Eu-angiospermes Eu-dicotylédones
Supérieures gamopétales : Astéridées
Ordre : Lamiales
Famille : Lamiaceae

La classification **APG** est la classification scientifique des Angiospermes la plus récente établie selon les travaux d'un groupe de chercheurs, the **A**ngiosperme **P**hylogeny **G**roup. Elle traduit les efforts faits en systématique pour que les systèmes de classification reflètent au mieux la phylogénie des familles mise en lumière par les avancées constantes de la génétique **(Spichiger et al., 2000).**

Cette classification, révisée en 2003 (APG, 2003) et basée en grande partie sur les analyses des gènes chloroplastiques, introduit, même au niveau des familles, des changements notables avec la classification classique.

1.4. Utilisations traditionnelles des Lamiacées

La famille des *Lamiacées* regroupe un grand nombre d'espèces d'intérêt économique majeur **(Guignard, 2004)** et dont les applications sont très variées, comme la parfumerie, la cuisine, la phytothérapie et l'aromathérapie :

En parfumerie : même si les parfums de synthèse tendent à remplacer ces essences, la parfumerie de luxe continue à utiliser ces plantes en les distillant, afin d'en extraire le précieux parfum qu'elles contiennent et de perdurer la qualité de ses produits.

En cuisine : de nombreuses herbes aromatiques sont des *Lamiacées* : basilic, menthe, thym, romarin, sauge...

En phytothérapie et aromathérapie : de nombreuses herbes sont des sources d'huiles essentielles, d'infusion et antibiotiques naturels pour l'aromathérapie, D'autres huiles sont utilisées également pour leurs propriétés hydratantes.

2. Genre Phlomis et l'espèce Phlomis Bovei de Noé

2.1. Description botanique du genre Phlomis

Le genre *Phlomis*, herbe vivace, comprend plus de 100 espèces distribuées en Afrique, en Asie et en Europe.

En Algérie, il existe 4 espèces : *Phlomis herba-venti* et trois espèces endémiques : *Phlomis Bovei*, *Phlomis caballeroi* et *Phlomis crinita* **(Quezel et Santa, 1963)**. Le nom *Phlomis* vient du grec phlox qui signifie flamme car les feuilles de ces plantes servaient à la fabrication de mèches de bougies et le nom de l'espéce *Bovei* est dédié à Nicolas Bové, botaniste français qui a exploré l'Algérie de 1837 à 1841.Ce genre est divisé en deux sections Phlomis et Phlomoides **(Albaladejo et al., 2005).** La section Phlomoides est rencontrée principalement au centre de l'Asie et en Chine, alors que la section Phlomis se trouve principalement dans la région méditerranéenne **(Hedge, 1986**).

Ce sont soit des plantes herbacées soit des arbrisseaux, généralement très velues, a feuilles opposées simples et ridées. Chaque paire de feuilles forme un angle droit par rapport à la précédente persistante (chez les espèces ligneuses). Les fleurs, jaunes, roses, blanches, violacées ou pourprées, sont groupées en verticilles plus ou moins denses. **(zaabat ,N)**

2.2. Espèce Phlomis Bovei de Noé

Figure 1 : Présentation des parties aériennes de *Phlomis Bovei de Noé*

2.3. Description

C'est une plante vivace qui peut atteindre 80 cm de haut et qui est très répandue en Algérie. Elle est reconnaissable à ses tiges dressées et peu rameuses, couvertes de feuilles lancéolées très poilues à bords crénelés de couleur verte au-dessus et blanchâtre au-dessous. **(Djerroumi et Nacef, 2004)**

Au moment de la floraison (juin / août), entre ces mêmes feuilles, surgissent des fleurs au casque velu qui viennent encercler les tiges qui les portent de grandes couronnes roses. Ce sont ses feuilles qui présentent un intérêt thérapeutique. **(Djerroumi et Nacef, 2004)**

2.4 Classification

L'Espèce *Phlomis Bovei* de *Noé* est classée de deux manières, selon l'APG II et l'ancienne classification (N, **zaabat)**

Ces classifications sont présentées dans le tableau suivant.

Tableau 3 : classification de l'Espèce Phlomis Bovei de Noé **(N, zaabat)**

Ancienne classification		**Classification selon APG II**	
Embranchement	Spermaphytes (Plantes a graines)	Règne	Plantae
Sous embranchement	Angiospermes (Plantes a ovaire	Angiospermes ou Magnoliaphyta	Eu-angiosperme
Classe	Dicotylédone	Supérieures gamopétales	Asteridees
Sous classe	Gamopétales		
Ordre	Lamiales	Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées (Lamiaceae)	Famille	Lamiaceae
Tribu	Stachrydees (selon Deyssam)	Sous famille	Lamoideae Harley
Genre	Phlomis	Genre	Phlomis L
Espèce	Phlomis Bovei	Espèce	Phlomis Bovei De Noé
Sous-espèce	Phlomis bovei subsp. bovei	Sous-espèce	Phlomis bovei subsp. bovei

2.5. Distribution

Phlomis Bovei est une espèce rare et endémique Algérienne. C'est l'une des neuf plantes endémiques enregistrées dans le rapport national sur la diversité biologique en Algérie **(Quezel, 1963).** On retrouve deux sous-espèces : *P.Bovei de Noe* subsp *Bovei* et *Phlomis Bovei de Noe* subsp *Maroccana Maire*.

Le *Phlomis de Bovei* est présent çà et là dans les forêts de montagne du Tell, sauf à l'ouest. Il est assez rare et endémique du Maghreb.

Figure 2 : Zones de répartition de *P. Bovei* (en vert)

2. 6. Synonyme

Phlomis samia Desfontaines

2.7. Nom vernaculaire

Kayat El Adjarah, Amezough guilef, Faseouan, Tarseouan, Iniji, R'ilef et *Azaref*

2.8. Utilisations traditionnelles

Le genre ***Phlomis*** est très utilisé en médecine traditionnelle dans de nombreuses régions. En Algérie le genre ***Phlomis*** est utilise en médecine traditionnelle pour soigner les inflammations et les rhumatismes **(Kabouche et al., 2004).**

L'huile essentielle de ce genre joue également un rôle important au niveau nutritionnel et en fabrication des médicaments **(Zargari, 1960).**

En Kabylie, il sert à soigner les plaies et les blessures cutanées qu'il resserre dans un délie relativement rapide aussi bien chez les humains que chez les animaux domestiques. Il est employée en usage interne par infusion (faire infuser quelques feuilles dans 1 litre d'eau, en prendre 2 tasses par jour) et en usage externe (écraser entre les doigts 1 feuille fraîche et propre, puis l'appliquer sur la plaie). **((Djerroumi et Nacef, 2004)**

Chapitre III

Polyphénols et activité biologique

1. Polyphénols

1.1. Définition

Les composés phénoliques constituent un ensemble de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Ce sont des métabolites secondaires des plantes. Ils possèdent dans leur squelette, un ou plusieurs cycles aromatiques portants un ou plusieurs groupes hydroxyles ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester…) **(Bruneton ; 1999**). Ils participent à la défense des plantes contres les agressions environnementales (**Gee et Johnson ; 2001**) et les attaques microbiennes (**Bennick ; 2002**).

Ces dernières années, les recherches sur les composés phénoliques se sont accentuées en raison de leurs activités anti-inflammatoires, antibactériennes, antifongiques, ainsi oxydantes et même anticancéreuses (**Montoro et al; 2005**).

1.2. Classification

Les polyphénols possèdent plusieurs groupements phénoliques avec ou sans autres fonctions (alcooliques, carboxyles…). Dans cette famille de molécules, se trouvent de nombreuses substances, qui peuvent se classer selon leur structure en cinq groupes principaux:

1.2.1. Les acides phénols

Les acides phénols, ou acides phénoliques, ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols. Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature.

(Haslam 1994).

1.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des produits largement distribues dans le règne végétal et sont couramment consommés quotidiennement dans l'alimentation. Ils sont retrouvés également dans les plantes médicinales. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. **(Touafek. ;2010).**

1.2.3. Les anthocyanes

Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, ce sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange. Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu. A l'origine de la couleur des fleurs, des fruits et des bais rouges ou bleues, elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplis d'eau. On trouve également les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines.**(Bassas et *al*, 2007).**

1.2.4. Les tanins

Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation **(Hemingway, 1992).**

Ils ont la capacité de former des complexes avec des macromolécules (les protéines …) et des liaisons entre les fibres de collagènes (**Paolini et al., 2003**). Leur structure chimique est particulièrement variable, mais comporte toujours une partie polyphénolique ; il existe deux catégories de tanins, d'origine biosynthétiques différentes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. **(Paolini et al., 2003).**

1.2.5. Les saponines

Les saponines sont des molécules naturellement produites par des plantes ou des animaux, dont le rôle n'est pas encore clairement cerné. Ce sont des hétérosides complexes dits *saponosides*, appartenant aux terpènes cycliques (nom générique donné aux hydrocarbures saturés cycliques ou acycliques ayant pour motif de base le terpène) ou aux stéroïdes. On les trouve chez de nombreux végétaux (salsepareille, quinoa...) mais sont dégradées à la cuisson. Douées de propriétés tensioactives, les saponines font mousser leurs solutions et servent de détergent. Elles présentent une toxicité plus ou moins importante (selon les saponines, les espèces qui les ingèrent, et le contexte). Injectées dans le sang ou dans les tissus, elles provoquent la dissolution (lyse) de cellules ou de tissus sous l'influence d'agents chimiques, physiques ou biologiques des globules rouges. **(Paolini et al., 2003).**

2. Activité antimicrobienne

Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20ème siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser.**(Haddouche; 2008)**

Ces dernières années, il y a eu un grand intérêt pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens, due à une augmentation alarmante du taux des infections avec les microorganismes résistant aux antibiotiques.

Une des approches courantes pour la recherche des substances biologiquement actives est le criblage systématique des micro-organismes ou les plantes, qui sont des sources de beaucoup d'agents thérapeutiques utiles. **(Sagdic *et al.*, 2002)**.

En particulier, l'activité antimicrobienne d'huiles et des extraits de plantes ont formé la base de beaucoup d'applications, y compris, pharmaceutiques, médecine, thérapie naturelle et la conservation des aliments **(Sagdic *et al.*, 2002)**.

3. Activités biologiques des extraits

Les extraits sont largement utilisés pour leurs propriétés antibactériennes, antifongiques, et activités insecticides**. (Silva et al. 2003).**

Des études sur les différents composants extraits ont montré d'importants modes d'action biologique pour éventuelle application en santé. Certains d'entre eux constituent des alternatives efficaces à des composés synthétiques de l'industrie chimique, sans qu'il y ait apparition d'effets secondaires **(Bakkalia et al.2007).**

4. Formes pharmaceutiques et voies d'administration des extraits

Les extraits peuvent être administrés sous différentes formes pharmaceutiques selon la voie recommandée pour la thérapie envisagée **(Millet, 2010).**

La voie orale (Sirops, Suspensions buvables)

La voie cutanée (Pommades, Crèmes, Gels)

La voie rectale (Les suppositoires, Suspensions et solutions à usage rectales)

La voie oculaire (Collyres, solutions pour lavage ophtalmologique)

- **Voie externe, voie royale pour l'utilisation des extraits :** Que ce soit par onction, modelage esthétique, massage, grâce au filtre constitué par la peau, la voie externe ne présente pratiquement aucun inconvénient si on sait choisir l'extraits. C'est cette voie de pénétration des principes actifs qui est à l'honneur dans les pays anglo-saxons, où la voie interne est strictement réservée à la prescription médicale. **(Roulier)**

Partie Expérimentale

Chapitre IV : Matériels et méthodes

Cette partie consiste à faire l'extraction des huiles essentielles et des extraits de *phlomis Bovei de Noé* et faire leur caractérisation suivie d'une étude microbiologique dont le but est de préparer une forme pharmaceutique à base de ces extraits.

1. Matériel végétal

Les organes aériens (tiges et feuilles) de *Phlomis Bovei de Noé* ont été récoltés en mois d'avril 2013, au pied du mont Aït Ouabane à 900 mètres d'altitude, plus de 55 kilomètres au sud-est du chef-lieu de la wilaya de Tizi-Ouzou.

Une identification botanique a été faite au sein du département d'Agronomie de la faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'UMMTO.

Les organes aériens ont été séchés au laboratoire pendant 30 jours, à l'air libre et à l'abri de la lumière.

1.1. Evaluation du taux d'humidité du matériel végétal

La détermination de la teneur en eau de la plante a été réalisée par séchage à l'étuve à 103°C, pendant 2 heurs, selon la méthode décrite par **Twidwell *et al.* 2002**. Le taux d'humidité est évalué selon la formule suivante :

$$H\% = \left(\frac{m1-m2}{m1}\right) * 100$$

Avec

m_1 : masse de l'échantillon avant dessiccation (g)

m_2 : masse de l'échantillon après dessiccation (g)

H% : Teneur en eau

Pour plusieurs essais, on calcule la moyenne arithmétique selon l'équation suivante:

$$H\%(moy.) = \frac{H1+H2+\cdots Hn}{n}$$

Avec

H_i : Teneur en humidité de l'échantillon i (i variable de 1 à n)

i= 1,2,…, n : nombre d'échantillons.

