

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

UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU  
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE



## MEMOIRE

*De fin d'études*

*En vue de l'obtention du diplôme de master académique*

*Filière : biologie*

*Spécialité : biotechnologie microbienne*

**Thème**

**Activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de  
deux plantes : *Pulicaria odora* et *Smilax aspera* de la région  
de Tizi-Ouzou**

**Travail réalisé par :**

M<sup>elle</sup> : CHERIFI LYNDA

M<sup>elle</sup> : HAMI ALICIA

**Devant le jury :**

**PRESIDENT:** M<sup>elle</sup> BEN AHMED DJILALI A.

Maitre de conférences A à l'UMMTO.

**PROMOTEUR :** M<sup>r</sup> OUELHADJ A.

Maitre de conférences A à l'UMMTO.

**EXAMINATEUR:** M<sup>r</sup> YEZID H.

Maitre de conférences B à l'UMMTO.

**EXAMINATEUR:** M<sup>r</sup> MOUALEK I.

Maitre- assistant A à l'UMMTO.

Année universitaire : 2016/2017

## *Remerciements*

*Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Nos vifs remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidés et soutenus en particulier :*

*Notre encadreur: **Monsieur OUELHADJ. A : Maitre de conférences A à l'UMMTO**, son précieux conseil et son aide durant toute la période du travail.*

*Ainsi qu'aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leur propositions.*

***Mademoiselle BEN AHMED DJILALI A. : Maitre de conférences A à l'UMMTO**, pour avoir accepté de présider le jury.*

***Monsieur MOUALEK I. : Maitre-assistant A à l'UMMTO**, pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

***Monsieur YEZID H. : Maitre de conférences B à l'UMMTO**, pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à toutes personnes qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## *Dedicace*

*Je dédis ce modeste travail :*

*A :*

*Ma très chère famille en gratitude spécialement :*

*Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longue années de sacrifices pour m'aider à avancer dans la vie ; MERCI pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi ;*

*Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son soutien, ces sacrifices consentis et ses précieux conseils, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude ;*

*Mon mari qui ma toujours entouré et motivé à sans cesse devenir meilleur ;*

*Mes frères et sœur qui n'ont cessé de m'encourager ;*

*Mes amis et camarade qui m'ont assisté dans ces moments difficiles ;*

*Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude et reconnaissance.*

*Alicia*

## *Dedicace*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Ma tres cheres et douce mere, mon tres cher pere à qui  
m'adresse au ciel les vœux les plus ardents pour la conservation  
de leur santé et de leur vie.*

*Pour mes cheres freres et sœur qui man toujours entouré et  
motivé*

*Pour mes tres chers amis qui n'ou cessé de m'aider*

*Lynda*

# Liste des abréviations

**AG** : Acide gallique.  
**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**AI**: Auto- indicateur  
**AM /AX**: Amoxicilline.  
**ANOVA** : Analyse de la variance.  
**ARN** : Acide ribonucléique.  
**ATB** : Antibiotique.  
**ATCC**: American Type Culture Collection.  
**ATP**: Adénosine triphosphate.  
**BHIB**: Brain Heart Infusion Broth  
**BSTFA** : Bis triméthylsilyl trifluoroacétamide.  
**CMI** : Concentration minimale inhibitrice.  
**CP** : Composés phénoliques.  
**CS** : Colistine.  
**CXT** : Céfotaxime.  
**CZ** : Céfazoline.  
**DMSO**: Dimethyl Sulfoxide  
**DO**: Densité optique.  
**DPPH** : 1.1- diphényl-2-picryl-hydrazyl.  
**EAG** : Equivalent d'acide gallique.  
**EOA** : Espèces oxygénées activées  
**EQ** : Equivalent de quercétine.  
**ERO** : Espèces réactives de l'oxygène.  
**FOX**: Céfoxitine.  
**GPX** : glutathion peroxydase.  
**I** : Imipineme.  
**IC 50** : Concentration inhibitrice 50.  
**IPP** : Inhibiteur des Pompes de Protons.  
**MH**: Muller-Hinton.  
**mm** : Millimètre  
**MS**: Matière sèche.  
**N** : Neomycine.

# Liste des abréviations

**nm** : Nanomètre

**OMS** : Organisation Mondiale de Santé

**OX** : Oxacilline.

**P** : Benzylpénicilline.

**PPT** : Polyphénols totaux.

**QQ**: Quorum quenching

**QS**: Quorum sensing.

**RA**: Rifampicine.

**RSA**: Radical Scavenger Activity.

**SOD**: Superoxyde dismutase.

**SXT**: Trimethoprim /Sulfamethoxazole.

**SPME** : Microextraction en phase solide

**UV** : Ultra-violet.

# Liste des tableaux

TABLEAU I : LES PRINCIPALES CLASSES DE COMPOSES PHENOLIQUES (HARBONE,1989 ; MANCHEIX ET AL.,2005 ; CROZIER ET AL.,2006). .....	4
TABLEAU II: PRINCIPAUX ACIDES HYDROXYBENZOÏQUES (SARNI-MANCHADO ET CHEYNIER, 2006). .....	6
TABLEAU III : PRINCIPAUX ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES (SARNI-MANCHADO ET CHEYNIER, 2006).....	6
TABLEAU IV : PRINCIPAUX TYPES DE COUMARINES (MACHIEIX ET AL., 2005). .....	7
TABLEAU V : PRINCIPALES CLASSES DES FLAVONOÏDES (NARAYANA ET AL, 2001; W-ERDMAN ET AL., 2007). .....	12
TABLEAU VI : LES PRINCIPALES SOURCES ALIMENTAIRES DES POLYPHENOLS. ....	14
TABLEAU VII : LES PRINCIPAUX MECANISMES DE LA RESISTANCE ET LEURS CONSEQUENCES (CARLE, 2009).....	19
TABLEAU VIII : L'ENSEMBLE DES RADICAUX LIBRES ET LES DERIVES REACTIFS NON RADICALAIRES. ....	26
TABLEAU IX : LES DIFFERENTS FLAVONOÏDES DE LA SURFACE ET LA VACUOLE DES FEUILLES ET L'INFLORESCENCE CHEZ PULICARIA ODORA (WILLIAMS ET AL., 2003). .....	32
TABLEAU X : SOLVANTS ET REACTIFS UTILISES. ....	38
TABLEAU XI : LES SOUCHES MICROBIENNES UTILISEES.....	40
TABLEAUX XII : LES MILIEUX DE CULTURE UTILISES. ....	41
TABLEAU XIII: LES ANTIBIOTIQUES ET L'ANTIFONGIQUE UTILISES. ....	42
TABLEAU XIV : LISTE DES APPAREILLES UTILISES .....	43
TABLEAU XV: RENDEMENT, ASPECT ET COULEUR DES TROIS EXTRAITS DES FEUILLES SECHES ET FRAICHES.....	55
TABLEAU XVI : TENEURS EN POLYPHENOLS TOTAUX DE L'EXTRAIT AQUEUX EXPRIMEES EN MG EAG/G .....	59
MS (N=3) .....	59
TABLEAU XVII: TENEURS EN POLYPHENOLS TOTAUX DES DIFFERENTS EXTRAITS EXPRIMEES EN MG EAG/G .....	61
MS (N=3) .....	61
TABLEAU XVIII : LES TENEURS EN FLAVONOÏDES DES EXTRAITS (AQUEUX ET ETHANOLIQUE) DES DEUX PLANTES EN MG EQ/ G MS. ..	64
TABLEAU XIX : LE POUVOIR REDUCTEUR EN POURCENTAGE (%) DES DIFFERENTS EXTRAITS (N=2). ....	66
TABLEAU XX: LES DIFFERENTES CONCENTRATIONS INHIBITRICES (IC 50) DES EXTRAITS ET DE L'ACIDE ASCORBIQUE.....	67
TABLEAU XXI : LE POURCENTAGE DE PIEGEAGE DU RADICAL LIBRE DPPH (RSA %) PAR L'ACIDE ASCORBIQUE ET LES EXTRAITS AQUEUX DES DEUX PLANTES PULICARIA ODORA ET SMILAX ASPERA. ....	68
TABLEAU XXIII : LES CONCENTRATIONS EFFICACES POUR REDUIRE 50% DE DPPH PAR L'ACIDE ASCORBIQUE ET LES EXTRAITS AQUEUX DE PULICARIA ODORA ET SMILAX ASPERA. ....	69
TABLEAU XXIV : CARACTERES MORPHOLOGIQUES DES SOUCHES BACTERIENNES ETUDIES. ....	71
TABLEAU XXV : DIAMETRES DES ZONES D'INHIBITION DES TEMOINS POSITIFS.....	75
TABLEAU XXVI : LES DIAMETRES DES ZONES D'INHIBITION EN MM OBTENUE SUR LES DIFFERENTES SOUCHES PAR L'EXTRAIT AQUEUX DE PULICARIA ODORA.....	81
TABLEAU XXVII : DIAMETRES DES ZONES D'INHIBITION EN MM SUR LES SOUCHES TESTES DE L'EXTRAIT AQUEUX DE SMILAX ASPERA. .	88
TABLEAU XXVIII : LES DIFFERENTS DIAMETRES DES ZONES D'INHIBITION DES EXTRAITS AQUEUX DES DEUX PLANTES PULICARIA ODORA ET SMILAX ASPERA EN MM SUR LES SOUCHES TESTEES. ....	90
TABLEAU XXIX : LES CARACTERES MACROSCOPIQUE ET MICROSCOPIQUE D'ASPERGILLUS NIGER. ....	92
TABLEAU XXX : RESULTATS DU TEST ANTIFONGIQUE DES DEUX SOUCHES FONGIQUES TESTE. ....	94
TABLEAU XXXI : RECAPITULATIF DE LA SENSIBILITE DES SOUCHES FONGIQUES TESTEES VIS-A-VIS DES EXTRAITS (AQUEUX ET ETHANOLIQUE) DES DEUX PLANTES (PULICARIA ODORA ET SMILAX ASPERA). ....	97

# LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : STRUCTURE CHIMIQUES DE RESVERATROL(TAPIERO <i>ET AL.</i> , 2002). .....	8
FIGURE 2 : STRUCTURE CHIMIQUE DES FLAVONOÏDES (ISOREZ, 2007). .....	9
FIGURE 4: STRATEGIES ET LES CIBLES BACTERIENNES UTILISEES POUR LUTTER CONTRE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES(LEMAOUI ET AL, 2017).....	24
FIGURE 6 : IMAGE DE LA PLANTE <i>PULICARIA ODORA</i> . .....	30
FIGURE 7 : IMAGE DE LA PLANTE <i>SMILAX ASPERA</i> .....	33
FIGURE 8: <i>PULICARIA ODORA</i> .....	36
FIGURE 9 : <i>SMILAX ASPERA</i> . .....	37
FIGURE 10: SCHEMA DU PROTOCOLE D'EXTRACTION DES POLYPHENOLS (MAHMOUDI <i>ET AL.</i> , 2013). .....	45
FIGURE 11: STRUCTURE CHIMIQUE DU RADICAL LIBRE DPPH (POPOVICI <i>ET AL.</i> , 2009). .....	49
FIGURE 12 : HISTOGRAMME DU RENDEMENT EN PPT POUR LES DEUX PLANTES.....	56
FIGURE 13 : COURBE D'ETALONNAGE A L'ACIDE GALLIQUE. ....	58
FIGURE 15 : COURBE D'ETALONNAGE A L'ACIDE GALLIQUE. ....	60
FIGURE 17 : COURBE D'ETALONNAGE A LA QUERCETINE.....	63
FIGURE 19 : LE POUVOIR REDUCTEUR DE L'ACIDE ASCORBIQUE ET DES EXTRAITS.....	66
FIGURE 21 : HISTOGRAMME DU POURCENTAGE DE PIEGEAGE DU RADICAL LIBRE DPPH PAR L'ACIDE ASCORBIQUE ET L'EXTRAIT AQUEUX DES DEUX PLANTES <i>PULICARIA ODORA</i> ET <i>SMILAX ASPERA</i> . .....	69
FIGURE 22 : REPRESENTATION DES TEMOINS NEGATIFS DES DIFFERENTES SOUCHES BACTERIENNES TESTEES.....	72
FIGURE 23 : SENSIBILITES DES SOUCHES BACTERIENNES TESTEES VIS-A-VIS DES ANTIBIOTIQUES UTILISES.....	74
FIGURE 24 : PHOTOS DES TESTS DE SENSIBILITES DES SOUCHES BACTERIENNES VIS-A-VIS DE L'EXTRAIT AQUEUX DE <i>PULICARIA ODORA</i> A UNE CONCENTRATION DE 500µG/ML.....	77
FIGURE 25 : PHOTOS DES TESTS DE SENSIBILITES DES SOUCHES BACTERIENNES VIS-A-VIS DE L'EXTRAIT AQUEUX DE <i>PULICARIA ODORA</i> A UNE CONCENTRATION DE 1000µG/ML.....	78
FIGURE 26 : PHOTOS DES TESTS DE SENSIBILITES DES SOUCHES BACTERIENNES VIS-A-VIS DE L'EXTRAIT AQUEUX DE <i>PULICARIA ODORA</i> A UNE CONCENTRATION DE 1500µG/ML.....	79
FIGURE 27 : PHOTOS DES TESTS DE SENSIBILITES DES SOUCHES BACTERIENNES VIS-A-VIS DE L'EXTRAIT AQUEUX DE <i>PULICARIA ODORA</i> A UNE CONCENTRATION DE 10000µG/ML.....	80
FIGURE 28 : PHOTOS DES TESTS DE SENSIBILITES DES SOUCHES BACTERIENNES VIS-A-VIS DE L'EXTRAIT AQUEUX DE <i>SMILAX ASPERA</i> A UNE CONCENTRATION DE 500µG/ML.....	84
FIGURE 29 : PHOTOS DES TESTS DE SENSIBILITES DES SOUCHES BACTERIENNES VIS-A-VIS DE L'EXTRAIT AQUEUX DE <i>SMILAX ASPERA</i> A UNE CONCENTRATION DE 1000µG/ML.....	85
FIGURE 30 : PHOTOS DES TESTS DE SENSIBILITES DES SOUCHES BACTERIENNES VIS-A-VIS DE L'EXTRAIT AQUEUX DE <i>SMILAX ASPERA</i> A UNE CONCENTRATION DE 1500µG/ML.....	86
FIGURE 31 : PHOTOS DES TESTS DE SENSIBILITES DES SOUCHES BACTERIENNES VIS-A-VIS DE L'EXTRAIT AQUEUX DE <i>SMILAX ASPERA</i> A UNE CONCENTRATION DE 10000µG/ML.....	87
FIGURE 32 : PHOTOGRAPHIE DES TEMOINS NEGATIFS DES SOUCHES FONGIQUES REALISE AVEC DU DMSO. ....	93
FIGURE 33 : PHOTOGRAPHIE DES TEMOINS NEGATIFS DES SOUCHES FONGIQUES REALISE AVEC DU DMSO ET LE METHANOL.....	93
FIGURE 34 : PHOTOGRAPHIES DES TEMOINS POSITIFS DES SOUCHES FONGIQUES TESTEES REALISE AVEC L'ANTIFONGIQUE <b>AMPHOTERICINE B FUNGIZONE®</b> . ....	94
FIGURE 35 : PHOTOS DES TESTS DE SENSIBILITES DES SOUCHES FONGIQUES VIS-A-VIS DE L'EXTRAIT AQUEUX DE <i>PULICARIA ODORA</i> A UNE CONCENTRATION DE 10000µG/ML.....	95
FIGURE 36 : PHOTOS DES TESTS DE SENSIBILITES DES SOUCHES FONGIQUES VIS-A-VIS DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE <i>PULICARIA ODORA</i> A UNE CONCENTRATION DE 10000µG/ML. ....	95
FIGURE 37: PHOTOS DES TESTS DE SENSIBILITES DES SOUCHES FONGIQUES VIS-A-VIS DE L'EXTRAIT AQUEUX DE <i>SMILAX ASPERA</i> A UNE CONCENTRATION DE 10000µG/ML. ....	96
FIGURE 38 : PHOTOS LES TESTS DE SENSIBILITES DES SOUCHES FONGIQUES VIS-A-VIS DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE <i>SMILAX ASPERA</i> A UNE CONCENTRATION DE 10000µG/ML.....	96



# Table des matiere

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>18</b>
<b>PREMIÈRE PARTIE</b> .....	<b>2</b>
<b>SYNTHÈSE</b> .....	<b>2</b>
<b>BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>2</b>
CHAPITRE I : LES COMPOSES PHENOLIQUES .....	3
<i>I. les composés phénoliques</i> .....	2
I.1. Généralités .....	2
I.2. Classification des composées phénoliques : .....	3
I.2.1. Les formes les plus simples .....	4
I.2.1.1. Les acides phénoliques .....	5
I.2.1.1.1. Acides hydroxybenzoïques .....	5
I.2.1.1.2. Acides hydroxycinnamiques .....	6
I.2.1.2. Structure : .....	9
I.2.2. Les polyphénols condensés .....	13
I.2.2.1. Les tannins .....	13
I.2.2.1.1. Les tannins hydrolysables .....	13
I.2.2.1.2. Les tanins condensés .....	13
I.2.2.2. La lignine .....	13
I.3. Les sources alimentaires des polyphénols .....	13
I.4. Biosynthèses des polyphénols .....	15
I.5. Extractions des polyphénols .....	15
I.5.1. Extraction des polyphénols sur la base de leur polarité .....	15
I.5.2. Extraction des polyphénols sur la base de leur acidité .....	16
I.5.3. Extraction des polyphénols sur la base de leur volatilité .....	16
I.5.4. Extraction des polyphénols sur la base de leur taille .....	16
I.5.5. Autres méthodes d'extraction .....	16
CHAPITRE II : LA RESISTANCE MICROBIENNE .....	17
<i>II. La résistance microbienne</i> .....	17
II.1. Définition .....	17
II.1.1. La résistance microbienne naturelle .....	17
II.1.2. La résistance microbienne acquise .....	17
II.2. Mécanismes d'échappement des microorganismes à l'action des antibiotiques .....	18
II.3. Les mécanismes de résistance .....	18
II.3.1. La résistance par modification enzymatique .....	20
II.3.2. Phénomène d'imperméabilité .....	20
II.3.3. Phénomène d'efflux .....	21
II.3.4. Défaut d'affinité .....	21
II.4. La résistance antifongique .....	22
II.5. la résistance aux antiviraux .....	23
II.6. Moyens de lutte contre l'antibiorésistance .....	23
CHAPITRE III : LE STRESS OXYDATIF .....	25
<i>III. Le stress oxydatif</i> .....	25
III.1. les espèces réactives de l'oxygène (ERO) .....	25
III.2. Les effets des espèces réactives de l'oxygène .....	26
III.3. les antioxydants .....	27
III.3.1. les antioxydants endogènes .....	27
III.3.1.1. Les antioxydants enzymatiques .....	27
III.3.1.2. Les antioxydants non enzymatiques .....	28
III.3.2. Les antioxydants exogènes .....	28
III.3.2.1. La vitamine E .....	28
III.3.2.2. La vitamine C .....	28
III.3.2.3. Les polyphénols .....	29
III.3.2.4. Le zinc .....	29

CHAPITRE IV : LES PLANTES UTILISEES .....	30
IV. LES plantes utilisées .....	30
IV.1. Pulicaria odora .....	30
IV.1.1. Classification et appellation .....	30
IV.1.2. Description .....	31
IV.1.2.1. Caractères biologiques et diagnostique.....	31
IV.1.2.2. Distribution géographique.....	31
IV.1.3. Composition et utilisation .....	31
IV.2. Smilax aspera .....	33
IV.2.1. Classification et appellation .....	33
IV.2.2. Description .....	34
IV.2.2. Distribution géographique .....	35
IV.2.3. Compostions et utilisation.....	35
<b>DEUXIEME PARTIE : .....</b>	<b>30</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>30</b>
CHAPITRE V : MATERIELS ET METHODES .....	31
V. Matériel et méthodes .....	36
V.1. Matériel.....	36
V.1.1. Matériel végétal .....	36
V.1.1.1. Pulicaria odora.....	36
V.1.1.2. Smilax aspera.....	37
V.1.2. Matériels du laboratoire.....	38
V.1.3. Souches microbiennes testées .....	39
V.1.3.1. Souches bactériennes.....	39
V.1.3.2. Souches fongiques.....	39
V.1.4. Les milieux de culture utilisés.....	40
V.1.5. Antibiotiques et antifongique utilisés.....	41
V.1.6. Emulsifiant utilisé .....	42
V.1.7. Appareillage .....	43
V.2. Méthodes.....	44
V.2.1. Extraction des polyphénols totaux .....	44
V.2.2. Détermination du rendement d'extraction .....	46
V.2.3. Dosage des polyphénols totaux.....	46
V.2.4. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux (FT) .....	47
V.2.5. Activité antioxydante.....	47
V.2.5.1. Test du pouvoir antioxydant par réduction du fer (FRAP).....	48
V.2.5.2. Estimation de l'activité antiradicalaire par la méthode de DPPH.....	48
V.2.7. Activité antimicrobienne .....	50
V.2.7. 1. Activité antibactérienne .....	50
V.2.7.1.1. Tests de confirmation microbiologiques des souches bactérienne .....	50
V.2.7.1.2. Etude de l'activité antibactérienne .....	51
a. Préparation des pré-cultures .....	51
b. Préparation et standardisation de l'inoculum .....	51
c. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur gélose.....	52
d. Lecture des résultats .....	52
V.2.7.2. Etude de l'activité antifongique .....	53
a. La pureté de la souche.....	53
b. Préparation de la suspension fongique .....	53
c. Réalisation de l'activité antifongique .....	53
d. Lecture des résultats .....	54
CHAPITRE VI : RESULTATS ET DISCUSSION .....	55
VI. Résultats et discussion.....	55
VI.1. Rendement d'extraction des polyphénols .....	55
VI.1.2. Analyse statistique .....	57
VI.2. La teneur des polyphénols totaux des différents extraits des deux plantes .....	58
VI.2.2. Analyse statistique .....	62

VI.3. Dosage des flavonoïdes totaux (FT) .....	63
VI.3.2. Analyse statistique .....	65
VI.4. Mise en évidence de l'activité antioxydante .....	65
VI.4.1. La réduction du fer (FRAP) .....	65
VI.4.2. La méthode de piégeage du radical libre DPPH .....	68
VI.5. Activité antimicrobienne.....	70
VI.5.1. Résultats des tests de vérification des souches bactériennes.....	70
VI.5.2. Résultats des témoins réalisés par la méthode de diffusion sur gélose .....	72
VI.5.2.1. Résultats des témoins négatifs réalisés avec le DMSO .....	72
La figure suivante représente les différents témoins négatif réalise avec le DMSO .....	72
VI.5.2.2. Résultats des témoins positifs (antibiogramme) .....	73
VI.5.3. Résultats de l'activité antibactérienne des extraits aqueux des deux plantes ( <i>Pulicaria odora</i> et <i>Smilax aspera</i> ) .....	76
VI.5.3.1. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de <i>Pulicaria odora</i> .....	76
VI.5.3.2. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de <i>Smilax aspera</i> .....	83
VI.5.3. Analyse statistique .....	91
VI.5.4. Activité antifongique des deux extraits aqueux et éthanolique des deux plantes ' <i>Pulicaria odora</i> ' et ' <i>Smilax aspera</i> ' .....	92
VI.5.4.1. Confirmation de la pureté de la souche fongique « <i>Aspergillus niger</i> » .....	92
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>98</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>103</b>
<b>BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>103</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>108</b>

## Résumé

*Pulicaria odora* et *Smilax aspera* sont deux plantes largement utilisées en médecine traditionnelle en Algérie. Ce qui nous a incités à la réalisation de ce présent travail qui porte sur l'étude de la teneur en polyphénols totaux, la teneur en flavonoïdes, les activités antioxydante et antimicrobienne.

Les meilleurs rendements de *Pulicaria odora* sont de  $4,75 \pm 0,61\%$  pour l'extrait acétique des feuilles sèches et  $3 \pm 0,141\%$  pour l'extrait éthanolique des feuilles fraîches. Concernant *Smilax aspera* le meilleur rendement pour les feuilles sèches est donné par l'extraction éthanolique avec une valeur de  $4,75 \pm 0,07\%$ , pour les feuilles fraîches c'est l'extrait aqueux avec une valeur de  $3 \pm 0,49\%$ .

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

Pour *Pulicaria odora* ; la teneur en PPT la plus élevée pour les feuilles sèches et fraîches est enregistré avec l'extrait aqueux qui sont de  $8,13 \pm 0,00$  mg EAG/g MS et  $39,98 \pm 0,115$  mg EAG/g MS respectivement.

Pour *Smilax aspera* ; la teneur en PPT la plus élevée pour les feuilles sèches et fraîches est enregistré avec l'extrait acétique qui sont de  $8,4 \pm 0,013$  mg EAG/g MS et  $10,09 \pm 0,033$  mg EAG/g MS respectivement.

Les flavonoïdes ont été évalués par la méthode utilisant le chlorure d'aluminium  $AlCl_3$ , la meilleure teneur est de  $364,19 \pm 0,0014$  mg EQ/gMS pour l'extrait aqueux des feuilles sèches de *Pulicaria odora* et  $498,33 \pm 0,0049$  mg EQ/gMS pour l'extrait éthanolique des feuilles fraîches.

Au sujet de *Smilax aspera* les valeurs les plus élevées sont enregistré grâce à l'extraction éthanolique pour les feuilles sèches et fraîches, qui sont respectivement de  $383,33 \pm 0,00$  mg EQ/gMS, et  $208,33 \pm 0,0205$  mg EQ/gMS.

L'activité antioxydante a été réalisée par deux méthodes : La méthode de réduction de fer (FRAP) qui a révélé la concentration inhibitrice à 50% la plus basse avec l'extrait aqueux de *Pulicaria odora* avec une valeur de:  $181,01 \mu\text{g/ml}$  contre  $31,91 \mu\text{g/ml}$  pour l'acide ascorbique. Et la méthode utilisant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH.), l'IC<sub>50</sub> la plus basse est enregistré pour l'extrait aqueux de *Pulicaria odora* estimé à  $106,56 \mu\text{g/ml}$  contre  $96,74 \mu\text{g/ml}$  pour l'acide ascorbique.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur huit souches bactériennes et deux souches fongiques. Les résultats indiquent que les extraits aqueux des deux plantes possèdent une activité antibactérienne sur la plus part des souches avec des diamètres plus au moins différents, mais sont inerte vis-à-vis des souches fongique ce qui nous a incité a utilisé l'extrait ethanologique qui a donné une activité au moine sur l'une des souches.

Mots clé : polyphénols, *Pulicaria odora*, *Smilax aspera*, extraction, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

## Abstract

*Pulicariaodora* and *Smilax aspera* are two plants widely used in traditional medicine in Algeria. What prompted us to realization of this present work is studying the total polyphenol content, flavonoid content, antioxidant and antimicrobial activities.

The best yields of *Pulicariaodora* are  $4.75 \pm 0.61\%$  for the acetic acid extract of dry leaves and  $3 \pm 0.141\%$  for the ethanolic extract of the fresh leaves. Concerning *Smilax aspera* the best yield for dry leaves is given by ethanol extraction with a value of  $4.75 \pm 0.07\%$ , for fresh leaves it is the aqueous extract with a value of  $3 \pm 0.49\%$ .

The total polyphenol content was determined using the Folin-Ciocalteu reagent.

For *Pulicariaodora*; the highest PPT content for dried and fresh leaves is recorded with the aqueous extract which are  $8.13 \pm 0.00$  mg EAG / g MS and  $39.98 \pm 0.115$  mg EAG / g MS respectively.

For *Smilax aspera*; the highest PPT content for dry and fresh leaves is recorded with the acetic extract which are  $8.4 \pm 0.013$  mg EAG / g MS and  $10.09 \pm 0.033$  mg EAG / g MS respectively.

Flavonoids were evaluated using the method using  $AlCl_3$  aluminum chlorides, the best content was  $364.19 \pm 0.0014$  mg EQ / gMS for the aqueous extract of the dry leaves of *Pulicariaodora* and  $498.33 \pm 0.0049$  mg EQ / ethanolic extract of fresh leaves.

About *Smilax aspera* the highest values are recorded through ethanol extraction for dry and fresh leaves, which are respectively  $383.33 \pm 0.00$  mg EQ / gMS, and  $208.33 \pm 0.0205$  mg EQ / gMS.

The antioxidant activity was carried out by two methods: The iron reduction method (FRAPE) which revealed the lowest 50% inhibitory concentration with the aqueous extract of *Pulicariaodora* with a value of:  $181.01 \mu\text{g} / \text{ml}$  against  $31.91 \mu\text{g} / \text{ml}$  for ascorbic acid. And the method used for 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), the lowest IC 50 is recorded for the aqueous extract of *Pulicariaodora* estimated at  $106.56 \mu\text{g} / \text{ml}$  against  $96.74 \mu\text{g} / \text{ml}$  for ascorbic acid.

Antimicrobial activity was determined on eight bacterial strains and two fungal strains. The results indicate that the aqueous extracts of the two plants possess antibacterial activity on most of the strains with more or less different diameters but are inert with respect to the

fungual strains which have prompted us to use the ethanol extract which gave activity to the monk on one of the strains.

Key words: polyphenols, *Pulicariaodora*, *Smilax aspera*, extraction, antioxidant activity, antimicrobial activity.



# **Introduction**

De nos jours, les produits naturels sont une source importante pour la recherche de nouveaux composés actifs contre de nombreuses maladies. L'utilisation thérapeutique des plantes fait partie intégrante des traditions de toutes les cultures. La valorisation médicinale de ces pratiques passe notamment par l'isolement et l'identification de nouvelles molécules naturelles bioactives appelées: les métabolites secondaires tels que polyphénols, alcaloïdes, terpènes et les flavonoïdes (ALILOU *et al.*, 2014).

Les polyphénols sont en effet doués de multiples vertus thérapeutiques, ils jouent un rôle très important, principalement, dans la lutte contre les cancers (prévention et traitements), les maladies inflammatoires et cardiovasculaires (HENNEBELLE *et al.*, 2004). Expliquant de ce fait leur grande utilisation dans la fabrication des médicaments.

L'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. Cause pour laquelle de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées, comme substances naturelles avec un potentiel antioxydant élevé on peut noter principalement les polyphénols, qui sont largement répandus dans le règne végétal qui ont une importance croissante.

Cependant, l'évaluation des propriétés phytopharmaceutiques, antioxydante et antimicrobienne des polyphénols demeure une tâche très intéressante et utile, pour cela des recherches scientifiques ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de différentes sources telles les plantes médicinales.

Parmi ces plantes utilisées en médecine traditionnelle pour leurs vertus curatives et leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes on peut citer *Pulicaria odora* et *Smilax aspera* sur les quelle est porté notre présent travaille.

Ces deux plantes constituent un patrimoine local très important qui n'est en grande partie décrit que d'un point de vue botanique, sauf quelques études portant sur les huiles essentielles de *Pulicaria odora* et leur activité antimicrobienne. Or que pour *Smilax aspera* nous avons rencontré peu d'études surtout dans cette aspect.

L'objectif de notre travail vise à démontrer la richesse de nos plantes en polyphénols et à déterminer leurs propriétés biologiques. Pour cela notre étude englobe deux aspects, dont le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction et la quantification des composés phénoliques. Il porte également sur l'évaluation de l'activité antioxydant des polyphénols par la méthode de réduction de fer (FRAP) ainsi que le test anti-radicalaire vis-à-vis du radical libre DPPH. Le second aspect est consacré à un test antibactérien afin de déterminer l'efficacité de ces polyphénols après extraction contre différentes souches microbienne (bactérienne et fongique) pouvant être pathogènes pour l'homme.



**PREMIÈRE**  
**PARTIE**  
**SYNTHÈSE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

*Chapitre I : les  
composés phénoliques*





## I. les composés phénoliques

### I.1. Généralités

Les composés phénoliques (CP), sont des molécules du métabolisme secondaire spécifiques du règne végétal, produits à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides et acides nucléiques). Ces groupement chimique sont une vaste classe de substances organique cyclique très varié, qui ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzénique portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (MACHEIX *et al.*, 2005).

On connaît actuellement plusieurs milliers de composé phénolique, un nombre qui augmente sans cesse et qui en fait un groupement chimique particulièrement importants (MANCHEIX *et al.*, 2005). Ce nombre peut aller jusque a 10000 molécules qui ont été isolée et identifiée : cette ensemble est caractérisé par un élément structural fondamental qui est la présence d'aumoins un noyau phénolique à 6 carbones, auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (MACHEIX *et al.*, 2005).

Les composés phénolique représente de 2 à 10% de la matière organique des plantes et intervienne activement dans différents processus biologique : photosynthèse, respiration, croissance ainsi que la résistance aux maladies infectieuse (MACHEIX *et al.*, 2005). En effets la désignation de secondaire apparait aujourd'hui de plus en plus discutable à la lumière des résultats obtenus au cours des vingt dernières années, reflétant le rôle des composés phénolique dans différents aspects de la vie de la plante et dans l'utilisation que fait l'homme des végétaux.

Les composés phénoliques peuvent en effet intervenir :

- dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, croissance, interaction moléculaire avec certains microorganismes...)
- dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relation avec les bactéries, les champignons, insectes, résistance aux UV)
- dans les critères de qualité (couleurs, astringence, amertume, qualité, nutritionnelles)
- dans les variations de certain caractéristique des végétaux lors des traitements technologique ex : préparation des jus de fruits.

- Dans la protection de l'Homme vis-à-vis de certaines maladies en raison de leur interactions possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés anti-oxydantes (MANCHEIX *et al.*, 2005).

## **I.2. Classification des composés phénoliques :**

À vrai dire il n'existe aucune classification universelle des composés phénoliques, MOTILVA *et al.* (2013), cependant de nombreux auteurs ont proposé des classifications propres à eux. Par exemple, CROZIER *et al.* (2010), ont séparé ces composés en deux catégories : les flavonoïdes et les non flavonoïdes. MANACH *et al.* (2004), distinguent six sous-classes de flavonoïdes.

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes, qui se différencient (MANCHEIX *et al.*, 2005) :

- par le squelette de base, allant d'un simple C<sub>6</sub> à des formes très polymérisées ;
- par le degré de modification de ce squelette ; degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation... ;
- Enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules ; glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques... (MANCHEIX *et al.*, 2006).

Ces espèces peuvent être des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 (HARBONE, 1990 ; CROZIER *et al.*, 2006).

Tableau I: Les principales classes de composés phénoliques (HARBONE,1989 ; MANCHEIX et al.,2005 ; CROZIER et al.,2006).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C6	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses classes
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -Hydroxybenzoïque	Epices, Fraïse
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques  Coumarines	Acides caféïque, férulique  Scopolétine, esculétine	Pomme de terre, pomme  Citrus
C6-C4	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C6-C2-C6	Stilbénes	Resvératrol	Vigne
C6-C3-C6	Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Flavonols</li> <li>▪ Anthocyanes</li> <li>▪ Flavanols</li> <li>▪ Flavanones</li> </ul> Isoflavonoïdes	Kaempférol, quercétine  Cyanidine, pélargonidine  Catéchine, épicatechine  Naringénine  Daidzéine	Fruits, légumes, fleurs  Fleurs, fruits rouges  Pomme, raisin  Citrus  Soja, pois
(C6-C3) <sub>2</sub>	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C6-C3) <sub>n</sub>	Lignines		Bois, noyaux des fruits
(C15) <sub>n</sub>	Tannins		Raisin rouge, kaki

Les composés phénoliques peuvent être divisés en deux catégories :

- les composés phénoliques simples.
- les composés phénoliques complexes

### I.2.1. Les formes les plus simples

Les formes phénoliques les plus simples présente des structures chimiques allant du simple phénol en C6 (non présent naturellement chez les végétaux) aux flavonoïdes en C15 et a des molécules proches (HABAUZIT et HORCAJADA., 2008).