2. Procédé d'extraction d'huile essentielle

2.1. Montage

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée à l'aide d'un montage d'hydrodistillation Simple : un chauffe-ballon de type PILZ et ballon tri-col surmonté d'un coude en verre au quel est raccordé un réfrigérant. Le schéma du montage est présenté sur la figure 3:

Figure 3 : Montage d'hydrodistilation utilisé

2.2. Mode opératoire

On introduit une masse des feuilles sèches dans le ballon tri-col avec un volume d'eau approprié à raison d'un rapport de 30g par 700 ml d'eau. Le mélange est porté à ébullition pendant 2h. Les vapeurs chargées des huiles essentielles sont condensées dans le réfrigérant. Le distillat est recueilli dans un erlenmeyer. Le mélange eau-huile essentielle se sépare par différence de densité. L'opération est reproduite plusieurs fois afin de recueillir une quantité suffisante d'huile essentielle. La quantité totale d'huile essentielle extraite est conservée au frais dans un flacon en verre ombré.

- ✓ **Décantation**

La séparation de l'huile essentielle de l'eau a été réalisée dans des ampoules à décanter.

Les traces d'huile restantes dans la phase aqueuse sont récupérées par une extraction par solvant. Le solvant choisit est l'éther diéthylique (Téb à 35°C)

- ✓ **Elimination du solvant organique (évaporation)**

L'élimination du solvant organique, a été réalisée à l'aide d'un évaporateur rotatif de type HEIDOLPH LABOROTA 4001, à une température de 35°C et à la pression atmosphérique.

Figure 4: Evaporateur rotatif de type HEIDOLPH LABOROTA 4001.

2.3. Evaluation du rendement en HE

Le rendement est définit comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue par extraction et la masse totale du matériel végétal traité. Il est donné selon la formule suivante:

$$\mathbf{R_{HE}\%} = \left(\frac{\mathbf{M_{HE}}}{\mathbf{M_S}}\right) \times \mathbf{100}$$

$\mathbf{R_{HE}}$: rendement en huile essentielle.

$\mathbf{M_{HE}}$: la masse de l'huile essentielle extraite (g).

$\mathbf{M_s}$: la masse du matériel végétal sèche (g).

2.4. Tests organoleptiques

L'aspect, la couleur et l'odeur de l'HE ont été déterminés à 20°C.

3. Etude phytochimique sur la plante fraîche

3.1. Expression à froid

Dans un mortier en porcelaine, on introduit séparément chacune des masses de matériel végétal frais (feuilles, tiges) puis on exerce une force afin d'épuiser le matériel végétal. Le mélange est filtré et l'extrait frais est soumis aux différents tests phytochimiques ainsi à la détermination des paramètres physico-chimiques.

3.1.1. Paramètres physicochimiques

- **Indices chimiques**

- ✓ **Indice d'acide**

L'indice d'acide **IA** est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans 1 g de substance.

L'indice d'acide est ensuite calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\mathbf{IA} = \frac{\mathbf{56.1\ VN}}{\mathbf{m}}$$

N : normalité de la solution de KOH

V : volume de KOH utilisé pour le titrage (en ml)

m : prise d'essai

Mode opératoire : Dans un erlenmeyer verser successivement 20 ml d'éthanol à 96% (solvant), 0.5g d'extrait frais et deux gouttes de phénolphtaléine. Ajouter progressivement une solution alcoolique de KOH (10^{-2}N). Une coloration rose persistante apparait pour un volume ajouté de 12 ml.

- ✓ **Indice de saponification**

L'indice de saponification **Is** est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres et à la saponification des esters présents dans 1g de substance.

L'indice de saponification est évalué à l'aide de la relation :

$$\mathbf{IS} = \frac{56{,}1\,N(V0-V)}{m}$$

$\mathbf{V_0}$: volume de la solution HCl pour l'essai à blanc (en ml)

V : volume de la solution HCl utilisé pour la prise d'essai (en ml)

m : masse de la prise d'essai (en g)

N : normalité de la solution HCl

Mode opératoire : Dans un ballon de 250 ml munie d'un réfrigérants à reflux, introduisez 10 g d'extrait frais. Ajouter 25 ml de KOH alcoolique (0.5N). Adapter le réfrigérant et chauffer à reflux pendant 30mn. Ajouter 1ml de phénolphtaléine, titré immédiatement par HCl (0.5N).

Effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions.

- ✓ **Indice d'ester (I_E) :**

L'indice d'esters est le nombre qui exprime en milligramme la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la saponification des esters présents dans 1g de substance. Il est calculé à partir de l'indice de saponification (I_S) et de l'indice d'acide (I_A) :

$$\mathbf{I_E = I_S - I_A}$$

- ❖ **Indices physiques**

- ✓ **Indice de réfraction**

L'indice de réfraction d'un milieu rapporté à l'air est égal au rapport du sinus de l'angle d'incidence d'un rayon lumineux dans l'air au sinus de l'angle de réfraction du rayon réfracté dans le milieu considéré (extrait).

Sauf indication contraire, l'indice de réfraction est déterminé à 20 ± 0,5 °C et la longueur d'onde spécifiée est rapportée à la raie D du sodium (λ = 589,3 nm) ; le symbole est alors n^{20}_D

L'indice de réfraction à la température de référence t est évalué à l'aide de l'équation:

$$\mathbf{n_D{}^t = n_D{}^{t'} + 0.0004(t'-t)}$$

Avec :

t : température de référence (20°C).

$\mathbf{n_D{}^{t'}}$: valeur à la lecture

t': température de l'extrait (température au moment de la mesure)

L'indice de réfraction a été mesuré à l'aide d'un réfractomètre**.**

- ✓ **Evaluation du pH**

La mesure de pH à température ambiante a été réalisé à l'aide d'un pH mètre de type HANNA.

3.1.2. Tests phytochimiques

- ✓ **Amidon**

Le test effectué consiste à :

Chauffer 5 ml de l'extrait frais avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain marie jusqu'à ébullition. Ajouter le réactif d'amidon (annexe 1).

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue violacée **(Guignard, 1979)**.

- ✓ **Saponosides**

Les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse **(Bruneton, 1999)**. Leur détection est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait frais, après l'agitation, le mélange est laissé au repos pendant 20 minutes et la teneur en saponosides est évaluée:

Pas de mousse : test négatif

Mousse moins de 1cm : test faiblement positif

Mousse de 1-2cm : test positif

Mousse plus de 2cm : test très positif

- ✓ **Tanins**

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1ml de l'extrait frais, 1ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de $FeCl_3$ diluée 10 fois. L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleu-verte indique la présence des tanins **(Trease et Evans, 1987)**.

4. Etude phytochimique sur la plante sèche

L'espèce sélectionnée fait l'objet d'une étude phytochimique qui consiste à détecter les différents composés chimiques existant dans la plante.

Quatre solvants de polarités différentes (eau, éthanol, méthanol et éther diéthylique) ont été utilisés, au cours de ces tests qui sont basés sur des essais de solubilité, des réactions de coloration et de précipitation.

4.1. Extraction par l'eau

50g de matériel végétal sont mis en contact avec 300 ml d'eau dans un ballon mono col surmonté d'un réfrigérant. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Le mélange est filtré et l'extrait aqueux est soumis aux différents tests phytochimiques ainsi à la détermination des paramètres physico-chimiques.

4.1.1. Paramètres physicochimiques

L'évaluation des paramètres physicochimiques s'effectue selon le protocole décrit en **3.1.1** en utilisant l'extrait aqueux.

4.1.2. Tests phytochimiques

L'évaluation des tests phytochimiques s'effectue selon le protocole décrit en **3.1.2** en utilisant l'extrait aqueux.

4.2. Extraction par éthanol

Le protocole d'extraction est le même que celui décrit en **4.1** en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction. Le mélange est filtré et l'extrait éthanolique est soumis aux différents tests phytochimiques.

4.2.1. Paramètres physicochimiques

L'évaluation des paramètres physicochimiques s'effectue selon le protocole décrit en **3.1.1** en utilisant l'extrait éthanolique.

4.2.2. Tests phytochimiques

- ✓ **Alcaloïdes sels**

Leur détection consiste à :

-Evaporer à sec 20 ml de l'extrait éthanolique.

-Ajouter 5 ml d'HCl (10%) au résidu obtenu, puis chauffer dans un bain marie.

-Filtrer le mélange et l'alcaliniser avec quelques gouttes d'une solution de NH_4OH (10%) jusqu'au pH 9.

- Extraire la solution avec l'éther diéthylique, ensuite concentrer à sec.

- Dissoudre le résidu dans du HCl (2%).

-Tester la présence des alcaloïdes par quelques gouttes de réactif de Mayer et Wagner (annexe 1) afin d'obtenir un précipité blanc et un précipité brun respectivement indiquant leur présence **(Memelink et al., 2001)**.

- ✓ **Tanins**

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1ml de l'extrait éthanolique 1ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de $FeCl_3$ diluée. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-noire (tanins galliques), vert ou bleue-verte (tanins catéchiques).

- ✓ **Composés réducteurs**

Leur détection consiste à traiter 1ml de l'extrait éthanolique avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling (annexe 1), puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique **(Trease et Evans, 1987)**.

4.3. Extraction par méthanol

Le protocole d'extraction est le même que celui décrit en **4.1** en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction. Le mélange est filtré et l'extrait méthanolique est soumis aux différents tests phytochimiques ainsi à la détermination des paramètres physicochimiques.

4.3.1. Paramètres physicochimiques

L'évaluation des paramètres physicochimiques s'effectue selon le protocole décrit en **3.1.1** en utilisant l'extrait méthanolique.

4.3.2. Tests phytochimiques

L'évaluation des tests phytochimiques s'effectue selon le protocole décrit en **4.2.2** en utilisant l'extrait méthanolique.

4.4. Extraction par l'éther diéthylique

Le protocole d'extraction est le même que celui décrit en **4.1** mais au lieu d'utiliser l'eau comme solvant d'extraction, on utilise l'éther diéthylique. Le mélange est filtré et l'extrait étherique est soumis aux différents tests phytochimiques.

- ✓ **Huiles volatiles**

La détection des huiles volatiles consiste à :

-Evaporer à sec 20 ml de l'extrait étherique.

- Dissoudre le résidu obtenu dans de l'alcool.

- Concentrer à sec la solution alcoolique obtenue. **(Bougandoura N. ;2011)**

Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu ayant une odeur spécifique.

- ✓ **Acides gras**

L'essai effectué consiste à :

- Concentrer à sec 20 ml de la solution étherique.

- Dissoudre le résidu obtenu dans de l'alcool.

-Traiter la solution alcoolique avec une solution base de soude ou de potasse.

-Ajouter un peu d'eau et extraire la solution avec l'éther diéthylique.

-Concentrer à sec la solution étherée. **(Bougandoura N. ;2011)**

Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu gras.

- ✓ **Alcaloïdes bases**

La détection des alcaloïdes consiste à :

- Evaporer à sec 10 ml de l'extrait ethérique.

-Dissoudre le résidu obtenu dans 1,5 ml d'HCl (2%).

- Ajouter 1 à 2 gouttes de réactif de Mayer. **(Bougandoura N. ;2011)**

La formation d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes bases.

5. Extraction des composés phénoliques

5.1 .Préparation des extraits bruts aqueux

10 g de matériel végétal de chaque partie de la plante (feuille, tige) ont été portés à reflux pendant 2 heures dans 150 ml d'eau distillée, puis filtrés ; ce filtrat a ensuite été évaporé à sec sous pression réduite à 65°C à l'aide d'un évaporateur rotatif de type HEIDOLPH LABOROTA 4001.

Le résidu obtenu est déterminé en poids pour calculer le rendement. (**Majhenic et al., 2007**).

✓ **Calcul des rendements en extraits brut secs**

Nous pouvons déterminer le rendement de la plante en extrait brut sec en calculant le rapport suivant :

R (%) = [(P1 – P2)/ P3] x 100

Avec

P1 : poids du ballon après évaporation (g).

P2 : poids du ballon avant évaporation (g).

P3 : poids du matériel végétal de départ (g).

5.2. Préparation des extraits bruts méthanoliques

10g de matériel végétal de chaque partie de la plante (feuille, tige) est placé dans un erlenmeyer dans 20 ml de méthanol pendant 24 h, après filtration, la solution méthanolique est évaporée à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif à 60°C. Le résidu sec pesé est repris par 3 ml du méthanol. **(Matkowski et Piotrowska, 2006).**

✓ **Calcul des rendements en extraits secs**

Le rendement de la plante en extrait brut sec méthanolique est calculé à l'aide de la formule décrite en **5.1.**

5.3. Préparation des extraits bruts éthanoliques

10g de matériel végétal de chaque partie de la plante (feuille, tige) est placé dans un erlenmeyer dans 20 ml de l'éthanol pendant 24 h, après filtration, la solution éthanolique est évaporée à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif à 60°C.

Le résidu sec pesé est repris par 3 ml de l'éthanol. **(Matkowski et Piotrowska, 2006).**

✓ **Calcul des rendements en extraits secs**

Le rendement de la plante en extrait brut sec éthanolique est calculé à l'aide de la formule décrite en **5.1.**

5.4. Préparation des extraits frais

10g de matériel végétal frais de chaque partie de la plante (feuille, tige) est placé dans un mortier en porcelaine le liquide obtenu et en suite met dans une centrifugeuse pendant 20 min à une vitesse de 60 trs /mn .le résidu obtenu est pesé et soumis au test de dosage.