### **I.2.1.1. Les acides phénoliques**

Deux principales classes d'acides phénoliques peuvent être distinguées ; les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique (LAFAY et GIL-IZQUIERDO.,2008).

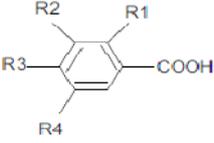
On peut signaler que les végétaux comestibles contiennent généralement de très faible concentration de l'acide hydroxybenzoïque. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine par contre on note une présence assez remarquable des acides hydroxycinnamiques (MACHEIX *et al.*, 2006).

#### **I.2.1.1.1. Acides hydroxybenzoïques**

Ils sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure de base de type (C6-C1), existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides et peuvent également être intégrés dans un nombre de structures complexes comme certains tanins (GRESELE *et al.*,2011).

Ces acides sont très communs aussi bien sous forme libre que sous forme combinée. On les retrouve à des quantités abondantes dans les végétaux et les aliments, notamment les épices, les fraises, certains fruits rouges et l'oignon dans lesquels les concentrations peuvent atteindre plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de fruits frais (MACHEIX *et al.*, 2005).

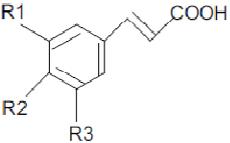
Tableau II: Principaux acides hydroxybenzoïques (SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006).

Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

### I.2.1.1.2. Acides hydroxycinnamiques

Il représente une classe très importante dont la structure de base et de type (C6-C3) dérivant de celle de l'acide cinnamique. Ces composés ont une distribution très large. Rarement libres mais souvent sous forme combinée avec des molécules organiques, ils peuvent être estérifiés ou même amidifiés ou combinés avec des sucres (O-acylglucosides, Oarylglucosides) ou des polyols tels que l'acide quinique (COLLIN *et al.*, 2011). Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules, les principaux acides hydroxycinnamiques sont représenté dans le tableau III

Tableau III : Principaux acides hydroxycinnamiques (SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006).

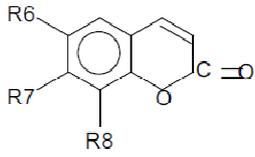
Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

➤ Parmi les dérivés des acide hydroxycinnamique on a :

**a) Les coumarines**

Les coumarines ont une structure de base (C6-C3), ce sont des dérivant des acides hydroxycinnamique par cyclisation interne de la chaîne latérale et certains forme complexe (BENDINI *et al.*, 2007). Elles sont Présentes dans de nombreux végétaux, et sont produites en grande quantité en réponse à une attaque biotique ou abiotique et semblent constituer a un moyen de défense de type phytoalexique. Ces composés sont connus pour leurs propriétés anti-coagulantes (COLLIN *et al.*, 2011).

Tableau IV : Principaux types de coumarines (MACHIEIX *et al.*, 2005).

Structure	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH3	OH	H	Scopolétole
	OCH3	OH	OH	Fraxétole
	H	OH	OH	Daphnétole

**b) Les stilbènes**

Ils dérivent aussi des acides hydroxycinnamiques, leur structure chimique de base est composée de deux cycles aromatiques joints par un pont méthylène. Ces derniers sont produit par les plantes en réponse à des attaques bactériennes, fongiques (comme le mildiou) ou virales (BRUNETON, 2009). Selon TAPIERO *et al.* (2002), les stilbènes ne sont pas répondu dans les plantes comestibles, à l’exception de resvératrol qui est présent dans le vin et connu par ses propriétés anticancérogènes, la figure suivante présente la structure chimique de resvératrol.

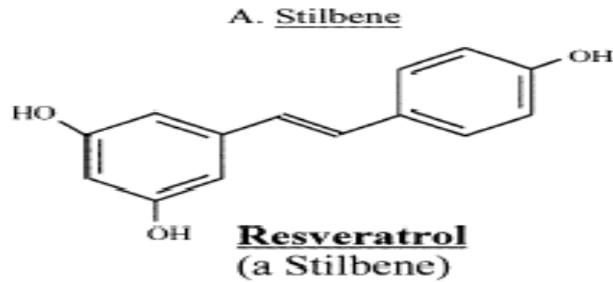


Figure 1 : Structure chimiques de resvératrol (TAPIERO *et al.*, 2002).

### c) L'acide caféique

C'est un dérivé des acides hydroxycinnamique, qui a une répartition quasi-universelle chez les végétaux. Il est souvent présent sous forme d'acide chlorogénique (ester 5-caféoylquinique) ce qui est le cas dans le café et la pomme. On le retrouve aussi sous forme d'acide caféoyltartrique (= acide caftarique) dans le raisin, d'acide caféoylshikimique dans la datte...etc. (BENDINI *et al.*, 2007).

#### I.2.1.2. Les flavonoïdes

##### I.2.1.2.1. Généralités:

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange (PIQUEMAL, 2008), cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus=jaune). (KARAALI *et al.*, 2004; MALESEV et KUNTIC, 2007).

Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique E.CHERVREUL en 1814, mais ont été réellement découverts qu'en 1930 par ALBERT SZENT-GYIÖRGYUI, désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes (NIJVELDT *et al.*, 2001).

Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french Paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise

importante de graisses saturées (GHEDIRA, 2005; MALESEV et KUNTIC, 2007). Près de 4000 flavonoïdes ont été décrits (MEDIC-ŠARIC *et al.*, 2004).

### I.2.1.2.2. Structure :

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) liés par une chaîne de 3 carbones (C3) en formant ainsi l'hétérocycle oxygéné (C) (W-ERDMAN *et al.*, 2007 ; YAO *et al.*, 2010).

Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6 (EMERENCIANO *et al.*, 2007), la structure de base commune à ce groupe de polyphénols est de type diphenylpropane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule (NARAYANA, 2001; MALESEV et KUNTIC, 2007) et Le chaînon propyle C3 peut être complété par une fonction éther formant ainsi un cycle central, appelé cycle C (ISOREZ, 2007), la structure des flavonoïdes est présentée dans la figure 2.

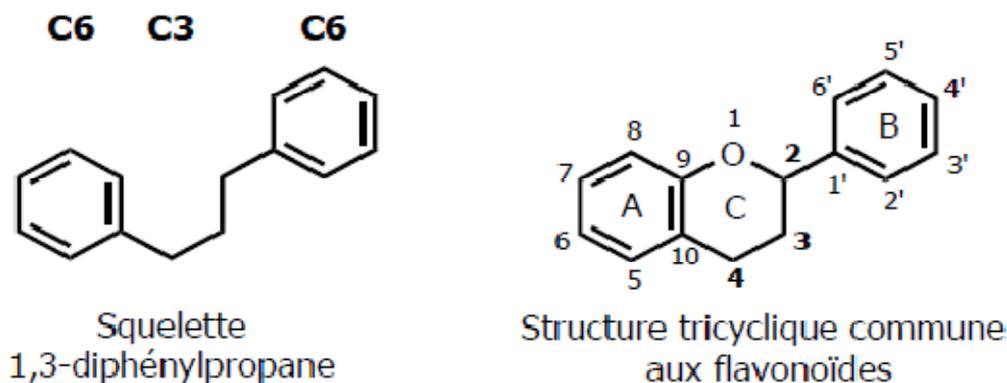


Figure 2 : Structure chimique des flavonoïdes (ISOREZ, 2007).

Les flavonoïdes sont les composés les plus représentatifs des composés phénoliques, ils comprennent à eux seuls plus de 6000 molécules regroupées en sous-classe (RIBEREAU-GAYON, 1968 ; ANDERSEN et MARKHAM, 2006 ; MACHEIX *et al.*, 2006). Les flavonoïdes sont retrouvés dans une grande variété d'aliments (fruits et légumes, céréales, jus de fruits, thé et vin...) ainsi intervenant dans la pigmentation des fleurs et exercent aussi un

rôle de défense contre les attaques microbiennes et protège aussi des rayonnements UV (BRUNETON, 2009 ; COLLIN *et al.*, 2011).

Les flavonoïdes sont subdivisés en sous-classe selon les variations autour du squelette de base qui se résume en trois points :

- Le niveau de méthylation (groupements O-CH<sub>3</sub> à la place des fonctions phénoliques ;
- Le degré d'hydroxylation des différents cycles ;
- Le niveau de glycosylation, les flavonoïdes des végétaux sont liés à des sucres. Généralement l'ose est lié à la molécule phénolique par une liaison glycosidique C-O-C, ou de type C-C beaucoup plus résistante (BENDINI *et al.*, 2007).

Par ce on distingue différentes classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavones, isoflavones, flavonols, les anthocyanines /anthocyanidines ainsi que les composés minoritaires tels que les chalcones et dihydrochalcones (HAVSTEEN, 2002 ; BEECHER, 2003 ; MACHEIX *et al.*, 2006 ; CROZIER *et al.*, 2009).

#### ❖ Flavonols

Ce sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal à l'exception des champignons et des algues. Les flavonols se caractérisent par un hétérocycle oxygéné relativement oxydé (présence d'une double liaison (C2-C3) et d'un groupement hydroxyle (OH) en position C3. Ce composé principalement de kaempférol, d'isorhamnétine, myricétine et de quercétine. Ils sont fréquemment sous forme de glycosides, avec une molécule de glucose ou de Rhamnose (CROZIER *et al.*, 2009).

#### ❖ Flavones

Les flavones sont moins répandus dans le règne végétal principalement chez les fruits et légumes que les flavonols. Les flavones présentent une double liaison (C2-C3) et le noyau aromatique B est fixé sur le carbone 2, ils sont généralement présents sous forme de 7-O-glycosides.

### ❖ Les flavanones

Les flavanones sont une classe caractéristique des agrumes. Caractérisés par la saturation de l'hétérocycle C, ils sont le plus souvent glycosilés par un disaccharide en C7, et subdivisé en deux familles : les rutinosides (6-O-&L-rhamnosyl-D-glucosides) et les néohespéridosides (2-O-&L-rhamnosyl-D-glucosides) (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007).

### ❖ Les isoflavones

Les isoflavones sont retrouvés dans les légumineuses et plus particulièrement dans les Fabacées, leur source principale dans l'alimentation humaine est le soja et ces produits dérivés. Ce qui différencie les isoflavones des flavones est la fixation d'un noyau benzénique au carbone 3 de l'hétérocycle. Les isoflavones sont fortement similaires au œstrogènes ce qui leur confère des propriétés pseudo-hormonales, et ils sont également nommés phyto-œstrogènes (CASSIDY *et al.*, 2000).

### ❖ Les chalcones et dihydrochalcones

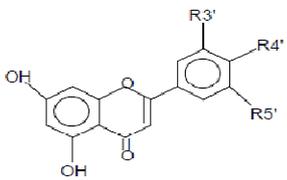
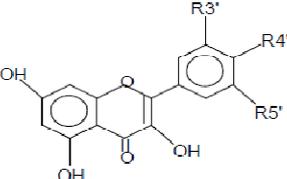
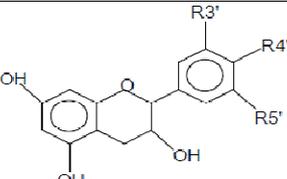
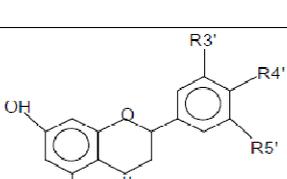
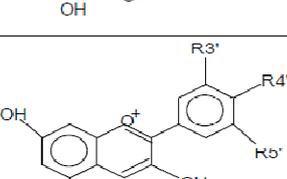
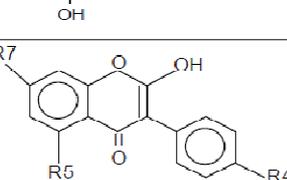
Les chalcones sont des flavonoïdes avec une structure ouverte, ils dérivent des flavanones par isomérisation réversible en milieu alcalin, ce qui engendre l'ouverture de l'hétérocycle C, ainsi que la formation d'une double liaison en position C2-C3, cette situation est renversée en milieu acide et provoque la transformation des chalcones en flavanones, ce qui explique leur faible présence dans l'alimentation humaine (TOMAS-BARBERAN et CLIFFORD, 2000).

Les dihydrochalcones dérivent des chalcones par réduction de la double liaison en position C2-C3 (COLLIN *et al.*, 2011).

### ❖ Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments naturels colorés que l'on retrouve dans les plantes vasculaires. Ils sont dissous dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs (tulipe, rose, orchidée) et des fruits (pomme, baies, raisin) auxquelles ils procurent les différentes colorations (orange, rose, rouge, violet et bleu) (MAZZA et MINIATI, 1993). Ils constituent le groupe le plus soluble dans l'eau et cette aptitude à se solubiliser facilement dans les milieux aqueux offre des possibilités très larges dans le domaine industriel.

Tableau V : Principales classes des flavonoïdes (NARAYANA *et al*, 2001; W-ERDMAN *et al.*, 2007).

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myricétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidezine

## **I.2.2. Les polyphénols condensés**

### **I.2.2.1. Les tannins**

Utiliser depuis l'antiquité par l'homme pour le traitement des peaux d'animaux. Les tannins ont une importance économique et écologique considérable et sont responsable de l'astringence de nombreux fruits et légumes et les produit dérivé (vin, thé, bière...)(MACHEIX *et al.*, 2005).

Les tannins sont des polymères phénoliques de poids moléculaire de 500 g/mol à 3000 g/mol, ils se trouvent presque dans toutes les parties de la plantes (feuilles, fruits et racines) et son divisé en deux groupes les tanins hydrolysables et tanins condensés (COWAN, 1999).

#### **I.2.2.1.1. Les tannins hydrolysables**

L'hydrolyse chimique ou enzymatique des tannins hydrolysables entraines la libération d'une partie phénolique qui est présenté par l'acide gallique dans le cas des gallotanins ou un dimère de ce même acide dans le cas d'ellagique, en plus l'hydrolyse libère une autre partie nom phénolique qui est souvent soit du glucose ou de la quinine (SARNI-MANCHAD et CHEYNIER, 2006).

#### **I.2.2.1.2. Les tanins condensés**

Les tanins condensés sont des oligomères ou des polymères de flavones 3-ols dérivé de la catéchine ou de ses nombreux isomères (SARNI-MANCHAD et CHEYNIER, 2006). Contrairement aux tanins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse et sauf des attaques chimiques fortes permettent leurs dégradation (MACHEIX *et al.*, 2005).

### **I.2.2.2. La lignine**

La lignine présente une biomasse considérable produite annuellement après la cellulose. Elle a un caractère hydrophobe marqué et s'accumule au niveau des parois cellulaires du bois ou du sclérenchyme. La lignine résulte de la polymérisation de trois molécules phénoliques les monolignols (alcools coumarylique), férulique et sinapique (MACHEIX *et al.*, 2005).

## **I.3. Les sources alimentaires des polyphénols**

Les polyphénols sont les micronutriments les plus abondantes dans notre alimentation (MANACH *et al.* 2004). Les polyphénols existent de façon intarissable dans les fruits, légumes, céréales, olives, chocolat et boisson comme thé, café et vin (D'ARCHIVIO *et al.* , 2007 ). Le tableau ci-dessus résume les principales sources alimentaires des polyphénols

Tableau VI : Les principales sources alimentaires des polyphénols.

Les composés phénoliques	Sources alimentaire	Référencés bibliographiques
Acide hydrox benzoïque	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Thé noir, vin rouge.</li> <li>- Les mûres, framboise et les fraises ;</li> <li>- Les oignons ;</li> <li>- Les olives.</li> </ul>	(MANACH <i>et al.</i> , 2004) (D'ARCHIVIO <i>et al.</i> , 2007) (TRESSERA-RIMBAU <i>et al.</i> ,2013)
Acide hydroxycinnamique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cidre</li> <li>- Vin rouge</li> <li>- Café</li> <li>- Les olives</li> <li>- Artichaut et pomme de terre.</li> </ul>	(MANACH <i>et al.</i> , 2004) (D'ARCHIVIO <i>et al.</i> , 2007)  (TRESSERA-RIMBAU <i>et al.</i> , 2013)
Anthocyanines	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Jus d'orange, vin rouge ET jus de raisin rouge ;</li> <li>- Aubergine, rhubarbe et prune.</li> </ul>	(MANACH <i>et al.</i> , 2004) (D'ARCHIVIO <i>et al.</i> , 2007)
Flavonols	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chou rouge, oignon jaune, chou frisé, poireaux, épinard, tomate cerise et brocoli ;</li> <li>- Les mûres, abricot et pomme ;</li> <li>- Vin rouge et infusion de thé noir et vert ;</li> </ul>	(MANACH <i>et al.</i> , 2004) (SCALBERT <i>et WILLASON.</i> ,2000) (TRESSERA-RIMBAU <i>et al.</i> , 2013)
Flanones	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vin rouge ;</li> <li>- Orange ;</li> <li>- Persil et céleri.</li> </ul>	(MANACH <i>et al.</i> , 2004) (TRESSERA-RIMBAU <i>etal.</i> , 2013)
Flavanones	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Jus d'orange, jus de citron et jus de pamplemousses ;</li> <li>- Tomate.</li> </ul>	(MANACH <i>et a l.</i> , 2004) (TRESSERA-RIMBAU <i>et al.</i> , 2013)
Isoflacones	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Farine de soja soja</li> <li>- Tofu et tempeh ;</li> <li>- Bière.</li> </ul>	(MANACH <i>et al.</i> , 2004) (TRESSERA-RIMBAU <i>etal.</i> , 2013)

#### **I.4. Biosynthèses des polyphénols**

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires issus par deux voies de synthèse : la voie de l'acide shikimique et la voie d'acétate (BRUNETON., 2009).

- La voie de l'acide shikimique : cette voie permet la formation des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine) à partir des oses. La désamination de ces acides aminés conduit à la formation de l'acide cinnamique, molécule non encore phénolique mais qui est directement à l'origine de la séquence biosynthétique dénommée voie des phénylpropanoïdes, qui permet la formation des acides hydroxycinnamiques (MACHEIX *et al.*, 2005).
- La voie d'acétate : cette voie permet la formation des poly-  $\beta$ -cétoesters de longueur variable donc polyacétate qui engendrant à leur tour par cyclisation, des composés polycycliques (BRUNETON., 2009).

#### **I.5. Extractions des polyphénols**

L'extraction des composés phénoliques à partir de la matière végétale peut être influencée par la nature chimique de ces composés, la méthode d'extraction, le temps et les conditions de stockage, la taille des particules d'échantillon et la présence des substances interférentes (NACZK et SHAHIDI., 2004).

L'extraction des polyphénols peut exploiter quatre propriétés des composés phénoliques qui sont : la polarité, l'acidité, la volatilité et la taille (COLLIN et CROUZET., 2011).

##### **I.5.1. Extraction des polyphénols sur la base de leur polarité**

D'après CALLEMIEN et COLLIN (2010) la catéchine et la quercétine sont solubles dans l'eau et insolubles dans le diéther, alors que les stilbènes et les prénylchalcones sont solubles dans les deux milieux. Le solvant diéther peut être utilisé pour délipider les matrices contenant des flavonoïdes ou flavonols, tandis que pour étudier le xanthohumol ou le resvératrol est nécessaire d'utiliser le cyclohexane. (COLLIN et CROUZET., 2011).

Le CO<sub>2</sub> supercritique est une alternative intéressante pour éliminer les composés hydrophobes sans perdre de polyphénols (CALLEMIEN et COLLIN., 2010).

### **I.5.2. Extraction des polyphénols sur la base de leur acidité**

Les polyphénols présentent un  $pK_a$  proche de 10 ce qui favorise leurs solubilités dans l'eau et même dans les solvants organiques et ça selon le pH (CALLEMIEN et COLLIN., 2010). Ceci peut être très intéressant lorsque l'on veut séparer les phénols d'intérêt d'autres molécules de même polarité (COLLIN et CROUZET., 2011).

### **I.5.3. Extraction des polyphénols sur la base de leur volatilité**

Les arômes appartenant à la famille des phénols volatils peuvent être extraits d'une matrice complexe par distillation sous vide (COLLIN et CROUZET., 2011).

Les flavonoïdes, les stilbènes et les chalcones ne sont par contre pas assez volatils pour être extraits de cette manière. Toutefois, ils peuvent le devenir après dérivation. Ainsi, le resvératrol a été analysé par SPME (microextraction en phase solide) après dérivation au BSTFA (bis (triméthylsilyl) trifluoroacétamide) (JERKOVIC., 2008).

### **I.5.4. Extraction des polyphénols sur la base de leur taille**

Diverses méthodes ont été développées pour étudier les polyphénols de plus grandes tailles. La dialyse peut être exploitée pour séparer les gros oligomères de proanthocyanidines de plus petits analogues. La chromatographie d'exclusion ou perméation sur gel permet un fractionnement selon le poids moléculaire (COLLIN et CROUZET, 2011).

### **I.5.5. Autres méthodes d'extraction**

La température d'extraction est également un paramètre à optimiser (25-60 °C), une température de 60°C permet ainsi d'accroître le rendement des stilbènes (CALLEMIEN *et al.*, 2005 ; PINELO *et al.*, 2006).

Selon PINELO *et al.*, (2006), des enzymes attaquant les polysaccharides permettent parfois d'améliorer le taux d'extraction des polyphénols.

*Chapitre II : la  
résistance  
microbienne*

## **II.La résistance microbienne**

D'après GAUDY et BUXERAUD (2005), les antibiotiques sont utilisées de façon intensive ce qu'a entraîné le monde bactérien a développé des stratégies de résistances vis-à-vis des antibiotiques.

### **II.1. Définition**

Selon l'organisation mondiale de santé (OMS) l'antibiorésistance est : la résistance d'un micro-organisme à un antibiotique (ATB) auquel il était jusque-là sensible. Elle résulte de l'aptitude des bactéries à supporter l'attaque de médicaments antimicrobiens tels que les antibiotiques. Cette résistance apparaît lorsque le micro-organisme mute ou acquiert un gène de résistance (VINCEN et LE BÂCLE, 2015).

Il existe deux types d'antibiorésistance : naturelle et acquise.

#### **II.1.1.La résistance microbienne naturelle**

La résistance naturelle d'une bactérie à un antibiotique est innée cela veut dire que cette bactérie est naturellement résistante à cette antibiotique il s'agit d'une caractéristique propre à une espèce bactérienne, qui est partagé par toutes les souches normale de cette espèce: comme par exemple *Achromobaterxylooxidans* est naturellement résistante à de nombreux antibiotiques tel que les aminosides et la plus part des céphalosporines (GAUDY et BUXERAUD (2005) ; BRIAND, 2009 ;BADOR, 2013 ; VINCEN et LE BÂCLE, 2015).

Cette résistance a pour support génétique le chromosome bactérien donc elle est transmissible à la descendance c.-à-d. la résistance naturelle est transmissible de génération en génération mais elle n'est pas ou peu transmissible d'une bactérie à une autre au sein d'une même espèce ou au sein d'espèces différentes (mode de transmission horizontale).

#### **II.1.2.La résistance microbienne acquise**

C'est une caractéristique de certaines souches au sein de l'espèce où les bactéries peuvent développer de la résistance à un antibiotique au quelle elle est préalablement sensible, cette résistance résulte d'une modification génétique soit par mutation spontané ou acquisition d'un matériel génétique étranger comme par exemple le plasmide (élément génétique mobile) (GAUDY et BUXERAUD (2005) ; CARLE (2009) ; VINCEN et LE BÂCLE, 2015).

La résistance acquise est favorisée par la prise massive des antibiotiques par l'Homme ou par l'animal, certes les ATB ne sont pas considérés en tant qu'agents mutagènes mais ils

exercent une pression de sélection c.-à-d. l'exposition à un antimicrobien favorise la survie des souches bactériennes résistantes présentes dans une population et lorsque les bactéries résistantes sont rejetées dans l'environnement elles se retrouvent en contact avec d'autres bactéries c'est ainsi que cette résistance sera transmise (mode de transmission horizontale) (CARLE, 2009 ; VINCENT et LE BÂCLE, 2015).

## **II.2. Mécanismes d'échappement des microorganismes à l'action des antibiotiques**

Selon BRIAND (2009), les bactéries présentent des mécanismes selon lesquels elles échappent aux ATB qui sont :

- La Tolérance : peut se traduire par un échec thérapeutique. Elle survient chez les Gram positive avec les antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi. La CMI est basse alors que la CMB est très élevée donc la bactérie ne peut pas être éliminée par un traitement normal.
- La persistance : elle apparaît au cours d'un traitement par les bêta-lactamines où certaines bactéries de départ après 24 Heures de traitement persistent tandis que les autres sont éliminées, les bactéries persistantes sont inactives métaboliquement ne permettant pas l'action des bêta-lactamines nécessitant des bactéries en pleine croissance.
- La dépendance : il s'agit d'un cas extrême où la bactérie ne peut se développer qu'en présence de l'ATB.

## **II.3. Les mécanismes de résistance**

Il existe quatre mécanismes principaux par lesquels les micro-organismes développent de la résistance : l'inactivation enzymatique de l'antibiotique, la modification ou le remplacement de la cible de l'antimicrobien, l'efflux actif ou encore la pénétration réduite de la molécule. En plus de ces mécanismes il y a aussi d'autres mécanismes qui ne sont pas répertoriés et sont associés à certaines classes de composés (CARLE, 2009 ; MUYLAERT et MAINIL, 2012). Les différents modèles du mécanisme de résistance peuvent être résumés dans la figure 3. Le tableau ci-dessous montre les principaux mécanismes de la résistance et leurs conséquences (CARLE, 2009).

Tableau VII : Les principaux mécanismes de la résistance et leurs conséquences (CARLE, 2009).

Mécanisme de résistance	Conséquence
Inhibition enzymatique	Production d'une enzyme qui inactive ou détruit l'antibiotique ; mécanisme de résistance le plus répandu.
Réduction de la perméabilité cellulaire	Changements de perméabilité de la paroi ou de la membrane bactérienne empêchant le médicament d'atteindre sa cible.
Altération des sites de liaison ciblés par l'antibiotique	Baisse de l'affinité de l'antibiotique pour son site d'action.
Pompes à efflux	Antibiotique éjecté de la cellule par transport actif et site d'action devenant inaccessible.

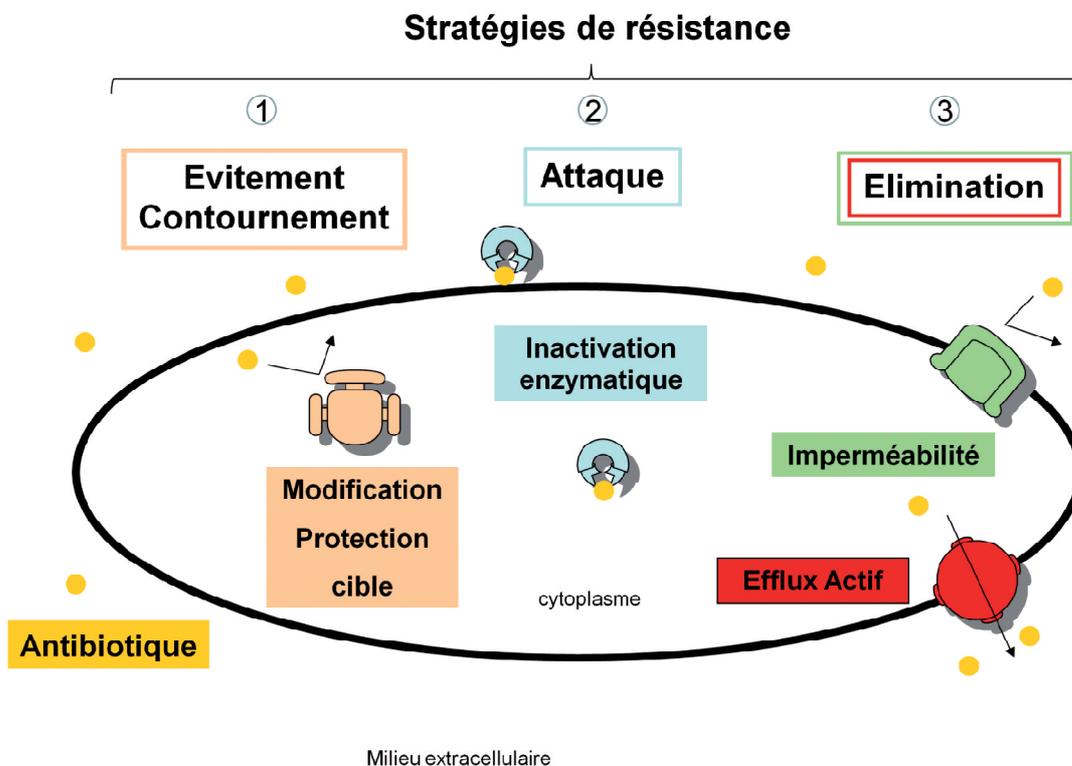


Figure 3: Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie Gram négative (AIRES, 2011).

### **II.3.1. La résistance par modification enzymatique**

Ce mécanisme est le plus important que ce soit quantitativement ou qualitativement pour de nombreuses classes d'antibiotiques et pratiquement pour toutes les espèces bactériennes. Cette résistance consiste à ce que la bactérie synthétise des enzymes qui rend l'antibiotique inactif, donc il ne peut pas agir sur sa cible ; ces enzymes sont soit naturelle tel que les bêta-lactamase qui sont utilisé contre les bêta-lactamines, des enzymes qui inactivent les aminosides...etc. Ou acquis chez certaines bactéries qui ont obtenus cette propriété par acquisition du matériel génétique par l'intermédiaire d'un plasmide donc résistance plasmidique ; comme par exemple les pénicillinases chez les staphylocoques, les enzymes inactivatrices des aminosides qui sont fréquemment rencontrés chez les entérobactéries. En plus de cette résistance il existe un autre mode d'acquisition d'une résistance qui s'agit d'une mutation dans les gènes gouvernant la synthèse de la céphalosporinase, qui sera synthétisé à un niveau plus élevé qui provoque l'inhibition d'un grand nombre de molécules de  $\beta$  lactamines(GAUDY et BUXERAUD, 2005).

Les différentes actions appliquées par ces enzymes pour conférer de la résistance aux bactéries sont : l'hydrolyse, l'acétylation, la phosphorylation, la nucléotidylation, l'estérification, la réduction et les réactions d'addition d'un glutathion (MUYLAERT et MAINIL, 2012).

### **II.3.2. Phénomène d'imperméabilité**

Chez les bactéries Gram négatif un autre mécanisme de résistance est rencontré qui est une réelle imperméabilité ou une réduction de perméabilité. Contrairement aux bactéries Gram positif les bactéries Gram négatif possède une membrane externe où se trouvent des porines, ces dernières permettent le passage de certains antibiotiques et leurs absences ou la réduction de leurs nombre empêche la pénétration del'antibiotiques donc ce dernier n'arrive pas à atteindre sa cible (BRIAND, 2009 ; MUYLAERT et MAINIL, 2012).

Les bactéries anaérobies et les bactéries aéro-anaérobies facultatifs (entérocoques et les streptocoques) possèdent une résistance vis-à-vis d'une classe d'antibiotiques les aminoglycosides, cette résistance est expliqué par le faite que la pénétration de composés de cette famille nécessite un transport dépendant d'un métabolisme aérobie (MUYLAERT et MAINIL, 2012).

### II.3.3. Phénomène d'efflux

La non accumulation de substances à l'intérieur de la bactérie est due à la présence d'un phénomène d'efflux actif ou une excrétion. Ce phénomène est médié par des protéines transmembranaires connues sous le nom d'une pompe à efflux ou transporteur actif, cet efflux nécessite de l'énergie pour s'effectuer (GAUDY et BUXERAUD, 2005 ; AIRES 2011 ; MUYLAERT et MAINIL, 2012).

Ce mécanisme consiste à expulsé les composés toxiques étrangers, tels que les antibiotiques de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule bactérienne, ce phénomène entraîne la réduction de la concentration de l'antibiotique dans le cytoplasme de la bactérie ce qui prévient et limité l'accès de l'antibiotique à sa cible (MUYLAERT et MAINIL, 2012).

La classification de ces pompes s'effectue selon deux caractères qui sont : la spécificité aux substrats et la source d'énergie utilisée. Selon la spécificité il existe deux types de transporteurs : les transporteurs SDR (specific-drug-resistance) qui sont spécifique à certaines molécules, et confèrent de hauts niveaux de résistance, qui est acquise par acquisition des éléments mobiles. Ce mécanisme confère une résistance à la tétracycline chez les bactéries Gram négatif. Et les transporteurs MDR (multiple-drug-resistance) qui agissent sur une multitude de molécules, et les gènes codant pour ces pompes sont des gènes chromosomiques. Selon la source d'énergie on distingue deux groupe: les transporteurs ABC (ATP-binding cassette) utilisant l'hydrolyse de l'ATP et plutôt spécifiques de certains composés, et les transporteurs secondaires exploitant le gradient électrochimique transmembranaire de protons et d'ions sodium : des SMR (Small Multidrug Resistance), MFS (Major Facilitator Superfamily), RND (Resistance/Nodulation/cell Division), MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) qui certes pour expulser la molécule à l'extérieur de la cellule et responsables de résistances multiples aux antibiotiques (AIRES, 2011 ; MUYLAERT et MAINIL, 2012).

### II.3.4. Défaut d'affinité

Ce phénomène peut être présenté sous deux formes :

- Une résistance naturelle avec une mauvaise affinité de certains ATB pour les cibles ; ce phénomène est observé chez les bactéries Gram positif et les anaérobies stricte où l'aztréonam présente peu d'affinité pour les PLP de ces bactérie cité précédemment.

- Une résistance acquise avec modification des cibles et ainsi perte d'affinité des ATB pour ces cibles, dans ce type de résistance la cible de l'antibiotique peut être structurellement modifiée ou remplacée ce qui engendre que le composé antimicrobien ne puisse plus se lier et exercer son action au niveau de la bactérie. Ce mécanisme est responsable d'un grand nombre de résistances acquises, cette dernière peut être due à l'acquisition de matériel génétique mobile qui code pour une enzyme qui est capable de modifier la cible de l'antibiotique, ou peut résulter d'une mutation au niveau de la séquence nucléotidique de la cible (MUYLAERT et MAINIL, 2012). Les staphylocoques ont acquis un gène qui leur confère une résistance vis-à-vis des bêta-lactamines, ce gène code pour une nouvelle PLP : la PLP 2a ou PLP 2' qui possédant une mauvaise affinité pour les bêta-lactamines.

#### **II.4. La résistance antifongique**

Il existe sept à huit antifongiques disponibles qui sont réparties en quatre familles : les pyrimidines fluorées, les polyènes, les azolés et les lipopeptides. Le mode d'action de chaque famille est différent de l'autre comme par exemple les pyrimidines agissent sur l'ADN et la synthèse des protéines, les polyènes agissent en se fixant sur l'ergostérol, les azolés inhibent la synthèse de l'ergostérol et les lipopeptides inhibent la synthèse du glucane pariétal (ACCOCEBERRY et NOEL 2006 ; DANNAOUI 2013).

La résistance naturelle aux antifongiques est souvent rencontrée chez l'espèce *Candida krusei*, cette résistance est due à l'absence de la concentration de l'antifongique dans la cellule ou à une faible affinité de l'antifongique pour sa cible (GUILLOT et DANNOUI, 2015).

La résistance acquise par les souches fongiques vis-à-vis l'amphotéricine B qui est un polyène, ce dernier a comme cible l'ergostérol où il se fixe pour former des pores ce qui permet aux électrolytes de traverser la membrane cytoplasmique de façon incontrôlée en provoquant la mort du champignon. La résistance à l'amphotéricine B repose sur deux étapes : blocage de la voie de la biosynthèse de l'ergostérol et une deuxième étape qui consiste à remplacer l'ergostérol dans la membrane par d'autre stérol viable, en effet cette résistance est due à une mutation au niveau du gène qui code pour la biosynthèse de l'ergostérol (ACCOCEBERRY et NOEL, 2006).

## II.5. la résistance aux antiviraux

Les antiviraux cibles généralement le mécanisme de réplication viral (IRWIN *et al.*, 2016). La résistance des virus vis-à-vis des antiviraux est due fréquemment à une mutation au niveau du gène de la polymérase virale, cette résistance est acquise suite à l'utilisation des antiviraux de façon intensive soit en prévention ou en traitement prolongé. Cette résistance entraîne un échappement virale qui se caractérise en première temps par une augmentation de la charge virale puis suivie par la reprise de la progression de la maladie (BOIVIN, 2006 ; FOURNIER et ZOULIM, 2006).

## II.6. Moyens de lutte contre l'antibiorésistance

D'après LEMAOUÏ *et al* (2017), la résistance microbienne devient un problème majeur et l'OMS a qualifié la résistance microbienne par « un problème de santé publique et une menace grave qui touche le monde entier ». Pour lutter contre ce problème différents moyens sont suivis et parmi eux on cite :

- Amélioration des anciennes molécules utilisées comme étant des antibiotiques après modification chimique de la structure de ces molécules comme par exemple la céfzoprane qui a subi des modifications chimiques afin d'avoir une nouvelle molécule plus efficace qui est la ceftaroline développer en 2008 qui appartient à la famille des bêta-lactamines.
- Association des antibiotiques de la famille des bêta-lactamines avec des inhibiteurs des bêta-lactamase afin de lutter contre la résistance causée par cette enzyme, parmi ces inhibiteurs on a : L'acide clavulanique, lesulbactame et l'avibactam.
- L'association avec le sel de bismuth : *Helicobacter pylori* est une bactérie qui arrive à survivre dans l'estomac, à se multiplier et à coloniser la muqueuse gastrique. Le seul traitement qui existe actuellement contre cette bactérie est basé sur l'association d'un inhibiteur des pompes de protons (IPP) avec la clarithromycine et l'amoxicilline (AM). Pour éradiquer et réduire la résistance primaire et démunir le risque de la résistance secondaire chez cette bactérie on associe l'IPP avec les deux antibiotiques puisque cette bactérie peut développer de la résistance à chaque antibiotique utilisé pour son traitement.
- Utilisation des peptides antimicrobienne PAMs : ces molécules sont synthétisées par les différents organismes, de la bactérie à l'homme en passant par les végétaux. Ces molécules ont un spectre large d'activité et un effet bactéricide en plus de ces propriétés anti-inflammatoire et immunomodulatrices. Les PAMs cationique agit soit

par insertion dans la membrane plasmique ce qui provoque la perméabilisation puis une lyse cellulaire alors que certains parmi eux arrivent à traverser la membrane et cibler des molécules anioniques telles que les acides nucléiques ou des enzymes, interférant ainsi avec les processus biologiques de la cellule.

- Utilisation de la stratégie quorum quenching (QQ) qui consiste à bloquer le système de la communication des bactéries (quorum sensing QS) soit par l'utilisation des molécules inhibitrices de QS ou utilisation des enzymes pour dégrader les auto-indicateurs AI, ces derniers sont des molécules médiatrices utilisées pour se signaler entre les bactéries (REMY *et al.*, 2016).

Il existe d'autres moyens de lutter contre l'antibiorésistance qui sont : inhibition du transfert des plasmides, utilisation de l'ATP synthase mycobactérienne, utilisation des ARN interférents, utilisation nanotechnologie et phagothérapie, presque les différentes stratégies développées dans ce travail sont résumées dans la figure suivante :

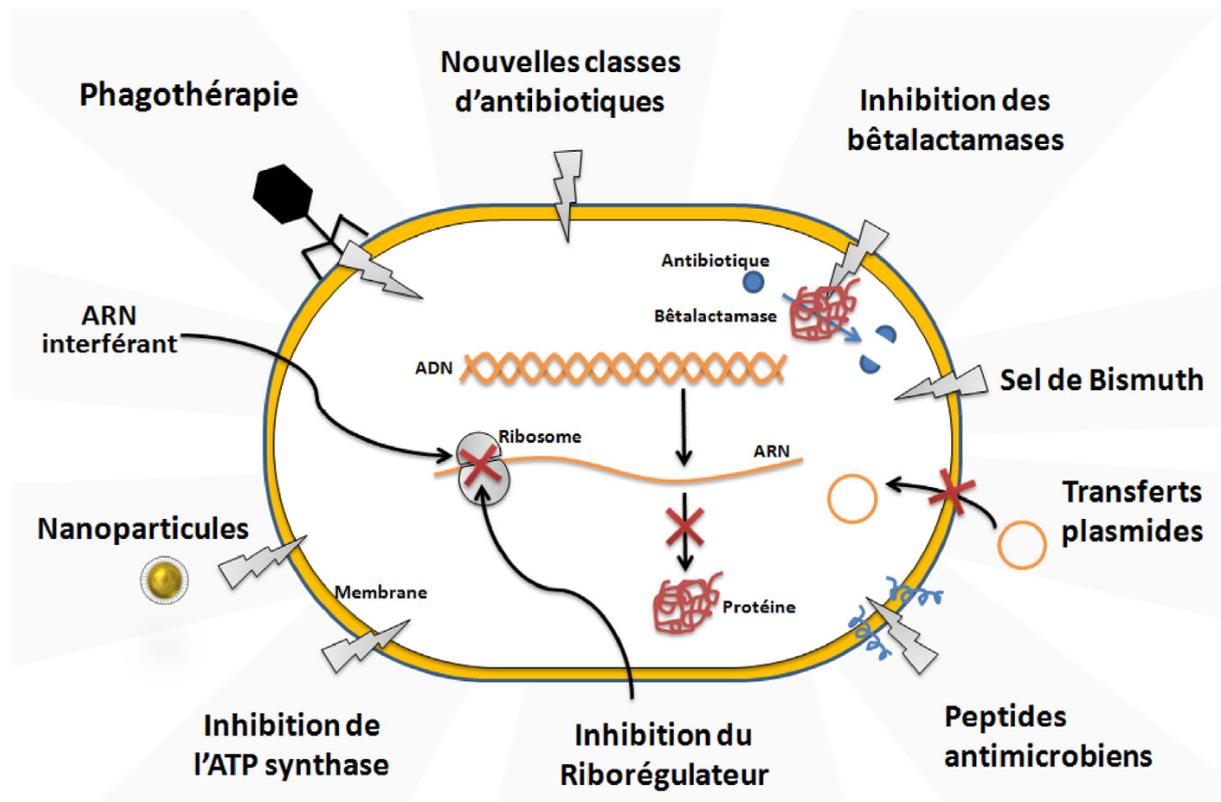


Figure 4: Stratégies et les cibles bactériennes utilisées pour lutter contre la résistance aux antibiotiques (LEMAOUI *et al.*, 2017).

*Chapitre III : le  
stress oxydatif*

### III. Le stress oxydatif

La présence des radicaux libre dans l'organisme de façon naturelle a été découverte il y a moins de 50 ans, les radicaux libres sont produits par différents mécanismes physiologiques de l'organisme de façon permanent et en faible quantité comme des médiateurs ou des résidus des réactions énergétiques ou de défense. La production de ces radicaux libres par l'organisme d'une manière excessive engendre le stress oxydant qui correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées (EOA) et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières (DRÖGUE, 2002 ; FAVIER, 2003 ; HALENG *et al.*, 2007).

#### III.1. les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les organismes aérobies produisent de l'énergie par l'utilisation de la chaîne respiratoire. Dans les conditions physiologique lors de cette production de l'énergie qui est de l'ordre de 36 molécules d'ATP, elle est accompagnée d'environ 0.4 à 4 % d'électrons qui s'échappent et réagissant directement avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme qui génère des EOA (HALENG *et al.*, 2007).

Les espèces réactives de l'oxygène ERO peuvent être produites par la réaction enzymatique de NADPH oxydase ou de cytochrome P450, ou produits par des agents physiques comme les rayonnements, et le mode de vie (tabagisme, alcoolisme, exercices physique intense) influence sur la production des ERO en augmentant leurs concentrations par rapport aux antioxydants (BAROUKI, 2006 ; HALENG *et al.*, 2007).

Le terme espèces réactives de l'oxygène représente l'ensemble des radicaux libres et les dérivés réactifs non radicalaires, et généralement les radicaux libres sont moins stable ce qui leur confère une réactivité plus forte par rapport aux dérivés réactifs non radicalaires. Un radical libre est une molécule chimique qui possède un électron célibataire (non apparié) (GARDES-ALBERT *et al.*, 2003 ; PHAM-HUY *et al.*, 2008)

L'ensemble des radicaux libres et les dérivés réactifs non radicalaires sont indiqués dans le tableau suivant :

Tableau VIII : L'ensemble des radicaux libres et les dérivés réactifs non radicalaires.

Radicaux libres	Dérivé réactifs non radicalaire	Référence bibliographiques
Anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$	Oxygène singulet $O_2$	(FAVIER, 2003)
Radical hydroxyle $OH^{\cdot}$	Peroxyde d'hydrogène $H_2O_2$	(HALENG <i>et al.</i> , 2007)
Monoxyde d'azote $NO^{\cdot}$	Nitroperoxyde $ONOOH$	(PHAM-HUY <i>et al.</i> , 2008)
Dioxyde d'azote $NO_2^{\cdot}$	Ozone $O_3$	
Peroxyde $ROO^{\cdot}$	Acide hypochloreux $HOCl$	
Peroxyde lipidique $LOO^{\cdot}$	Acide nitreux $HNO_2$	

### III.2. Les effets des espèces réactives de l'oxygène

Les ERO présentes deux effets contradictoire, d'une part à des concentrations modérées ils ont des effets bénéfique tels que l'intervention dans le processus de la maturation des structures cellulaire, elles participent aux fonctionnements des signaux cellulaire, à la défense immunitaire contre les agents pathogène, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, d'une autre part où la production des ERO par l'organisme est excessive, ils provoquant des lésions de molécules biologique en citant l'ADN, les protéines, les lipides, les glucides, ces lésion génèrent des mutation au niveau de l'ADN ou perte d'activité dans le cas des enzymes (FAVIER, 2003 ; PHAM-HUY *et al.*, 2008). Les effets des ERO développés dans ce contexte sont résumés par la figure suivante :

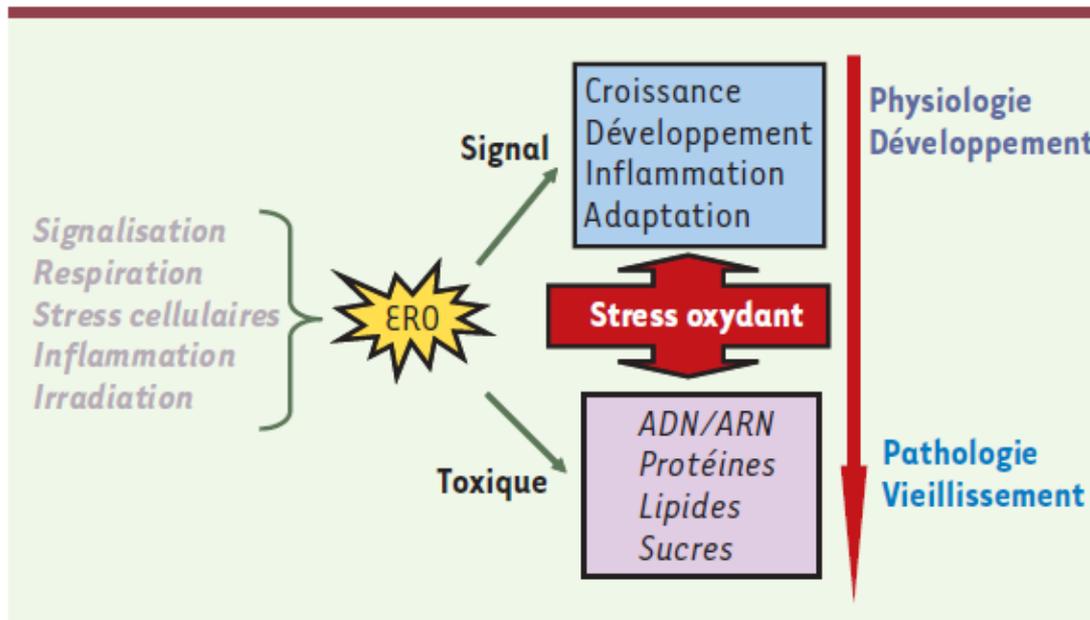


Figure 5 : Schéma des effets des ERO dans l'organisme (MIGDAL et SERRES, 2011).

Le stress oxydant est considéré soit comme étant un facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution de très nombreuses maladies. Le stress oxydant est la source principale de plusieurs maladies : le cancer, la sclérose, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, vieillissement et le diabète (FAVIER, 2003 ; MIGDAL et SERRES, 2011).

### III.3. les antioxydants

Le terme antioxydant désigne toutes molécules capables de stabiliser et désactiver les radicaux libres avant que ces dernières provoquent des dommages au niveau de la cellule. Au niveau de l'organisme il existe deux types d'antioxydants enzymatique et non enzymatique qui travaillent en synergie afin de protéger les cellules des attaques des radicaux libres. Les antioxydants peuvent être endogène ou exogène porté par l'alimentation (RAHMAN, 2007).

#### III.3.1. les antioxydants endogènes

Les antioxydants endogènes regroupent les antioxydants enzymatiques, les protéines et les systèmes de réparation des dommages oxydatifs les endonucléase (HALENG *et al.*, 2007).

##### III.3.1.1. Les antioxydants enzymatiques

Les différents enzymes utilisées par l'organisme pour lutter contre les radicaux libres afin de protégé l'organisme des dommages causé par ces dernières sont : les superoxydesdismutases SOD qui sont des métalloprotéines et représentent les premières lignes

de défense contre le stress oxydant en assurant l'élimination de l'anion super oxyde  $O_2^{\cdot-}$ , la glutathion peroxydase GPx est une sélénoprotéine et son rôle est d'éliminer les peroxydes lipidiques qui résulte de l'activité du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturé, et le système thiorédoxine permet de maintenir les protéines à l'état réduit en utilisant la thiorédoxine (HALENG *et al.*, 2007).

### **III.3.1.2. Les antioxydants non enzymatiques**

Les antioxydants non enzymatiques sont divisés en antioxydants d'origines métabolique et antioxydants exogène. Parmi les antioxydants d'origine métabolique il existe l'acide lipoïque, L-arginine, coenzyme Q10, protéines chélateur aux métaux, acide urique et bilirubine (PHAM-HUY *et al.*, 2008).

### **III.3.2. Les antioxydants exogènes**

En plus des antioxydants endogènes il existe des antioxydants exogènes qui sont des substances portés par l'alimentation, ces antioxydants jouant un rôle dans la lutte contre le stress oxydant. Plusieurs maladies chroniques sont dues à une déficience en ces antioxydants exogènes, parmi eux il y a : vitamine C, vitamine E, acides gras essentiels (oméga 3 et oméga 6), caroténoïdes, polyphénols, flavonoïdes et les oligoéléments (sélénium, manganèse, et zinc) (HALENG *et al.*, 2007 ; PHAM-HUY *et al.*, 2008).

#### **III.3.2.1. La vitamine E**

Le terme vitamine E désigne un ensemble d'isomères, les tocophérols, et les tocotriénols, de point biologique il y a que deux isomères particulièrement intéressants, l' $\alpha$ - et le  $\gamma$ -tocophérol. Leur mode d'action consiste premièrement de s'insérer au niveau de la membrane grâce à leur pouvoir hydrophobe, puis empêcher la propagation de la peroxydation lipidique et ça est réalisé au lieu que les radicaux peroxy ( $ROO^{\bullet}$ ) réagissent avec les acides gras polyinsaturés vont réagir avec les deux isomères l' $\alpha$ - et le  $\gamma$ -tocophérol (PHAM-HUY *et al.*, 2008).

#### **III.3.2.2. La vitamine C**

La vitamine C est synthétisée par la plupart des mammifères alors que l'homme n'arrive pas à la produire, donc il est obligé d'enrichir son régime alimentaire avec des aliments riches en vitamine C. Cette dernière est, avant tout, un excellent piègeur des EOA ( $HO^{\bullet}$  ou  $O_2^{\cdot-}$ ). Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques (PHAM-HUY *et al.*, 2008).

### **III.3.2.3. Les polyphénols**

Les polyphénols peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène (anion superoxyde  $O_2^-$ , radical hydroxyle  $OH^\cdot$ ) pour produire des radicaux phénoxystable. Ils sont considérés comme d'excellent piègeur des EOA et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre (HALENG *et al.*, 2007 ; COLLIN et CROUZET., 2011).

### **III.3.2.4. Le zinc**

Le zinc est un oligoélément qui joue un rôle de cofacteur pour de nombreuses enzymes et intervient dans le métabolisme des nucléotides, la synthèse des prostaglandines et le fonctionnement de l'anhydrase carbonique...ect. Le zinc protège les groupements thiols des protéines et il peut même inhiber la formation d'EOA induit par les métaux de transition comme le fer et le cuivre (HALENG *et al.*, 2007).

*Chapitre IV : Les  
plantes utilisées*

## IV. LES plantes utilisées

### IV.1. *Pulicaria odora*

*Pulicaria odora* (L.) ou *Inula odora*.L appartient à la famille des *Astéracées* ou *composées*.

*Pulicaria odora*, *Inula odorante*, du latin *pulex* : puce (plantes utilisés comme insecticide), *inula* : ancien nom de l'aunée dérivé du grec *inaein* : purger (allusions aux propriétés de certaines espèces) et *odorus* : odorante (RAMEAU *et al.*, 2008). Et la figure suivante représente une prise de vue de la plante *pulicaria odora* :



Figure 6 : Image de la plante *pulicaria odora*.

#### IV.1.1. Classification et appellation

Règne : *Plantae*

Embranchement : *Spermatophyte*

Sous embranchement : *Angiospermes*

Ordre : *Astérales*

Famille : *Astéraceae*

Genre : *Pulicaria*

Espèce : *pulicaria odora* (L.)

*Pulicaria odora* est connue dans la région kabyle par le nom « Silmeksa » (MEDDDOUR *et al.*, 2009) et en Maroc elle est connue par le nom « Ouden El hallouf » (HANABALI *etal.*, 2005).

## **IV.1.2.Description**

### **IV.1.2.1.Caractères biologiques et diagnostique**

D'après RAMEAU et al, (2008)

- *Pulicaria odora* est une plante vivaces de 30-60 cm ; hémicryptophyte ;
- Floraison : juin à aout ; pollinsée par les insectes, dispersés par le vent ;
- Tige souterraine renflée en tubercules et couverte des feuilles écailleuses ;
- Plante velue ou laineuse ;
- Tige dressé, simple ou rameuse dans sa moitié supérieure ;
- Feuilles alternes de forme ovale oblongue, denticulés, les inférieures atténuées en pétiole, persistante à la floraison, les caulinaires embrassantes, mais sans oreillettes saillantes ;
- Grands capitules (15-25 mm) longuement pédonculé, solitaires au sommet de la tige et des rameaux, involucre à bractées velues, linéaire, acuminées ; toutes les fleurs jaunes, celles en languette étalées, dépassant longuement le disque formé par les fleurs en tubes ;
- Akènes blanchâtre, velus, aigrette rousse dotée d'une couronne dentée de 10 à 12 poils 3 fois plus long que l'akène.

### **IV.1.2.2.Distribution géographique**

*Pulicaria odora* est répartie dans la région méditerranéenne comme dans les Alpes Maritimes, le var et la crose ; assez rare dans les bouches-du Rhône (RAMEAU et al., 2008).

Selon NASSIRI et al (2016), *Pulicaria odora* est présente au niveau de la commune rurale d'Aguelmous province de Khénifra, Maroc. Elle est présente aussi à la wilaya de Tizi-Ouzou, Algérie et en Portugal (WILLIAMS et al., 2003 ; MEDDOUR et al., 2009).

### **IV.1.3.Composition et utilisation**

L'étude faite par WILLIAMS et al (2003) sur la composition en flavonoïdes sur la surface et la vacuole des feuilles et l'inflorescence de cinq plantes de genre *Pulicaria* (*P. dysenterica*, *P. odora*, *P. paludosa*, *P. sicula*, *P. vulgaris*) a montré que *P. odora* présente un profil de composition distinct par rapport aux autres.

Les flavonoïdes de surface, la vacuole des feuilles et l'inflorescence identifiée chez *P. odora* sont présents dans tableau suivant :

Tableau IX : Les différents flavonoïdes de la surface et la vacuole des feuilles et l'inflorescence chez *Pulicaria odora* (WILLIAMS *et al.*, 2003).

Les composés		Feuilles	Inflorescence
Surface	6 méthyl éther 6-hydroxykaempferol	-	(+)
	3, 7,4' triméthyl éther 6-hydroxykaempferol	-	++
	3,6, 7 ,4' tetraméthyl éther 6- hydroxykaempferol	+	++
	3, 5, 6, 7, 4' pentaméthyl éther 6- hydroxykaempferol	+	++
	6 méthyl éther quercetagenin	-	(+)
	Pentaméthyl éther quercetagenin (b)	-	(+)
	Quercetin 3-glucuronide	-	(+)
Vacuole	Quercetin 3-glucoside	-	(+)
	Quercetin 7-glucoside	-	+
	Patuletin 7-glucoside	-	++
	6méthyl éther 6-hydroxykaempferol 7-glucoside	-	++

(-) = n'est pas présent ;

(+) = constituant sous forme de trace ;

+ = constituant mineur ;

++ = constituant majeur ;

(b) molécule non complètement identifiée.

D'après HANABALI et al, (2005) l'huile essentielle des racines de *P. odora* est composée de 27 composés dont le thymol (47.83%) et son dérivé thymol isobutyrate (30.05%) sont les principaux constituants.

Selon EZOUBEIRI et al (2005), les principaux constituants de l'huile essentielle de *P. odora* sont : 2 isopropyl 4 méthylphénol et acide isobutyrique 2 isopropyl 4-méthylphénylester, et ces composé sont isolé pour la 1<sup>ère</sup> fois chez le genre *Pulicaria*.

L'utilisation de *P. odora* est différente d'un pays à un autre comme par exemple à Tizi-Ouzou Algérie *P. odora* est utiliser seulement pour les pathologies dermiques (MEDDOUR et al., 2009) alors que en Maroc elle est utilisé pour plusieurs vertus tel que les maux de dos, troubles intestinaux et comme un remède naturel qui s'appelle « Mssakhen » pour les femme après l'accouchement (EZOUBEIRI et al.,2005).

## IV.2.Smilax aspera

*Smilax aspera* est une plante qui appartiens à la famille *Smilacaceae*, elle présente plusieurs synonymes parmi eux *Smilax sarsaparilla* L., *Smilax rotundifolia* L., *Smilaxomata*Hook, *Smilax febifuga*Kunth, *Smilax discolor*Schltld...etc (GHEDIRA et GOETZ, 2016). Et la figure suivante représente la plante *Smilax aspera* :



Figure 7 : Image de la plante *Smilax aspera*.

### IV.2.1.Classification et appellation

Règne : *Plantae*

Superdivision : *Embryophyta*

Division : *Trachéophyta*

Subdivision : *Spermatophytina*

Classe : *Magnoliopsida*

Superordre : *Liliana*

Ordre : *Liliales*

Famille : *Smilacaceae*

Genre : *Smilax L.*

Espèce : *Smilax aspera L.*

Selon GHEDIRA et GOETZ (2016), il y a plusieurs nom vernaculaires sont attribué à *Smilax aspera* :

Nom français : *Salsepareille d'Europe* ;

Nom anglais : *Saraparilla* ;

Nom arabe : فشاع.

#### **IV.2.2.Description**

D'après GHEDIRA et GOETZ (2016), *Smilax aspera* est un sous-arbrisseau pouvant atteindre 1 m de hauteur, vivace, dioïque, glabre, rhizomes tubéreux et tige grêle, sarmenteuse, graines d'épines anguleuses, grimpant. Le feuillage est persistant, alterne, vert foncé, les feuilles sont en forme de cœur et à pétiole muni de deux vrilles, elles sont pourvues de cinq à sept nervures longitudinales.

L'inflorescence est une ombelle sessile disposée en grappe flexueuse, formée de 3 à 12 petites fleurs à l'aisselle des feuilles, les mâles et les femelles sont tubulaires à corolle étoilée et composées de six fins lobes lancéolés, six étamines saillantes à anthères double. La corolle est de couleur blanc-verdâtre ou jaune-verdâtre.

Les pieds femelles portent des grappes de baies globuleuses brillantes, rouge groseille puis grenat foncé comprenant une à trois graines.

### **IV.2.2. Distribution géographique**

Selon RAMEAU et al, (2008), *Smilax aspera* se trouve dans la région méditerranéenne et en Crose. Elle se trouve aussi en Afrique de l'est, Inde, Cachemire, Sirlanka et Yunnan (province du sud-ouest de la Chine) (XU et al., 2011).

### **IV.2.3. Compostions et utilisation**

D'après IVANOVA, (2010) le rhizome de *Smilaxaspera* est composé de six saponines, trans-resveratrol et anthocyanines.

Les baies des *Smilax aspera* présente sont riches en caroténoïdes qui sont responsables de leur couleur rouge (DELGADO-PELAYO et HONERO-MENDEZ, (2012).

L'utilisation de *Smilax aspera* en médecine traditionnelle est due à ces propriétés dépurative, diaphorétique, diurétique, stimulante et tonique. Elle est utilisée pour le traitement de syphilis, rhumatisme et traitement de la ménopause chez les femmes (IVANOVA et al., 2010 ; DELGADO-PELAYO et HONERO-MENDEZ, 2012).

**Deuxième partie :**  
**Partie expérimentale**

*Chapitre V :*  
*Matériels et méthodes*

## V. Matériel et méthodes

La réalisation de notre travail a eu lieu au niveau des laboratoires de la faculté des Sciences Biologique et des Sciences Agronomique de l'Université MOULOUD MAMMARI, dont on cite les laboratoires communs d'analyses physico-chimiques I et II et le laboratoire pédagogique de microbiologie toute au long de la période allant du mois de Février au mois de juillet 2017.

### V.1. Matériel

#### V.1.1. Matériel végétal

Ce travail a été effectué sur les deux plantes suivantes : *Pulicaria odora* et *Smilax aspera*, identifiées par Monsieur Laribi, ces dernières ont été récoltées afin d'étudier leurs propriétés anti-oxydante, antibactérienne et antifongique après extraction des polyphénols

##### V.1.1.1. *Pulicaria odora*

La plante *Pulicaria odora* d'origine de la région d'Azazga, de la wilaya de Tizi-Ouzou en Kabylie (Algérie), a été récoltée le mois de février de l'année 2017.



Figure 8: *Pulicaria odora*.

### V.1.1.2. *Smilax aspera*

La plante *Smilax aspera* d'origine de la région d'Azazga, de la willaya de Tizi-Ouzou en Kabylie (Algérie), a été récoltée le mois de mars de l'année 2017.



Figure 9 : *Smilax aspera*.

Après avoir récolté les feuilles des deux plantes *Pulicaria odora* et *Smilax aspera*, rincés à l'eau afin d'ôter toute impureté, on procède à un égouttage suivie d'un séchage dans des conditions bien déterminées à savoir une température ambiante et à l'abri de la lumière pour une durée de 20 jours.

Après séchage, les feuilles des deux plantes sont broyées grâce à un broyeur électrique, et récupéré sous forme d'une fine poudre délicatement conservé dans des flacons en verre recouverts d'aluminium afin de les gardé à l'abri de la lumière.

La poudre citée si dessus qui représente les feuilles sèches, ainsi que des feuilles fraîchement récolté qui sont par la suit écrasé ou broyer pour obtenir une pate sont utilisées lors de l'extraction des polypénols, et cela a été réalisé à titre comparatif.

## V.1.2. Matériels du laboratoire

Tableau X : Solvants et réactifs utilisés.

Nature	Le produit	La prévenance	L'utilisation	
Solvants	Acétate d'éthyle	BiochemChemopharma France	Extractions des polyphénols	
	Ethanol	Sigma Aldrich Allemagne		
	Méthanol	Sigma Aldrich Allemagne	Dosage des polyphénols totaux	
Réactifs	Folin-ciocalteu	Sigma Aldrich Allemagne		
	Carbonate de Sodium (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich Allemagne		
	Acide gallique (C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> )	Biochem Chemopharma Québec		Polyphénols standard
	Acide ascorbique	Biochem Chemopharma Québec		Antioxydant standard
	Tampon phosphate			Activité anti-oxydante par réduction du fer (FRAP)
	Acide trichloracétique (C <sub>2</sub> HCl <sub>3</sub> O <sub>2</sub> )	Biochem Chemopharma Québec		
	Ferricyanure de potassium	/		
	Chlorure ferrique (FeCl <sub>3</sub> )	BiochemChemopharma France		
	1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)	/	Activité anti-oxydante par piégeage des radicaux libre	
Quercétine	/			

	(C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> )	/	Polyphénols standard
	Hydroxyde de sodium (NaOH)	/	Dosage des flavonoïdes
	Nitrite de sodium (NaNO <sub>2</sub> )	/	
	Chlorure d'aluminium (AlCl <sub>3</sub> )	/	

### V.1.3. Souches microbiennes testées

#### V.1.3.1. Souches bactériennes

L'activité antibactérienne des polyphénols extrait à partir des deux plantes, *Pulicaria odora* et *Smilax aspera*, a été réalisée sur différentes souches bactérienne, Gram positif et Gram négatif. Parmi ces souches testées on distingue des souches référenciées appartenant à l'American Type Culture Collection (ATCC), et des souches responsables de pathologie humaine très grave qui ont été isolées au niveau hospitalier, et qui sont connues pour leur résistance à différents antibiotique.

#### V.1.3.2. Souches fongiques

L'activité antifongique des polyphénols extrait à partir des deux plantes qui sont *Pulicaria odora* et *Smilax aspera* a été testé sur deux souches fongiques *Aspergillus niger* et *Candida albicans* qui provienne du laboratoire pédagogique de microbiologie de l'UMMTO.

L'ensemble des souches bactériennes et fongiques testé sont cité dans le tableau suivant :

Tableau XI : Les souches microbiennes utilisées

	Souches bactériennes et fongiques	Type de Gram	Provenance
Souches référenciées	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gram positif	Laboratoire pédagogique de microbiologie de l'UMMTO
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gram négatif	
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	Gram positif	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Gram négatif	
Souches d'origine clinique	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positif	Laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi-Ouzou
	<i>Escherichia coli</i>	Gram négatif	
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Gram négatif	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram négatif	
Souches fongiques	<i>Aspergillus niger</i>	/	Laboratoire pédagogique de microbiologie de l'UMMTO
	<i>Candida albicans</i>	/	

#### V.1.4. Les milieux de culture utilisés

Les différents milieux de culture utilisés pour réaliser ce travail sont cités dans le tableau suivant, et la composition de chaque milieu est résumée dans l'annexe 1 :

Tableaux XII : Les milieux de culture utilisés.

Milieux de culture	Utilisation	Provenance
Gélose nutritive	Repiquage des colonies (culture et isolation de colonies non exigeantes)	HIMEDIA Inde
Gélose de Muller Hinton (MH)	Etude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens.	laboratoire CondaPronadisa, Espagne
Milieu liquide : BrainHeart Infusion Broth (BHIB)	Revivification et enrichissement des souches bactériennes	laboratoire CondaPronadisa, Espagne
Gélose Chapman	Culture et sélection de <i>Staphylococcus aureus</i>	Matériel Médico-chirurgical (MMDEC), Tizi-Ouzou
Gélose Hecktöen	Milieu sélectif des GRAM négatif	Matériel Médico-chirurgical (MMDEC), Tizi-Ouzou
Gélose King A	Culture et sélection de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Institut Pasteur, Algérie
Gélose sabouraud	Culture et repiquage des levures et champignons	Institut Pasteur, Algérie

### V.1.5. Antibiotiques et antifongique utilisés

Pour chaque souche bactérienne et fongique testées on a réalisé un témoin positif en utilisant des antibiotiques, ces dernières sont choisies selon la sensibilité et la résistance de ses souches et leurs disponibilités au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie, les antibiotiques testées sont mentionnées dans le tableau qui se suit :

Tableau XIII: Les antibiotiques et l'antifongique utilisés.

	<b>Nom</b>	<b>Abréviation</b>	<b>Compagnie</b>
<b>Antibiotiques</b>	Rifampicine	RA	Bioanalyse Inde
	Imipineme	I	
	Oxacilline	OX	
	Sulfaméthoxazole / Trimethoprim	SXT	
	Céfoxitine	FOX	
	Neomycine	N	
	Céfotaxime	CXT	
	Benzylpénicilline	P	
	Colistine	CS	
	Céfazoline	CZ	
	Ampicilline	AM	
	<b>Antifongique</b>	Amphotéricine B Fungizone®	

#### V.1.6. Emulsifiant utilisé

L'émulsifiant utilisé c'est le Dimethylsulfoxyde (DMSO), qui est un solvant organique polaire, utilisé pour réaliser l'activité antibactérienne et antifongique des extraits des deux plantes. Cet émulsifiant améliore la diffusion des extraits dans le milieu.

### V.1.7. Appareillage

Tableau XIV : Liste des appareils utilisés

Appareil	Marque	Origine
Spectrophotomètre	Vis-7220G. Biotech Engineering Management CO.LTD	Royaume-Unis
Etuve	BINDER-MEMMERT	Allemagne
Balance de précision	KERN 770	Allemagne
Centrifugeuse	HettichUniversal / K2S.	Allemagne
Autoclave	WEBECO	Allemagne
Four Pasteur	BINDER	Allemagne
Bain Marie	MEMMERT	Allemagne
Agitateur à barreau magnétique non chauffant	GERHARDT	Allemagne
Broyeur électrique	KRUPS 75	Allemagne
Réfrigérateur	ENIEM	Algérie

## V.2. Méthodes

### V.2.1. Extraction des polyphénols totaux

Afin d'extraire les polyphénols totaux des deux plantes (*Pulicaria odora* et *Smilax aspera*) par la méthode de macération, nous avons travaillé selon le protocole décrit par MAHMOUDI *et al.* (2013), qui se présente comme suit :

1. Nous avons pris 20g de poudre (feuilles sèches) et pate (feuilles fraîches) de chaque plantes séparément, au quelle on a ajouté les différents solvants a différents volume selon la solubilisation de chaque poudre :

1.1. Les 20g de poudre et pate des feuilles de *Pulicaria odora* ont été macéré séparément dans :

- 300 ml d'eau distillée ;
- 200 ml d'acétate d'éthyle ;
- 200 ml d'éthanol.

1.2. Les 20g de poudre de la 2<sup>ème</sup> plante *Smilax aspera*, ont été aussi macéré séparément dans :

- 200 ml d'eau distillée ;
- 100 ml d'acétate d'éthyle ;
- 200 ml d'éthanol.

La macération des deux plantes a été réalisée à température ambiante, à l'abri de la lumière et sous agitation modéré pendants 2h.