- ✓ **Calcul des rendements en extraits secs**

Le rendement de la plante en extrait brut frais est calculé à l'aide de la formule décrite en **5.1**.

6. Dosage des composées phénoliques

La teneur en phénols totaux des extraits des plantes qui font l'objet d'analyse a été déterminé par la méthode de **Singleton et Rossi (1965).**

Un volume de 200 µl de chaque extrait brut de chaque partie de la plante (feuille, tige) est introduit dans des tubes à essai, le mélange (1ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois et 0,8 ml de carbonate de sodium à 7.5%) est additionné. Les tubes sont agités et conservés durant 30 minutes à la température ambiante

La concentration en composées phénoliques est déterminée en utilisant le réactif de Folin Ciocalteu. Ce dernier est constitué d'acide Phosphomolybdique et d'acide Phosphorique pour donner une coloration bleue, et ceci en milieu Alcalin, l'intensité de cette coloration est directement proportionnelle à la concentration des Polyphénols dans la solution. L'absorbance est mesuré à 750 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif.

7. Pouvoir antimicrobien des différents extraits des feuilles et tiges de l'espèce végétale Phlomis Bovei de Noé

Les tests antimicrobiens ont pour but de rechercher l'activité biologique de chaque extrait des feuilles et des tiges vis-à-vis des différents microorganismes : bactéries et moisissures. Les extraits actifs pourraient ainsi justifier l'usage en médecine traditionnelle des plantes dont ils sont extraits et permettraient, à partir du présent travail, d'ouvrir d'autres pistes pour la recherche.

- ✓ **Principe**

L'activité antimicrobienne des extraits a été testée in vitro par la méthode de diffusion sur gélose **(Osato 2009, Liao et al. 2010**).

Cette méthode repose sur le même principe que celui des tests d'antibiogramme. C'est-à-dire, l'application de patchs imprégnés d'extrait de plante sur des milieux de culture ensemencés de microorganismes. L'activité antimicrobienne, si elle est présente, se manifestera alors par des zones d'inhibition autour des disques.

7.1. Activité antibactérienne des extraits

Ce test est réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie « C.H.U-Nedir Mohamed-Tizi Ouzou».

L'activité antibactérienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé cité par **Lesueur et al., 2007**

7.1.1. Souches bactériennes utilisées

Quatre souches bactériennes ont été testées ; ces souches issues des prélèvements (pus) de malades ; *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Proteus mirabilus.* (annexe 2)

7.1.2. Milieux de culture utilisés

Nous avons utilisé trois milieux de culture (annexe 3): Gélose Nutritive, Gélose Mueller Hinton et Bouillon nutritif.

7.1.3. Méthode de diffusion en milieu gélosé

7.1.3.1. Préparation de l'inoculum bactérien

Les souches bactériennes ont été revivifiées dans un bouillon nutritif à 37°C pendant 24heures. Puis des gouttelettes de suspension bactérienne sont ensemencées en strie dans des boites de Pétri préalablement coulées de gélose nutritive.

Après incubation, deux ou trois colonies, bien isolées, ont été prélevées et mise en culture dans 10ml de bouillon nutritif. Après 18 heures d'incubation à 37°C, nous avons effectué des dilutions de la suspension afin de standardiser l'inoculum. Ce dernier doit être dilué de telle façon que sa densité optique mesurée à 625nm soit comprise entre 0,08-0,1. Cette densité optique est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (annexe 4). **(Lesueur et al., 2007)**

Des dilutions de 1/10 et de 1/100 ont été réalisées respectivement pour Staphylococcus aureus et les autres souches dans de l'eau physiologique stérile. **(Lesueur et al., 2007)**

7.1.3.2. Protocole expérimental

Des disques de papier filtre de 6mm de diamètre imbibés de différents extraits (éthanolique, méthanolique, frais et aqueux) des deux parties de la plante étudiée ont été placés à la surface de gélose Mueller Hinton sèche, inoculée au préalable par un millilitre de dilution de la suspension bactérienne. Après incubation à 37°C pendant 24heures, la sensibilité a été évaluée en mesurant le diamètre d'inhibition. **(Lesueur et al., 2007)**

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition, des différents extraits autour des disques.

7.2. Activité antifongique

Ce test est réalisé au niveau du laboratoire de parasitologie et de mycologie « C.H.U-Nedir Mohamed-Tizi Ouzou ».

L'activité antifongique des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé cité par **Sacchetti et al., 2005** et **Rasooli et al., 2008**.

7.2.1. Souches fongiques :

Les souches fongiques sont issues à partir des prélèvements de malades (selles, langue, oreille).

Levures : *Candida albicans* (annexe 2)

7.2.2. Milieux de culture

Nous avons utilisé les milieux de culture suivants : Gélose Sabouraud et Gélose Sabouraud avec Chloramphénicol + Actidione. (annexe 3)

7.2.3. Méthode de diffusion en milieu gélosé

✓ **Principe**

Les cultures-mère ont été développées sur une gélose approprié (Sabouraud avec chloramphénicol et actidione), afin d'inhiber la croissance des éléments de la flore bactérienne contaminants et d'atteindre la phase stationnaire de la croissance. (**Sacchetti et al., 2005)** et (**Rasooli et al., 2008)**.

Les disques stériles imprégnés de différents extraits des deux parties de la plante étudiée ont été déposés stérilement sur la gélose Sabouraud, ensemencé au préalable par la suspension microbienne. (**Sacchetti et al., 2005)** et (**Rasooli et al., 2008)**.

Les levures ont été incubées 48 h à 37 °C.

L'activité antifongique a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition des différents extraits.

7.3. Détermination de la concentration minimale d'inhibition CMI des différents extraits des deux organes (feuilles et tiges) de la plante étudiée

✓ **Préparation de l'inoculum**

On prépare les suspensions (bactérienne et fongique) de la même façon que celle décrite dans l'aromatogramme.

✓ **Préparation des solutions**

La CMI est réalisée en milieu liquide, les différents extraits à tester ont été dilués dans le DMSO (1000µg/ml) puis dilue dans M-H (pour les bactéries) et SAB (pour les levures). Des dilutions en série de 1/2 à 1/16 de chaque produit ont été préparées à des concentrations allant de 500 à 62.5 µg/ml. **(Zaabat)**

La réalisation des solutions se fait comme suit :

1 ml de l'extrait est dilué dans 50ml de milieu M-H (bactérie) ou SAB (levure), maintenu en surfusion, dans un premier flacon ce qui donne la solution mère; verser la moitié de premier flacon dans un deuxième flacon et ajuster avec 25 ml de milieu pour une dilution de 1/2. Procéder de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution de 1/16.

Les mélanges de chaque dilution sont immédiatement répartis dans des boites de pétri, qu'on laisse solidifiées sur la paillasse. La gamme de concentration finale ainsi obtenue correspond à 500, 250, 125, 65.5 µg/ml**. (Mebarki, 2010)**

Après solidification ; la suspension bactérienne ou fongique est ensemencée à la surface du milieu gélosé. Ensuite les boites de pétri sont mises en incubation pendant 24h à 37°C pour les bactéries et 48h à 37°C pour les levures.

La lecture des résultats se fait visuellement par l'observation de la croissance ou l'inhibition de la croissance du microorganisme testé. .

La CMI est définie comme étant la plus petite concentration du produit pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu.

8. Forme pharmaceutique

Le but de cet essai, est de préparer une formule pharmaceutique pour un éventuel traitement contre une infection bactérienne. Donc notre objectif est de développer une crème antibactérienne.

Nous avons opté pour une formulation dans le but de traiter les infections de la peau dues aux germes (staphylocoques et les streptocoques), notamment l'impétigo.

Afin d'évaluer l'efficacité de notre préparation on effectue des tests microbiologiques sur la bactérie Staphylocoques en comparant avec un antibiogramme d'un médicament antibactérien commercialisé.

Le médicament est «ACIFUDAL® » dont les excipients sont : propyléneglycol, parahydroxybenzoate de méthyle, parahydroxybenzoate de propyle, et le principe actif est l'acide fusidique.

Les résultats pourront servir à d'éventuels essais cliniques et toutes les procédures pour une mise en forme définitive.

8.1. Contrôle de la matière première

Le contrôle de la matière première est une étape obligatoire avant les essais de formulation, afin de vérifier et d'identifier l'authenticité des produits utilisés.

8.2. Préparation de la formulation pharmaceutique

Nous avons tenté de préparer une formule à base de propyléneglycol, parahydroxybenzoate de méthyle, parahydroxybenzoate de propyle +l'extrait éthanolique de Phlomis Bovei de Noé.

L'extrait éthanolique utilisé a été identifié au cours de notre étude.

Propyléneglycol utilisé a été procurée au niveau d'une pharmacie.

Parahydroxybenzoate de méthyle et parahydroxybenzoate de propyle utilisés ont été récupérés an niveau de EURL-DEP.DIS-PHARM (Dépositeur-Distributeur-Produits Pharmaceutique)

- ✓ **Mode de préparation**

Les constituants sont sous forme liquide et solide (propyléneglycol, parahydroxybenzoate de méthyle, parahydroxybenzoate de propyle). Nous avons pesé des quantités bien définies de ces trois constituants de sorte à obtenir un mélange de 100g. Dans un mortier en porcelaine on ajoute 2g d'extrait éthanolique de Phlomis Bovei de Noé au mélange précédant jusqu'à obtention d'une crème homogène.

Mettre la crème dans un récipient hermétique et conserver ce dernier dans un endroit frais à 4°C.

8.3. Contrôle de l'activité antibactérienne de la crème préparée

Au préalable, le pH de la crème préparée est contrôlé à l'aide d'un pH-mètre de marque HANNA.

On prépare une suspension de Staphylococcus aureus selon le protocole décrit en **VII.1.3.1**

Dans des boites de Muller Hinton préalablement ensemencées de la suspension de Staphylococcus aureus, on dépose des disques stériles imbibé de la crème formulée ou bien de la crème ACIFUDAL commercialisée.

La lecture se fait par mesure du diamètre de la zone d'inhibition de la crème formulée comparé à celui de la zone d'inhibition de la crème «ACIFUDAL®» commercialisés.

Chapitre V : Résultats et discussions

1. Le taux d'humidité

Avant d'évaluer le taux d'humidité nous avons effectué des pesés sur les feuilles et les tiges de la plante étudiée, le tableau 4 présente les résultats de ces pesés.

Tableau 4 : pesés des feuilles et des tiges de Phlomis Bovei de Noé

Echantillons	1ère pesée(g)		2ère pesée(g)		3ère pesée(g)		4ère pesée(g)		5ère pesée(g)	
	Tige	Feuille	Tige	Feuille	Tige	Feuille	Tige	Feuille	Tige	Feuille
Echantillon 1	1.55	1.23	1.51	1.20	1.50	1.15	1.47	1.12	1.45	1.10
Echantillon 2	0.74	0.52	0.72	0.50	0.72	0.47	0.65	0.40	0.65	0.35
Echantillon 3	1.14	1.01	1.11	0.92	1.11	0.90	1.10	0.86	1.10	0.80
Echantillon 4	0.88	0.42	0.87	0.40	0.86	0.34	0.86	0.30	0.86	0.29
Echantillon 5	0.81	0.32	0.79	0.30	0.78	0.28	0.72	0.25	0.71	0.23
Echantillon 6	1.05	0.90	1.03	0.86	1.02	0.84	1.01	0.80	1.00	0.75
Echantillon 7	0.49	0.23	0.48	0.21	0.48	0.20	0.48	0.19	0.47	0.17
Echantillon 8	0.77	0.33	0.75	0.30	0.74	0.26	0.74	0.24	0.79	0.22
Echantillon 9	1.23	1.01	1.21	1.00	1.20	0.93	1.20	0.92	1.19	0.87
Echantillon 10	1.18	1.00	1.16	0.93	1.14	0.88	1.14	0.84	1.13	0.80
Poids moyen	0.98	0.67	0.96	0.66	0.95	0.62	0.94	0.59	0.94	0.55

Le taux moyen d'humidité pour les tiges de Phlomis Bovei est de 4%, Ceci signifie que la majeure partie du poids des tiges de la plante étudiée est constituée de matière sèche. Ces résultats sont présentés sur la figure 5