A la fin de la macération, nous avons réalisé une filtration sur un tissu mousseline, les filtras récupéré sont centrifugé pendant 20 min a 4000 t /min, puis filtrés sur un papier filtre N°1 et séché dans des cristallisoirs dans le but de l'évaporation des solvants ainsil'obtention d'une poudre, cette dernière et conservé a 4°C, et reconstitué juste avant utilisation. Les différentes étapes d'extraction des polyphénols sont résumées dans la figure suivante :

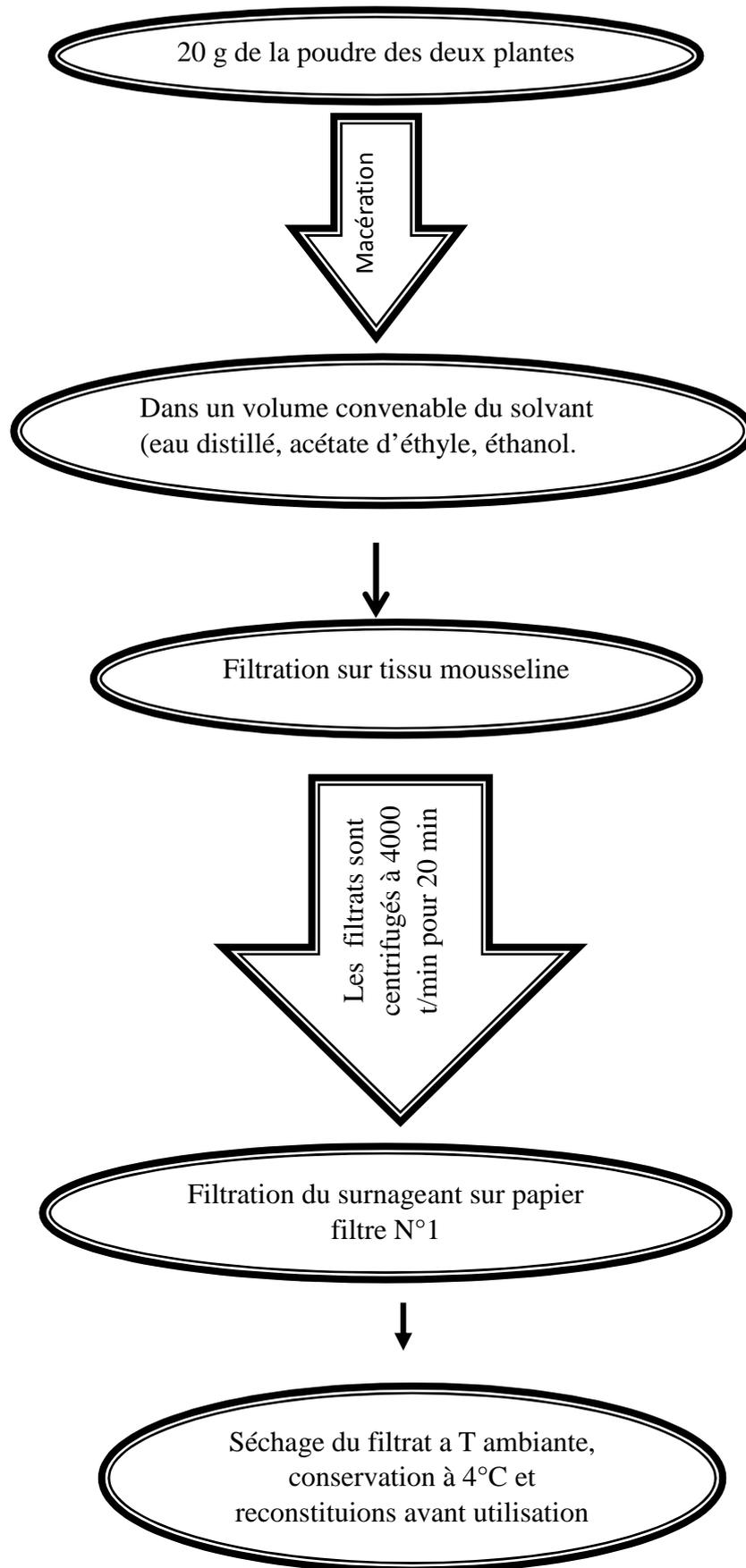


Figure 10: schéma du protocole d'extraction des polyphénols (MAHMOUDI *et al.*, 2013).

### V.2.2. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement désigne la masse de l'extrait (résidu sec) déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction selon l'équation suivante décrite par (MAHMOUDI *et al.*, 2013) :

$$\mathbf{R\ (\%) = (M\ ext / M\ éch) \times 100}$$

Où :

**R** : est le rendement en % ;

**M ext** : est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en mg ;

**M éch** : est la masse de la matière sèche végétale en mg.

### V.2.3. Dosage des polyphénols totaux

Pour doser les polyphénols totaux (PPT) des trois extraits, aqueux, acétate d'éthyl et éthanolique, des deux plante, nous avons opté pour le protocole décrit par TALBI *et al.* (2015) :

Nous avons préparé des dilutions convenable de l'échantillon et du standard (acide ascorbique), qui sont tous deux préparé dans le même solvant qui est soit celui utilisé lors de l'extraction ou bien du méthanol c.à.d. les échantillons aqueux sont reconstitué dans l'eau distillé et le standard lui-même est préparé dans l'eau distillé, on ce qui concerne les échantillons acétique et éthanolique leur reconstitution a été effectué dans du méthanol et ainsi le standard aussi.

Puis nous avons pris 200 µl de chaque dilution des échantillons et standard cité si dessus, pour les quelle on a ajouté 1ml du réactif de Folin (10 fois dilué). Après 4 min, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel, puis le mélange est incubé à température ambiante pendant 2h et au finale la mesure de l'absorbance a été effectuée à 760nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (AG), et les teneurs en PPT sont calculées selon l'équation suivante :

$$T = C \cdot V / M$$

**T** : Total des composés phénoliques (mg EAG / g d'extrait sec de la plante) ;

**C** : Concentration de l'extrait équivalente à l'acide gallique, obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml) ;

**V** : Volume de l'extrait (ml) ;

**M** : Poids sec de l'extrait de la plante (g).

Elle est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g de matière sèche « MS »).

#### **V.2.4. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux (FT)**

Pour déterminer la teneur en flavonoïdes totaux des extraits aqueux et éthanolique des feuilles sèches et fraîches des deux plantes, nous avons procédé par la méthode colorimétrique décrite par ZHISHEN MENGHENG et JIANMING (1999). Cette méthode consiste à réaliser des dilutions convenable de l'extrait et du composé standard qui est la quercétine qui sont de 20, 40, 60, 80 et 100mg/L afin d'établir une gamme d'étalonnage.

Puis 1ml de chaque dilution du standard ainsi que de l'extrait sont introduit dans des tubes contenant 4ml d'eau distillé ;

A l'instant  $t=0$ , on ajoute 0.3ml de Nitrite de Sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) a 5% ;

A l'instant  $t=5\text{min}$ , on ajoute 0.3ml du Chloride d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) a 10% ;

A l'instant  $t=6\text{min}$ , on a ajouté 2ml du soude ( $\text{NaOH}$ ) a 1M ;

A l'instant même le mélange réactionnel est dilué avec 2.4 ml d'eau bidistillé et agité vigoureusement avant de mesurer l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à 510 nm. La teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en équivalents de mg de quercétine par gramme d'extrait sec.

#### **V.2.5. Activité antioxydante**

L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée selon deux tests : la réduction du fer FRAP et le piégeage du radical libre DPPH.

### V.2.5.1. Test du pouvoir antioxydant par réduction du fer (FRAP)

Ce test est basé sur la réduction du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (HUBERT,2006) qui se manifeste par le virage de la couleur jaune du  $\text{Fe}^{3+}$  en une couleur bleu vert du ( $\text{Fe}^{2+}$ ) dont l'intensité est mesuré à 700nm et proportionnelle au pouvoir réducteur des extraits testés (JAYAPRAKASH *et al.*, 2001). Afin de réaliser le test de réduction du fer nous avons procédé comme suite :

- Préparation des dilutions de l'extrait aqueux et éthanolique des feuilles sèche des deux plantes (*Pulicaria odora* et *Smilax aspéra*) ainsi que du standard (l'acide ascorbique) ;
- Préparation du mélange réactionnelle qui se compose de 400  $\mu\text{l}$  de l'extrait ainsi que du standard (prélevé à partir de chaque dilution), plus 400  $\mu\text{l}$  du tampon phosphate (0.2M a pH 6.6) et 400  $\mu\text{l}$  du ferricyanure de potassium à 1% ;
- Incubation dans un bain marié réglé à 50°C pendant 20min ;
- Après incubation 400  $\mu\text{l}$  d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés au milieu réactionnel ;
- Centrifugation à 3000rpm pendant 10min ;
- Puis 400  $\mu\text{l}$  du surnagent sont mélangé avec 400  $\mu\text{l}$  d'eau distillée et de 80  $\mu\text{l}$  du chlorure ferrique à 0.1% ;
- Au finale la lecture de l'absorbance a été effectuée à 700nm.

### V.2.5.2. Estimation de l'activité antiradicalaire par la méthode de DPPH

Le composé 2,2diphényl-1-picryle hydrazyle DPPH est un composé utilisé afin d'étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. Cette molécule possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote qui est illustré dans la figure 11 (POPOVICI *et al.*, 2009) . Le DPPH est un radical libre stable de couleur violette qui absorbe au maximum à 517 nm. (IRATNI *et al.*, 2015)

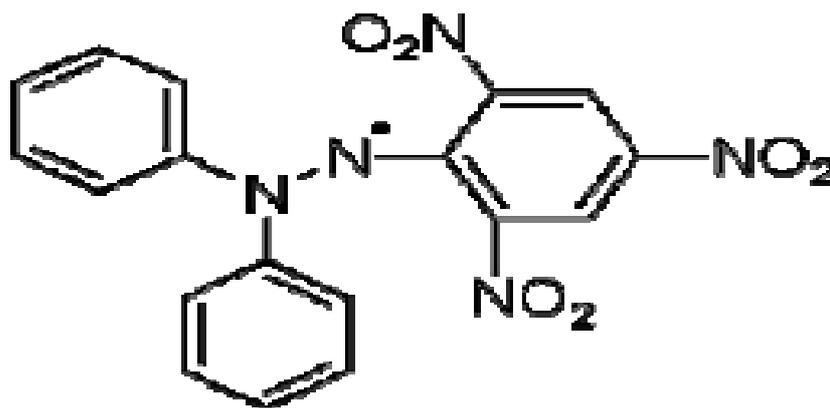


Figure 11: Structure chimique du radical libre DPPH (POPOVICI *et al.*, 2009).

Le radical libre DPPH est réduit en diphényle picryle hydrazine en présence d'un composé antioxydant (SANCHEZ-MORENO, 2002).

#### a. Mode opératoire

Pour la réalisation de ce test on a procédé de cette façon :

Au préalable nous avons préparé les différentes dilutions de l'acide ascorbique qui sert de référence et des extraits aqueux des deux plantes *Pulicaria odora* et *Smilax aspera* (80 à 200 µg/ml), ensuite 1 ml de la solution méthanolique de DPPH est ajouté à 50 µl de chaque dilution du standard et de l'extrait, agité et incubé pour 30 min à l'obscurité, puis la lecture se fait par un spectrophotomètre UV-VISIBLE à 517 nm.

#### b. Expression des résultats

Les résultats du test de l'activité antioxydante par la méthode du DPPH sont exprimés par l'indice de la réduction de l'activité antiradicalaire en pourcentage % RSA (Radical Scavenger Activity). L'activité antiradicalaire est estimée par l'équation décrite par TALBI *et al.* (2015) :

$$\%RSA = (\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}) \times 100$$

Abs contrôle : absorbance de la solution DPPH en absence d'un antioxydant ;

Abs échantillon : absorbance de la solution de DPPH en présence d'un antioxydant.

## **V.2.7. Activité antimicrobienne.**

### **V.2.7. 1. Activité antibactérienne**

#### **V.2.7.1.1. Tests de confirmation microbiologiques des souches bactérienne**

##### **a. Revivification des souches dans le milieu BHIB (BrainHeart Infusion Broth)**

Vu la congélation (états de conservation) des souches microbiennes a testées, ces dernières sont revivifiées dans un milieu de culture liquide ; le BrainHeart Infusion Broth (BHIB) et ce afin de pouvoir les utiliser, les différentes espèces microbiennes ont été repiqué à partir de leur milieux de conservation dans des tubes contenant du BHIB, ces tubes sont ensuite incubés a 37°C pendant 24h.

##### **b. Repiquage dans un milieu sélectif**

Après revivification sur milieux liquide (BHIB), les souches microbiennes a testé sont sélectionné grâce a un repiquage sur milieu sélectif. Nous avons effectué un repiquage sur milieux d'isolement (milieux sélectif des souches) à partir des cultures contenues dans le BHIB, ensuite incuber à 37°C pendant 24h.

##### **c. Coloration de Gram**

Afin de s'assurer de la pureté des souches isolées après repiquage sur milieu sélectif, nous avons effectué une coloration de gram ainsi qu'un examen microscopique au grossissement (x1000) dans le but d'observé le mode de regroupement, la forme des cellules bactériennes et le type de Gram. La coloration de Gram a été réalisée selon le protocole décrit par DELARRAS (2007), qui est le suivant :

- A partir d'une colonie bactérienne isolée nous avons réalisé un frottis :
- Dépôt d'une goutte d'eau et du prélèvement au milieu d'une lame en verre en faisant des rotations ;
- Fixation du frottis, avec de l'éthanol à 90° pendant 5 minutes puis on passe la lame 3 fois dans la flamme du bec Bunsen ;
- Réalisation d'une coloration basique au violet de Gentiane et laisser agir pendant 30secondes à 1minute .Toutes les bactéries sont colorées en violet puis rincé à l'eau;

- Réalisation d'une stabilisation de la couleur violette en utilisant une solution iodo-iodurée (lugol), étaler et laisser agir pendant 30 secondes à 1 minute puis rincer à l'eau ;
- Décoloration à l'alcool: on prend la lame inclinée et on verse l'alcool goutte à goutte jusqu'à décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. puis on rince sous un filet d'eau ;
- Réalisation d'une 2<sup>ème</sup> coloration avec de la Fuchsine ou de la Safranine: laisser agir de 30 secondes à 1 minute puis rincer doucement à l'eau, et sécher au-dessus de la flamme d'un bec bunsen ;
- Observation au microscope optique à l'objectif x 100 (à immersion).

Les bactéries Gram négatif sont colorées en rose tandis que les bactéries Gram positif sont colorées en violet.

### **V.2.7.1.2. Etude de l'activité antibactérienne**

#### **a. Préparation des pré-cultures**

Afin d'obtenir des colonies jeune (18 à 24h) qui servent lors du test antibactérien des extraits de nos deux plantes nous avons procédé à un repiquage des souches revivifiées à partir des tubes de BHIB dans des boîtes de Petri contenant de la gélose nutritive.

L'ensemencement a été réalisé par la méthode des trois cadrans, dans le but d'obtenir des colonies bien isolées qui serviront à la standardisation de l'inoculum. Les boîtes de Petri sont incubées à 37°C pendant 18h préférentiellement et au plus tard 24h.

#### **b. Préparation et standardisation de l'inoculum**

Pour la réalisation de cette étape, nous avons procédé de cette façon : premièrement on prélève des colonies bien isolées à partir des boîtes de Pétriensemencées précédemment, ensuite on dissout les colonies prélevées dans des tubes contenant 10 ml d'eau physiologique, une fois la suspension bactérienne est préparée, nous l'avons standardisée à une DO de 0,08 à 0,1 grâce à un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 625 nm qui correspond à une concentration de  $10^7$  à  $10^8$  UFC/ml.

### c. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur gélose

La technique de diffusion sur gélose est la méthode suivie pour la réalisation du teste antimicrobien, celle-ci est réalisé grâce à des disques de papier Whatman qui sont imprégné avec 15µl des extrait aqueux des deux plantes (*Pulicaria odora* et *Smilax aspera*). C'est une technique décrite par DJENANE *et al.* (2011), caractérisée par sa fréquence d'utilisation en raison de sa facilité d'emploi, sa fiabilité et sa reproductibilité.

Cette méthode communément appelée aromatoگرامme est réalisée comme suit :

- L'ensemencement des boites de Pétri coulés préalablement avec 15ml du milieu MH, a été réalisé par la méthode des strié à l'aide d'un écouvillon stérile ;
- Imprégné un disque stérile de papier Whatman avec 10µl à 15 µl de l'extrait a testé et de DMSO a raison de 5% afin d'amélioré la diffusion ;
- Sécher le disque pour quelques secondes seulement pour éviter l'évaporation de l'extrait, puis le déposé au milieu de la boite de pétri ;
- Les boites de Pétri sont maintenues pendant 2 h à 4 °C pour permettre la diffusion de l'extrait ;
- Incuber les boites de pétri à 37°C pendant 24h.

Un disque de papier Wattman imprégné aves du DMSO a servi comme témoin négatif.

Le témoin positif est réalisé par différents antibiotiques standards (4à 5 disques d'antibiotiques).

Remarque : ces différents tests réalisés sont répété deux fois.

### d. Lecture des résultats

Après 24h d'incubation, la lecture des résultats est réalisée par la mesure du diamètre d'inhibition (les zones claires qui se forment au tour du disque). Le diamètre du disque est inclus lors de la mesure. Les résultats obtenus sont classés selon PONCE *et al.* (2003).

- Non sensible (-) ou résistante si le diamètre est inférieur à 8mm.
- Sensible (+) si le diamètre est compris entre 9 à 14mm.
- Très sensible (++) si le diamètre est compris entre 15 à 19mm.
- Extrêmement sensible (+++) si le diamètre est supérieur 20mm.

### **V.2.7.2. Etude de l'activité antifongique**

#### **a. La pureté de la souche**

Pour la réalisation de l'activité antifongique nous avons utilisé deux souches qui sont : *Aspergillus niger* et *Candida albicans*.

La pureté de la souche a été vérifiée grâce au caractère macroscopique et microscopique des deux souches après avoir réalisé un repiquage sur milieu sabouraud

- Caractères macroscopique : comme la couleur des souches, la présence ou l'absence de pigments diffusibles, la texture ont été mis en évidence ;
- Caractères microscopiques : une observation microscopique au grossissement G x 400 a été effectuée pour une lame contenant un petit fragment de la souche (spores et mycélium).

#### **b. Préparation de la suspension fongique**

A partir des boites de pétri préalablement repiquées nous avons préparé des suspensions fongiques comme suite :

Un prélèvement des spores d'*Aspergillus Niger*, a été réalisé puis dessous dans 10 ml d'eau physiologique. La standardisation à  $10^6$  spores/ml est réalisée à l'aide de la cellule de Malassez par comptage des spores.

Les boites de pétri coulées avec le milieu Sabouraud sont ensuiteensemencé avec la suspension fongique par inondation, puis incubés à 37°C pendant 72h.

Concernant *Candidat Albicans*, après préparation de la suspension, la standardisation a été réalisée grâce à un spectrophotomètre à une DO de 0,08 à 0,1correspondant à une concentration de  $10^7$  cellules/ml. Les boites de pétri sontensemencées grâce à un écouvillon stérile puis incubées pendant 24h à 28°C.

#### **c. Réalisation de l'activité antifongique**

Afin d'effectuer ce test antifongique nous avons procédé de la même manière que pour l'activité antibactérienne donc des disques de papier whatman imprégné avec 15µl de l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique séparément plus 5% du DMSO ont été déposés au milieu de la

boite qui sont ensuite incubé à 37°C pendant 72h pour *Aspergillus niger* et pendant 24h à 28°C pour *Candidat Albicans*.

Pour la réalisation du témoin négatif un disque de papier whatman est imprégné avec du DMSO pour le test de l'extrait aqueux or que pour l'extrait éthanolique nous avons utilisé du méthanol plus 5% du DMSO.

Un disque de papier Wattman imprégné avec de la fongizone (anti fongique), a servi comme témoin positif.

#### **d. Lecture des résultats**

La lecture a été effectué de la même manière que pour l'activité antibactérienne par la mesure du diamètre des zones d'inhibition, et la sensibilité ou la résistance est déterminé en fonction de cette mesure de la zone d'inhibition.

*Chapitre VI :*  
*Résultats et discussion*

## VI. Résultats et discussion

### VI.1. Rendement d'extraction des polyphénols

La méthode d'extraction des polyphénols suivie est la méthode de macération qui consiste en la libération de ces molécules bioactive vers la solution d'extraction (eau ou solvants organique)

Au cour de notre travail, nous avons réalisé trois extraction qui sont : l'extraction aqueuse (Aq), l'extraction éthanolique (Et-OH) et l'extraction acétique (AcEt)

Les résultats obtenus à partir de ces différentes extractions dont le rendement, la couleur et l'aspect sont illustré dans le tableau suivant ;

Tableau XV: Rendement, aspect et couleur des trois extraits des feuilles sèches et fraîches.

	Extraits	feuilles sèches			feuilles fraîches		
		Aqueux	Acétate d'éthyl	Ethanolique	Aqueux	Acétate d'éthyl	Ethanolique
<i>Policara odora</i>	Aspect	Poudre fine	Pâte collante	Pâte collante	Poudre	Pâte collante	Pâte collante
	Couleur	Brune	Verte foncée	Verte foncée	Verte	Verte	Verte
	Rendement %	3,349±1,19	4,75±0,61	2,41±0,06	0,358±0,04	0,47±0,00	3±0,14
<i>Smilax aspera</i>	Extraits	Aqueux	Acétate d'éthyl	Ethanolique	Aqueux	Acétate d'éthyl	Ethanolique
	Aspect	Poudre	Pâte collante	Pâte collante	Poudre	Pâte collante	Pâte collante
	Couleur	Noire	Verte foncée	Verte foncée	Verte	Verte foncée	Verte foncée
	Rendement %	4,29±0,76	1,032±0,08	4,75±0,07	3±0,49	0,275±0,06	2,5±0,26

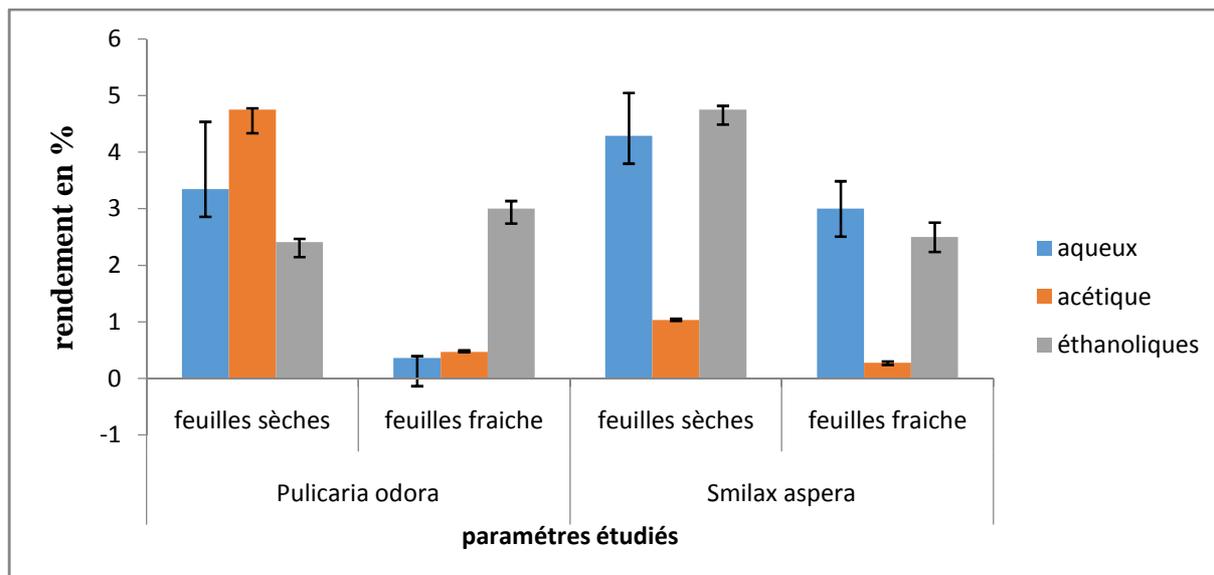


Figure 12 : Histogramme du rendement en PPT pour les deux plantes.

D'après les résultats illustrés au sein de la figure 12 on remarque que pour les feuilles de *Pulicaria odora* à l'état sec, le rendement est meilleur dans le cas de l'extraction acétique avec une valeur de  $4,75 \pm 0,61$  %, suivi par un rendement moyen pour l'extraction aqueuse qui est de  $3,349 \pm 1,19$  %, au final un faible rendement est donné par l'extraction éthanolique dont la valeur est égale à  $2,41 \pm 0,06$  %.

Or que dans le cas des feuilles fraîches le rendement le plus élevé est celui de l'extraction éthanolique qui est de l'ordre de  $3 \pm 0,14$  %, puis en 2<sup>ème</sup> lieu l'extraction acétique avec un rendement de  $0,47 \pm 0,00$  % et en dernier lieu viens l'extraction aqueuse avec un rendement de  $0,358 \pm 0,04$  %.

Il ressort à travers l'observation de ces résultats que les feuilles sèches de *Pulicaria odora* donne un rendement plus intéressant que les feuilles fraîches et cela pour les deux extractions aqueuse et acétique or que pour l'extraction éthanolique le meilleure rendement est obtenue avec les feuilles fraîches.

D'après la figure 12, on remarque que les feuilles sèches de *Smilax aspera*, donne le meilleure rendement grâce à l'extraction éthanolique qui est de l'ordre de  $4,75 \pm 0,07$  %, puis une légère baisse a été observé dans le cas l'extraction aqueuse avec une valeur de  $4,29 \pm 0,76$  %, vers la fin l'extraction acétique avec un faible rendement équivalent à  $1,032 \pm 0,08$  %.

Concernant les feuilles fraîches de *Smilax aspera*, nous avons obtenu le rendement le plus significatif avec l'extraction aqueuse qui est de l'ordre de  $3 \pm 0,49$  %, suivi par un rendement

moyen donné par l'extraction éthanolique avec une valeur de  $2,5 \pm 0,264\%$ , et un faible rendement enregistré pour l'extraction acétique qui est de  $0,275 \pm 0,06\%$ .

D'après ces résultats on peut dire que les feuilles sèches de *Smilax aspera* donnent un rendement plus élevé comparé au feuilles fraîches, et cela est remarqué dans les trois cas d'extraction (acétique, aqueuse et éthanolique)

A titre de comparaison entre les deux plantes (*Pulicaria odora* et *Smilax aspera*) on se base sur le rendement obtenue lors des trois extractions on remarque que :

- Cas des feuilles sèches : pour *Pulicaria odora* meilleur rendement est obtenu par l'extrait acétique or que pour *Smilax aspera* c'est l'extrait éthanolique qui a donné le rendement le plus élevé ;
- Cas des feuilles fraîches : pour *Pulicaria odora* c'est l'extrait éthanolique qui a donné le rendement le plus élevé or que l'extrait aqueux de *Smilax aspera* a enregistré le meilleur rendement.

L'étude faite par BOLOU *etal.* (2001), sur les feuilles de *Terminalia glaucescens plancha* a donné un rendement en polyphénols de 16.8% pour l'extrait aqueux et de 21,9% pour l'extrait éthanolique. Ces résultats sont supérieur au nôtre et cela est valable pour les deux plantes *Pulicaria odora* et *Smilax aspera*.

### VI.1.2. Analyse statistique

Dans le cas des feuilles sèches de *Pulicaria odora* le test d'ANOVA a donné une p-value  $> 0,05$  donc il n'y a pas une différence significative entre les extraits, le type du solvant utilisé pour l'extraction n'influence pas sur le rendement d'extraction. Dans le cas des feuilles fraiche de *Pulicaria odora* le test d'ANOVA a donné une p-value  $< 0,05$ , ce que révèle une différence significative : le type du solvant influence sur le rendement. Le test de Newman-keuls a classé les différents extraits en deux groupes homogènes (annexe 3).

Dans le cas des feuilles sèches et des feuilles fraîches de *Smilax aspera* le teste d'ANOVA a donné une p-value  $> 0,05$  donc statistiquement il n'existe pas de différence significative, c.-à-d. la nature du solvant utilisé n'influence pas sur le rendement d'extraction (annexe 3).

## VI.2. La teneur des polyphénols totaux des différents extraits des deux plantes

La méthode suivie pour doser les PPT des différents extraits des feuilles sèches et fraîches des deux plantes (*Pulicaria odora* et *Smilax aspera*) est la méthode spectrophotométrique au réactif de Folin- Ciocalteu décrite par TALBI *et al.* (2015).

La teneur en composés phénoliques obtenus à partir de l'extraits aqueux, a été estimée grâce à une courbe d'étalonnage réalisée avec un extrait de référence, l'acide gallique (figure13) à différentes concentrations (20-160 µg/ml) (WONG *et al.*, 2006), et exprimée en milligrammes d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS).

Les résultats obtenus pour le dosage des PPT en utilisant l'équation de la régression Linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'AG sont rapportés dans le tableau XVI, Les Valeurs sont les moyennes  $\pm$  SD de trois répétitions.

Remarque : la courbe d'étalonnage de la figure 13 fait référence aux extraits aqueux reconstitués dans l'eau distillée, elle est donc utilisé uniquement pour estimer la teneur en PPT de l'extrait aqueux reconstitué dans l'eau distillé.

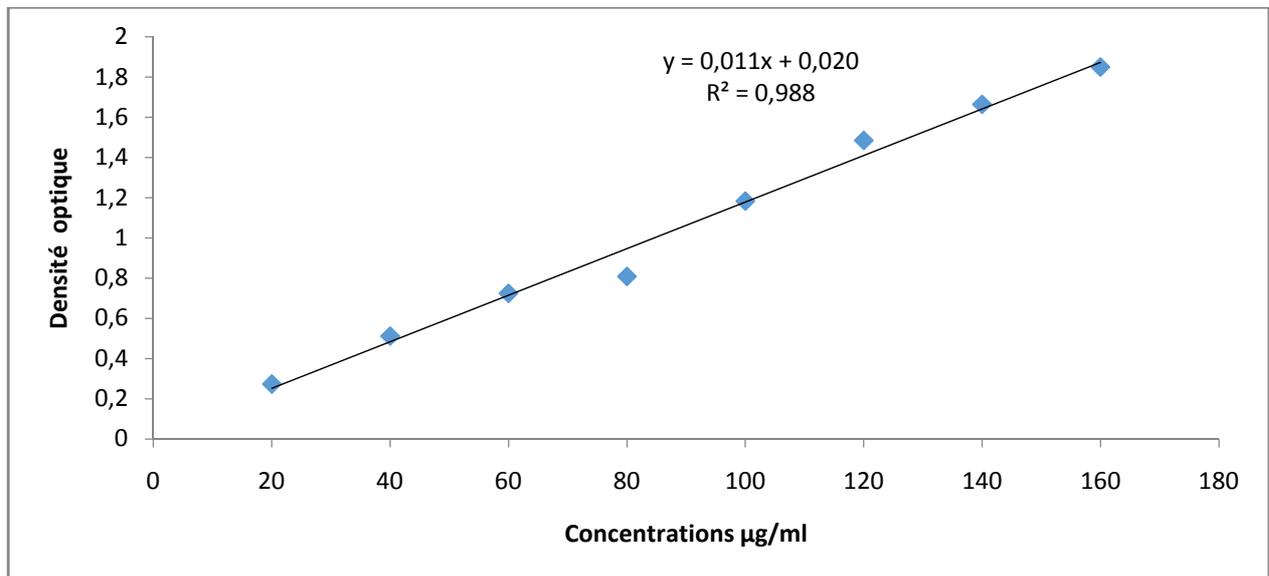


Figure 13 : Courbe d'étalonnage à l'acide gallique.

TableauXVI : Teneurs en polyphénols totaux de l'extrait aqueux exprimées en mg EAG/g MS (n=3).

	Plantes	Etats des feuilles	La teneur en polyphénols
Extraits aqueux	<i>Pulicaria odora</i>	Feuilles sèches	11,38±0,00
		Feuilles fraîches	5,8±0,00
	<i>Smilax aspera</i>	Feuilles sèches	1,71±0,00
		Feuilles fraîches	1,051±0,00

A partir le tableau si dessus (XVI) nous pouvant dire que :

Les feuilles sèches de *Pulicaria odora* donne une teneur en PPT de l'ordre de 11,38±0,00 mg EAG/g MS qui représente la valeur la plus élevé comparé à la teneur en PPT donné par les feuilles fraîches de la même plante qui est égale 5,8±0,00 mg EAG/g MS.

Nous avons noté aussi le même résultat concernant la 2<sup>ème</sup> plante *Smilax aspera*, avec une teneur en PPT de 1,71±0,00 mg EAG/g MS enregistré pour les feuilles sèches, qui est légèrement plus élevé que la teneur en PPT des feuilles fraîche dont la valeur est de 1,051±0,00 mg EAG/g MS.

En ce référent aux résultats obtenus on peut dire que les feuilles (sèches et fraîches) de *Pulicaria odora* présente une teneur en polyphénols plus élevé que les feuilles (sèche et fraîche) de *Smilax aspera*.

La courbe d'étalonnage de la figure 15, est utilisé afin d'estimé la teneur en composés phénoliques obtenus à partir des différents extraits (aqueux, acétique et éthanolique) et ainsi comparé entre ces trois cas d'extraction notant que la reconstitution de ces trois extrait a était réalisé dans du méthanol, cette dernière est réalisée avec un extrait de référence, l'acide gallique (figure 15) à différentes concentrations (20-200 µg/ml) (WONG et al., 2006), et exprimée en milligrammes d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS).

L'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'AG tracée, a été utilisée afin de calculer les concentrations en PPT des différentes extractions dans le but d'estimer leur teneur. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau XVI et les valeurs sont les moyennes  $\pm$  SD de trois répétitions.

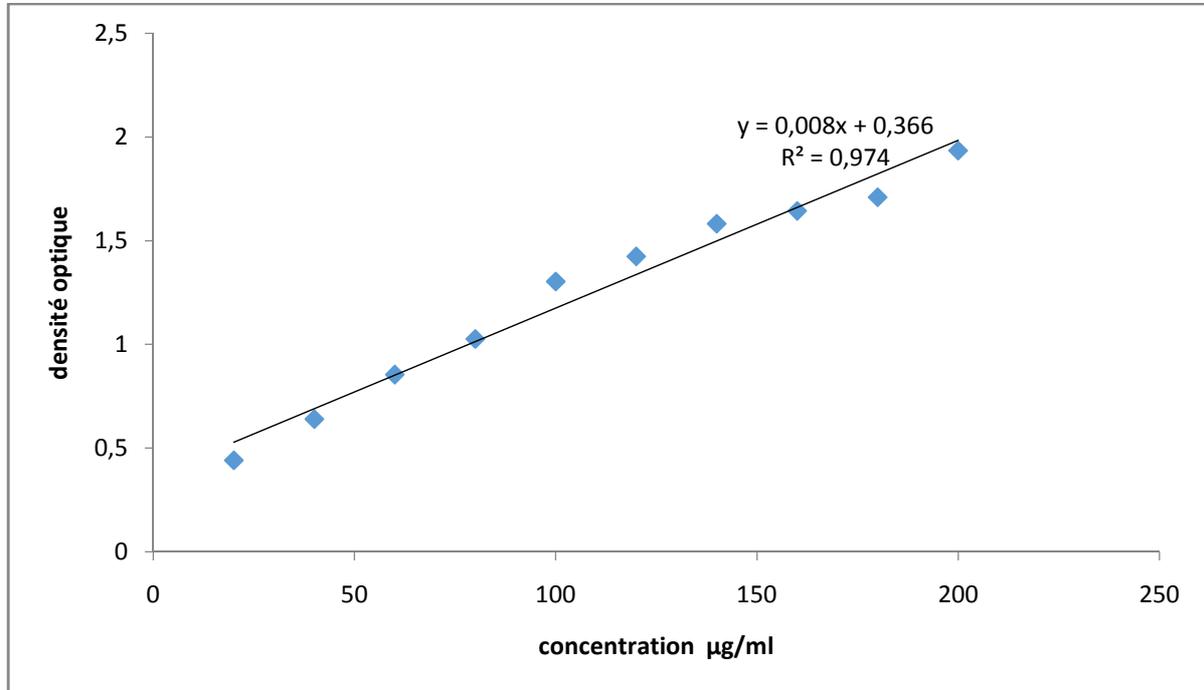


Figure 15 : Courbe d'étalonnage à l'acide gallique.

Tableau XVII: Teneurs en polyphénols totaux des différents extraits exprimées en mg EAG/g MS (n=3)

		Feuilles sèches			Feuilles fraîches		
	Extraits	Aqueux	Acétate d'éthyl	Ethanolique	Aqueux	Acétate d'éthyl	Ethanolique
<i>Pulicaria odora</i>	Teneur en polyphénols	8,13±0,00	1,62±0,04	1,03±0,07	39,98±0,11	0,711±0,00	6,64±0,00
	Extraits	Aqueux	Acétate d'éthyl	Ethanolique	Aqueux	Acétate d'éthyl	Ethanolique
<i>Smilax aspera</i>	Teneur en polyphénols	4,51±0,07	8,4±0,01	0,856±0,01	6,6±0,00	10,09±0,03	0,97±0,03
	Extraits	Aqueux	Acétate d'éthyl	Ethanolique	Aqueux	Acétate d'éthyl	Ethanolique

D'après les résultats observé dans le tableau précédent (XVII), il s'avère que pour les feuilles sèches de *Pulicaria odora* les teneurs en PPT varie de 8,13±0,00 mg EAG/g MS dans le cas de l'extraction aqueuse, 1,62±0,01 pour l'extraction acétique et au finale 1,03±0,07 mg EAG/g MS a été enregistré pour l'extraction éthanolique.

La distribution des résultats ce manifeste de la manière suivante pour la plante fraîche, dont on remarque que la meilleur teneur en PPT est obtenu à partir de l'extraction aqueuse avec une valeur de 39,98±0,11 mg EAG/g MS, puis une valeur moyenne de l'ordre de 6,64 ±0,00 mg EAG/g MS pour l'extraction éthanolique et en dernière position vient l'extraction acétique avec une teneur de l'ordre de 0,711±0,00 mg EAG/g MS.

Il ressort de la comparaison de ces résultats que les feuilles fraîches de *Pulicaria odora* ce manifeste par une teneur en PPT plus élevée que les feuilles sèches ; et cela dans les deux cas d'extraction aqueuse et éthanolique , or que nous avons observé le contraire pour l'extraction a l'acétate d'éthyl dont la teneur en PPT est légèrement plus élevée dans le cas des feuilles sèches par rapport au feuilles fraîches de la même plante .

Concernant la 2<sup>ème</sup> plante *Smilax aspera* les trois cas d'extraction en utilisant les feuilles sèches se traduisent par des teneurs en PPT qui se classent comme suit : l'extraction acétique prend le dessus avec une valeur de  $8,4 \pm 0,01$  mg EAG/g MS, suivie par l'extraction aqueuse avec une valeur moyenne de  $4,51 \pm 0,07$  mg EAG/g MS puis en finale l'extraction éthanolique avec une faible valeur qui est de  $0,856 \pm 0,018$  mg EAG/g MS.

Le même classement des teneurs en PPT a été enregistré lors des trois extractions en utilisant les feuilles fraîches, avec la valeur la plus élevée pour l'extraction acétique qui est de l'ordre de  $10,09 \pm 0,03$  mg EAG/g MS, suivie par l'extraction aqueuse avec une teneur moyenne de  $6,6 \pm 0,00$  mg EAG/g MS, puis une faible teneur en PPT de  $0,97 \pm 0,03$  mg EAG/g MS pour l'extraction éthanolique.

Après comparaison de ces teneurs en PPT enregistrées pour les feuilles fraîches et sèches de la même plante *Smilax aspera* nous pouvons dire que les teneurs obtenues lors de l'utilisation des feuilles fraîches sont plus importantes que celles obtenues avec les feuilles sèches, ce qui est remarqué pour les trois cas d'extraction qui se classent comme suit : extraction acétique, extraction aqueuse et à la fin l'extraction éthanolique.

En comparant les résultats enregistrés pour les deux plantes *Pulicaria odora* et *Smilax aspera*, on observe que l'extraction qui donne la teneur en PPT la plus élevée est l'extraction aqueuse pour *Pulicaria odora* (feuilles sèches et fraîches) par contre pour *Smilax aspera* (feuilles sèche et fraîche) la meilleure teneur en PPT est donnée par l'extrait acétique.

Les résultats obtenus par ATHAMENA et al. (2010), ont démontré que l'extrait acétique de *Cuminumcyminum* donne une teneur en PPT de  $19,39 \pm 1,89$  mg EAG/g MS qui est supérieure à l'extrait acétique de nos deux plantes.

Selon l'étude réalisée par IRATNI et al. (2015), sur les feuilles de *Pistacia lentiscus* dont la teneur en PPT lors de l'extraction aqueuse est de  $119,79 \pm 1,89$  mg EAG/g MS, la teneur enregistrée lors de l'extraction aqueuse de nos deux plantes est inférieure.

### VI.2.2. Analyse statistique

Le test d'ANOVA dans le cas des feuilles sèches et des feuilles fraîches de *Pulicaria odora* a donné une p-valeur  $< 0,05$  ce qui indique qu'il existe une différence significative donc le type du solvant utilisé pour l'extraction influence sur la teneur en polyphénols totaux des différents extraits. Le test complémentaire (Newman-keuls) a classé les différents extraits en trois groupes homogènes (annexe 3).

Dans le cas des feuilles sèches et des feuilles fraîches de *Smilax aspera* le teste d'ANOVA a donné une p-value < 0,05 ce qui révèle une différence significative, d'après ces résultats on constate que le type du solvant influence sur la teneur en polyphénols des différents extraits. Le test complémentaire de Newman-keuls a rapatrié les différents extraits en trois groupes homogènes (annexe 3).

### VI.3. Dosage des flavonoïdes totaux (FT)

Les fractions représentant les flavonoïdes totaux (FT) dans les deux extrais 'aqueux éthanolique' pour les feuilles sèches et fraîches des deux plantes '*Pulicaria odora* et *Smilax aspera*', sont déterminé en mg équivalent de quercétine par gramme de matières sèches (MS). Les FT ont été quantifiés par la méthode utilisant le trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ).

La quercitène est le flavonoïde pris comme référence pour la courbe d'étalonnage. Cette courbe a été utilisée pour le calcul des concentrations des FT, à partir de ces dernières on a pu estimer les teneurs en FT et qui sont représentées dans le tableau XVIII.

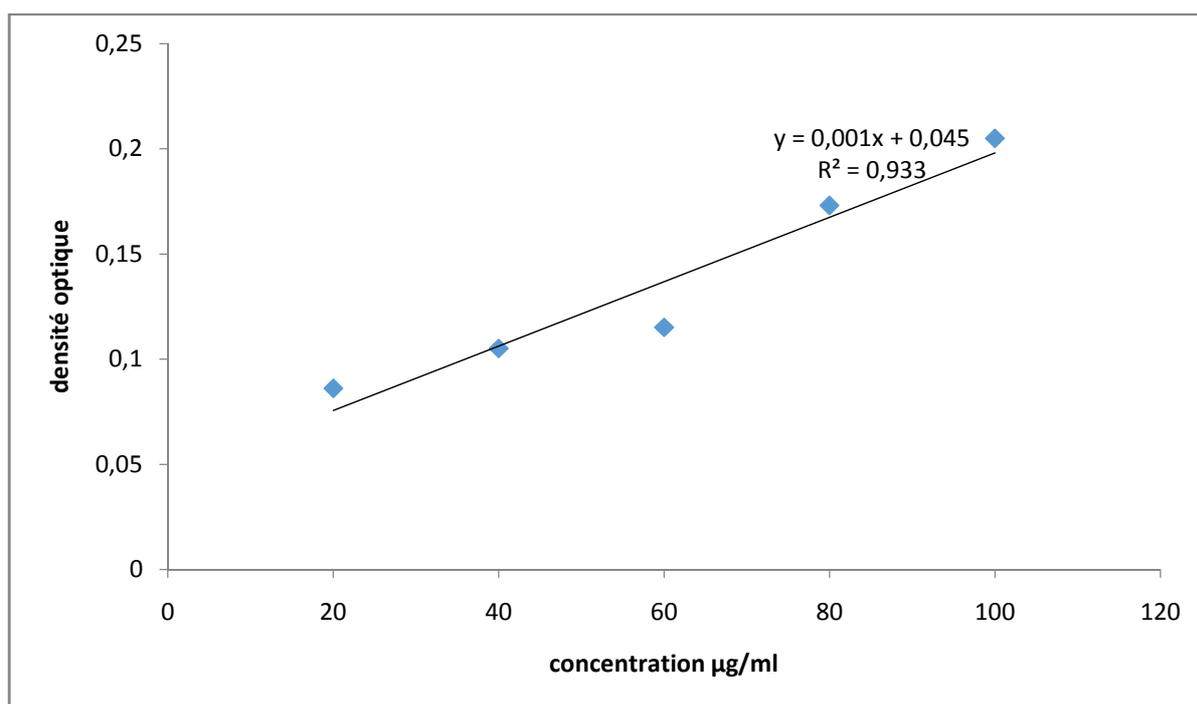


Figure 17 : Courbe d'étalonnage à la quercétine.

Tableau XVIII : Les teneurs en flavonoïdes des extraits (aqueux et éthanolique) des deux plantes en mg EQ/ g MS.

		Feuilles sèches		Feuilles fraîches	
	Extraits	Aqueux	Ethanolique	Aqueux	Ethanolique
<i>Pulicaria odora</i>	Teneur en flavonoïdes	364,19±0,00	200±0,00	51,55±0,00	498,33±0,00
	Extraits	Aqueux	Ethanolique	Aqueux	Ethanolique
<i>Smilax aspera</i>	Teneur en flavonoïdes	213,43±0,00	383,33±0,00	22,91±0,00	208,33±0,02
	Extraits	Aqueux	Ethanolique	Aqueux	Ethanolique

Le test des flavonoïdes pour *Pulicaria odora* a révélé des teneurs variables, en ce qui concerne les feuilles sèches la teneur la plus élevée est enregistrée dans l'extrait aqueux avec une valeur de 364,19±0,00 mg EQ/g MS, par contre avec l'extrait éthanolique la teneur diminue pour atteindre 200±0,00 mg EQ/g MS.

D'une autre part l'extrait éthanolique des feuilles fraîches a enregistré une teneur plus élevé qui est de l'ordre de 498,33±0,00 mg EQ/g MS comparant à leur extrait aqueux dont la teneur est de 51,55±0,00 mg EQ/g MS. On constate alors que les teneurs diffèrent lors d'utilisation des feuilles sèches ou fraîches.

Concernant la 2<sup>ème</sup> plantes *Smilax aspera*, le teste des FT a révélé des teneurs élevées pour l'extrait éthanolique que ce soit pour les feuilles sèches ou fraîches dont les teneurs sont respectivement de 383,33±0,00 mg EQ/g MS et 208,33±0,02 mg EQ/g MS comparant à l'extrait aqueux dont les teneurs sont plus basses (feuilles sèches : 213,43±0,00 mg EQ/g MS et feuilles fraîches : 22,91±0,00 mg EQ/g MS)

En comparant entre les deux plantes *Pulicaria odora* et *Smilax aspera*, nous remarquons que dans le cas des feuilles sèches de *Pulicaria odora* l'extraction aqueuse donnent une meilleur teneur en FT, alors que dans le cas des feuilles sèches de *Smilax aspera* c'est l'extrait éthanolique qui donne la meilleur teneur en FT.

Or que dans le cas des feuilles fraîches on enregistre une similitude car pour les deux plantes c'est l'extrait éthanolique qui donne la meilleur teneur en FT.

L'étude réalisée par TALBI *et al.* (2014), sur *Nigella sativa* L. dont l'extrait aqueux a donné une teneur en flavonoïde totaux de  $169,26 \pm 5,78$  mg EQ/g MS, cette dernière est inférieure à la valeur obtenue lors de l'extraction aqueuse pour les feuilles sèches des plantes étudié (*Pulicaria odora* et *Smilax aspera*).

### **VI.3.2. Analyse statistique**

Le teste d'ANOVA a donné une p-value  $< 0,05$  dans le cas des feuilles sèches et feuilles fraîches de *Pulicaria odora*, ce qui signifie que une différence significative existe entre les différents extraits, nous avons constaté que le type de solvant influence sur la teneur en flavonoïdes. Le teste complémentaire de Newman-keuls a classé les différents extraits en deux groupe homogène (annexe 3).

Dans le cas de la plante *Smilax aspera* le teste d'ANOVA a donné une p-value  $< 0,05$  pour l'échantillon des feuilles sèches, ce qui révèle une différence significative : le type du solvant utilisé lors de l'extraction influence sur la teneur en flavonoïdes. Le test complémentaire de Newman-keuls a classé les extraits en deux groupes homogène. Alors que dans le cas des feuilles fraîches le test d'ANOVA a donné une p-value  $> 0,05$  ce que indique qu'il n'existe aucune différence significatives c.-à-d. dans le cas des feuilles fraîches de *Smilax aspera* le type du solvant n'influence pas sur la teneur en flavonoïdes (annexe 3)

## **VI.4. Mise en évidence de l'activité antioxydante**

L'évaluation de l'activité antioxydante a été effectuée selon deux méthodes : la méthode de piégeage du radical libre DPPH (2,2- diphenyl-1-picryl-hydrazyl) et la méthode de réduction du fer FRAP.

### **VI.4.1. La réduction du fer (FRAP)**

La méthode de réduction du fer est une méthode simple et directe pour déterminé le pouvoir antioxydant, comme il est connue le fer est un métal de transition il intervienne dans la génération des radicaux libres (IRATNI *et al.*, 2015).

La figure qui se suit montre le pouvoir réducteur du fer du standard (acide ascorbique) et des différents extraits : *Pulicaria odora* (aqueux et éthanolique), *Smilax aspera* (aqueux et éthanolique)

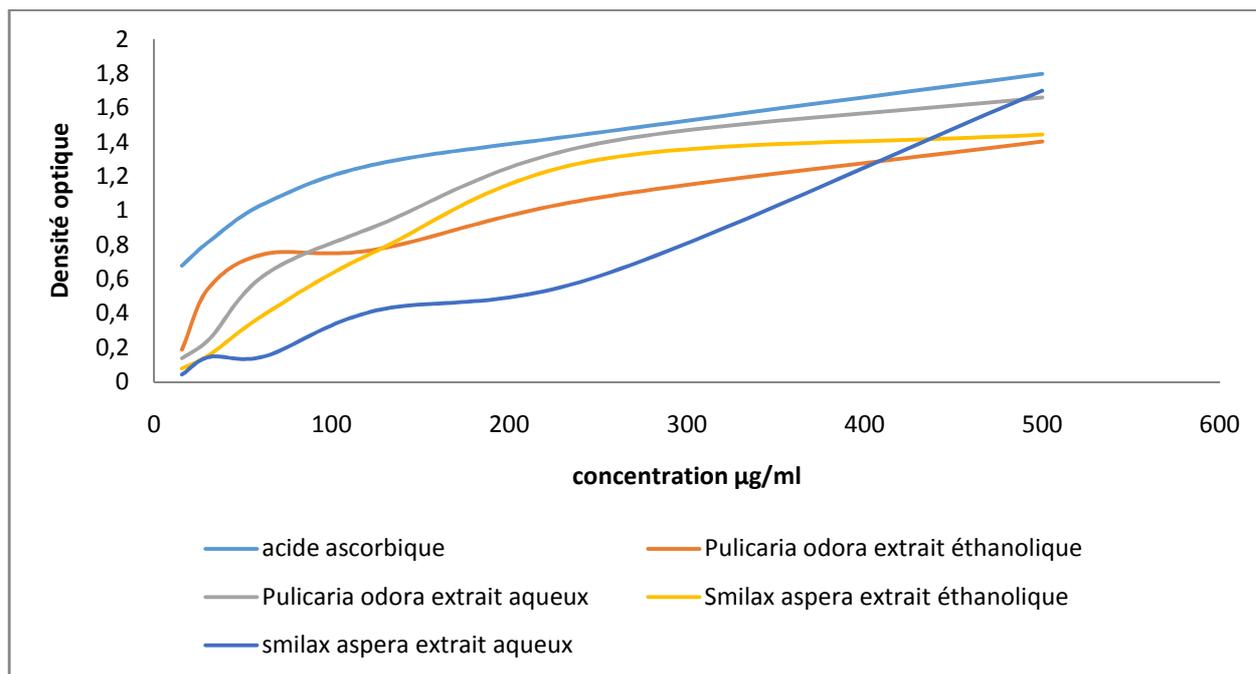


Figure 19 : Le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique et des extraits.

D'après le graphe de la figure 19 on remarque que le pouvoir réducteur est proportionnel à la concentration des extraits, dont l'augmentation des concentrations des extraits, engendre une augmentation des densités optiques, donc le pouvoir antioxydant augmente. Le pouvoir réducteur montré par l'acide ascorbique est plus élevé par rapport aux autres extraits.

Tableau XIX : Le pouvoir réducteur en pourcentage (%) des différents extraits (n=2).

		15,62	31,25	62,5	125	250	500
Acide ascorbique		36,77±0,21	45,77±0,50	58,05±0,38	70,72±0,16	80,94±0,16	100±0,00
<i>Pulicaria odora</i>	Extrait éthanolique	10,5±0,23	30,94±0,00	41,56±0,09	43,05±0,00	59,8±0,07	78,02±0,03
	Extrait aqueux	12,44±0,01	15,72±0,06	34,72±0,45	50,61±0,38	77,36±0,16	92,3±0,13
<i>Smilax aspera</i>	Extrait éthanolique	4,38±0,02	8,88±0,17	22,08±0,02	42,47±0,70	72,13±0,02	80,33±0,23
	Extrait aqueux	2,44±0,00	8,16±0,00	8,31±0,02	23,22±0,02	34,33±0,13	94,44±0,01

Le tableau (XIX) précédant, montre que le pouvoir antioxydant adifférentes concentrations testés, est plus important pour l'acides ascorbique comparent aux extraits. On observe à une concentration de 500µg/ml le pouvoir réducteur enregistré pour l'acide ascorbique est de 100±0,00% suivi par l'extraits aqueux de *Smilax aspera* avec un pouvoir de 94,44±0,01%. Concernent les autres extraits, ils sont classés comme suit : Extrait aqueux de *Pulicaria odora* avec un pouvoir réducteur de 92,3±0,13 %, extrait éthanolique de *Smilax aspera* avec un pouvoir réducteur de l'ordre de 80,33±0,23 % et enfin l'extrait éthanolique de *Pulicaria odora* avec un pouvoir réducteur de 78,02±0,03%.

D'après les résultats illustrés dans le tableau XIX on a pu tracer des courbes de régressions pour l'acide ascorbique et pour les différents extraits (annexe2), qui serte a déterminé les IC 50 des extraits et de l'acide ascorbique, les résultats obtenu par ces courbes sont mentionné dans le tableau XX.

Tableau XX: Les différentes concentrations inhibitrices (IC 50) des extraits et de l'acide ascorbique.

		IC 50 µg/ml
	Acide ascorbique	31,91±0,71
<i>Pulicaria odora</i>	Aqueux	181,01±0,36
	Ethanolique	216,26±0,36
<i>Smilax aspera</i>	Aqueux	281,14±0,07
	Ethanolique	236,83±0,36

D'après les résultats du tableau XX, on observe que l'acide ascorbique donne une concentration de 31,91±0,71µg/ml qui est la concentration la plus faible enregistré puis suivie par les autres extraits avec des concentrations plus au moins élevés qui sont 181,01±0,36µg/ml, 216,26±0,36µg/ml, 236,83±0,36µg/ml, 281,14±0,07µg/ml pour les extraits aqueux de *Pulicaria odora*, extrait éthanolique de *Pulicaria odora*, extrait éthanolique de *smilax aspera* et extrait aqueux de *smilax aspera* respectivement.

L'activité réductrice d'un composé phénolique est lié à sa capacité de transfert d'électron et peut donc, servir d'indicateur significatif de son activité antioxydant (AJILA *etal.*, 2007).

L'étude rapportée sur *Pistacialentiscus* faite par IRATNI *et al.* (2015), a démontré que le pouvoir réducteur de cette plante lors de l'extraction aqueuse est beaucoup plus importants comparé aux résultats obtenus pour nos deux extraits aqueux (*Pulicaria odora* et *Smilax aspera*).

#### VI.4.2. La méthode de piégeage du radical libre DPPH

Le radical DPPH (2,2- diphenyl-1-picryl-hydrazyl) est couramment utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des substances naturelles et cela dû à sa stabilité et sa simplicité d'utilisation, le teste de DPPH permet d'avoir des résultats fiables concernant la capacité antioxydant des composé testés.

Le test de piégeage du radical libre DPPH consiste à ce que la couleur violet change vers la couleur jaune en présence des antioxydants dans le milieu réactionnel afin de mesuré l'absorbance a un une longueur d'onde de l'ordre de 517nm, dont laquelle le DPPH absorbe au maximum. (JOTHY *et al.*, 2011).

Tableau XXI : Le pourcentage de piégeage du radical libre DPPH (RSA %) par l'acide ascorbique et les extraits aqueux des deux plantes *Pulicaria odora* et *Smilax aspera*.

Concentration en µg/ml	80	100	120	140	160	180	200
Acide ascorbique	47,8±0.07	52,5±0.02	56±0.01	59,9±0.04	70,2±0.05	85,8±0.02	90,1±0.04
<i>Pulicaria odora</i>	49,22±0.03	50,05±0.06	50,38±0.05	50,71±0.07	51,04±0.02	51,37±0.04	51,7±0.02
<i>Smilax aspera</i>	20,4±0.05	21,57±0.08	22,75±0.04	23,92±0.09	25,09±0.01	26,26±0.08	27,43±0.01

Le tableau XXI mentionne le pourcentage de piégeage du radical libre DPPH par l'acide ascorbique et les extraits aqueux de *Pulicaria odora* et *Smilax aspera*.

Le test de piégeage du radical libre DPPH par l'acide ascorbique a donné un pourcentage de 90,1±0.04% à une concentration de 200 µg/ml, alors que ce qui concerne nos extraits à cette concentration on remarque que le pourcentage de piégeage enregistré dans le cas de l'extrait

aqueux de *Pulicaria odora* est de l'ordre de  $51,70 \pm 0,02\%$  et celui de l'extrait aqueux de *Smilax aspera* est l'ordre de  $27,43 \pm 0,01\%$ .

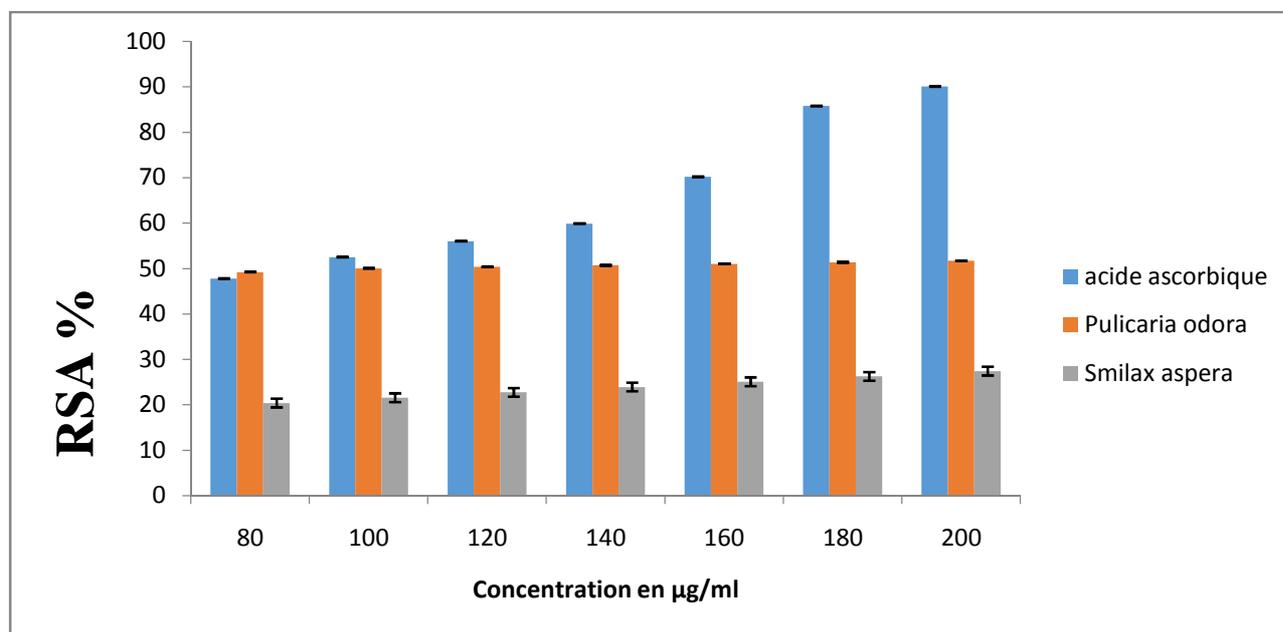


Figure 21 : Histogramme du pourcentage de piégeage du radical libre DPPH par l'acide ascorbique et l'extrait aqueux des deux plantes *Pulicaria odora* et *Smilax aspera*.

On remarque d'après la figure 21 que le pourcentage de piégeage du DPPH augmente en augmentant la concentration des extraits donc la concentration en éléments antioxydants est augmentée dans le milieu réactionnel. D'après les résultats du pourcentage de piégeage du radical libre DPPH, des courbes de régressions ont été établies pour l'acide ascorbique et pour les deux extraits aqueux des deux plantes (annexe 2) afin de déterminer les concentrations efficaces pour réduire 50 % de DPPH (IC 50) qui sont illustrées dans le tableau XXIII

Tableau XXIII : Les concentrations efficaces pour réduire 50% de DPPH par l'acide ascorbique et les extraits aqueux de *Pulicaria odora* et *Smilax aspera*.

Les différents extraits	IC 50 en µg/ml
Acide ascorbique	$96,74 \pm 0,07$
<i>Pulicaria odora</i>	$106,56 \pm 0,05$
<i>Smilax aspera</i>	$585,49 \pm 0,01$

L'IC50 enregistré pour l'acide ascorbique est de l'ordre de  $96,74 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$  qu'est inférieur par rapport à l'IC50 enregistré pour nos extraits (*Pulicaria odora* et *Smilax aspera*), ces dernière sont ordonnés comme suite :  $106,56 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$ ,  $585,49 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$  pour les extraits aqueux de *Pulicaria odora* et *Smilax aspera*, respectivement.

On remarque que l'IC50 enregistré pour l'extrait aqueux de *Pulicaria odora* est proche de celle de l'acide ascorbique alors que celle enregistrée pour l'extrait aqueux de *Smilax aspera* est plus élevé donc l'extrait aqueux de *Pulicaria odora* présente un pouvoir antioxydant plus élevé que celui de *Smilax aspera*.

La capacité antioxydante des composé phénolique est associe à la disponibilité de ces dernier qui agissent entant que piègeurs de radicaux libres (PROESTOS et *al.*, 2013)

Un extrait possédant un composé phénolique qui contient un grand nombre de groupes hydroxyle a une activité antioxydant élevé (ARABSHAHI et *al.*, 2007).

## **VI.5. Activité antimicrobienne**

### **VI.5.1. Résultats des tests de vérification des souches bactériennes**

Après coloration de Gram, les caractères morphologiques des souches étudiées sont représenté dans le tableau suivant :

Tableau XXIV : Caractères morphologiques des souches bactériennes étudiés.

	Souches bactériennes	Milieu de culture	Type de Gram	Aspect microscopique
Souches référenciées	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gélose chapman	Gram positif	Cocci en grappe de raisin
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gélose Hecktöen	Gram négatif	Coccobacilles
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	Gélose nutritive	Gram positif	Bacilles
	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	Gélose nutritive King A	Gram négatif	Bacilles
Souches d'origine clinique	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gélose Chapman	Gram positif	Cocci en grappe de raisin
	<i>Escherichia coli</i>	Gélose Hecktöen	Gram négatif	Coccobacilles
	<i>Acinetobacterbaumannii</i>	Gélose Hecktöen	Gram négatif	Bacilles
	<i>Klebsiellapneumoniae</i>	Gélose Hecktöen	Gram négatif	Coccobacilles

Remarque : en ce qui concerne la souche *Bacillus cereus* ATCC 10876, elle nous a été fournis dans son milieu sélectif (purifiée) donc juste une coloration de Gram a été effectuée.

**VI.5.2. Résultats des témoins réalisés par la méthode de diffusion sur gélose**

**VI.5.2.1. Résultats des témoins négatifs réalisés avec le DMSO**

La figure suivante représente les différents témoins négatif réalise avec le DMSO

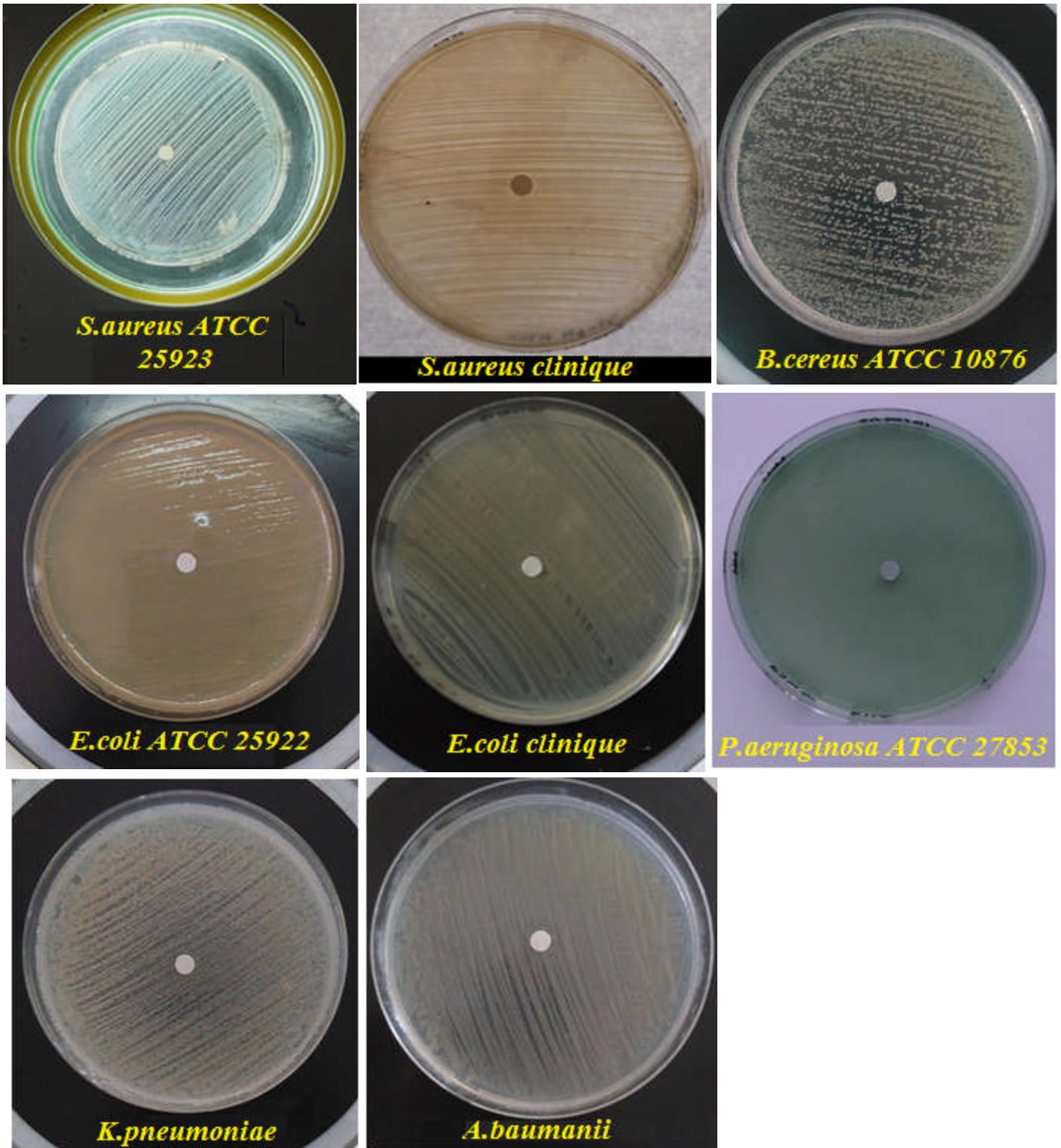


Figure 22 : Représentation des témoins négatifs des différentes souches bactériennes testées.

A partir de la figure ci-dessus on déduit que le DMSO est inerte vis-à-vis de l'activité antibactérienne vu qu'il ne présente aucun effet sur les souches testées.

#### **VI.5.2.2. Résultats des témoins positifs (antibiogramme)**

Pour la réalisation des témoins positifs nous avons utilisé des antibiotiques (ATB) approprié pour chaque souche microbienne dont le choix est basé sur la fréquence de leur utilisation dans le milieu hospitalier ainsi que la souche bactérienne. La figure suivante résume l'ensemble des témoins positifs

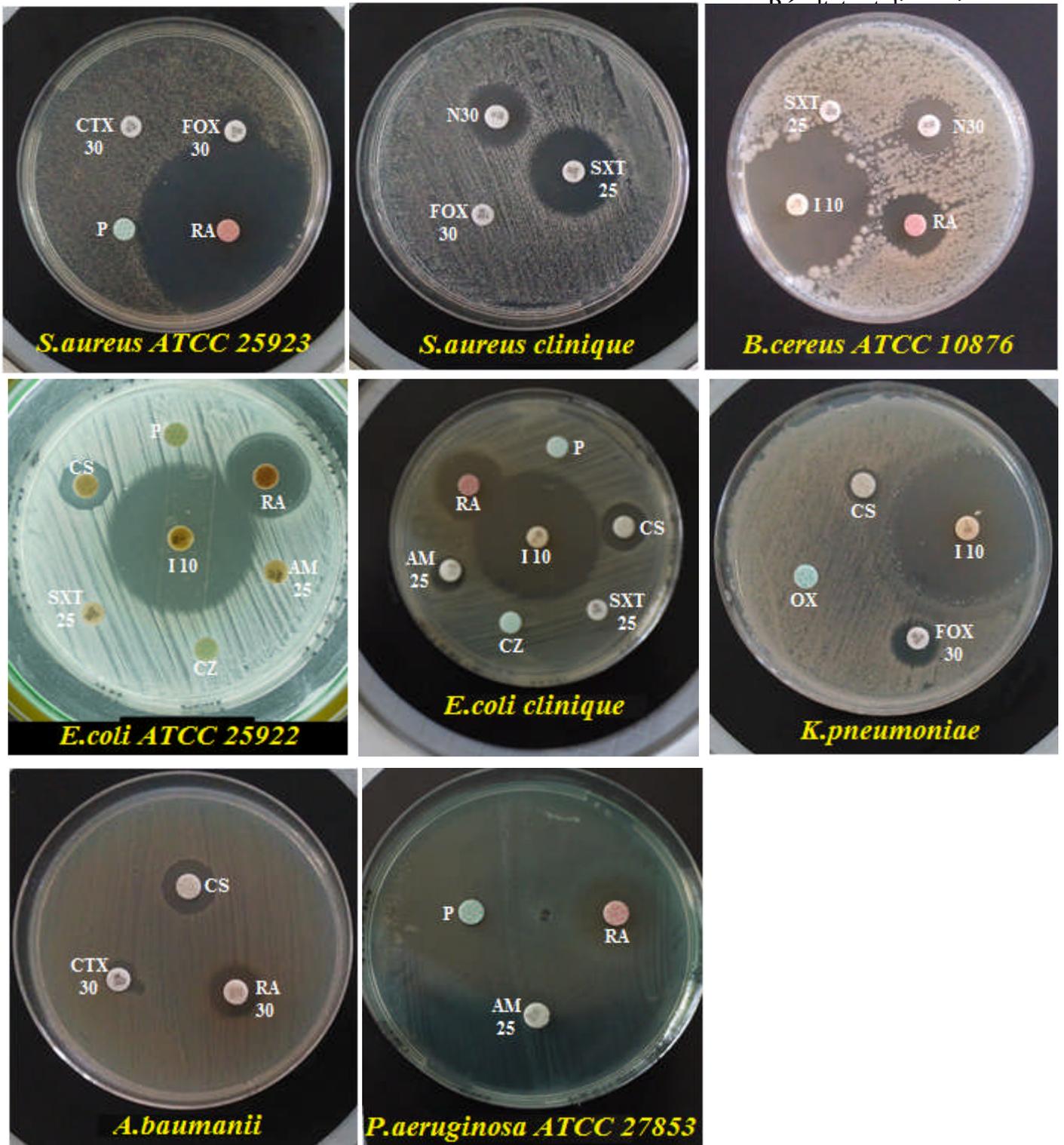


Figure 23 : Sensibilités des souches bactériennes testées vis-à-vis des antibiotiques utilisés : Céfoxitine (Fox 30), Imipenème (I10), Rifampicine (RA), Oxacilline (OX), Sulfaméthoxazole / Triméthoprime (SXT 25), Néomycine (N30), Céfotaxime (CTX 30), Benzylpénicilline (P), Colistine (CS), Céfazoline (CZ), Ampicilline (AM 25).