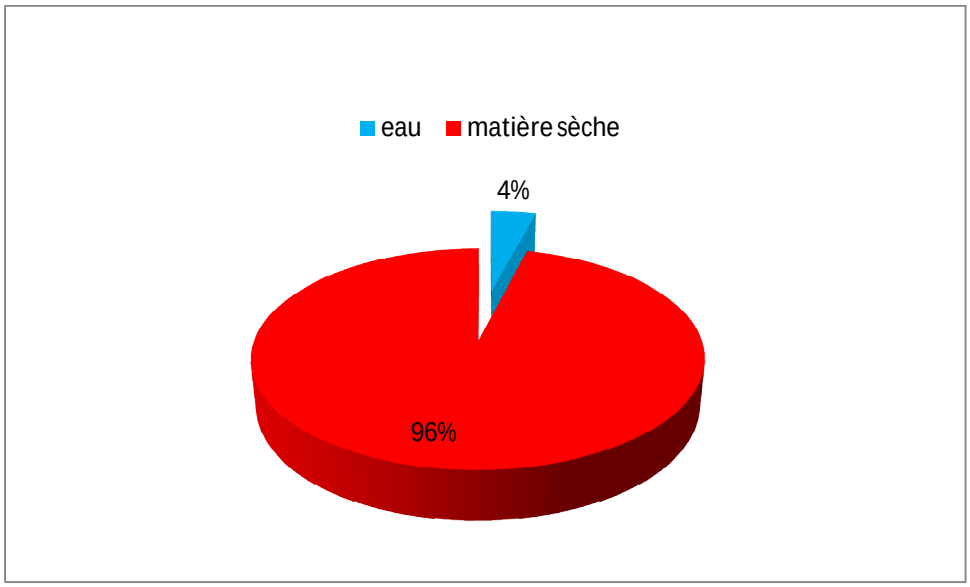

Figure 5 : Teneur en eau et en matière sèche des tiges de Phlomis Bovei de Noé

En effet le taux moyen d'humidité pour les feuilles de Phlomis Bovei est de 18%. Ceci signifie que plus de la moitié du poids des feuilles de la plante étudiée est constituée de matière sèche. Ces résultats sont présentés sur la **figure 6**

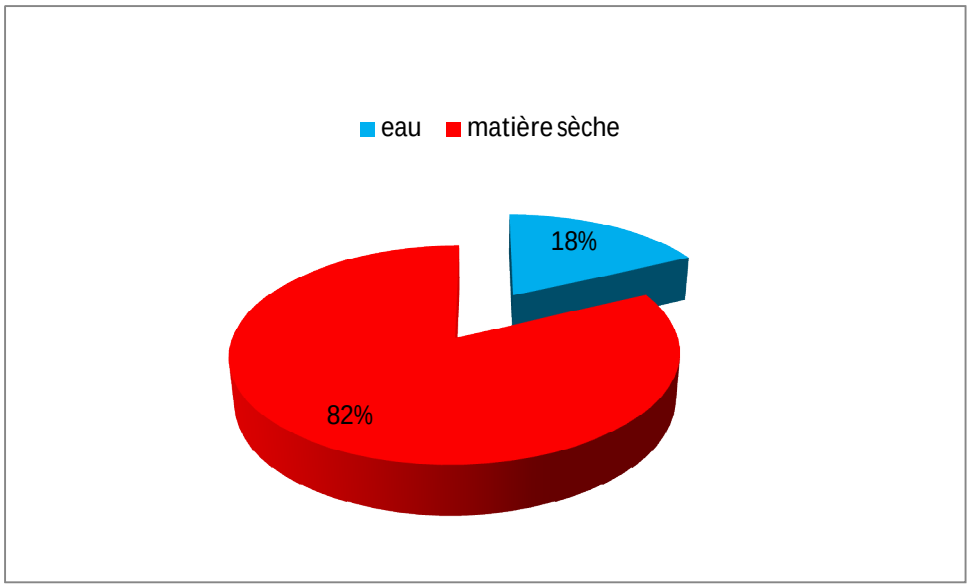

Figure 6 : Teneur en eau et en matière sèche des feuilles de Phlomis Bovei de Noé

Les taux d'humidité faible des deux parties (feuilles et tiges) de la plante étudiée sont dus aux poiles tecteurs qui couvre quasiment la surface, ces poiles jouent un rôle dans la protection de la plante contre la dessiccation **(Djerroumi et Nacef, 2004)**

2. Rendement en huile essentielle

Le rendement d'extraction en HE de *Phlomis Bovei de Noé* obtenue est de 0.0125% par rapport à la matière sèche. Ce rendement est très faible comparativement à ceux avancés dans la littérature **(sokovic et al. 2002) et (zaabat)**

La figure 7 représente le rendement en huiles essentielles de Phlomis Bovei de différentes régions.

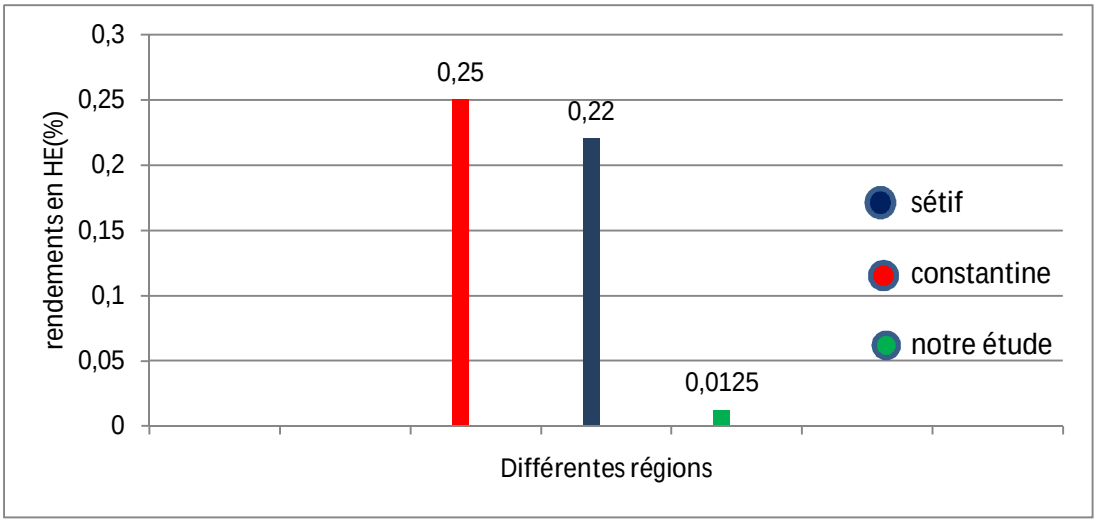

Figure 7 : Rendement en huile essentielle de *Phlomis Bovei de Noé* de différentes régions **(Sokovic 2002 et Zaabat)**

Le faible rendement en HE de notre étude est dû à l'altitude de la région Ait Ouabane (1100m) d'altitude par contre l'altitude des deux région (sétif,constantine) prie comme référence sont de 1500m d'altitude plus l'altitude est grande plus le rendement en huile essentielle de Phlomis Bovei est meilleur (**Zaabat)** aussi à la période de cueillette car la meilleure période est le mois d'Aout, c'est le mois où la plante est en fin de floraison (plante mature) tandis que notre plante à été cueilli prématurément (mois d'avril).

- ✓ **Examen organoleptique**

L'huile essentielle de *Phlomis Bovei de Noé* obtenue par hydrodistilation, a l'aspect d'un liquide peu visqueux, de couleur jaune clair, son odeur très intense et forte.

Par manque du matériel on n'a pas pu effectuer l'analyse CG/MS de notre huile

3. Paramètres physico-chimiques des extraits

Nous regroupons sur le tableau 5 les résultats obtenus pour les paramètres physico-chimiques des différents extraits étudiés de *Phlomis Bovei de Noé.*

Tableau 5: Données physico-chimiques des différents extraits de Phlomis Bovei de Noé

Paramètres physico-chimiques		Extrait aqueux		Extrait frais		Extrait éthanolique		Extrait méthanolique	
		Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges
Indices chimiques	Indice d'acide	1.2	1.01	1.8	1.9	2.01	2.0	1.89	1.97
	Indice de saponification	17.02	17.0	18.22	18.10	18.50	18.38	18.20	17.90
	Indice d'ester	15.86	15.50	17.02	16.67	17.49	17.24	16.61	16.77
Indices physiques	Indice de réfraction	1.36	1.36	1.36	1.36	1.36	1.36	1.36	1.36
	pH	5.15	5.09	3.3	3.9	3.4	3.7	3.5	3.6

Par manque des données de la littérature, nous avons comparé entre eux les résultats des paramètres physico-chimiques évalués pour les différents extraits de *Phlomis Bovei*.

D'après ces résultats nous remarquons que les indices chimiques sont plus élevés avec les extraits alcooliques (éthanolique, méthanolique) et les extraits frais des feuilles qu'avec les extraits aqueux. En effet l'éthanol et le méthanol sont de bons solvants en raison de leur polarité et de leur bonne solubilité **(Mohsen et Ammar, 2009)**.

4. Composition chimique des extraits

Les tests phytochimiques nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de notre plante. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation, un changement de couleur spécifique.

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques réalisés sur les différents extraits des parties (tiges et feuilles) de *Phlomis Bovei de Noé* mentionnés dans le tableau 6

Tableau 6 : Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans les deux parties de la plante étudiée.

Classes recherchées			Feuilles	Tiges
Extrait aqueux	Amidon		-	-
	Saponosides		-	+
	Tanins		+	-
Extrait frais	Amidon		-	-
	Saponosides		-	+
	Tanins		+	-
Extrait éthanolique	Tanins	Galliques	-	-
		catéchiques	+	+
	Composés réducteurs		-	-
	Alcaloïdes sels		-	-
Extrait méthanolique	Tanins	Galliques	-	-
		catéchiques	+	+
	Composés réducteurs		-	-
	Alcaloïdes sels		-	-
Ether diéthylique.	Alcaloïdes bases		+	+
	Acide gras		+	+
	Huiles volatiles		+	-
	pH		4.0	3.8

D'après le tableau 6 les tanins sont faiblement présents dans les extraits aqueux et frais des feuilles de *Phlomis Bovei de Noé* ainsi leurs absence totale dans les extraits (aqueux et frais) des tiges. Par contre dans les deux extraits éthanoliques et méthanoliques de différentes parties (feuilles et tiges) sont présents avec une intensité importante. Leur présence est confirmée par une réaction positive avec la solution de chlorure ferrique en donnant une coloration bleu verdâtre dans les feuilles et les tiges, il s'agit donc des tanins catéchiques.

On remarque aussi la présence des saponosides dans les extraits (aqueux et frais) des tiges mais avec une quantité faiblement importante ainsi leurs absence totale dans les extraits (aqueux et frais) des feuilles.

Les tests phytochimiques réalisés ont montré l'absence totale d'amidon et des composés réducteurs dans tous les extraits des deux parties étudiées de la plante *Phlomis Bovei de Noé.*

5. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques existants dans notre plante nous a permis de calculer le rendement de chaque extrait brut.

Le rendement qui a été déterminé par rapport à 10 g de matériel végétal sec et broyé est exprimé en pourcentage.

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Les rendements en extraits obtenus à partir des extraits des parties de la plante

Les extraits testés	**Les solvants utilisés**	**Rendements %**	
		Tiges	**Feuilles**
Extrait bruts	Méthanol	07.93	08.19
	Ethanol	11.22	11.34
	Aqueux	05.96	06.18
Extrait frais	frais	06.87	07.28

Les résultats obtenus dans le tableau 7 montrent un faible rendement en composé phénolique des différents extraits de l'espèce végétale étudiée.

Ce faible rendement est dû à la période de la cueillette de la plante et au solvant d'extraction car un bon solvant doit être très soluble vis-à-vis des composés phénoliques.

D'après les résultats trouvés dans la littérature (**http://tpe-huile-essentielle-)**, les teneurs en extraits varient non seulement d'un organe à un autre de la plante mais également en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide des polyphénols tels que :

- ✓ La température d'ébullition du solvant d'extraction doit être faible pour que le solvant puisse être éliminé facilement ce qui signifie que l'éthanol, le méthanol et l'eau été de mauvais solvant vu leur température d'ébullition élevée.
- ✓ Le solvant d'extraction dépond de sa structure chimique : un composé polaire sera soluble dans un solvant polaire tandis qu'un composé peu polaire sera soluble dans un solvant peu polaire.
- ✓ La taille et la rigidité des molécules.

Le calcul des rendements permet non seulement d'apprécier les extraits totaux issus de l'espèce, mais également d'envisager la masse de notre plante à prélever en cas de besoin pour une éventuelle étude similaire. Ce qui permettrait une meilleure valorisation dans l'usage des espèces visées.

6. Dosage des polyphénols

La courbe d'étalonnage est donnée dans l'annexe 5.

Les résultats tirés de la courbe d'étalonnage sont mentionnés dans le tableau 8

Tableau 8: teneur en composés phénoliques des différents extraits étudiés

Extraits	Ethanolique		Méthanolique		aqueux		Frais	
	Feuille	Tige	Feuille	Tige	Feuille	Tige	Feuille	Tige
Teneur (g /L)	01.02	00.9	00.81	00.55	00.66	0.46	0.71	0.41

Les résultats mentionnés dans le tableau 8 montrent que la teneur en composés phénoliques de l'espèce végétale étudiée est faible dans les deux organes étudiés (feuilles et tiges) comparativement aux résultats avancés dans la littérature, ce faible rendement est dû probablement a la plante qui n'a pas été encore mature lors de la cueillette. Ainsi au solvant d'extraction ; le composé à extraire doit être très soluble dans le solvant (pour pouvoir être extrait dans celui-ci) et puis procéder à leurs dosage.(**http://tpe-huile-essentielle)**

Ces faibles teneurs des différents extraits issues de l'espèce étudiée justifie les faibles rendements en composé phénolique, l'utilisation de l'éthanol, le méthanol et l'eau comme solvant d'extraction été un mauvais choix. Il a été démontré dans la littérature que l'hexane est le meilleur solvant d'extraction donnant de bons rendements en composés phénoliques grâce à sa volatilité élevée (**http://tpe-huile-essentielle-).**

7. Résultats des tests microbiologiques

7.1. Pouvoir antimicrobien des extraits

Beaucoup de travaux ont été menés sur le pouvoir antimicrobien des produits naturels extraits des plantes.