Le tableau qui suit résume l'ensemble des diamètres d'inhibition ainsi que la sensibilité ou résistance des souches bactérie vis-à-vis des ATB.

Tableau XXV : Diamètres des zones d'inhibition des témoins positifs.

	Souche bactériennes	Les antibiotiques utilisés et le diamètre des zones d'inhibition en mm										
		RA	I	SXT	N	FOX	CTX	P	CS	CZ	AM	OX
souches référencées	<i>E. coli</i> ATCC 25922	22	38	6	NT	NT	NT	6	14	6	6	NT
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	54	NT	NT	NT	14	6	6	NT	NT	NT	NT
	<i>Bacillus Cereus</i> ATCC10876	20	40	6	17	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	18	NT	NT	NT	NT	NT	6	NT	NT	6	NT
Souches d'origine cliniques	<i>E. coli</i>	20	40	6	NT	NT	NT	6	14	6	10	NT
	<i>S. aureus</i>	NT	NT	25	16	6	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	<i>K. pneumoniae</i>	NT	40	NT	NT	10	NT	NT	07	NT	NT	6
	<i>Acinétobacterbau manii</i>	13	NT	NT	NT	NT	9	NT	14	NT	NT	NT

NT : non-testé

- Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des zones d'inhibition.

D'après le tableau XXV on constate qu'il existe une différence dans la résistance ou la sensibilité des souches aux ATB et cette différence est en fonction de la souche et de l'ATB utilisé ; par exemple : *S. aureus*ATCC 25923est extrêmement sensible à la Rifampicine avec un diamètre d'inhibition de 54mm, mais résistante aux ATB suivants : Céfotaxime et Benzylpénicilline.

Mais de façon général, on remarque que presque toutes les souches sont sensibles à l'Impineme et la Rifampicine et résistantes à la Benzylpénicilline.

**VI.5.3. Résultats de l'activité antibactérienne des extraits aqueux des deux plantes (*Pulicaria odora* et *Smilax aspera*)**

Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits aqueux de nos deux plantes (*Pulicaria odora* et *Smilax aspera*), nous avons testés différentes concentrations (500 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml et 10000 µg/ml).

**VI.5.3.1. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de *Pulicaria odora*.**

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de *Pulicaria odora* sont illustrés dans les figures suivantes :

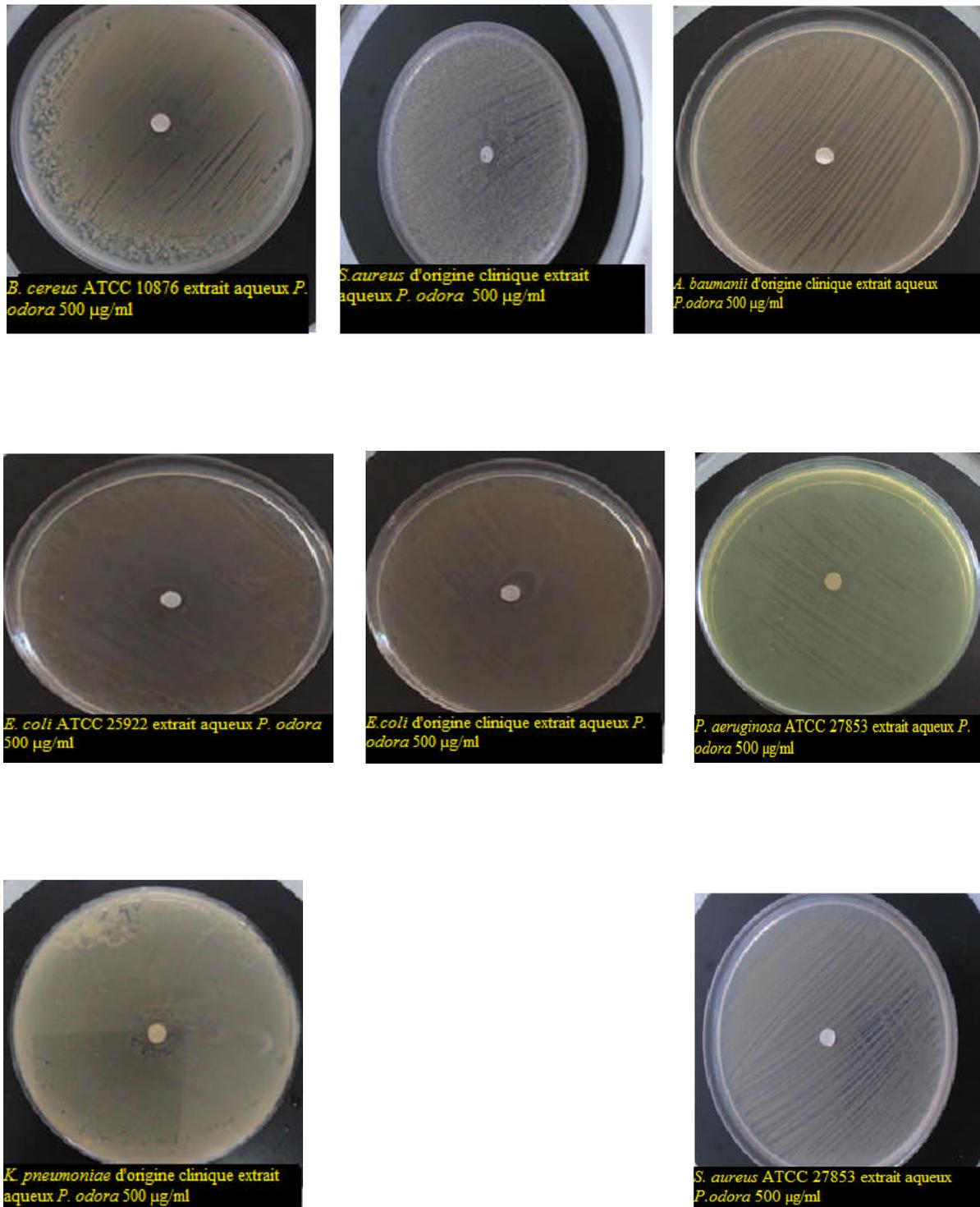


Figure 24 : Photos des tests de sensibilités des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait aqueux de *Pulicaria odora* à une concentration de 500µg/ml.

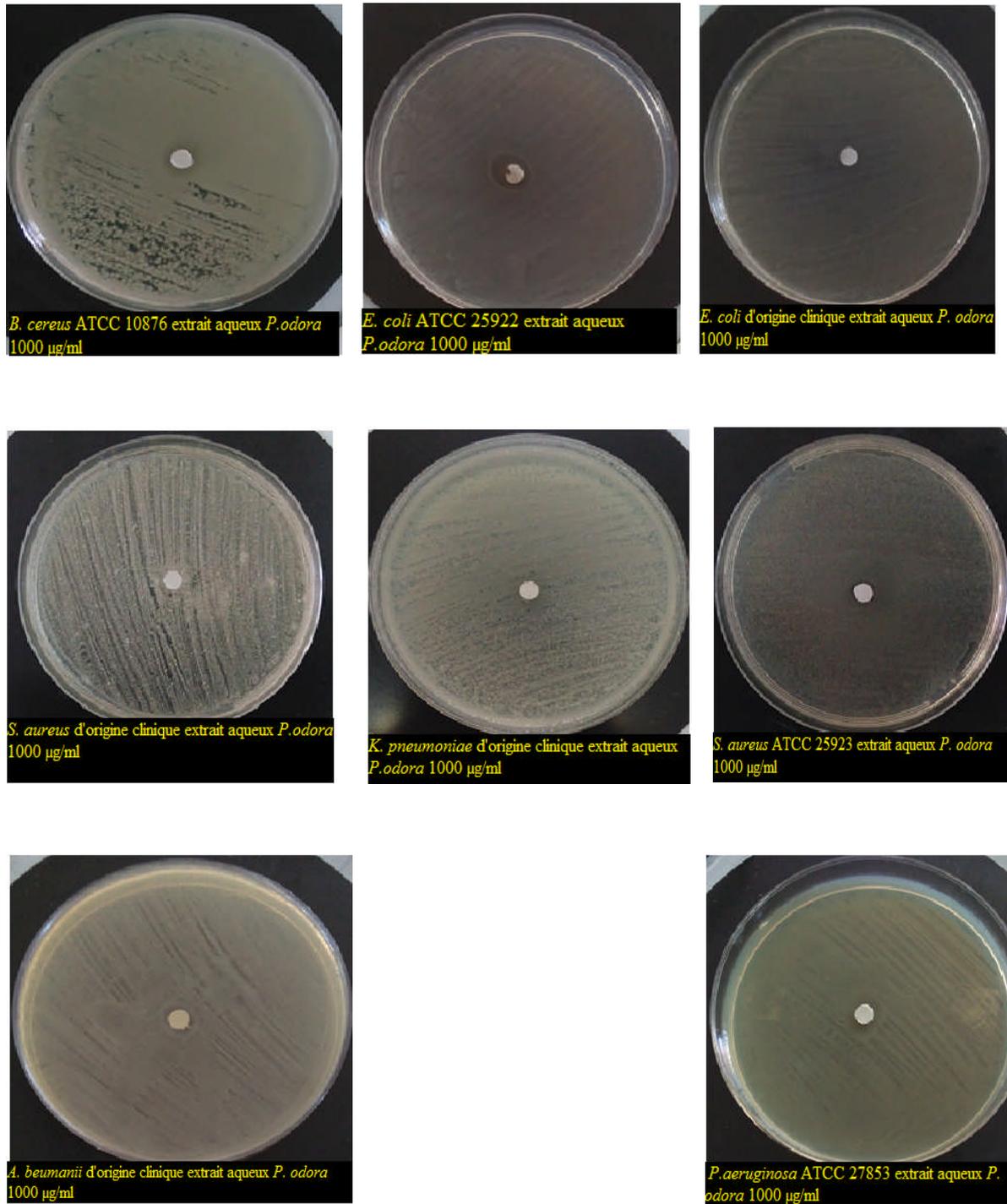


Figure 25 : Photos des tests de sensibilités des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait aqueux de *Pulicaria odora* à une concentration de 1000µg/ml.

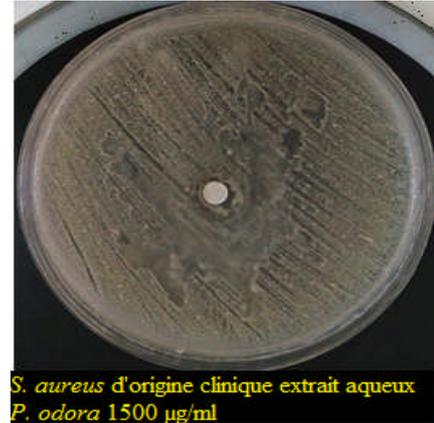
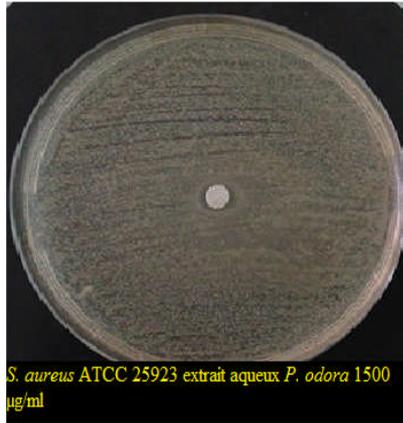


Figure 26 : Photos des tests de sensibilités des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait aqueux de *Pulicaria odora* à une concentration de 1500µg/ml.

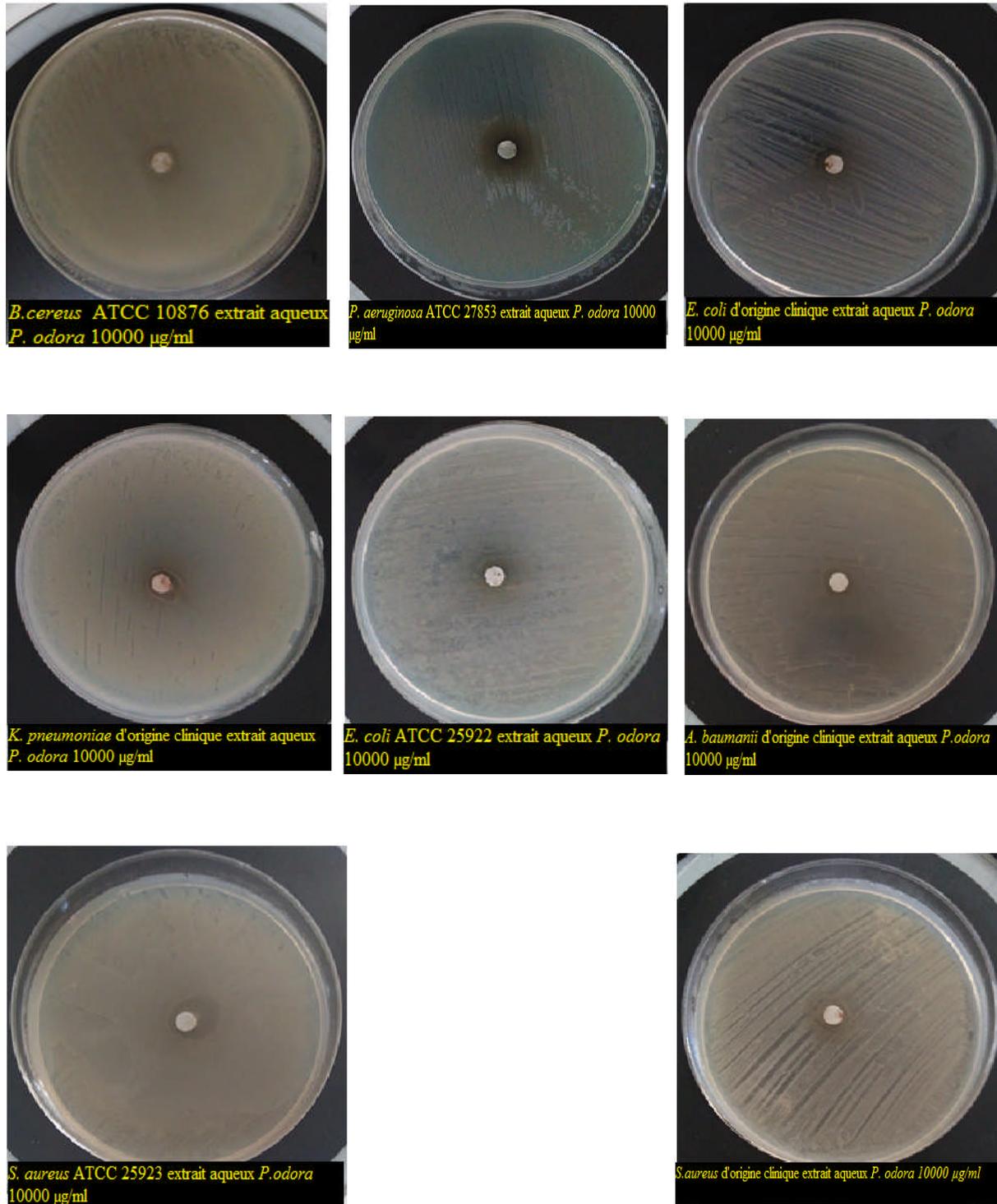


Figure 27 : Photos des tests de sensibilités des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait aqueux de *Pulicaria odora* à une concentration de 10000µg/ml

Les différents diamètres des zones d'inhibition de l'extrait aqueux de *Pulicaria odora* sur les souches testés sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau XXVI : Les diamètres des zones d'inhibition en mm obtenue sur les différentes souches par l'extrait aqueux de *Pulicaria odora*.

	<i>Pulicaria odora</i>			
	Concentration en µg/ml			
Souches testés	500	1000	1500	10000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6±0,00	7±0,00	8±0,00	14±2,82
<i>Staphylococcus aureus</i> (clinique)	6±0,00	6±0,00	9,5±0,70	10,5±0,70
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11,5±3,53	10,5±0,70	NT	13±0,00
<i>Escherichia coli</i> (clinique)	18,5±4,49	10±0,00	NT	11,5±0,70
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	10±0,00	10±0,00	NT	11,5±2,12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12±0,00	12±2,12	NT	14±4,24
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6±0,00	13±1,41	NT	10±0,00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10±1,41	6±0,00	NT	11±0,00

D'après le tableau XXVI On remarque que la concentration de l'extrait peut influencer ou pas sur l'activité.

En effet, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 est sensible à l'extrait aqueux de *Pulicaria odora* à une concentration de 10000 µg/ml avec un diamètre de 14±2,82mm, mais ce diamètre diminue avec la diminution de la concentration car la souche est toujours sensible à une concentration de 1500 µg/ml mais le diamètre est de 8±0,00 mm, or que pour les deux

concentrations 500 µg/ml et 1000 µg/ml la souche est résistante. Et *Staphylococcus aureus* clinique est toujours sensible à de forte concentration (10000 µg/ml le diamètre est de 10,5±0,70 mm et pour 1500 µg/ml le diamètre est de 9,5±0,70 mm) de l'extrait aqueux de *Pulicaria odora* et résistante aux faibles concentrations (500 µg/ml et 1000 µg/ml)

Même résultats a été constaté pour *Escherichia coli* ATCC 25922, dont les diamètres des zones d'inhibition évoluent avec l'élévation de la concentration de l'extrait, allant de 11,5±3,53mm pour 500 µg/ml jusque a 13±0,00 mm pour 10000 µg/ml.

Rajoutant aux souches cité précédemment, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dont la concentration de l'extrait corrèle avec le diamètre d'inhibition en effet ce dernier varie de 10mm à 500 µg/ml jusque a 11,5±2,12mm à 10000 µg/ml pour la 1<sup>ère</sup> souche et de 12mm à 500 µg/ml jusque a 14±4,24 à 10000µg/ml pour la 2<sup>ème</sup> souche.

Par contre avec *Escherichia coli* clinique on a obtenu des résultats contradictoire a ceux cité précédemment car avec une faible concentration de 500 µg/ml le diamètre de la zone d'inhibition est de 18,5±4,49mm par contre avec l'élévation de la concentration ce diamètre diminue atteignant 11,5±0,70 mm pour 10000 µg/ml

Le même cas de figure a été observé pour les deux souches suivante *Acinetobacter baumannii* et *Klebsiella pneumoniae* pour lesquelles on remarque que la concentration de l'extrait n'a pas d'influence complémentaire au diamètre enregistré qui est de 6±0,00 mm à 500 µg/ml , puis augmente jusque a 13±1,41mm pour 1000 µg/ml et diminue un nouveaux pour 10000 µg/ml jusque a 10mm , pour la 1<sup>ère</sup> souche. Et aussi pour la 2<sup>ème</sup> souche dont les diamètres sont de 10±1,41mm à 500 µg/ml puis aucune inhibition n'a été enregistrée à 1000 µg/ml et en fin 11mm pour 10000 µg/ml

Ces résultats obtenus peuvent être dus à des erreurs de manipulation malgré que ce test a été refait trois fois avec des souches purifiées et des extraits non contaminés ainsi que dans des conditions de travail aseptiques au maximum (selon les moyens du laboratoire), comme on peut supposer aussi que ces extraits possèdent une dose efficace pour ces souches citées précédemment, dont l'efficacité diminue au s'annule complètement au-dessus ou au-dessous de cette dose. Les molécules bioactives (celles possédant un effet antibactérien) peuvent être présentes à de faible concentration comparant ou autre constituant ce qui peut contribuer à l'inhibition de leur activité lors de l'augmentation des concentrations à l'issue d'un antagonisme.

L'étude réalisée par EZOUBEIRI *et al.* (2005), sur l'huile essentielle de *Pulicaria odoraa* montré une très bonne activité sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 qui est de 20mm, cette valeur est supérieure à celle enregistré pour l'extrait aqueux de *Pulicaria odora*. Par contre concernant *Escherichia coli* ATCC 25922 dont la valeur du diamètre est de 10mm, et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 avec un diamètre nul, ne concorde pas avec notre extrait car notre activité est meilleure.

Les résultats obtenus par HANBALI *et al.* (2005), lors de son étude sur l'huile essentielle de *Pulicaria odora* ont démontré que cette dernière possède une très bonne activité sur *Bacillus cereus* dont le diamètre est de 30mm. Cette activité est supérieure à la nôtre mais dans notre cas il s'agit de *Bacillus cereus* ATCC 10876.

Concernant l'activité obtenue sur *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* par la même huile essentielle dont les diamètres des zones sont moyenne, l'activité de notre extrait est supérieure dans certaine concentration.

#### **VI.5.3.2. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de *Smilax aspera*.**

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de *Smilax aspera* sont illustrés dans les figures suivantes :

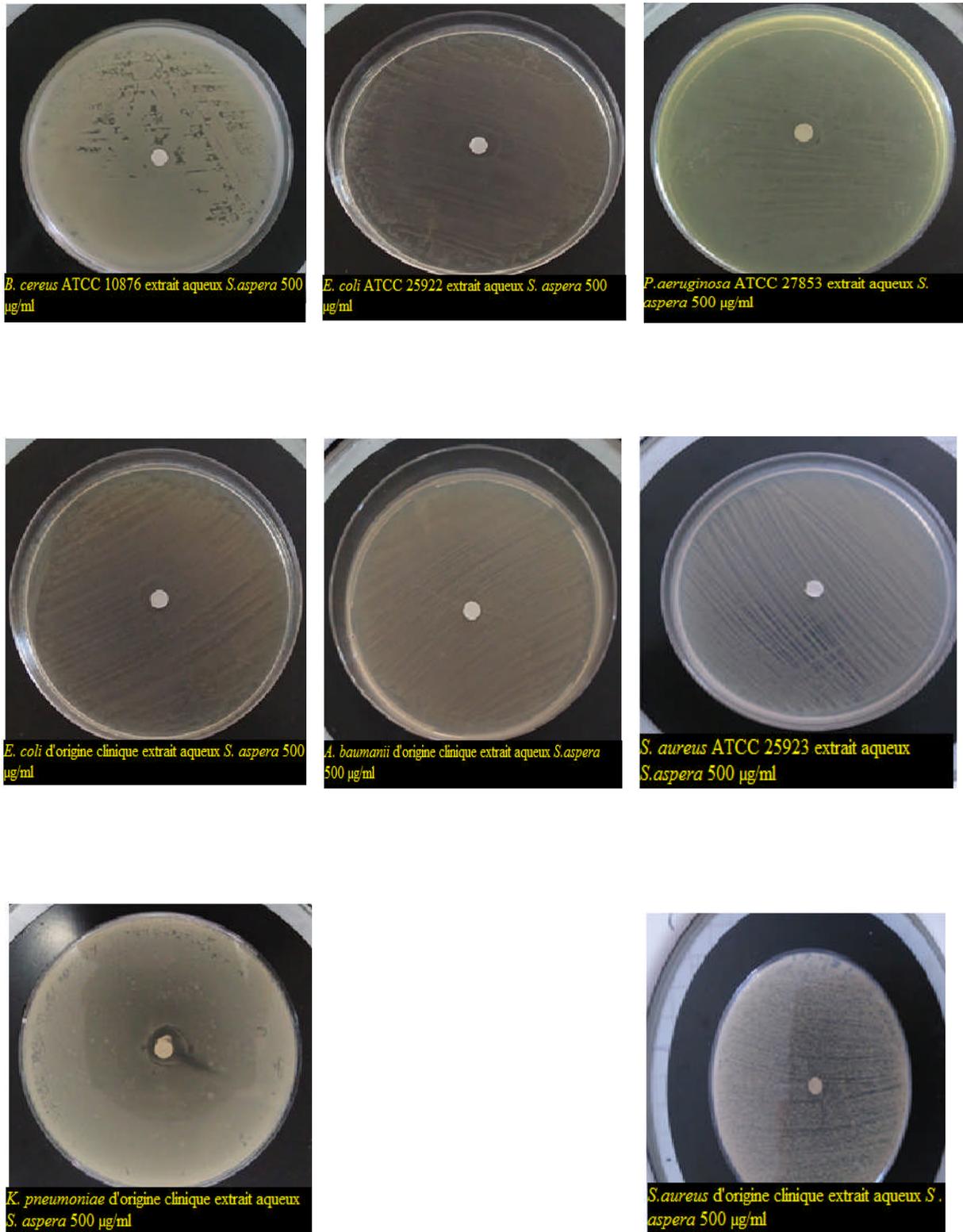


Figure 28 : Photos des tests de sensibilités des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait aqueux de *Smilax aspera* à une concentration de 500µg/ml.

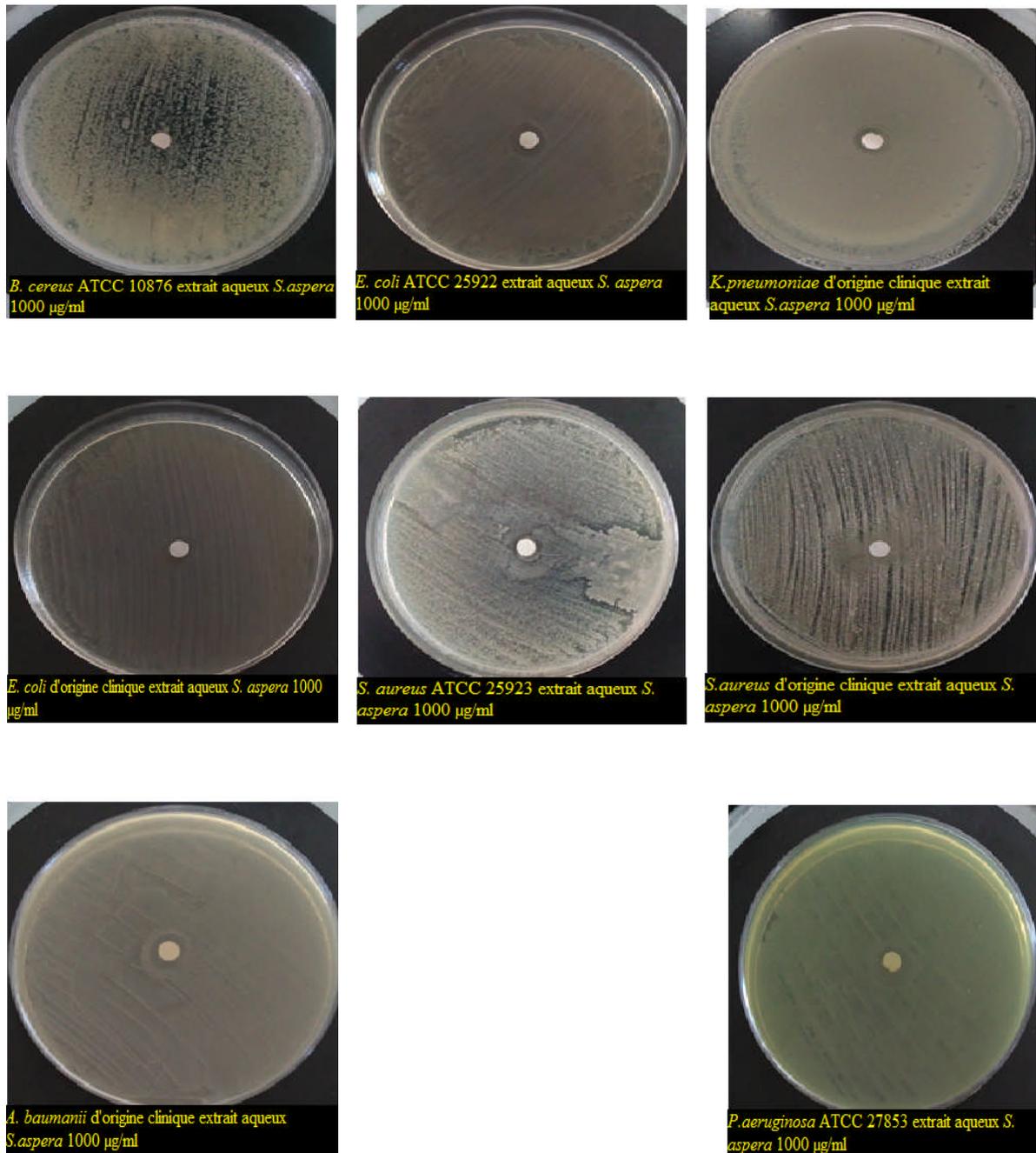


Figure 29 : Photos des tests de sensibilités des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait aqueux de *Smilax aspera* à une concentration de 1000µg/ml



*S. aureus* d'origine clinique extrait aqueux  
*S. aspera* 1500 µg/ml



*S. aureus* ATCC 25923 extrait aqueux  
*S. aspera* 1500 µg/ml

Figure 30 : Photos des tests de sensibilités des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait aqueux de *Smilax aspera* à une concentration de 1500µg/ml.

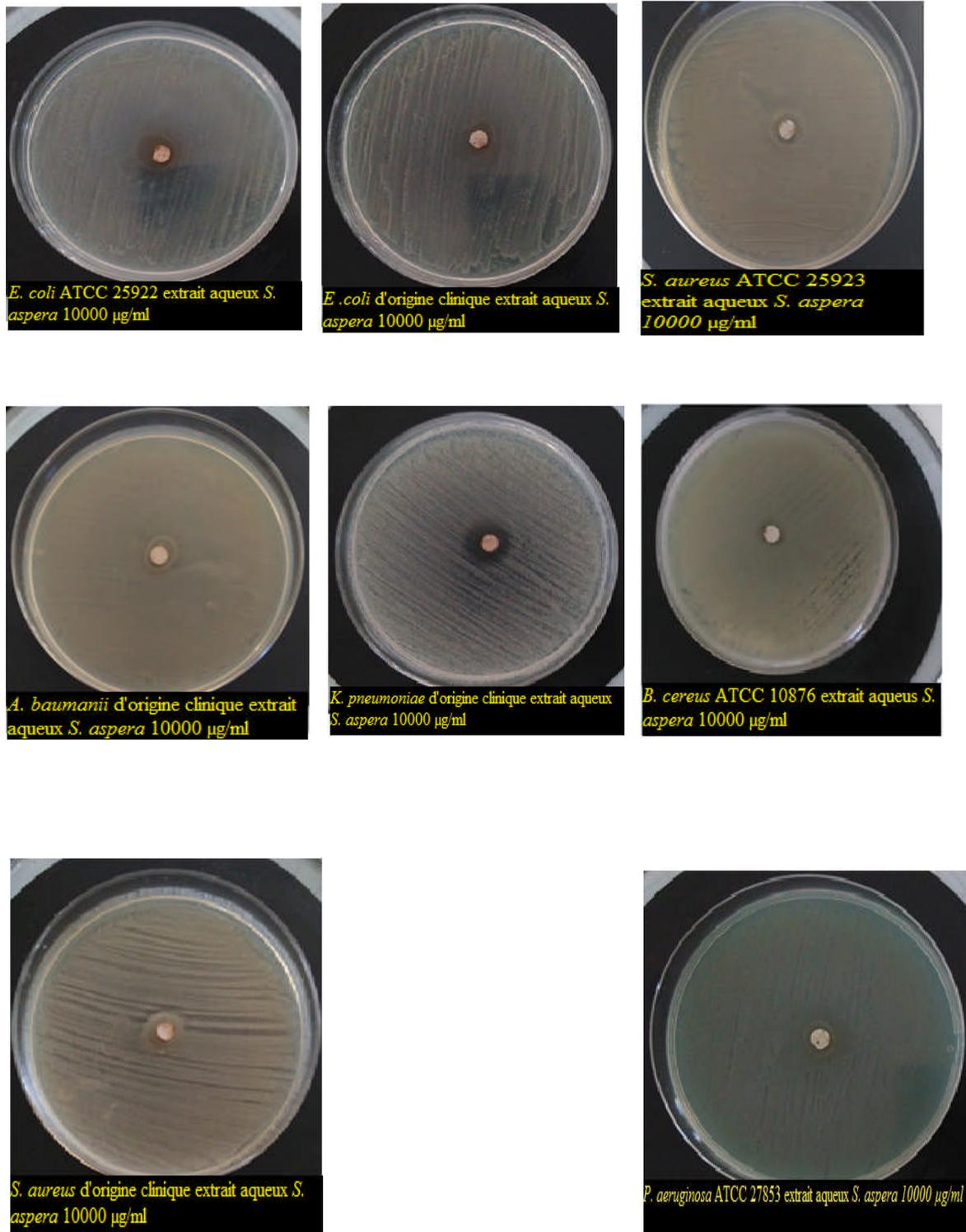


Figure 31 : Photos des tests de sensibilités des souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait aqueux de *Smilax aspera* à une concentration de 10000µg/ml.

Les diamètres des zones d'inhibition de l'extrait aqueux de *Smilax aspera* sur les souches bactériennes testés sont indiqués dans le tableau suivant :

Tableau XXVII : Diamètres des zones d'inhibition en mm sur les souches testés de l'extrait aqueux de *Smilax aspera*.

Souches testés	<i>Smilax aspera</i>			
	Concentration en µg/ml			
	500	1000	1500	10000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6±0,00	9,5±0,70	12±0,00	13±0,00
<i>Staphylococcus aureus</i> (clinque)	6±0,00	12±0,00	17,5±3,53	12±0,00
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10±1,41	10,5±0,70	NT	12±0,00
<i>Escherichia coli</i> (clinique)	12±2,82	12±0,00	NT	13±0,00
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	6±0,00	6±0,00	NT	10±0,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12±2,12	12±1,41	NT	13,5±0,70
<i>Acinetobacter baumannii</i>	8±0,00	13±2,82	NT	16±3,53
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12.5±0,70	11.5±0,70	NT	16±0,00

L'extrait aqueux de la 2<sup>ème</sup> plante *Smilax aspera* a été testé sur les mêmes souches cités précédemment et les résultats obtenus sont les suivants :

D'après les résultats du tableau XXVII nous pouvons dire que le diamètre des zones d'inhibition varie positivement en fonction de la concentration de l'extrait, donc ce dernier influence sur les souches testés, et l'intensité de la réponse 'inhibition' est proportionnelle à

la dose de l'extrait. En effet *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ne présente aucune sensibilité à 500 µg/ml, et elle est sensible aux autres concentrations testées (9,5±0,70 mm à 1000 µg/ml, 12±0,00 mm à 1500 µg/ml et 13±0,00 mm à 10000 µg/ml). Cela est constaté aussi pour le reste des souches telles que *Escherichia coli* ATCC 25922 qui est sensible avec des diamètres des zones d'inhibition allant de 10±1,41mm à 500 µg/ml jusque a 12±0,00 mm à 10000 µg/ml, ainsi que *Escherichia coli* clinique (12±2,82mm à 500 µg/ml et 13mm à 10000 µg/ml). Citant aussi *Bacillus cereus* ATCC 10876 qui est juste sensible à 10000 µg/ml avec un diamètre de 10mm ; et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dont les diamètres sont de 12±2,12mm à 500 µg/ml, 12±1,41mm à 1000 µg/ml et 13,5±0,70 mm à 10000 µg/ml. En fin *Acinetobacterbaumannii* qui est très sensible à 10000 avec un diamètre de 16±3,53mm et juste sensible au plus faible concentration (8±0,00mm à 500 µg/ml et 13±2,82 à 1000 µg/ml) ainsi que *Klebsiella pneumoniae* qui est très sensible à 10000 µg/ml dont on enregistre un diamètre de 16mm.

D'après l'étude fait par IRATNI *et al.* (2015), sur l'activité antibactérienne de *Pistacialentiscusa* qu'a démontré que les diamètres d'inhibition enregistré pour *E. coli*, *S. aureus* et *K.pneumoniae* sont inférieur par rapport aux diamètres enregistré par l'extrait aqueux de *Smilax aspera*.

Le tableau suivant montre l'ensemble des diamètres des zones d'inhibition enregistré pour les extraits aqueux des deux plantes *Pulicaria odora* et *Smilax aspera* :

Tableau XXVIII : Les différents diamètres des zones d'inhibition des extraits aqueux des deux plantes *Pulicaria odora* et *Smilax aspera* en mm sur les souches testées.

Microorganisme testés	Concentration des extraits en µg/ml							
	<i>Pulicaria odora</i>				<i>Smilax aspera</i>			
	500	1000	1500	10000	500	1000	1500	10000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6±0,00	7±0,00	8±0,00	14±2,82	6±0,00	9,5±0,70	12±0,00	13±0,00
<i>Staphylococcus aureus</i> (clinique)	6±0,00	6±0,00	9,5±0,70	10,5±0,70	6±0,00	12±0,00	17,5±3,53	12±0,00
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11,5±3,53	10,5±0,70	NT	13±0,00	10±1,41	10,5±0,70	NT	12±0,00
<i>Escherichia coli</i> (clinique)	18,5±4,49	10±0,00	NT	11,5±0,70	12±2,82	12±0,00	NT	13±0,00
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	10±0,00	10±0,00	NT	11,5±2,12	6±0,00	6±0,00	NT	10±0,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATC C 27853	12±0,00	12±2,12	NT	14±4,24	12±2,12	12±1,41	NT	13,5±0,70
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6±0,00	13±1,41	NT	10±0,00	8±0,00	13±2,82	NT	16±3,53
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10±1,41	6±0,00	NT	11±0,00	12,5±0,70	11,5±0,70	NT	16±0,00

En comparant les résultats obtenus lors du test antibactérien des deux extraits aqueux des deux plantes '*Pulicaria odora*' et '*Smilax aspera*' récapitulé dans le tableau XXVIII nous constatant que les deux extraits possèdent un effet antibactérien qui varie généralement en fonction de la souche ainsi que la concentration de l'extrait. N'est ou moins on peut citer que l'extrait aqueux de *Smilax aspera* a donné des résultats plus appréciable que l'extrait aqueux de *Pulicaria odora* sur la majorité des souches et l'ensemble des concentrations testées, à l'exception de *Bacillus cereus* ATCC 10876 qui plus sensible à l'extrait aqueux de *Pulicaria odora*.

### VI.5.3. Analyse statistique

A une concentration de 500 µg/ml le teste d'ANOVA a révélé une différence significative due aux différentes souches bactériennes testées, alors que ce qui concerne les extraits des deux plantes ils ont aucune influence sur l'activité antibactérienne, et l'assemblage entre ces deux facteurs a donné une p-value < 0.05, donc une différence significative existe. Le teste Newman Keuls les a classé en deux groupes homogène (annexe 3).

A une concentration de 1000 µg/ml le teste d'ANOVA a donné une p-value < 0.05 avec les trois variations (souches bactérienne testées, extrait aqueux des deux plantes et leurs association) donc à cette concentration les différentes variations influencent sur l'activité antibactérienne. Le teste Newman Keuls les a classé en quatre groupes homogène(annexe 3).

Dans le cas des *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* clinique, en plus des deux concentrations cité précédemment on a testé une concentration de 1500 µg/ml, dans ce cas le teste d'ANOVA a donné une p-value < 0,05 avec les variations suivant : Souches bactérienne testées et extrait de la plante, or que leurs association a donné avec le teste d'ANOVA une p- value > 0.05 donc il existe aucune différence significative. Le teste Newman Keuls les a classé en deux groupes homogène(annexe 3).

Le teste d'ANOVA dans le cas dont on a testé une concentration de 10000 µg/ml sur les souches bactériennes a donné une p-value >0,05 donc statistiquement il n'existe aucune différence significative, c.-à-d. le type de l'extrais n'a pas pu influencer l'activité antibactérienne, la nature des souches testées et leurs association (annexe 3).

**VI.5.4. Activité antifongique des deux extraits aqueux et éthanolique des deux plantes ‘*Pulicaria odora*’ et ‘*Smilax aspera*’**

**VI.5.4.1. Confirmation de la pureté de la souche fongique « *Aspergillus niger* »**

Afin de confirmer la pureté de la souche fongique « *Aspergillus niger* » nous nous sommes basés sur deux caractères : L’aspect macroscopique et l’aspect microscopique

- L’aspect macroscopique : Après avoir cultivé la souche sur milieu Sabouraud, nous avons eu recours à l’observation de l’aspect du mycélium de la souche, la surface et la consistance de la colonie ainsi que le revers de la boîte.
- L’aspect microscopique : Résumé en l’observation de la forme du thalle et des spores.

Le tableau suivant résume l’ensemble des résultats enregistrés après observation macroscopique et microscopique de la souche « *Aspergillus niger* »

Tableau XXIX : Les caractères macroscopique et microscopique d’*Aspergillus niger*.

<i>Aspergillus niger</i>	
Caractères macroscopiques	Caractères microscopiques
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Présence d’un mycélium aérien à couleur progressive : blanc, puis jaune et enfin noir ;</li> <li>- Revers des colonies : jaune pâle pour les colonies jeunes, brun pour les colonies adultes ;</li> <li>- Aspect des colonies : poudreuses, duveteuses à granuleuse.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Thalle à mycélium cloisonné ;</li> <li>- Têtes aspergillaires (spécificité du genre <i>aspergillus</i>)</li> </ul>

### 2.5.4.2. Résultats des témoins réalisés par la méthode de diffusion sur gélose

#### 2.5.4.2.1. Résultats des témoins négatifs réalisés avec le DMSO pour l'extrait aqueux.



Figure 32 : Photographie des témoins négatifs des souches fongiques réalisé avec du DMSO.

- D'après les résultats obtenus (figure 32) on constate que le DMSO ne présente aucune activité antifongique vis-à-vis des deux souches testées.

#### 2.5.4.2.2. Résultats des témoins négatifs réalisés avec le DMSO et le méthanol pour l'extrait éthanolique.



Figure 33 : photographie des témoins négatifs des souches fongiques réalisé avec du DMSO et le méthanol.

- D'après les résultats obtenue (figure 33) on constate que le DMSO et le méthanol ne présente aucune activité antifongique vis-à-vis des deux souches testé.

### 2.5.4.3. Résultats des témoins positifs réalisés avec l'antifongique



Figure 34 : Photographies des témoins positifs des souches fongiques testées réalisé avec l'antifongique **Amphotéricine B Fungizone®**.

Les diamètres des zones d'inhibition enregistré après le teste antifongique sont résumé dans le tableau suivant

Tableau XXX : Résultats du test antifongique des deux souches fongiques testé.

Souche fongique	Amphotéricine B Fungizone® 10%
<i>Aspergillus niger</i>	10 mm
<i>Candida albicans</i>	12 mm

D'après les résultats illustré dans le tableau précédent on remarque que, Amphotéricine **B Fungizone®** est un antifongique faible vu les diamètres enregistré qui sont de 10mm a 12mm.

### 2.5.4.4. Sensibilité des souches fongique testées vis-à-vis des extraits (aqueux et éthanolique) des deux plantes (*Pulicaria odora* et *Smilax aspera*)

La méthode suivit pour évaluer l'activité antifongiques est la même que celle suivit lors de l'activité antibactérienne qui est la méthode de diffusion sur gélose, la seul différence est le milieu de culture utilisé qui est le sabouraud dans ce cas.

- Sensibilité des deux souches fongiques testées vis-à-vis de l'extrait aqueux de *Pulicaria odora*

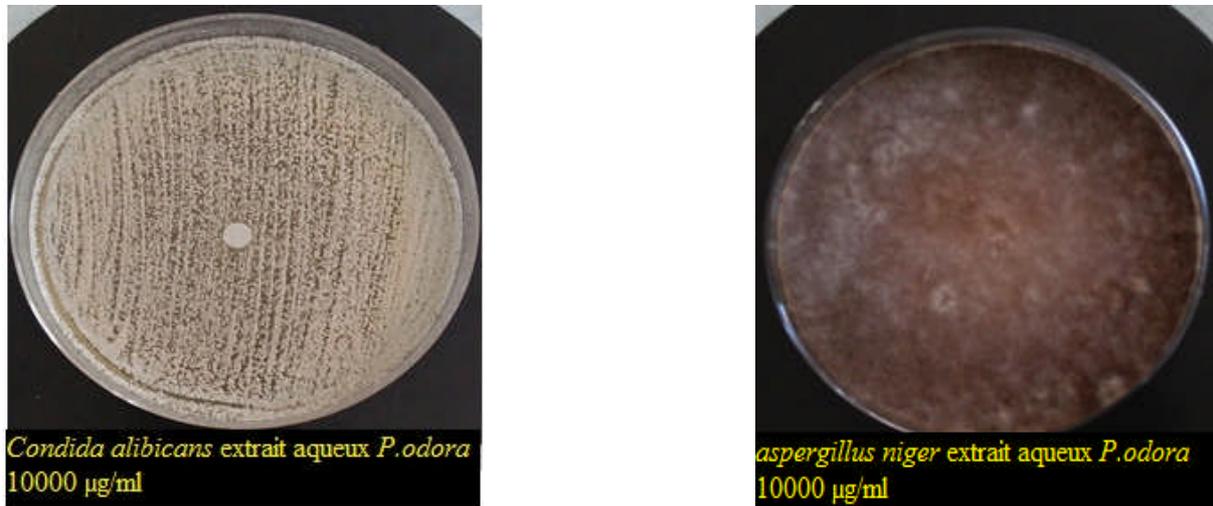


Figure35 : Photos des tests de sensibilités des souches fongiques vis-à-vis de l'extrait aqueux de *Pulicaria odora* à une concentration de 10000µg/ml.

Ces photos montre que l'extrait aqueux de *pulicaria odora* ne possède aucun effet vis-à-vis des deux souches fongiques testées '*candida albicans* et '*Aspergillus niger*'.

- Sensibilité des deux souches fongiques testées vis-à-vis de l'extrait éthanolique de *Pulicaria odora*



Figure 36 : Photos des tests de sensibilités des souches fongiques vis-à-vis de l'extrait éthanolique de *Pulicaria odora* à une concentration de 10000µg/ml.

D'après la figure 36 précédente on remarque que l'extrait éthanolique de *Pulicaria odora* donne une activité sur l'une des deux souches testées qui est *Aspergillus niger* avec un diamètre de l'ordre de 10 mm à une concentration de 10000µg/ml, et inerte vis-à-vis de la souche *candida albicans* dont on n'enregistre aucune activité.

- Sensibilité des deux souches fongiques testées vis-à-vis de l'extrait aqueux de *Smilax aspera*



Figure 37: Photos des tests de sensibilités des souches fongiques vis-à-vis de l'extrait aqueux de *Smilax aspera* à une concentration de 10000µg/ml.

Ces photos montre que l'extrait aqueux de *Smilax aspera* ne possède aucune activité vis-à-vis des deux souches fongiques testées '*candida albicans* et '*Aspergillus niger*'.

- Sensibilité des deux souches fongiques testées vis-à-vis des extraits éthanolique de *Smilax aspera*

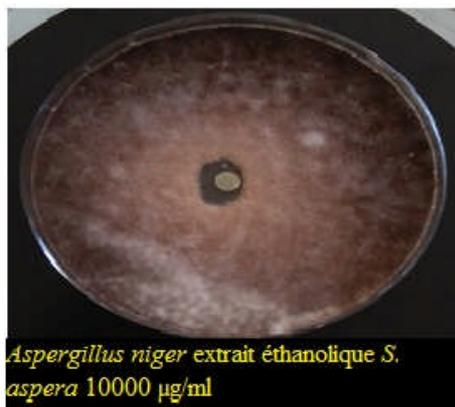


Figure38: Photos les tests de sensibilités des souches fongiques vis-à-vis de l'extrait éthanolique de *Smilax aspera* à une concentration de 10000µg/ml.

D'après la figure 38 précédente on remarque que l'extrait éthanolique de *Smilax aspera* donne une activité sur les deux souches fongiques testées, avec un diamètre des zones d'inhibitions moyen pour *Aspergillus niger* qui est de  $11,5 \pm 3,53$ , et une meilleure activité concernant *Candida albicans* avec un diamètre plus élevé de l'ordre de  $14 \pm 0,00$  mm pour une concentration de  $10000 \mu\text{g/ml}$ .

Tableau XXXI : Récapitulatif de la sensibilité des souches fongiques testées vis-à-vis des extraits (aqueux et éthanolique) des deux plantes (*Pulicaria odora* et *Smilax aspera*).

		<i>Pulicaria odora</i>		<i>Smilax aspera</i>	
Extraits		Aqueux	Ethanolique	Aqueux	Ethanolique
Cellules fongiques	Concentration en $\mu\text{g/ml}$	10000	10000	10000	10000
	<i>Aspergillus niger</i>	$6 \pm 0,00$	$10 \pm 0,00$	$6 \pm 0,00$	$11,5 \pm 3,53$
	<i>Candida albicans</i>	$6 \pm 0,00$	$6 \pm 0,00$	$6 \pm 0,00$	$14 \pm 0,00$

L'étude réalisée par EZOUBEIRI *et al.* (2005) sur l'huile essentielle de *Pulicaria odora* a montré une bonne activité sur *Candida albicans* qui est de 16 mm, ce résultat est contradictoire au notre à l'exception de l'extrait éthanolique de *Smilax aspera* qui a une valeur proche à cette dernière.

#### VI.5.4.5. Analyse statistique

Le test d'ANOVA pour l'activité antifongique avec les extraits éthanoliques des deux plantes (*Pulicaria odora*, *Smilax aspera*) à une concentration de  $10000 \mu\text{g/ml}$  a donné une p-value  $< 0,05$ , une différence significative est enregistrée : le type de l'extrait (*Pulicaria odora*, *Smilax aspera*) influence sur l'activité antifongique. Alors que les souches testées ainsi que leur association avec la nature des extraits n'ont aucune influence sur l'activité antifongique. Le test de Newman-Keuls les a classés en deux groupes homogènes (annexe 3).

# **Conclusion et perspectives**

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Une étude des propriétés antioxydantes et antibactérienne a Concerné deux plantes, très fréquemment employées en Algérie, *Pulicaria odora* et *Smilax aspera*.

Quantitativement, l'estimation du rendement des différentes extractions a révélé des valeurs varie en fonction du type de solvants ainsi que de la matière première et les valeurs obtenus sont comme suite :

1. Les rendements des extraits de feuille sèche de *Pulicaria odora* est de  $3.349 \pm 1.194\%$  pour l'extrait aqueux,  $4.75 \pm 0.618\%$  pour l'extrait acétique et  $2.41 \pm 0.064\%$  pour l'extrait éthanolique.
2. Les valeurs enregistré pour les feuilles fraîche de *Pulicaria odora* lors de ces trois extractions : aqueuse, acétique et éthanolique sont respectivement de  $0.358 \pm 0.04\%$ ,  $0.47 \pm 0.007\%$ ,  $3 \pm 0.141\%$
3. Concernant *Smilax aspera*, l'extraction aqueuse, acétique et éthanolique des feuilles sèches a révélé les valeurs respectives suivantes  $4.29 \pm 0.763\%$ ,  $1.032 \pm 0.08\%$ ,  $4.75 \pm 0.07\%$ .
4. Les mêmes extractions ont été réalisé par les feuilles fraîches de *Smilax aspera* est le rendement est de  $3 \pm 0.49\%$  pour l'extrait aqueux,  $0.275 \pm 0.06\%$  pour l'extrait acétique et  $2.5 \pm 0.264\%$  pour l'extrait éthanolique.

Rajoutant a cela l'évaluation du contenu des polyphénols totaux en adoptant la méthode de Folin ciocalteu révèle la présence des quantités moyennement importantes en polyphénols qui sont :

Pour *Pulicaria odora* ; la teneur des trois extraits aqueux, acétique et éthanolique des feuilles sèches sont respectivement de  $8.13 \text{ mg EAG/g MS}$ ,  $1.62 \pm 0.041 \text{ mg EAG/g MS}$  et  $1.03 \pm 0.071 \text{ mg EAG/g MS}$ . les valeurs obtenus lors de ces même extraction avec les feuilles fraîche sont respectivement de  $39.98 \pm 0.115 \text{ mg EAG/g MS}$ ,  $0.711 \pm 0.0017 \text{ mg EAG/g MS}$  et  $6.64 \text{ mg EAG/g MS}$ .

Pour *Smilax aspera* ; les teneurs en polyphénols des différentes extractions aqueuse, acétiques et éthanolique des feuilles sèches sont respectivement de  $4.51 \pm 0.077 \text{ mg EAG/g MS}$ ,  $8.4 \pm 0.013 \text{ mg EAG/g MS}$  et  $0.856 \pm 0.018 \text{ mg EAG/g MS}$ . Concernant les feuilles fraîches les résultats sont comme suit :  $6.6 \text{ mg EAG/g MS}$  pour l'extraction aqueuse,  $10.09 \pm 0.033 \text{ mg EAG/g MS}$  pour l'extraction acétique et  $0.97 \pm 0.039 \text{ mg EAG/g MS}$  pour l'extraction éthanolique.

De même nous avons dosé les flavonoïdes par la méthode d' $\text{AlCl}_3$  qui nous mène à conclure que ces deux plantes contiennent principalement des flavonoïdes avec des quantités plus au moins importantes, qui sont de  $364,19 \pm 0,00 \text{ mg EQ/g MS}$  pour l'extrait aqueux et  $200 \pm 0,00 \text{ mg EQ/g MS}$  pour l'extrait éthanolique pour les feuilles sèches de *Pulicaria odora*, et pour les feuilles fraîches de la même plante les valeurs sont comme suite :  $51,55 \pm 0,00 \text{ mg EQ/g MS}$  pour l'extrait aqueux et  $498,33 \pm 0,00 \text{ mg EQ/g MS}$  pour l'extrait éthanolique.

Au sujet de *Smilax aspera* les valeurs enregistré pour les deux extractions aqueuse et éthanolique des feuilles sèches sont respectivement de  $213,43 \pm 0,00 \text{ mg EQ/g MS}$  et  $383.33 \pm 0,00 \text{ mg EQ/g MS}$ , et ceux des feuilles fraîches sont de  $22,91 \pm 0,00 \text{ mg EQ/g MS}$  pour l'extrait aqueux et  $208,33 \pm 0,02 \text{ mg EQ/g MS}$  pour l'extrait éthanolique.

L'activité antioxydante des polyphénols après extraction a été déterminé par la méthode basé sur la réduction du fer (FRAP) ainsi que par la méthode du DPPH qui ont montré que les deux plante possède un pouvoir antioxydants importants avec des valeurs acceptable qui se résume comme suite : 181.01 µg/ml, 216.26 µg/ml, 236.83 µg/ml, 281.14 µg/ml obtenue par la methode du FRAP, pour les extraits de *pulicaria odora* aqueux, et éthanolique, *Smilax aspera* éthanolique et aqueux respectivement contre 31.91 µg/ml pour l'acide ascorbique. 163.31µg/ml et 585.01µg/ml obtenue par la méthode du DPPH, pour les extraits aqueux de *Pulicaria odora* et *Smilax aspera*, respectivement contre 96.74 µg/ml pour l'acide ascorbique.

Au cours de cette étude nous avons réalisé également un test antimicrobien vis-à-vis de quelques souche pathogènes (huit souches bactérienne et 2 souche fongiques), les résultats microbiologiques ont montré que les extraits des deux plantes *Pulicaria odora* et *Smilaxaspera* agissent différemment sur les espèces bactériennes testées dont on peut citer *E. coli* clinique sur laquelle on a enregistré un diamètre d'inhibition de 18,5±4,49 mm avec une concentration de 500µg/ml de l'extrait aqueux de *Pulicaria odora*. Ainsi que *klebsiellapneumoniae* sur laquelle on a enregistré un diamètre d'inhibition de 16±0,00 mm avec une concentration de 10000 µg/ml de l'extrait aqueux de *Smilax aspera*. Concernant l'activité antifongique nous avons obtenus avec une concentration de 10000 µg/ml de l'extrait éthanolique de *Smilax aspera* un diamètre de 14±0,00 mm sur *Candida albicans*.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense et chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires dont *Pulicaria odora* et *Smilax aspera* possédant des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières. De cet effet, et comme perspectives on propose de :

- élargir le spectre d'étude en étudiant la plante d'autres régions à des fins comparatives;
- Effectuer un screening phytochimique complet afin de cerner les différents composants et principalement celui ou ceux qui sont actifs ;
- Investir dans des études plus approfondies pour découvrir si ces plantes présentent d'autres éventuelles activités (anti-inflammatoire, coagulante...);
- Effectuer des études de toxicité pour une éventuelle utilisation de ces dernières en tant que conservateur en divers industries comme l'agro-alimentaire, pharmaceutique...etc.

# **Références Bibliographiques**

- Accoceberry I.** et **Noël T.** (2006).antifongiques : cibles et mécanismes de résistances. *Ther.*, 61 (3) :195-199.
- Aires J.** (2011). Les systèmes d'efflux actifs bactériens : caractérisation et modélisation pour quelles perspectives ?.*Bull. Acad. Vét.*, 3(164): 265-270.
- Alilou N. Bencharaki B. Hassai L.M.I. etBaraka N.** (2014). Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d'*Asteriscusgraeolenssubsp.odorus*. *Afrique science.*,10 (3) : 316-328.
- Andersen O.M.** et **Markham K.R.** (2006). Flavonoides chemistry, biochemistry and application.Taylor and Francis-washington.
- Arabshahi D.S., Devi D.V.et Urooj A.** (2007). Evaluation of antioxidant activity of some plantextracts and their heat, pH and storage stability.*Food Chem.*, 100: 1100-1105.
- Athman S., Chalghem I., Kassah-Laouar A., laroui S. et Khebri S.** (2010). Activité anti-oxydant et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum L.* *LSJ.*, 1(11) : 69-80.
- Barouki R.** (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Rev Med liege.*, 62 (10) : 628-72
- Beecher G.R.**(2003). Proceeding of the third international scientific smposium on tea and Human health/ role of flavonoids in the diet overview of dietary, flavonoids: Nomenclature, ocaurrence and Intakel.*Nutr. Rev.*, 3: 3248-3254.
- Bendini A., Cerretani L., Carrasco-Pancorbo A., Ana maria Gomez-Caravaca A.M., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A. and Lercker G.** (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade.*Mol.*, 12: 1679-1719.
- Boivin G.** (2002). La résistance aux antiviraux. Faut-il penser en pratique général ?.*Le M du Québec.*, 3(37). 73-76.
- Bolou G.E.K., Attioua B., N'Guessan A.C., Coulibaly A., N'Guessan., J.D.et Djaman A.J.**(2011). Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de*Terminalia glaucescens planch.* sur*Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*, *B. S. R. Se. L.*, Vol. 80 :772 – 790.
- Briand Y.M.** (2009). Une histoire de la résistance aux antibiotiques, à propos de six bactéries. Ed l'Harmattan, Paris.
- Bruneton J.** (2009). Pharmacognosie : Phytochimie. Lavoisier, 4<sup>eme</sup> édition., Paris.

- Callemien D.** et **collin S.** (2010). Structure, organoleptic properties, quantification methods, and stability of phénolic compounds in Beer. *Food REV INT.*, 26: 1-48.
- Carle S.** (2009). La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important !. *Pharmactuel* 42 : 6-2.
- Cassidy A., Hanley B. et Lamuela-Raventos R.M.** (2000). Isoflavones, lignans and stilbenes: origins, metabolism and potential importance to human health. *J Sci Food Agr.*, 348: 1230-1238.
- Collin S., Counet C., Callemien D. et Jerkovic V.** (2011). Nomenclature et voies de synthèse des principaux polyphénols ; in : « Polyphénols et Procédés : Transformation des polyphénols aux travers des procédés appliqués à l'agroalimentaire ». Lavoisier., Paris.
- Collin S. et Crouzet J.** (2011). Polyphénols et procédés : Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à agroalimentaire. Paris.
- Cowan M.M.** (1999). Plants products antimicrobial agents. *CMR.*, 12 (4): 564-582.
- Crozier A., I.B. Clifford M.N and Ashihara H.** (2006). Plant secondary Métabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd.
- Dannaoui E.** (2013). Résistance des *Condida* aux antifongiques : détectin et mécanisme. *RFL.*, 450.
- D'Archivio M., Filesi C. et Di Benedetto R.** (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita.*, 34, 4: 348-381.
- Delgado-Pelayo R. et Hornero-Médez D.** (2012). Identification and quantitative analysis of carotenoides and their Esters form Sarsaparilla (*Smilax aspera* L.) Berries. *J. Agric, food chem.*, 60: 8225-8232.
- Delarras C.** (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition TEC& DOC. Lavoisier, Paris.
- Djenane D., Aïder M., Yangüela J., Idir L., Gómez D. et Roncalés P.** (2012). Antioxidant and antibacterial effects of *Lavandula* and *Mentha* essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157:H7 and *S.aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. *Meat Science.*, 92 (4): 667–674.
- Drögue W.** (2002). Free Radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 82: 47-95.
- Emerenciano V. P., Barbosa K. O., Scotti M. T. et Ferriro M. J. P.** 2007. Selforganising maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae: a classification of tribes using flavonoid data. *J. Braz. Chem. Soc.*, 18 (5): 891-899.

- Ezoubeiri A. Ggadhi C.A. Fdil N. Benharref A. Jana M. et Vanhaelen M. (2005).** Isolation and antimicrobial activity of two phenolic compounds from *Pulicaria odora*. *J Ethnopharmacol* .,99: 287-292.
- Favier A. (2003).** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Act.Chem.*, 108-115.
- Fournier C. et Zoulim F. (2006).** Les antiviraux dans l'Hépatite B : mode d'action et résistance. *La lettre de l'Hépatogastroentérologue.*, 4 (9), 188-193.
- Gardès-Albert M., Bonne Font- Rousselot D., Abedinzadeh Z. et Jore D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène, comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?. *L'Act. Chem* .,91-95.
- Gaudy C., Buxeraud J. (2005).** Antibiotiques ; pharmacologie et thérapeutique. Ed Elsevier, Paris.
- Ghédira K. et Goetz P. (2016).** Salspareille *Smilax sarsaparilla* L. ( syn : *Smilax aspera* L.) [Smilacaceae]. *Phytother.* , 14 : 330- 333.
- Greselle P., Cerletti C., Guglielmini G., Pignatelli P., DE Gaetano G. et Violi F. (2011).** Effect of resveratrol and other wine polyphenol on vascular function: an update. *J. Nutr. Biochem.*, 22: 201-211.
- Guillot J. et Dannaoui E. (2015).** La résistance aux antifongiques : importance en médecine humaine et vétérinaire. *Bull. Acad. France Tome 168*, 4
- Habauzit V. et Horcajada m-N. (2008).** Phenolic phytochemicals and bone. *Pytochem Rev.*, 7: 313-344.
- Haleng J., Pincemail J., Defraingne J.O. Charlier C et Chapelle J.P. (2007).** Le stress oxydant. *Rev Med liege.*, 62 (10): 628-638.
- Hanbli F.E.L., Akissira F., Ezoubeiri A., Gadh C.E.A. Mellouk F., Benherra A., Amparo B. et Boira H. (2005).** Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Pulicaria odora* L. *J Ethnopharmacol* .,99: 399-411.
- Harborne J.B. (1990).** Constraints on the evolution of biochemical pathways. *Boil. J. of the Linnean Societ.*, 39: 135-151.
- Havsteen B.H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut.*, 96: 67-202.

**Hennebelle T. Sahpaz S. et Bailleul F.** (1004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Pytother.*, 1 :3-6.

**Hubert J.** (2006). Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, Thèse de doctorat Institut national polytechnique de Toulouse, France.

**Iratni Aiche-G., Moualek I., Mestar Guechaoui-N., Mezaache Aichour S., Zerroug M-M. et Houali K.** (2015). In vitro evaluation of biological activities of *Pistacia lentiscus* aqueous extract. *Int. J. Pham. Pharm. Sci.*, 11 (7): 133-139.

**Isorez G.** (2002). Contribution à la chimie des flavonoïdes : Accès à des analogues de pigments du vin rouge. Université Louis Pasteur- Strasbourg 1. France.

**Ivanova Antoameta M., Khova B., Batsalova T., Dzhambaz B. et Kostova I.** (2011). New furostanol saponine from *Smilax aspera* L. and their in vitro cytotoxicity. *Fitoterapie.*, 82: 282-287.

**Jayaprakash G.K., Singh R.P. et Sakariah K.K.**(2001). Antioxidant activity of grape seed extracts on peroxidation models in-vitro. *J Agric. Food Chem.*, (55): 1018-1022.

**Jerkovic V., Nguyen F., Timmermans A. et Collin S.** (2008). Comparaison of procedures for Resveratrol analysis in Beer: assessment of stilbenoids stability through wort fermentation and Beer aging. *J. Inst. Brew.*, 114 (2): 143-149

**Karaali A., Boyacioğlu D., Güneş G. et Özçelik B.** 2004. Flavonoids in fruit and vegetables : their impact on food quality, nutrition and health—STREP or CA. European commission's the 6<sup>th</sup> framework programme for research. Istanbul technical university. Turkey.

**Lafay S. et Gil-Izquierdo A.** (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem Rev.*, 7: 301-311.

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

**Macheix J.J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C.** (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR Presses Polytechniques et Universitaires. Romandes. Lausanne.

- Macheix J.J., Fleuriet A. et Machado P.S. (2006).** Composés phénoliques dans la plante-structure, biosynthèse, répartition et rôles ; in : « Les Polyphénols En Agroalimentaire ». Edition Tec et Doc., Lavoisier., Paris.
- Mahmoudi S., Khali m. et Mahmoudi N. (2013).** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynarascolymus L.*). *Nature et Technologie.*, 09 : 35-40.
- Malešev D. et Kuntić V. 2007.** Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *J. Serb. Chem.Soc.*, **72** (10) : 921-939.
- Manach C., Scalbert A., Mrand C., Remesy C. et Jimenez L .( 2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J. Clin Nutr.*, 79:727-47.
- Meddour R. Mella A. Meddour-Sahar O. et Derridj A. (2009).** La flore Médicinale et ses usages actuels en kabylie( Wilaya de TIZI-OUZOU, ALGERIE) : quelques résultats d'une étude Ethnobotanique. *Revue des régions Arides.*, 181-201.
- Medić-Šarić M., Jasprica I., Smolčić-Bubalo A. et Monar A. 2004.** Optimisation of chromatography of flavonoids and phenolic acids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA.*, **77** (1-2) : 361-366.
- MAZZA G. et MINIATI E. (1993).** Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. Boca Raton. CRP press.
- Muylaert A., Mainil J.G. (2012).** Résistance bactérienne aux antibiotiques : les mécanismes et leur «contagiosité». *Ann. Med. Vét.*, 156: 109-123.
- Nacz M. et Shahidi F.(2004).** Extraction and analysis of phenolic in food .*J. Chromatogr.A.*,1054 : 95-111.
- Nassri L., Zarkani S., Daoudi A., Bammou M., Bouiamine E.H.et Ibijbijien J. (2016).** Contribution à l'élaboration d'un catalogue ethnobotanique de la commune rurale d'Aguelmous ( Province de Khénifra, Maroc). *IJJAS.*, 2(17): 373-387.
- Nijveldt R. J., Van Nood E., Van Hoorn D. E. C., Boelens P. G., Van Norren K. et Van Leeuwen P. A. M. 2001.** Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Chim. Nutr.*, **74** : 418-425.
- Pham-Huy L.A., HE H. et Pham-Huy C. (2008).** Free radicals, antioxidant in disease and health. *Itr. J. Med. Sci.*, 4: 89-96.

- Popovici C., Sakova I. et Tylkous B.** (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par réactivité avec le radical libre DPPH. *RGI.*, 4 : 25-39
- Rameau J.C., Mension D. Durine G., Grauber Ville C., Bruno E. et Keller R.**, flore forestière française guide écologique illustré, tome 3.
- SANCHEZ-MORENO C., LARRAURI JOSE A. et SAURA-CALIXTO F. A.** (1998). Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food. Agr.*, 76(2): 270-276.
- Sarni-Manchado P. et Cheynier V.** 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Lavoisier.
- SANCHEZ-MORENO C., LARRAURI JOSE A. et SAURA-CALIXTO F. A.** (1998). Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food. Agr.*, 76(2): 270-276.
- Scalbert A. et Williams G.** (200). Dietary intake bioavailability of polyphenols. *JN.*, 130: 2073s-2085s.
- TALBI H., BOUMAZA A., EL-MOSTAFA K., TALBI J. et HILALI A.** (2015). Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. *JMES.*, 6 (4): 1111-1117.
- Tapier H. Tew K.D. Nguyen Ba G. et Mathé G.** (2002). Polyphenols : do a role in the prevention of human pathologies?. *Biomed pharmacother.*, 56: 200-7.
- TOMAS- BARBERAN., F.A. et CLIFFORD M.N.** (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives: nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food. Agr.*, 80: 1024-1032.
- Tresserra-Rimbau A., A. Medina-Reimon A., Pérez-Jiménez J., Martí'nez-Gonzalez M.A., Covas M.I., Corella D., Salas-Salvado J., E. Go'mez-Gracia E., Lapetra J., Aros F., Fiol M., Ros E., Serra-Majem L., Pinto X., Munoz M.A., Saez G.T., Ruiz-Gutie'rrez V., Warnberg J., Estruch R., et Lamuela-Raventos R.M.** (2013) dietary intake and major food source of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk the predimes stuy. *Nutrition,metabolisme et cardiovascular disease.*, 23 :953-959.
- Vincent R., Le Bâcle C.** (2015). Antibiorésistance et conséquences en santé au travail pour *références en santé au travail, INRS*, 143 : 21-43.
- W –Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly., Hollman J. P., L –Keen C., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., WilliamsonG. et Burrowes J.** 2007. Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *JN.*,137: 718s-737 s.

**Williams C.A., Harbone J.b., Greenhan R., Jenny., Grayer J.R., Kite G.C. et Eagles J.**(2003). Variation in lipophilic and vacuolar flavonoids among European *Pulicaria* species *Phytochemistry.*, 64: 275–283.

**Xu X.H., Wan .Y., Qi Z.c., QIU Y.X. et Fu C.H. (2011).**Isolation of compound microsatellite Markers for the commune Mediterranean shrub *Smilax aspera*( Smilacaceae). *Am. J. Bot.*, e64-e66.

**YAO J., WANG J.Y. et LIU L. (2010).** Anti-oxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis. *Arch. Med. Res.*, 41: 288-294.

**Zhishen J., Mengcheng T. et Jiaming W. (1999).** The determination of flavonoids contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chem.*, 64: 555-55.

# **Annexes**

## **Annexe 1 : Composition des solutions et milieux de culture utilisés**

### **❖ Eau physiologique stérile**

Composition en g/l :

Chlorure de sodium (NaCl)..... 9g

Eau distillée.....1000ml

pH=7

Stérilisation à 121°C/15min.