Lors de cette étude, nous avons testé l'action des différents extraits (éthanoliques, méthanoliques, aqueux et frais) de deux parties (feuilles et tiges) de l'espèce végétale *Phlomis Bovei de Noé* vis-à-vis de quelques souches bactériennes et mycéliennes.

L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par **Moreira et al., 2005** Ils ont classé le diamètre des zones d'inhibition (D) de la croissance microbienne comme suit :

- Non sensible (-) : $D \leq 8$ mm
- Sensible (+) : $9 \leq D \leq 14$ mm
- Très sensible (+ +) : $15 \leq D \leq 19$ mm
- Extrêmement sensible (+++) : $D \geq 20$ mm

7.1.1. Pouvoir antibactérien des extraits

Après 24 heures d'incubation à 37°C, les zones d'inhibition observées autour des disques imprégnés des différents extraits des feuilles et des tiges de la plante étudiée ont été mesurées. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 8 pour les extraits des feuilles et sur la figure 9 pour les extraits des tiges.

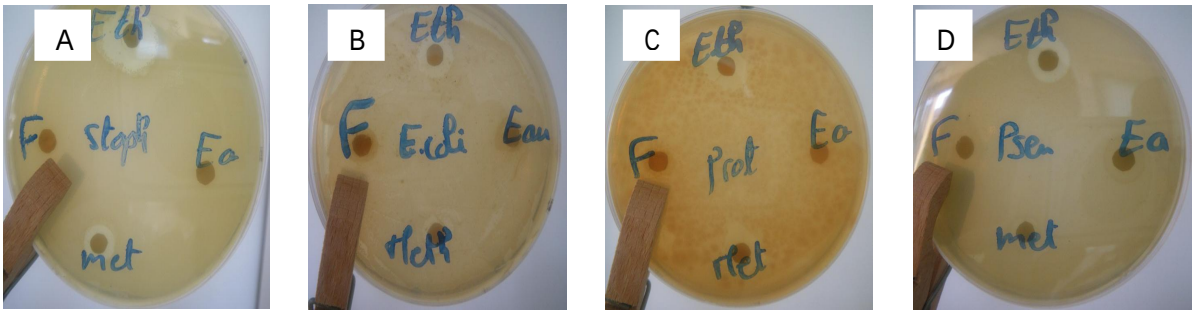

Figure 8 : Zones d'inhibition des différents extraits des feuilles de *Phlomis Bovei de Noé* relatives aux différentes souches bactériennes testées.

A : *Staphylococcus aureus*, **B** : *Escherichia coli*, **C** : *Proteus mirabilus*. **D** : *Pseudomonas aeruginosa* (**Eth** : éthanol ;**Met** : méthanol ; **F :**Frais ; **E** :Eau)

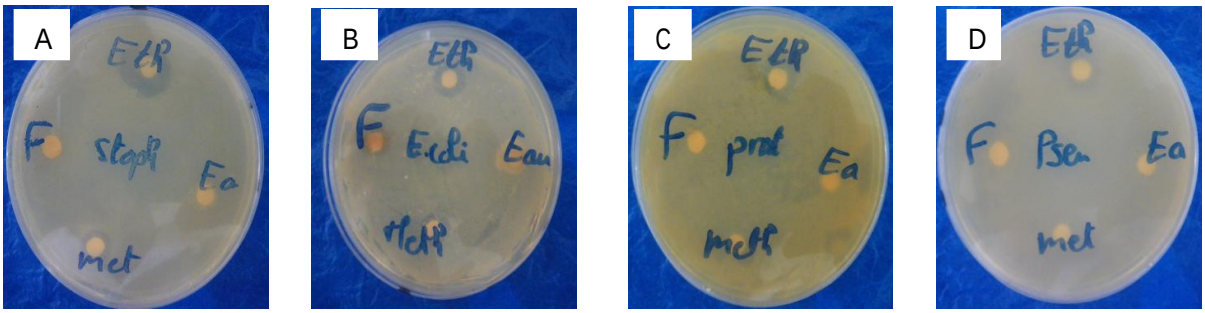

Figure 9 : Zones d'inhibition des différents extraits des tiges de *Phlomis Bovei de Noé* relatives aux différentes souches bactériennes testées.

A : *Staphylococcus aureus*, **B** : *Escherichia coli*, **C** : *Proteus mirabilus*. **D** : *Pseudomonas aeruginosa* (**Eth** :éthanol ; **Met** : méthanol ; **F :**Frais ; **E** :Eau)

Les résultats présentés sur les figures 8 et 9 montrent que l'extrait éthanolique de *Phlomis Bovei de Noé* présente une bonne activité contre *Staphylococcus aureus* par rapport aux autres extraits.

Le tableau 9 regroupe les valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition des différents extraits des deux parties (feuilles et tiges) de la plante étudiée. Pour *Staphylococcus aureus*, l'extrait éthanolique des feuilles et des tiges de la plante étudiée montre des diamètres d'inhibition de 19 mm et de 14 mm respectivement.

Selon l'échelle donnée par **Moreira et al. (2005),** la bactérie *Staphylococcus aureus* est très sensible (++) à l'extrait éthanolique des feuilles da la plante étudiée mais sensible (+) à l'extrait éthanolique des tiges.

Tableau 9 : Valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition des différents extraits des feuilles et des tiges de *Phlomis Bovei de Noé* relatives aux différentes souches bactériennes testées.

Souches bactériennes testées		D (mm)							
		Extrait éthanolique		Extrait méthanolique		Extrait aqueux		Extrait frais	
		Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges
Gram+	Staphylococcus aureus	19	14	12	10	09	0	0	0
Gram-	Escherichia coli	12	10	11	09	09	0	0	0
	Proteus mirabilus	14	10	11	08	08	0	0	0
	Pseudomonas aeruginosa.	13	08	09	0	08	0	0	0

Les résultats obtenus ont montré que les extraits organiques (éthanolique et méthanolique) des feuilles de la plante étudiée ont produit des zones d'inhibition plus grandes que les extraits aqueux.

Plusieurs travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram + (annexe 2) par rapport aux Gram – (annexe2) vis-à-vis des extraits des plantes **(Falleh et al., 2008** ; **Hayouni et al., 2007 ; Turkmen et al., 2007 ; Shan et al., 2007 ; Koné et al., 2004).** Ceci peut être attribué à la différence entre les couches externes des bactéries Gram (-) et Gram (+). Les bactéries Gram (-), indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle à la membrane externe, qui se compose des phospholipides et des protéines, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules. **(Georgantelis et al., 2007)**.

L'hypersensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* peut s'expliquer probablement par la sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes, tels que la température et les extraits naturels dus à l'absence de la membrane externe **(Balentine et al., 2006)**.

Falleh et al.,(2008) et **Shan et al.(2007)** ont rapporté que plusieurs classes de polyphénols telles que les acides phénoliques, les tannins servent de mécanisme de défense des plantes contre les micro-organismes, les insectes, et les herbivores pathogènes et sont aussi des substances antibactériennes importantes

Généralement, toutes les plantes de la famille *Lamiaceae* connues pour ses composés phénoliques, ont été prouvé actif contre une variété de micro-organismes **(Gortzi et al., 2007)**.

A la lumière de ces résultats ont dit que l'extrait éthanolique (feuilles et tiges) de *Phlomis Bovei de Noé* contient un agent antibactérien.

7.1.2. Pouvoir antifongique des extraits

Les zones d'inhibition observées autour des disques imprégnés des différents extraits des feuilles et des tiges de la plante étudiée après 48 h d'incubation à 37°C sont présentées sur la figures 10 et résumés dans le tableau 10

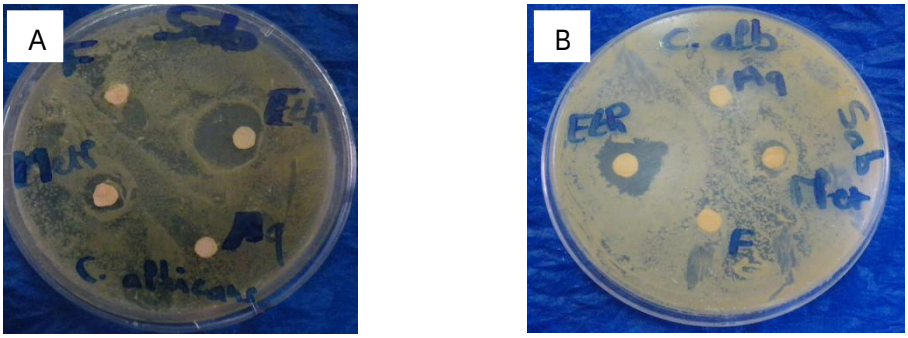

Figure 10 : Zones d'inhibition des différents extraits des feuilles et tiges de *Phlomis Bovei de Noé* relatives à la souche fongique testée (*C.albicans*).

A : Extrait des feuilles, **B** : Extrait des tiges

(**Eth** : éthanol ; **Met** : méthanol ; **F :** Frais ; **E** : Eau)

Tableau 10 : Valeurs des diamètres de la zone d'inhibition des différents extraits de Phlomis Bovei de Noé relatives à la souche fongique testée (C.albicans).

Souche fongique testée	D (mm)							
	Extrait éthanolique		Extrait éthanolique		Extrait aqueux		Extrait frais	
	Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges
Candida albicans	17	13	12	09	09	07	10	08

Le tableau 10 rapporte les résultats du pouvoir antifongique des différents extraits des deux parties (feuilles et tiges) de l'espèce *Phlomis Bovei de Noé* vis-à-vis de la souche fongique par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait éthanolique de *Phlomis Bovei de Noé* a produit des zones d'inhibitions plus grandes que les autres extraits.

L'action de l'extrait éthanolique des feuilles de *Phlomis Bovei de Noé* est importante (17mm) sur *C.albicans*. Selon l'échelle donnée par **Moreira et al., 2005** la levure *Candida albicans* est très sensible (++) à l'extrait éthanolique des feuilles da la plante étudiée.

On peut expliquer ces résultats par la différence de composition entre les deux extraits, l'alcool permettant une meilleure extraction de composés moins polaires comme des dérivés terpéniques **(Takasaki et al., 1998)** ou les flavonoïdes **(Hernandez et al., 2000).** Ce qui indique que l'activité antifongique dépend aussi de plusieurs facteurs tels que le type du solvant utilisé pour l'extraction.

A la lumière de ces résultats nous pouvons dire que l'extrait éthanolique de *Phlomis Bovei de Noé* contient un agent antifongique.

7.2. Détermination de la CMI

D'après le tableau 11, les bactéries *Proteus mirabilus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont les plus résistantes aux différents extraits testés, car elles ne sont pas inhibées quelque soit la concentration de l'extrait utilisé.

Une concentration minimale de 250 µg/ml de l'extrait éthanolique des feuilles de la plante étudiée a permis d'inhiber la bactérie *Staphylococcus aureus* et la levure *C.albicans*. Par contre *E.colé* s'est inhibée à une concentration de 500 µg/ml.

Pour cela nous pouvons conclure que l'activité antimicrobienne des extraits dépend non seulement des composés phénoliques mais aussi de la présence de différents métabolites secondaires tels que les Tanins, alcaloïde, flavonoïde.

Une recherche supplémentaire sur la composition chimique de chaque extrait est plus que nécessaire pour comprendre l'évaluation de composés présentant l'activité antimicrobienne.

Tableau 11 Valeurs de la CMI

Extrait testé	dilutions	Concentration de l'extrait dans le milieu (mg/ml)		Staphylococcus aureus	Escherichia coli	Proteus mirabilus	Pseudomonas aeruginosa.	Candida albicans
Extrait éthanolique	1/2	500	Feuilles	-	-	+	+	-
			Tiges	-	+	+	+	+
	1/4	250	Feuilles	-	+	+	+	-
			Tiges	+	+	+	+	- /+
	1/8	125	Feuilles	- /+	+	+	+	+
			Tiges	+	+	+	+	+
	1/16	62.5	Feuilles	+	+	+	+	+
			Tiges	+	+	+	+	+
Extrait méthanolique	1/2	500	Feuilles	-	-/+	+	+	+
			Tiges	+	+	+	+	+
	1/4	250	Feuilles	+	+	+	+	+
			Tiges	+	+	+	+	+
	1/8	125	Feuilles	+	+	+	+	+
			Tiges	+	+	+	+	+
	1/16	62.5	Feuilles	+	+	+	+	+
			Tiges	+	+	+	+	+
Extrait aqueux	1/2	500	Feuilles	+	+	+	+	+
			Tiges	+	+	+	+	+
	1/4	250	Feuilles	+	+	+	+	+
			Tiges	+	+	+	+	+
	1/8	125	Feuilles	+	+	+	+	+
			Tiges	+	+	+	+	+
	1/16	62.5	Feuilles	+	+	+	+	+
			Tiges	+	+	+	+	+
Extrait frais	1/2	500	Feuilles	+	+	+	+	+
			Tiges	+	+	+	+	+
	1/4	250	Feuilles	+	+	+	+	+
			Tiges	+	+	+	+	+
	1/8	125	Feuilles	+	+	+	+	+
			Tiges	+	+	+	+	+
	1/16	62.5	Feuilles	+	+	+	+	+
			Tiges	+	+	+	+	+

+ : Présence de germe ; - : Absence de germe

8. Résultats de la forme pharmaceutique

8.1. Contrôle de la matière première

Avant de procéder à la formulation, nous avons contrôlé la matière première afin de vérifier et d'identifier l'authenticité des produits utilisés.

Tableau 12 : Caractères organoleptiques des excipients

Excipients	Propyléneglycol	parahydroxybenzoate de méthyle	parahydroxybenzoate de propyle
pH	8.2	5.5	4
Odeur	inodore	inodore	inodore
Couleur	incolore	blanche	blanche
Forme	liquide clair	Poudre cristalline fine	Poudre cristalline fine

D'après le tableau 12, la matière première est dans les normes d'où l'authenticité des produits utilisés.

Tableau 13 : Caractères organoleptiques de l'extrait éthanolique

Apparence	Extrait éthanolique
pH	5.5
Odeur	Forte
Couleur	verte
Forme	Liquide Visqueux

8.2. Contrôle du pH et tests visuels sur la crème formulée

Les résultats sont résumés dans le tableau 12

Tableau 14 : Tests organoleptiques de la crème formulée et la crème commerciale

Substance	pH	Aspect	Homogénéité
Crème formulée	3.9	Liquide visqueux vert, opaque	Une seule phase homogène
Crème commerciale ACIFUDAL	4.0	Liquide visqueux blanc, opaque	Une seule phase homogène

Le pH de la crème formulée est de 3.9, cette valeur de pH est favorable pour lutter contre les infections de la peau causées par les staphylocoques et les streptocoques, lesquelles résistent à des pH > 4,2. Donc un milieu de pH<4,2 défavorise sa prolifération. (Le Loir et al., 2003).

8.3. Tests microbiologiques

Les zones d'inhibition observées autour de la crème formulée et de la crème commercialisée (ACIFUDAL®**)** après 24h d'incubation à 37°C sont présentées sur la figure 11et résumés dans le tableau 15.

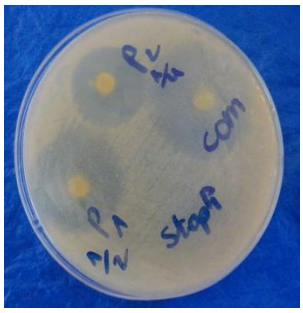

Figure 11 : Activité antibactérienne des préparations à base de l'extrait éthanolique de Phlomis Bovei de Noé et Acifudal® sur *Staphylococcus aureus*.

Avec :

P_1(½) : extrait éthanolique de P.B.de Noé avec une dilution de ½ (500 µg/ml)

P_2(¼) : extrait éthanolique de P.B.de Noé avec une dilution de ¼ (250 µg/ml)

Com : crème commercialisée (Acifudal®)

Tableau 15 Valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition de l'Acifudal® ainsi que les préparations à base de l'extrait éthanolique de *Phlomis Bovei de Noé*.

Substances	Mélange* + extrait éthanolique			ACIFUDAL®
Staphylococcus aureus	Dilutions	½	¼	
	Diamètre (mm)	31	18	36

Les résultats mentionnés dans le tableau 15, montrent une activité antibactérienne des préparations à base de l'extrait éthanolique de *Phlomis Bovei de Noé* avec un diamètre variant de 18 à 31mm.

Selon l'échelle d'estimation de l'activité antibactérienne donnée par **Moreira et al., 2005**, la bactérie *Staphylococcus aureus* est extrêmement sensible (+++) à la préparation à base d'extrait éthanolique pour une dilution de ½ et très sensible (++) pour une dilution de ¼. Cependant en comparant l'activité antibactérienne de la préparation pour une dilution de ½ à celle de l'Acifudal® , elle semble être du même ordre de grandeur avec des diamètres d'inhibition de 31mm et 36mm respectivement.

Conclusion

Conclusion générale et perspectives

Notre présente étude a porté sur l'espèce *Phlomis Bovei de Noé* qui appartient à la famille des Lamiacées, une des familles les plus importantes dans la flore Algérienne et la plus utilisée par les thérapeutes traditionnels. Elle a permis de mettre en évidence à travers un criblage phytochimique la présence des tanins, des saponosides, des Alcaloïdes bases, des Acide gras et des Huiles volatiles.

La feuille et la tige de la plante étudiée présentent une teneur en eau assez importante d'où l'intérêt du séchage avant extraction afin d'obtenir des rendements appréciables. L'évaluation des rendements d'extraction en huiles essentielles a révélé une teneur nettement faible de l'ordre de 0.0125%.

Les résultats des tests phytochimiques sur les extraits séparés des feuilles et des tiges du *Phlomis Bovei de Noé* étaient beaucoup meilleurs avec les extraits alcooliques (éthanolique, méthanolique) et les extraits frais des feuilles qu'avec les extraits aqueux.

Le dosage des phénols totaux a montré des faibles teneurs en composés phénoliques des différents extraits de l'espèce végétale étudiée.

L'étude de l'activité antimicrobienne de nos extraits s'est avérée très intéressante, du fait que nous avons obtenu des résultats positifs sur les souches testées. Les résultats des tests microbiologiques nous ont permis de montrer que les différents extraits des deux parties de la plante (feuilles et tiges) possèdent une activité antifongique et antibactérienne intéressante.

En ce qui concerne le pouvoir antibactérien évalué par la méthode de diffusion de disque des différents extraits (éthanol, méthanolique, aqueux et frais) des deux organes de la plante étudiée, nos résultats montrent que la bactérie *Staphylococcus aureus* présente une sensibilité élevée vis-à-vis de l'extrait éthanolique des feuilles de Phlomis Bovéi de Noé comparativement aux autres bactéries.

L'étude du pouvoir antifongique des différents extraits (alcooliques, aqueux et frais) des deux parties de la plante étudiée (feuilles et tiges) a permis de visualiser une action

inhibitrice intéressante de l'extrait éthanolique sur *Candida Albicans* comparativement aux autres extraits.

L'étude antibactérienne de la crème formulée à base de l'extrait éthanolique des feuilles du *Phlomis Bovei de Noé* a montré qu'elle possède une activité inhibitrice sur le *Staphylococcus aureus* comparable à celle observée avec la crème Acifudal® commercialisée.

En perspectives notre présente étude pourra servir à d'éventuelles études cliniques, (essais de tolérance locale) et la mise en forme définitive de la préparation. Par ailleurs, des essais d'isolation de substances biologiquement actives à partir des extraits du *Phlomis Bovei de Noé* pourront constituer un créneau d'avenir très prometteur pour l'industrie pharmaceutique et cosmétique en Algérie.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

AFNOR, Association Française de Normalisation, Recueil de normes Française «Huiles essentielles ». AFNOR, Paris. AFNOR NF T 75-006, (2000).

Albaladejo R. G., Aguilar J. F., Aparicio A., Gonzalo N., 2005. Contrasting nuclear plastidial phylogenetic patterns in the recently diverged Iberian *Phlomis crinita* and *P. lychnitis* lineages (*Lamiaceae*). 54(4), 987-998.

Babulka P- Plantes médicinales du traitement des pathologies rhumatismales : de la médecine traditionnelle à la phytothérapie moderne, phytothérapie,vol.5, pp 137- 145. 2007

Bakkalia. F, Averbeck. S, Averbeck. D, Idaomar.M. Biological effects of essential oils A review. Food and Chemical Toxicology. 46, Pages 446–475 (2008).

Balentine, C.W., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Duong, D.Q., Pohlman, F.W. (2006) The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. Meat Science. 73: 413-421.

Bennick A. Interaction des polyphénols d'usine avec les protéines salivaires. Thèse de doctorat. Université de Toronto. Canada : Andres. 2002 ,184-196.

Bessas, A; Benmoussa, L; Kerarma, M. (2007). Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud Algérien. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en biologie.

Bougandoura N. ;(2011) Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales Saturejacalaminthasspnepta (nabta) et Ajugaiva L.(chendgoura) de l'ouest d'Algérie. Thèse magister en Biologie Option Substances naturelles, activités biologiques et synthèse. Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen

Bruneton J. ; 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation. 3ème Ed. Lavoisier. Paris, 199-388.

Carvalli J.F (2002). Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN de carbone -13 d'huile essentielle de Madagascar. Thèse de Doctorat, Université de Corse Pascal Paoli.

Chabrier J.Y (2010). Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Doctorat en Pharmacie. Université Henri Poincaré - Nancy 1.

Djerroumi A. et Nacef M., (2004). 100 Plantes médicinales d'Algérie. Palais du livre.

Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008) Phenolic composition of Cynara cardunculus L. organs, and their biological activities .C. R. Biologies. 331: 372-379.

Franchomme P, Pénoel D- Matières médicale aromatique fondamentale- L'aromathérapie exactement ; Roger Jallois éditeur ; Limoges, Vol. 4 ; pp 317- 446, (1990).

Gee J.M., Johnson I.T. Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry*. 2001, 8: 1-182.

Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., Georgakis, S A. (2007) Effect of rosemary extract, chitosan and α-tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. Meat Science. 76: 172-181.

Gildmeister E., Hoffman FR.Les huiles essentielles. Ed Schimmel et Cie. 1919.

Gortzi, O., Lalas, S., Chinou, I., Tsaknis, J. (2007) Evaluation of the Antimicrobial and Antioxidant Activities of Origanum dictamnus Extracts before and after Encapsulation in Liposomes. Molecules. 12: 932-945.

Grayer R. J., Eckert M. R., Veitch N. C., Kite G. C., 2003. The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, Nepetoidins A and B, in the *Lamiaceae*. *Phytochemistry*, 64, 519-528

Guignard J-L. ; 1979. Abrégé de biochimie végétale. 2ème Edition Masson, Paris, 84.

Guignard J. L., Pelt J. M., 2001. Botanique Systématique moléculaire.12ème édition. Masson, Paris

Guignard J. L., Dupont F., 2004.Botanique Systématique moléculaire. 13ème édition. Masson, Paris

Haddouche F et Benmansour A (2008). Article de synthèse: Huiles essentielles et activités biologiques, Application à deux plantes aromatiques. Journal les technologies de laboratoire N°8.

Haslam E. Natural polyphenols (vegatable tannins): Gallic Acid metabolism. Nat. Prod. 1994, 11: 41-66.

Hayouni, E.A, Abedrabba, M ., Bouix, M., Hamdi, M., (2007)The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian Quercus coccifera L. and Juniperus phoenicea L. fruit extracts. Food Chem. (in press).

Hedge I. C., 1986. Labiatae of South-West Asia: diversity, distribution and endemism. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, 89B, 23-35.

Hemingway, R.W. (1992). Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: Lpant polyphenols: synthesis, proprieties, significande. Laks P.E, Hemingway R.W New York.

Hernandez N.E., Tereschuk M.L., Abdala L.R. ; 2000. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafí del Valle (Tucumán, Argentina). Journal of Ethnopharmacology, 73, 317-322.

Heywood V. H., Brumitt R. k., Culham A., Seberg O. 2007. Flowering plant families of the

world. Royal botanic Gardens,Kew.

Hoffmann E et Vincent S (2005).Spectrométrie de masse. 3e édition, BUNOD.

http://tpe-huile-essentielle-e-monsite.com/page/i-les-differents-procedes-d-Extraction-d-une-huile-essentielle/4-extraction-par-solvant.htm/

Hussain Aboullah ijaz, Characterization and biological activities of essential oils of some species of lamiaceae. Thèse de doctorat. Université d'agriculture Faisalabad, Pakistan, (2004).

Kabouche A., Kabouche Z., Seguin E., Tillequin F., Bruneau C., 2004a. Comparative phytochemical study of the butanolic extracts of two Algerian Phlomis species. Chemistry of Natural Compounds, 40, 188-189.

Koné, W.M., Kamanzi Atindehou, K., Terreaux, C., Hostettmann, K., Traoré, D., Dosso, M. (2004) Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. J Ethnopharmacol. 93: 43-49.

Le Loir, Y., Baron, F., & Gautier, M. (2003). Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genetics and Molecular Research : GMR*, *2*(1), 63-76.

Lesueur D., Serra D.de Rocca, Bighelli A., Hoi T.M., Ban N.K., Thai T.H., Casanova J. ; 2007. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of Michelia faveolata Meryll ex Dandy from Vietnam. Flavour and Fragrance Journal, 22, 317-321.

Liao CH, Lai CC, Hsu MS, Chu FY, Wu MY, Huang YT, Hsueh PR. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates determined by the agar dilution, disk diffusion and Etest methods: comparison of results using GC agar and chocolate agar. Int. J. Antimicrob. Agents 2010, 35 (5): 457-60.

Majhenic L., kerget M.S., Knez Z. ; 2007. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. Food Chemistry, **104**, 1258–1268.

Masango, P. Cleaner production of essential oil by steam distillation. Journal of Cleaner Production. 13: 833-839, (2004).

Matkowski, A; Piotrowska, M. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae, Fitoterapia, 77: 346-353.

Mebarki N., (2010). Extraction de l'huile essentielle de Thymus fontanisii et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne, thèse de magister en génie des procédés chimiques et pharmaceutiques option Industrie pharmaceutique. Université M'hamed Bougara, Boumerdes.

Memelink J., Verpoort R., Kijine J.W. ; 2001. Organization of jasmonate responsive gene expression in alkaloid metabolism. Trends in Plant Science, **6** , 212-221.

Millet. F. Les formes galéniques et les huiles essentielles Phytothérapie 8,133-36, (2010)

Mohammedi Z (2006).Etude de pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen ,thèse de magister en biologie option Produits naturels , activités biologiques et synthèse .Université Abu Bakr Belkaid, Tlemcen

Mohsen, S. M., Ammar, A.S.M. (2009) Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. Food Chem.112: 595-598.

Montoro P, Barara A, Pizza C, De Tommasi N. structure antioxydante activety relationships of flavonoids isolated from diffrent plant spaices food chemistry. 2005;349- 355.

Moreira, M.R., Ponce, A.G., Del Valle, C.E., Roura, S.I. (2005) Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. Leaving Water Temperature, 38: 565-570.

Naghibi F,Mosaddegh M,Mohammadi M.S et Ghorbani A- Labiatae Family in folk Medicine in Iran : from Ethnobotany to pharmacology- Iranian Journal of Pharmaceutical Research, Vol.2, pp 63-79. 2005

Osato M. Comparison of the Etest and the NCCLS-approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*. Int. J. Antimicrob. Agents 2009, 17 (1): 39-44.

Ozenda P., 1991. Flore et végétation du Sahara (2^{e} éd). Paris, France, CNRS, 662.

Paolini V., Dorchies Ph., Hoste H. ; 2003. Effet des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre. Alter. Agri., 17-19.

Pharmacopée européenne 6^{éme} édition

Piochon M (2008).Étude Des Huiles Essentielles D'espèces Végétales De La Flore Laurentienne: Composition Chimique, Activités Pharmacologiques Et Hémi-Synthèse. Université Du Québec À Chicoutimi

Quezel F., Santana S., Nouvelle Flore de l'Algerie et des regions Desertiques Meridionales, 1.2 , 801-802 Ed CNRS, Paris France 1962-1963.

Rasooli, I., Fakoor, M.H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A., Rezaei, M.B. (2008) Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International J of Food Microbiology*.122:135-139.

Roulier, G. Les huiles éssentielles pour votre santé. Dangles éditions.

ROUX .Daniel, *Conseil en aromathérapie*, 2ème édition Pro-officina, mars (2008).

Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R. (2005) Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem*. 91: 621-632.

Sagdic, O., Kuscu, A., Özcan, M., Özcelik, S. (2002) Effects of Turkish spice extracts at

various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*. **19**: 473-480

Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D., Corke, H. (2007) The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. International J Food Microbiology. 117: 112- 119.

Silou T, Malanda M, Loubaki L, Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de Cymbopogon citrarus grâce à un plan factoriel complet 2^3 – Journal of Food Engineering, Vol 65, pp 219-223. 2004

Singleton, V.L ; Rossi, J.A .(1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents, American Journal of Enology and Viticulture,16: 144-158

Sokovic, M.D.; Marin, P.D.; Janackovic, P.; Vajs, V.; Milosavljevic, S.; Dokovic, D.; Tesevic, V.; Petrovic, S. Composition of the essential oils of *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae). *J. Essent. Oil Res.* **2002**, *14*, 167-168.

Spichiger R. E., Savolainen V. V., Figeat M., 2000. *Botanique Systematique des Plantes a Fleurs*. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne.

Takasaki M., Yamauchi I.I., Haruna M., Konoshima T. ; 1998. New glycosides from Ajuga decumbens. Journal of Natural Products, 61, 1105 – 1109.

Touafek O (2010). Etude phytochimique de plantes médicinales du nord et du sud algériens. Doctorat en chimie organique. Universite Mentouri-Constantine.

Trease E., Evans W.C. ; 1987. Pharmacognosy Billiaire. Editions Tindall London 13, 61-62.

Turkmen, N., Velioglu, Y. S, Sari, F., Polat, G. (2007) Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. Molecules. 12:484-496.

Twidwell E. K. Wagner J.J. et Thiex Nancy J. Use a Microwave Oven determine moisture content of frages ExEx8077.p2; (2002)

Wang J., SunB., Cao Y., Tian Y et Lix (2008). Optimization of ultrasound- assisted extraction of phénolic compounds from wheat bran. Food chemistry; Vol-106; pp 804-810

Werker E., Putievsky E., Ravid U. The essential oils and glandular hairs in different chemotypes of *Origanum vulgar L*. Journal Annals of Botany. 1985, 55, 793-801

Whish, J. P. M. and R. R. Williams. Effects of post harvest drying on the yield oftea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). Journal of Essential Oil Research. 8: 47-51. (1996)

WICHTL M., ANTON R., 2003. Plantes thérapeutiques - Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Éd. Tec et Doc et EMI.

Zaabat N., Determination structurale et evaluation biologique de substances naturelles de deus espèces de la famille des lamiacees : Marrubium deserti de Noé et Phlomis Bovei de Noé, thèse de doctorat en science spécialité chimie organique option phytochimie. Université Mentouri, constantine.

Zargari A., 1960. Medicinal plants 4. Clarendon, Oxford, 449.

Glossaire

Glossaire

Amidon : Est un glucide complexe (polysaccharide) composé de chaînes de molécules de D-Glucose. Il s'agit d'une molécule de réserve énergétique pour les végétaux supérieurs et un constituant essentiel de l'alimentation humaine.

Bactéricide : Se dit d'une substance qui inhibe et tue la bactérie.

Bactériostatique : Se dit d'une substance qui bloque mais ne tue pas la bactérie.

Fongicide : Se dit d'une substance qui inhibe et tue les levures.

Fongique : qui se rapporte aux champignons.

Fongistatique : Se dit d'une substance qui bloque mais ne tue pas les levures.

Hydroxybenzoate de méthyle ou méthylparabène est un conservateur de la famille des parabènes. Il est utilisé dans les cosmétiques, les médicaments et les aliments, pour ses propriétés antibactériennes et antifongiques.

Inoculum : Echantillon contenant des germes vivants, destiné à être introduit au sein d'un milieu favorable à sa multiplication, afin de l'identifier, de l'étudier ou d'en produire une quantité supérieure.

Médicaments homéopathiques sont préparés à partir de substances végétales, animales, minérales ou chimiques, fortement diluées.

Membrane : Structure biologique formée de feuilles comportant une bicouche lipidique où sont insérées diverses protéines.

Miscibles : Deux liquides sont dits miscibles quand ils se mélangent totalement l'un dans l'autre.

Mycose: Manifestation provoquée par la présence d'un champignon microscopique dans l'organisme. On distingue les mycoses superficielles, et les mycoses profondes ou systémiques.

Nom vernaculaire : Est un nom usuel, en langue locale, donné à une ou plusieurs espèces animales ou végétales dans son pays ou sa région d'origine. Les noms vernaculaires sont souvent repris pour former la base des noms normalisés ou des noms vulgaires créés pour permettre la vulgarisation des noms scientifiques.

Parabène est un parahydroxybenzoate d'alkyle, c'est-à-dire un ester résultant de la condensation de l'acide parahydroxybenzoïque avec un alcool. Ses propriétés antibactérienne et antifongique font qu'il est généralement utilisé comme conservateur dans les cosmétiques, les médicaments et les aliments.

Poil tecteur : est un poil, c'est-à-dire une expansion des cellules épidermiques, jouant un rôle dans la protection de la plante, notamment contre la dessiccation.

Propylène glycol ou **propane-1,2-diol** appelé aussi 1,2-dihydroxypropane, méthyl glycol est un diol utilisé principalement comme additif alimentaire considéré comme généralement non toxique.

Spore : En biologie une spore est une cellule ou un organe (pluricellulaire) de multiplication végétative ou de reproduction. Elle constitue une des étapes du cycle de vie de nombreuses bactéries, plantes, algues. Les spores peuvent donner naissance à un nouvel individu sans fécondation.

Tanins condensés (tanins catéchiques ou proanthocyanidols) : ce sont des polymères flavanoliques,constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone le plus souvant C4-C8 ou C4-C6 tel la catéchine ou l'épicatéchine.

Tanins hydrolysables : ce sont des esters d'oses et d'acide phénol (acide gallique ou ellagique).

Annexes

Annexe 1 : Réactifs de caractérisation

- **Réactif d'amidon :** la préparation du réactif d'amidon s'effectue comme suit :
    - Dissoudre 1,2 g d'iode (I_2) dans 50 ml d'eau distillée contenant 2,5 g d'iodure de potassium (KI).
    - Chauffer pendant 5 minutes.
    - Diluer jusqu'à 500 ml.

- **Réactif de Mayer :** la préparation de ce réactif s'effectue comme suit :
    - Dissoudre 1,358 g de HgCl2 dans 60 ml d'eau distillée.
    - Dissoudre 5 g de KI dans 10 ml d'eau distillée.
    - Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 ml d'eau.

- **Réactif de Wagner :** ce réactif a été préparé comme suit :
    - Dissoudre 2 g de KI et 1,27 de I_2 dans 75 ml d'eau distillée.
    - Ajuster le volume total à 100 ml d'eau distillée.

- **Réaction de liqueur de Fehling** :
    - Mélanger 5ml de liqueur Fehling A avec 5ml de liqueur Fehling B.
    - Le caractère réducteur des aldoses ou des cétones donne un précipité rouge brique.

- **Réactif de Folin-Ciocalteu :** Ce réactif est disponible dans le commerce prêt à l'emploi. Il peut être préparé de la façon suivante:
    - 100 g de tungstate de sodium et 25 g de molybdate de sodium sont dissous dans 700 ml d'eau distillée.
    - Ajouter 50 ml d'acide phosphorique à 85% 100 ml d'acide chlorhydrique concentré
    - Porter à l'ébullition sous reflux durant 10 heures
    - Ajouter ensuite 150 g de sulfate de lithium, quelques gouttes de brome et porter à nouveau à l'ébullition durant 15 min.
    - Refroidir et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

Annexe 2 : Quelques microorganismes

Les microorganismes : Ce sont des êtres vivants microscopiques, de nature végétale (micro-algues par exemple) ou animale (microbe). Les micro-organismes ne peuvent pas être vus à l'œil nu, ce qui définit leur taille, ils sont très divers : les bactéries, les virus et champignons parmi ces familles de microorganismes on citera les plus connues et celle qu'on utilisera dans notre étude.

1. Bactéries : Les bactéries sont des êtres vivants qui appartiennent à un groupe. Ce sont des organismes cellulaires simples appelés Procaryote qui ne contiennent pas de noyaux et qui sont d'habitude trouvé en très grand nombre parce qu'ils peuvent se multiplier rapidement.
Il y a beaucoup de types de bactéries qui sont toutes séparées dans différents groupes, chaque groupe ayant des propriétés uniques.
Une caractéristique importante des bactéries est la paroi cellulaire. Les bactéries peuvent être divisées en deux groupes (Gram négatif et Gram positif) basé sur la différence de la structure et de la composition chimique de la paroi cellulaire mise en évidence grâce à la coloration de Gram.

1.1. Bactéries à gram - : Il n'y a qu'une seule ou au plus deux couches de peptidoglycane qui ne représente que 5 à 20 % des constituants de la paroi bactérienne. Mais 3 polymères situés en dehors du peptidoglycane viennent compléter la paroi : des lipoprotéines, une « membrane externe » qui contient du lipopolysaccharide.
Les lipoprotéines sont le lien entre le peptidoglycane et la « membrane externe » : le composant protéine est un polymère de 15 acides aminés qui forme une liaison peptidique avec le tétrapeptide des chaînes latérales du peptidoglycane ; le composant lipide est relié à la « membrane externe ».
La « membrane externe » est constituée d'une double couche de phospholipides dans laquelle tout ou partie des phospholipides de la couche la plus externe sont remplacés par des molécules de lipopolysaccharide. Au sein de cette « membrane externe », qui est une mosaïque fluide, se trouvent associés au moins deux types de protéines spécifiques : certaines sont dites protéines de structure car elles consolident la membrane externe; d'autres, appelées « porines » permettent le passage des petites molécules hydrophiles et en particulier, sur le plan médical, des antibiotiques (β-lactamines, tétracyclines, quinolones...).

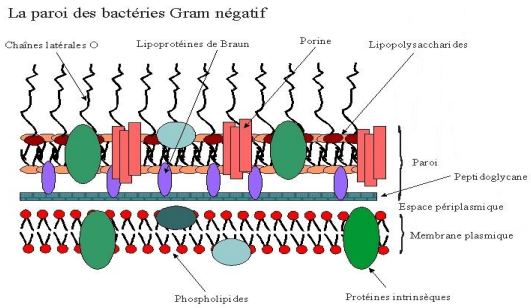

Figure : Paroi des bactéries à Gram -

- ✓ **Escherichia coli :**

C'est l'une des espèces bactériennes les plus souvent rencontrées en pathologie humaine. Escherichia coli est l'espèce type du genre Escherichia des entérobactéries. Appelée communément "colibacille" c.-à-d. "bacille à côlon", cette espèce qui a fait l'objet d'un très grand nombre d'études constitue le modèle des bacilles à Gram- aérobies.

La plupart des E. coli se multiplient rapidement (18 à 24 h) sur les milieux habituels. Les colonies ont en moyenne 2 mm de diamètre, elles sont rondes, plastes et à bords réguliers. Cette bactérie est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire et qui se transmet par voie orofécale.

- ✓ **Pseudomonas aeruginosa :**

Il s'agit d'un petit bacille, mobile grâce à son flagelle simple, que l'on retrouve partout dans la nature, dans l'eau, le sol, les plantes, les animaux et l'homme. Pseudomonas aeruginosa produit deux pigments (colorant) bleu gris : la pyocyanine, d'où il tire son nom de bacille pyocyanique, nom usuel de la bactérie en France, colorant vert, la pyoverdine. Ce bacille est facilement mis en évidence en laboratoire, il est non sporulé (sans spore) et a une forme droite ou légèrement incurvée.

Cette bactérie préfère les milieux humides et on la trouve quelquefois au niveau de la peau, de l'appareil respiratoire supérieur, de l'oreille externe et du tube digestif chez l'individu sain. Ce sont essentiellement les individus qui ont reçu des antibiotiques, qui sont affaiblis sur le plan immunitaire ou qui ont été hospitalisés, qui développent le plus facilement le bacille. En dehors de ces cas, le taux de portage (transmission du germe) est relativement faible.

Les infections à Pseudomonas aeruginosa sont le plus souvent des infections d'origine nosocomiale. Ce terme concerne tout ce qui est relatif aux hôpitaux. Plus généralement, il est employé pour une maladie contractée lors d’une hospitalisation.

- ✓ **Proteus mirabilis :**

Les bactéries du genre *Proteus* sont des bacilles (en forme de bâtonnets) Gram négatif aérobies mobiles qui fait partie de la famille des entérobactéries. Les entérobactéries mesurent habituellement de 0,3 à 1,0 µm de large par 0,6 à 6,0 µm de long. Il s'agit de bactéries uréase positives capables d'essaimage lorsque cultivées en milieu solide. Elles font partie de la flore gastro-intestinale normale de l'humain.

Les espèces du genre *Proteus* sont fréquemment en cause dans les infections des voies urinaires (IVU) compliquées. Les bacilles sont habituellement observés dans les voies urinaires hautes (siège fréquent de l'infection) et peuvent entraîner des urolithiases (formation de pierres dans le rein ou la vessie), des cystiteset des pyélonéphrites aiguës. De rares cas de bactériémie secondaire à une IVU imputables à des bactéries du genre *Proteus* ont aussi été signalés, de même que des cas de septicémie et d'infection des plaies. Après fixation aux parois et colonisation des voies urinaires, les bacilles libèrent de l'uréase, qui catalyse la conversion de l'urée en ammoniaque et en CO_2. Il en résulte une diminution du pH urinaire, et, éventuellement, la formation de calculs rénaux ou vésicaux. *P. mirabilis* est l'espèce du genre *Proteus* la plus souvent en cause en présence d'une infection.

1.2. Bactéries à Gram+ : Il y a de nombreuses couches de peptidoglycane qui représentent jusqu'à 90 % des constituants de la paroi bactérienne. Celle-ci contient aussi un feutrage (10 à 50 % du poids sec de la paroi) d'acides teichoïques (polymères du glycérol ou du ribitol phosphate) associés étroitement au peptidoglycane et faisant parfois saillie à la surface de la bactérie. Certains, les acides lipoteichoïques, sont placés transversalement. et s'enfoncent jusqu'à la membrane cytoplasmique. En général il n'y a pas ou peu de protéines dans la paroi des bactéries à Gram positif. Parmi les exceptions, notons la protéine A de *Staphylococcus aureus.*

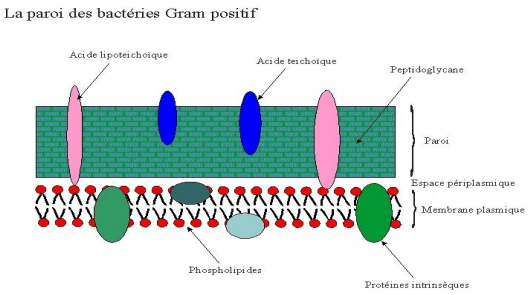

Figure : Paroi bactéries à Gram +

- ✓ **Staphylococcus aureus :**

Staphylocoque doré (***Staphylococcus aureus***) est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, de septicémies physiques (greffe, prothèses cardiaques). *S. aureus* se présente comme une coque en amas (grappes de raisin), Gram positif et catalase positif. Sa teneur en caroténoïdes lui confère une couleur dorée à l'origine de son nom. Les Staphylocoques sont des cocci à Gram positif classiquement disposés en amas.

2. Levure : Une levure est un champignon unicellulaire apte à provoquer la fermentation des matières organiques animales ou végétales. Les levures sont employées pour la fabrication du vin, de la bière, des alcools industriels, des pâtes levées et d'antibiotiques.
Lorsqu'on parle de « levure » sans précision, on désigne en général la levure de boulanger (ou de bière), *Saccharomyces cerevisiae*. Il ne faut pas la confondre avec le levain ou la levure chimique, ne serait-ce que pour éviter les déboires culinaires.
La dénomination *levure* découle de l'observation des fermentations et tout particulièrement celle qui a lieu durant la fabrication du pain : on dit communément et depuis longtemps que le pain *lève*. Ce n'est pas, à proprement parler, une dénomination scientifique actuelle. Mais l'importance des levures dans le domaine des fermentations conduit à conserver ce terme générique qui continue à être correctement perçu.

- ✓ **Candida Albicans:**

Candida albicans est l'espèce de levure la plus importante et la plus connue du genre *Candida*. Elle provoque des infections fongiques (candidiase ou candidose) essentiellement au niveau des muqueuses digestives (chez le nourrisson de moins de 18 mois) et gynécologique. Les candidoses sont une cause importante de mortalité chez les patients immunodéprimés comme les patients atteints du sida, les patients cancéreux sous chimiothérapie ou après transplantation de moelle osseuse. Les candidoses orales et oesophagienne sont fréquentes chez le patient atteint du sida. Lorsque *Candida* s'infiltre dans le flux sanguin, l'infection devient systémique et on parle alors de candidémie. Les candidémies sont caractérisées par une mortalité de l'ordre de 40 %. *C. albicans* peut donner également une multitude d'autre infections car il s'agit d'un pathogène opportuniste très polyvalent : il peut être responsable d'infection superficielle cutanée, causer un érythème fessier chez les nouveau-nés, une bronchopneumonie et/ou une pneumonie, une vaginite, une balanite ou être responsable d'infections profondes.

Annexe 3 : Caractéristique des milieux de cultures utilisés

1. Bouillon nutritif :

- **Domaine d'utilisation :** Le bouillon nutritif constitue un milieu d'utilisation générale pour un grand nombre de microorganismes ne présentant pas d'exigences particulières. Sa formulation répond aux directives.
- **Composition :**

Formule théorique en g/l d'eau distillée

milieu déshydraté (BK003)	20,0 g

- **Principe :** Le bouillon nutritif est constitué d'un mélange de Tryptone et d'extrait de viande qui contribue à la croissance des microorganismes. Le chlorure de sodium est destiné au maintien de la pression osmotique.
- **Préparation**

- Mettre en solution 20,0 g de milieu déshydraté (BK003) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Agiter lentement jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes

2. Gélose nutritive : La gélose nutritive ou gélose nutritive ordinaire (GNO) ou encore gélose ordinaire est un milieu d'isolement non-sélectif.

- **Composition**

extrait de viande	1,0g
extrait de levure	2.5g
peptone	5,0g
chlorure de sodium	5,0g
Agar	15,0g
pH	7,0

- **Préparation**

Mettre 28g de poudre en suspension dans un litre d'eau purifiée, bien mélanger.

Chauffer sous agitation et laisser bouillir pendant 1 minute.

Stériliser à l'autoclave à 118 °C pendant 15 minutes.

3. **Gélose Mueller-Hinton :** C'est un milieu destiné à la réalisation d'antibiogramme par diffusion.

- **Composition :**

Formule théorique en g/l d'eau purifiée :

Peptones de viande « Bovin » 2g	2g
Peptones de caséine « Bovin » 17.5g	17.5g
Fécule de pomme de terre « amidon » 1.5g	1.5g
Ion Ca++	45 à 75mg/l
Ion Mg++	20 à 35mg/l
Agar 17g	17g

- **Principe :** Sa faible teneur en thymine –thymidine « élément inhibiteur de l'activité des sulfamides » diminue les phénomènes de repousse autour des disques et permet une meilleure détermination des diamètres d'inhibitions.
- **Preparation :**

Mettre 38g de poudre en suspension dans un litre d'eau purifiée, bien mélanger.

Chauffer sous agitation et laisser bouillir pendant 1 minute.

Autoclaver à118 °C pendant 15 minutes.

4. Gélose Sabouraud-Base : C'est un milieu recommandé pour l'isolement des champignons à partir des prélèvements cliniques.

- **Composition :**

Formule théorique en g/l d'eau purifiée

Peptones de viande « Bovin »	3g
Peptones de caséine « Bovin »	3g
Peptones de Soja 3g	3g
Extrait de levure 2g	1g
Extrait de malt 1g	1g
Glucose 19g	19g
Phosphate mono- potassique 0.5g	0.5g
Phosphate disodique 0.5g	0.5g
Agar 13 g	13g

- **Principe** : La présence des peptones et du glucose favorise le développement des souches fongique.
- **Préparation :**

Mettre 65g de poudre en suspension dans un litre d'eau purifiée bien mélangé.

Chauffer sous agitation et laisser bouillir pendant 1 minute.

Autoclaver à 118 °C pendant 15 minutes.

5. Gélose Sabouraud-Chloramphénicol : C'est un milieu sélectif recommandé pour l'isolement des levures e champignons filamenteux à partir de prélèvement poly –microbien.

- **Composition :**

Formule théorique en g/l d'eau purifiée

Peptones de viande « Bovin »	3g
Peptones de caséine « Bovin »	3g
Peptones de Soja	3g
Extrait de levure	2g
Extrait de malt	1g
Glucose	19g
Phosphate mono- potassique	0.5g
Phosphate disodique	0.5g
Chloramphénicol	0.5g
Agar	13g

- **Principe :**

La présence de peptone et de glucose favorise le développement des souches fongique et la sélectivité vis-à- vis des bactéries est assurées par le chloramphénicol.

- **Préparation :**

Mettre de poudre en suspension dans un litre d'eau purifiée bien mélangé.

Chauffer sous agitation et laisser bouillir pendant 1 minute.

Autoclaver à 118 °C pendant 15 min

Annexe 4 : Valeurs des densités optiques de l'inoculum bactérien préparé à 625nm

Souches bactériennes testées	Gram +	Gram -		
	Staphylococcus aureus	Escherichia coli	Proteus mirabilus	Pseudomonas aeruginosa.
Densité optique à 625nm	0.095	0.098	0.095	0.088

Annexe 5 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

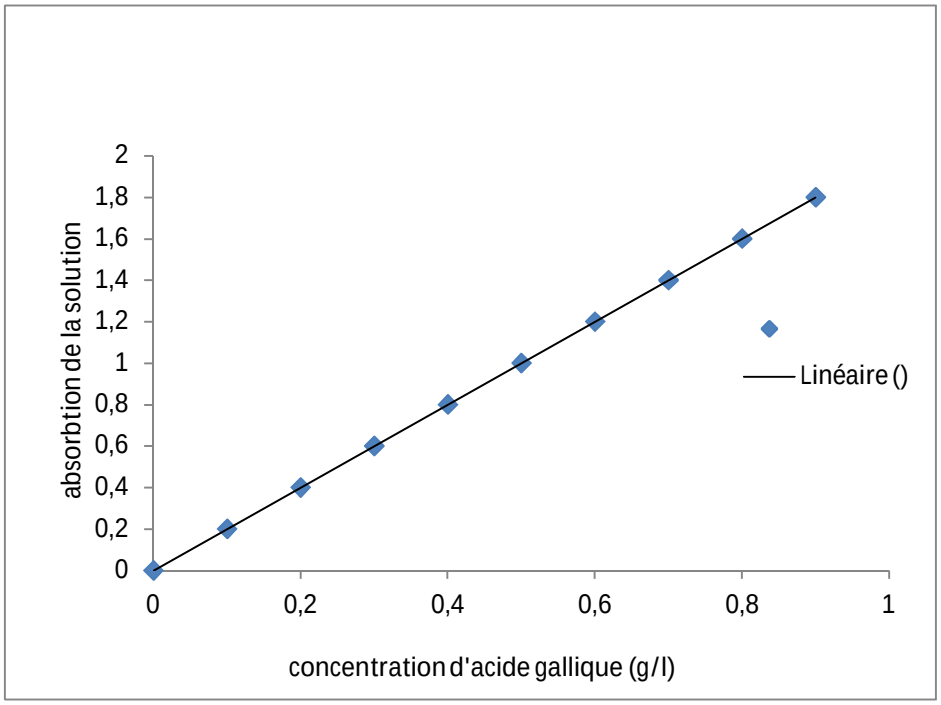

Figure : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Annexe 6 : Valeurs de l'absorbance des différents extraits

Extraits	Ethanolique		Méthanolique		aqueux		frais	
	Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges	Feuilles	Tiges
Absorbance à 765nm	01.80	02.00	01.10	01.62	00.93	01.42	00.83	01.62