### **❖ Gélose Mueller Hinton (MH)**

Composition en g/l

Extrait de viande.....3g

Hydrolysate acide de caséine.....17,5g

Agar.....18g

pH=7,4

Stérilisation à 120°C/15 min

### **❖ Bouillon BrainHeart Infusion (BHIB)**

Composition en g/ml

Protéase-peptone.....10g

Infusion de cervelle de veau.....12,5g

Chlorure de sodium.....2,5g

Phosphate disodique.....2,5g

Eau distillée.....1000ml

pH=7,4

Stérilisation à 120°C/15 min

### **❖ Gélose nutritive (GN)**

Composition en g/l

Peptone.....10g

Extrait de viande.....3g

Extrait de levure.....3g

Chlorure de sodium.....5g

Agar.....18g

pH=7,2±0,2

Stérilisation à 120°C/15 min

### **❖ Gélose Chapman**

Composition en g/l

Extrait de viande.....1g

Extrait de levure.....3g

Tryptone.....5 g

Peptone bactériologique.....10g

Mannitol.....10g

Rouge de phénol.....0,025g

Agar.....15g

pH=7,4

Stérilisation à 120°C/15 min

#### ❖ **Gélose Hecktöen**

Composition en g/l

Peptone pepsique de viande.....	15 g
Extrait de viande.....	3g
Extrait de levure.....	3 g
Lactose.....	12g
Salicine.....	2g
Saccharose.....	12g
Chlorure de sodum.....	5g
Thiosulfate de sodum.....	5g
Citrate de fer ammoniacal.....	1,5g
Sels biliaries.....	4g
Bleu de bromothymol.....	0,064g
Fuschine acide.....	0,1g

pH=7,4

Stérilisation à 120°C/ 15 min

#### ❖ **Gélose King A**

Composition en g/l

Peptone de viande.....	20g
Glycérol (Glycérine).....	10ml
Potassuim sulfate.....	1,5g
Agar.....	20g

pH=7,2

Stérilisation à 120°C/15 min

#### ❖ **Gélose Sabouraud**

Eaudistillée.....	1000ml
Peptone.....	10g
Glucose 20g Agar-agar.....	15g

**Annexe 2 : Courbes de régression de l'activité antioxydante qui ont servi au calcul de l'IC 50.**

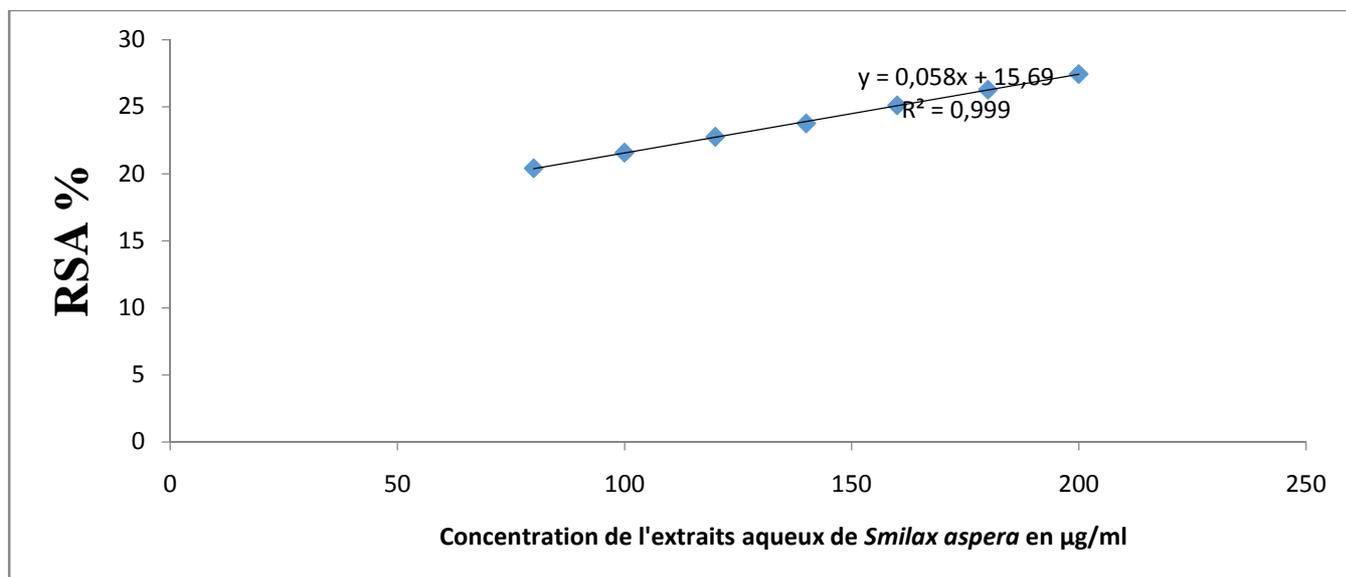


Figure : Courbe de régression de l'activité anti-radicalaire (DPPH) de l'extrait aqueux de *Smilax aspera*.

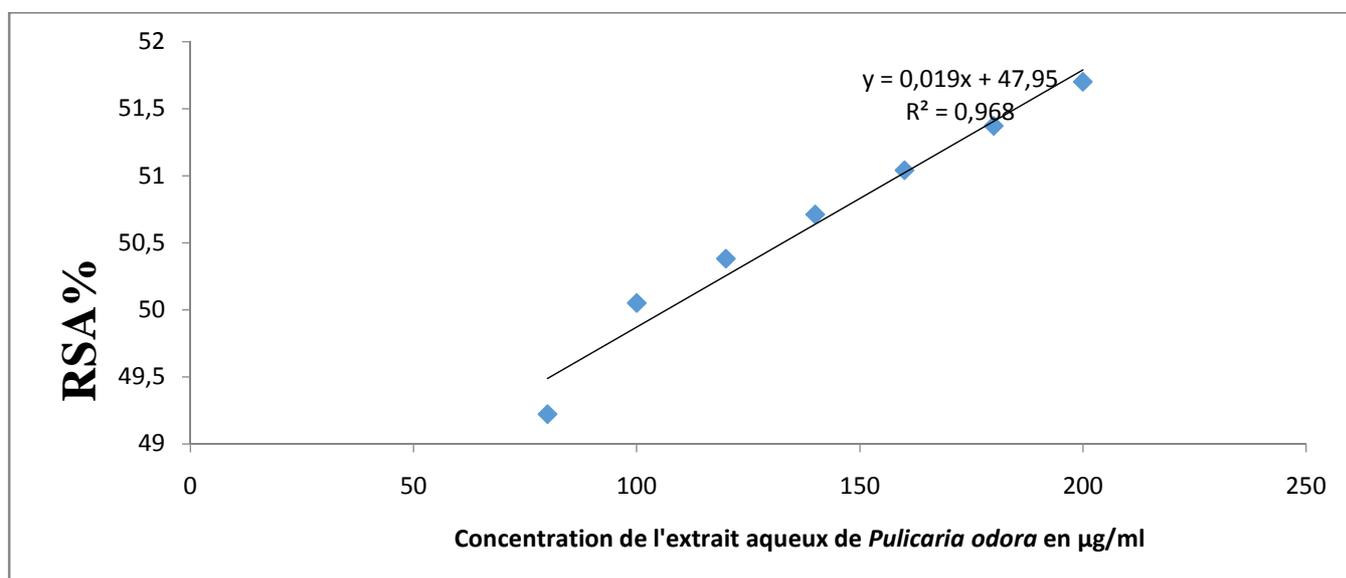


Figure : Courbe de régression de l'activité anti-radicalaire (DPPH) de l'extrait aqueux de *Pulicaria odora*.

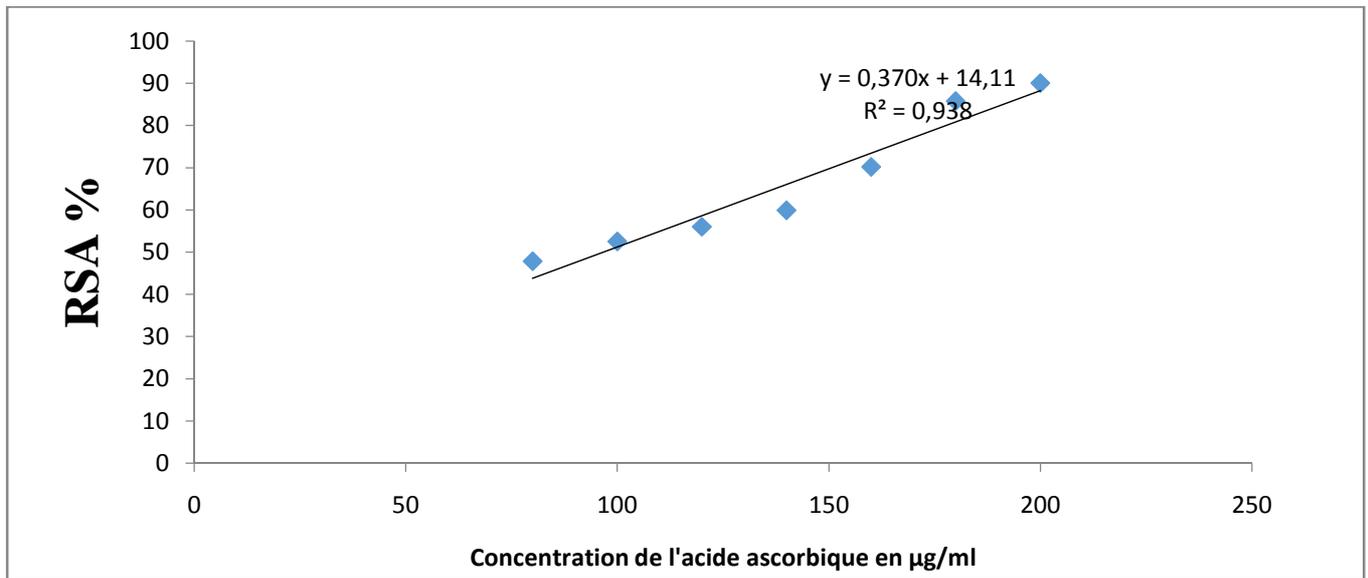


Figure : Courbe de régression de l'activité anti-radicalaire (DPPH) de l'acide ascorbique.

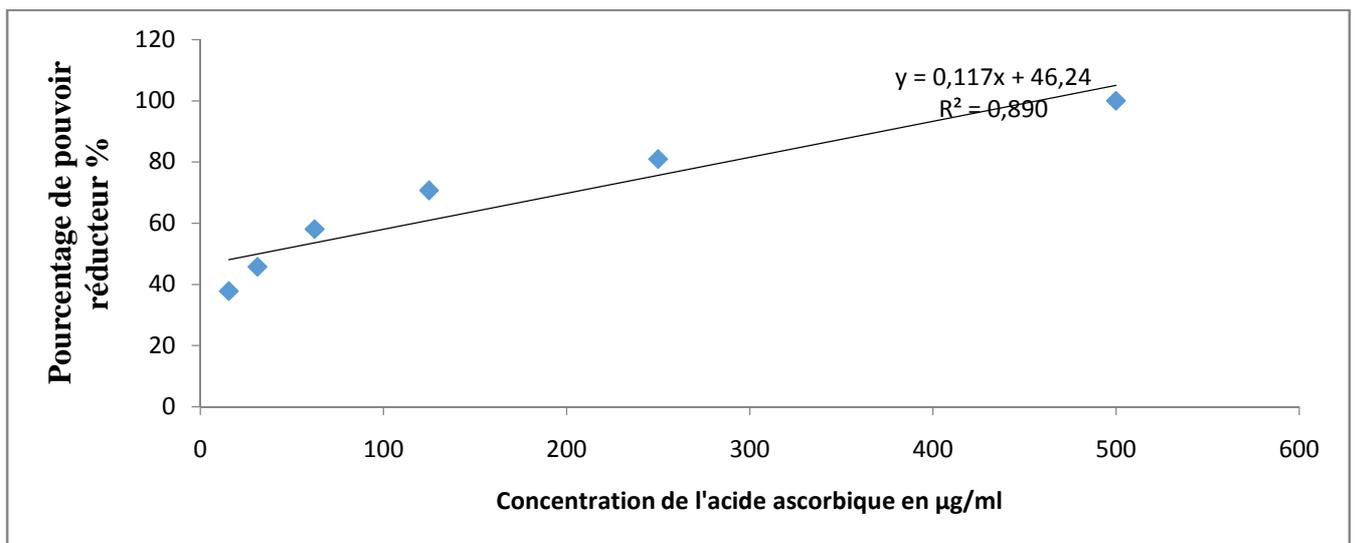


Figure : Courbe de régression de pouvoir réducteur en % de l'acide ascorbique.

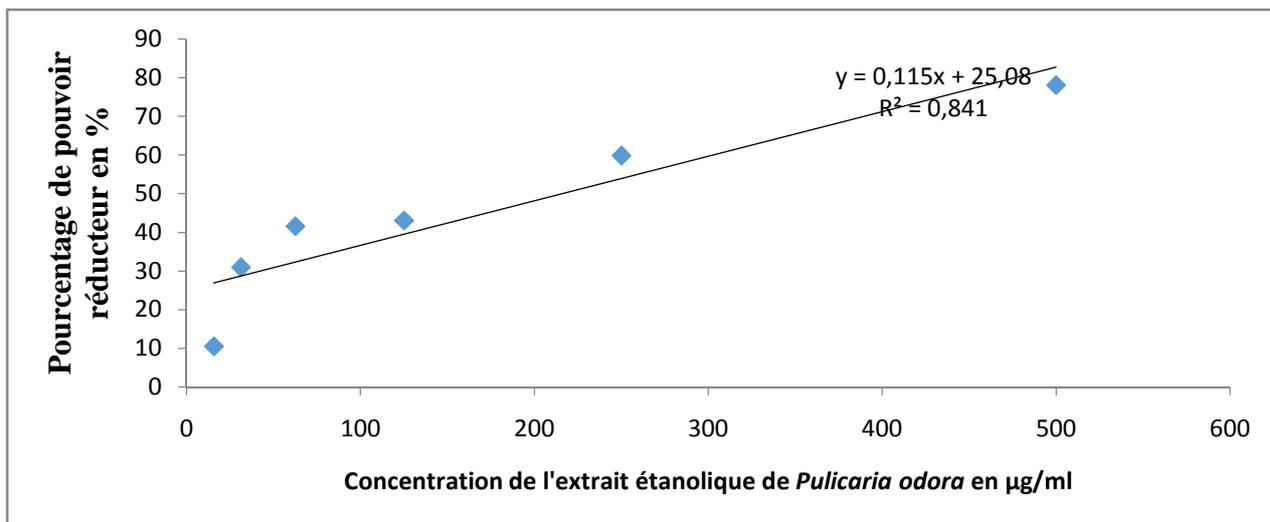


Figure : Courbe de régression de pouvoir réducteur en % de l'extrait éthanologique de *Pulicaria odora*.

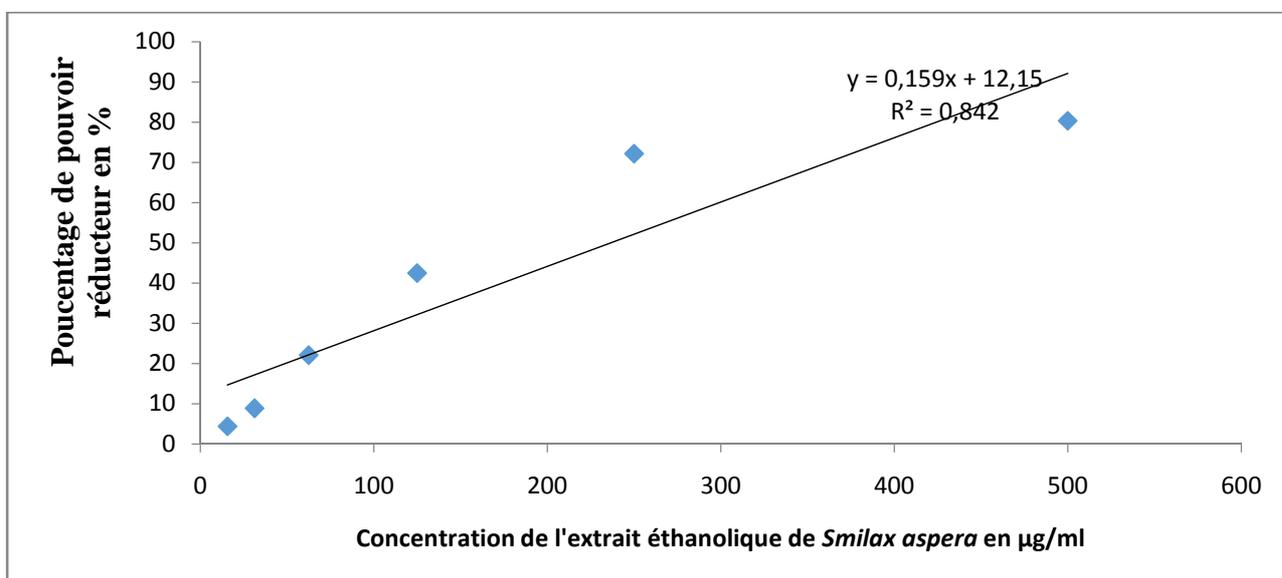


Figure : Courbe de régression de pouvoir réducteur en % de l'extrait éthanologique de *Smilax aspera*.

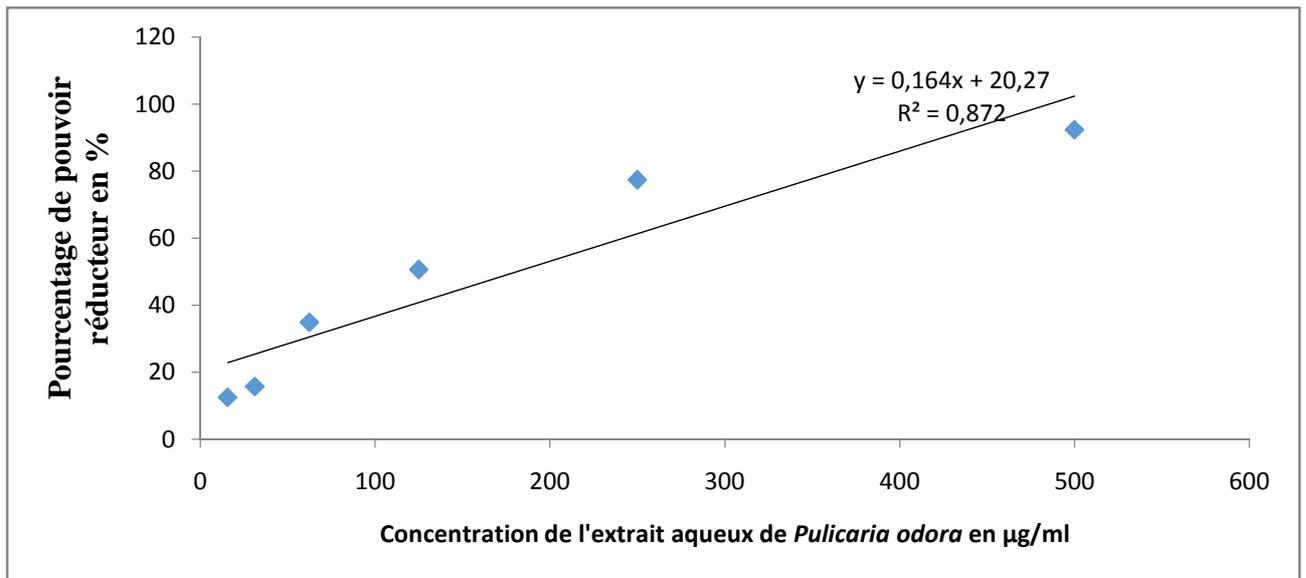


Figure : Courbe de régression de pouvoir réducteur en % de l'extrait aqueux de *Pulicaria odora*.

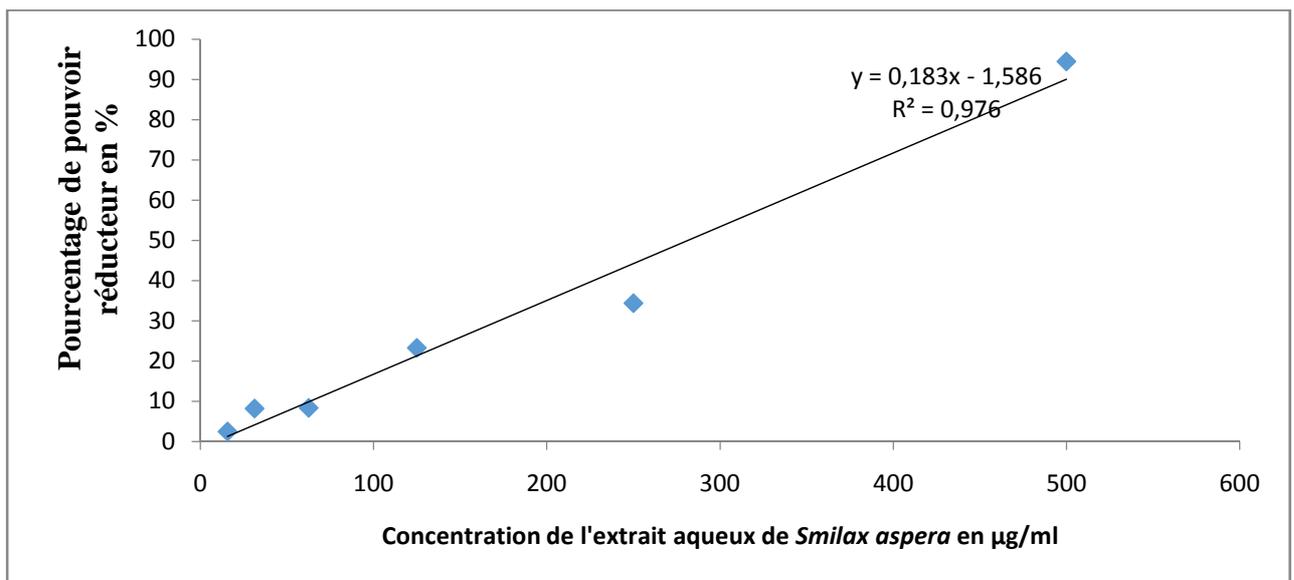


Figure : Courbe de régression de pouvoir réducteur en % de l'extrait aqueux de *Smilax aspera*.

### Annexe 3 : Résultats des tests statistiques

Tests Univariés de Significativité pour rendement (Feuille de données2) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	88,4069	1	88,40693	4,650050	0,056452	
solvants	13,0040	3	4,33465	0,227995	0,874803	
Erreur	190,1204	10	19,01204			

**Figure 1 :** Table de l'ANOVA pour les résultats du rendement d'extraction des polyphénols des feuilles sèches de *Pulicaria odora*.

Tests Univariés de Significativité pour rendement (Feuille de données6) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	12,22728	1	12,22728	109,8600	0,000044	
solvants	10,60953	2	5,30476	47,6624	0,000208	
Erreur	0,66779	6	0,11130			

Test de Newman-Keuls ; variable rendement (Feuille de données6) Groupes Homogènes, alpha = ,05000 Erreur : MC Inter = ,11130, dl = 6,0000					
Cellule N°	solvants	rendement Moyenne	1	2	
1	aqueux	0,358000	****		
2	acétique	0,472500	****		
3	éthanolique	3,000000		****	

**Figure 2 :** Tables de l'ANOVA et Newman Keuls pour les résultats du rendement d'extraction des polyphénols des feuilles fraîches de *Pulicaria odora*.

Tests Univariés de Significativité pour rendement (Feuille de données10) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	76,94965	1	76,94965	7,960013	0,037050	
solvant	16,64143	2	8,32071	0,860731	0,477271	
Erreur	48,33512	5	9,66702			

**Figure 3 :** Table de l'ANOVA pour les résultats du rendement d'extraction des polyphénols des feuilles fraîches de *Smilax aspera*.

Tests Univariés de Significativité pour rendement (Feuille de données16) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	25,01297	1	25,01297	8,624232	0,042529	
solvants	8,70089	2	4,35045	1,499992	0,326532	
Erreur	11,60125	4	2,90031			

**Figure 4 :** Table de l'ANOVA pour les résultats du rendement d'extraction des polyphénols des feuilles fraîches de *Smilax aspera*.

Tests Univariés de Significativité pour teneur en PPT (Feuille de données6) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	116,1653	1	116,1653	157547,9	0,000000	
extraits	93,2424	2	46,6212	63229,5	0,000000	
Erreur	0,0044	6	0,0007			

Test de Newman-Keuls ; variable teneur en PPT (Feuille de données6) Groupes Homogènes, alpha = ,05000 Erreur : MC Inter = ,00074, dl = 6,0000						
Cellule N°	extraits	teneur en PPT Moyenne	1	2	3	
3	éthanolique	1,008000	****			
2	acétique	1,640000		****		
1	aqueux	8,130000			****	

**Figure5 :** Tables de l'ANOVA et Newman Keuls pour les résultats la teneur en polyphénols totaux PPT des feuilles sèches de *Pulicaria odora*.

Tests Univariés de Significativité pour teneur en PPT (Feuille de données6) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	2247,202	1	2247,202	603,9495	0,000000	
extraits	2684,723	2	1342,362	360,7680	0,000001	
Erreur	22,325	6	3,721			

Test de Newman-Keuls ; variable teneur en PPT (Feuille de données6) Groupes Homogènes, alpha = ,05000 Erreur : MC Inter = 3,7208, dl = 6,0000						
Cellule N°	extraits	teneur en PPT Moyenne	1	2	3	
3	éthanolique	0,71133	****			
2	acétique	6,71333		****		
1	aqueux	39,98000			****	

**Figure 6 :** Tables de l'ANOVA et Newman Keuls pour les résultats la teneur en polyphénols totaux PPT des feuilles fraîches de *Pulicaria odora*

Tests Univariés de Significativité pour teneur en PPT (Feuille de données6)						
Paramétrisation sigma-restreinte						
Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	251,5290	1	251,5290	101957,4	0,000000	
extraits	93,1271	2	46,5635	18874,6	0,000000	
Erreur	0,0148	6	0,0025			

Test de Newman-Keuls ; variable teneur en PPT (Feuille de données6)						
Groupes Homogènes, alpha = ,05000						
Erreur : MC Inter = ,00247, dl = 6,0000						
Cellule N°	extraits	teneur en PPT Moyenne	1	2	3	
3	éthanolique	0,856333	****			
1	aqueux	6,606667		****		
2	acétique	8,396667			****	

**Figure 7:** Tables de l'ANOVA et Newman Keuls pour les résultats la teneur en polyphénols totaux PPT des feuilles sèches de *Smilax aspera*.

Tests Univariés de Significativité pour teneur en PPT (Feuille de données6)						
Paramétrisation sigma-restreinte						
Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	242,7572	1	242,7572	7199,323	0,000000	
extraits	127,1197	2	63,5599	1884,961	0,000000	
Erreur	0,2023	6	0,0337			

Test de Newman-Keuls ; variable teneur en PPT (Feuille de données6)						
Groupes Homogènes, alpha = ,05000						
Erreur : MC Inter = ,03372, dl = 6,0000						
Cellule N°	extraits	teneur en PPT Moyenne	1	2	3	
3	éthanolique	0,97067	****			
1	aqueux	4,51000		****		
2	acétique	10,10000			****	

**Figure 8 :** Tables de l'ANOVA et Newman Keuls pour les résultats la teneur en polyphénols totaux PPT des feuilles fraîches de *Smilax aspera*.

Tests Univariés de Significativité pour flavonoïdes (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	318310,4	1	318310,4	15422,42	0,000065	
solvants	26961,6	1	26961,6	1306,32	0,000765	
Erreur	41,3	2	20,6			

Test de Newman-Keuls ; variable flavonoïdes (Feuille de données1) Groupes Homogènes, alpha = ,05000 Erreur : MC Inter = 20,639, dl = 2,0000				
Cellule N°	solvants	flavonoïdes Moyenne	1	2
2	éthanolique	199,9950	****	
1	aqueux	364,1950		****

**Figure 9** : Tables de l'ANOVA et Newman Keuls pour les résultats la teneur en flavonoïdes totaux PPT des feuilles sèches de *Pulicaria odora*.

Tests Univariés de Significativité pour flavonoïdes (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	302368,0	1	302368,0	2169,732	0,000461	
solvants	199612,4	1	199612,4	1432,378	0,000697	
Erreur	278,7	2	139,4			

Test de Newman-Keuls ; variable flavonoïdes (Feuille de données1) Groupes Homogènes, alpha = ,05000 Erreur : MC Inter = 139,36, dl = 2,0000				
Cellule N°	solvants	flavonoïdes Moyenne	1	2
1	aqueux	51,5500	****	
2	éthanolique	498,3300		****

**Figure 10** : Tables de l'ANOVA et Newman Keuls pour les résultats la teneur en flavonoïdes totaux PPT des feuilles fraîches de *Pulicaria odora*.

Tests Univariés de Significativité pour flavonoïdes (Feuille de données1)						
Paramétrisation sigma-restreinte						
Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	10123159	1	10123159	182248,9	0,001491	
solvant	8026804	1	8026804	144507,8	0,001675	
Erreur	56	1	56			

Test de Newman-Keuls ; variable flavonoïdes (Feuille de données1)						
Groupes Homogènes, alpha = ,05000						
Erreur : MC Inter = 55,546, dl = 1,0000						
Cellule N°	solvant	flavonoïdes Moyenne	1	2		
1	aqueux	213,430	****			
2	éthanolique	3683,330		****		

**Figure 11** : Tables de l'ANOVA et Newman keuls pour les résultats la teneur en flavonoïdes totaux PPT des feuilles sèches de *Smilax aspera*.

Tests Univariés de Significativité pour flavonoïdes (Feuille de données1)						
Paramétrisation sigma-restreinte						
Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	55573,35	1	55573,35	19,90653	0,046741	
solvant	36069,61	1	36069,61	12,92023	0,069434	
Erreur	5583,43	2	2791,71			

**Figure 12** : Table de l'ANOVA pour les résultats la teneur en flavonoïdes totaux PPT des feuilles fraîches de *Smilax aspera*.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour diamètres des zones d'inhibition (teste d'anova a contenué domaine) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	2701,125	1	2701,125	800,3333	0,000000
souches bactérienne testés	321,875	7	45,982	13,6243	0,000011
plantes	0,125	1	0,125	0,0370	0,849811
souches bactérienne testés*plantes	62,875	7	8,982	2,6614	0,049735
Erreur	54,000	16	3,375		

Cellule N°	Test de Newman-Keuls ; variable diamètres des zones d'inhibition (teste d'anova a contenué domaine) Groupes Homogènes, alpha = ,05000 (Recherche Non-Exhaustive) Erreur : MC Inter = 3,3750, dl = 16,000				
	souches bactérienne testés	plantes	diamètres des zones d'inhibition Moyenne	1	2
9	<i>A. baumannii</i> d'origine clinique	<i>P. odora</i>	6,00000	****	
16	<i>B. cereus</i> ATCC 10876	<i>S. aspera</i>	6,00000	****	
8	<i>S. aureus</i> d'origine clinique	<i>S. aspera</i>	6,00000	****	
7	<i>S. aureus</i> d'origine clinique	<i>P. odora</i>	6,00000	****	
5	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. odora</i>	6,00000	****	
6	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aspera</i>	6,00000	****	
1	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. odora</i>	7,50000	****	
10	<i>A. baumannii</i> d'origine clinique	<i>S. aspera</i>	8,00000	****	
15	<i>B. cereus</i> ATCC 10876	<i>P. odora</i>	8,00000	****	
11	<i>K. pneumoniae</i> d'origine clinique	<i>P. odora</i>	10,00000	****	
2	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aspera</i>	10,00000	****	
4	<i>E. coli</i> d'origine clinique	<i>S. aspera</i>	12,00000	****	
13	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>P. odora</i>	12,00000	****	
12	<i>K. pneumoniae</i> d'origine clinique	<i>S. aspera</i>	12,50000	****	
14	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aspera</i>	12,50000	****	
3	<i>E. coli</i> d'origine clinique	<i>P. odora</i>	18,50000	****	****

**Figure 13 :** Tables de l'ANOVA et Newman Keuls pour les résultats de l'activité antibactérienne à une concentration de 500 µg/ml des deux extraits.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour diamètre des zones d'inhibition (teste d'anova a contenué domaine) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	3321,125	1	3321,125	4087,538	0,000000
souches bactérienne testés	117,375	7	16,768	20,637	0,000001
plantes	28,125	1	28,125	34,615	0,000023
souches bactérienne testés*plantes	74,375	7	10,625	13,077	0,000015
Erreur	13,000	16	0,812		

Cellule N°	Test de Newman-Keuls ; variable diamètre des zones d'inhibition (teste d'anova a contenué domaine) Groupes Homogènes, alpha = ,05000 (Recherche Non-Exhaustive) Erreur : MC Inter = ,81250, dl = 16,000						
	souches bactérienne testés	plantes	diamètre des zones d'inhibition Moyenne	1	2	3	4
11	K. pneumoniae d'origine clinique	P. odora	6,00000	****			
7	S. aureus d'origine clinique	P. odora	6,00000	****			
16	B. cereus ATCC 10876	S. aspera	6,00000	****			
5	S. aureus ATCC 25923	P. odora	6,50000	****			
6	S. aureus ATCC 25923	S. aspera	9,50000		****		
15	B. cereus ATCC 10876	P. odora	10,00000		****	****	
3	E. coli d'origine clinique	P. odora	10,00000		****	****	
2	E. coli ATCC 25922	S. aspera	10,50000		****	****	****
1	E. coli ATCC 25922	P. odora	10,50000		****	****	****
12	K. pneumoniae d'origine clinique	S. aspera	11,50000		****	****	****
8	S. aureus d'origine clinique	S. aspera	12,00000		****	****	****
13	P. aeruginosa ATCC 27853	P. odora	12,00000		****	****	****
9	A. baumannii d'origine clinique	P. odora	13,00000			****	****
4	E. coli d'origine clinique	S. aspera	13,00000			****	****
10	A. baumannii d'origine clinique	S. aspera	13,00000			****	****
14	P. aeruginosa ATCC 27853	S. aspera	13,50000				****

**Figure 14 :** Tables de l'ANOVA et Newman Keuls pour les résultats de l'activité antibactérienne à une concentration de 1000 µg/ml des deux extraits.

		Tests Univariés de Significativité pour diamètres des zones d'inhibitions (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
<b>ord. origine</b>	<b>1104,500</b>	<b>1</b>	<b>1104,500</b>	<b>339,8462</b>	<b>0,000051</b>	
souches bactériennes	24,500	1	24,500	7,5385	0,051606	
plantes	<b>72,000</b>	<b>1</b>	<b>72,000</b>	<b>22,1538</b>	<b>0,009262</b>	
souches bactériennes*plantes	8,000	1	8,000	2,4615	0,191744	
Erreur	13,000	4	3,250			

		Test de Newman-Keuls ; variable diamètres des zones d'inhibitions (Feuille de données1) Groupes Homogènes, alpha = ,05000 Erreur : MC Inter = 3,2500, dl = 4,0000				
Cellule N°	souches bactériennes	plantes	diamètres des zones d'inhibitions Moyenne	1	2	
1	<i>S. aureus</i> ATCC 29523	<i>P. odora</i>	8,00000	****		
3	<i>S. aureus</i> clinique	<i>P. odora</i>	9,50000	****		
2	<i>S. aureus</i> ATCC 29523	<i>S. aspera</i>	12,00000	****		
4	<i>S. aureus</i> clinique	<i>S. aspera</i>	17,50000		****	

**Figure 15 :** Tables de l'ANOVA et Newman Keuls pour les résultats de l'activité antibactérienne à une concentration de 1500 µg/ml des deux extraits.

		Tests Univariés de Significativité pour diamètres des zones d'inhibition (teste d'anova a contenué domaine) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
<b>ord. origine</b>	<b>4608,000</b>	<b>1</b>	<b>4608,000</b>	<b>867,3882</b>	<b>0,000000</b>	
souches bactérienne testés	39,500	7	5,643	1,0622	0,429772	
plantes	0,125	1	0,125	0,0235	0,880006	
souches bactérienne testés*plantes	11,375	7	1,625	0,3059	0,940887	
Erreur	85,000	16	5,313			

**Figure 15 :** Table de l'ANOVA pour les résultats de l'activité antibactérienne à une concentration de 10000 µg/ml des deux extraits.

Tests Univariés de Significativité pour diamètres des zones d'inhibition (Feuille de données1)						
Paramétrisation sigma-restreinte						
Décomposition efficace de l'hypothèse						
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
<b>ord. origine</b>	<b>861,1250</b>	<b>1</b>	<b>861,1250</b>	<b>275,5600</b>	<b>0,000077</b>	
souches fongique	1,1250	1	1,1250	0,3600	0,580841	
plantes	45,1250	1	45,1250	14,4400	0,019104	
souches fongique*plantes	21,1250	1	21,1250	6,7600	0,060048	
Erreur	12,5000	4	3,1250			

Test de Newman-Keuls ; variable diamètres des zones d'inhibition (Feuille de données1)						
Groupes Homogènes, alpha = ,05000						
Erreur : MC Inter = 3,1250, dl = 4,0000						
Cellule N°	souches fongique	plantes	diamètres des zones d'inhibition Moyenne	1	2	
3	<b>C. albicans</b>	P. odora	6,00000	****		
1	A. niger	P. odora	10,00000	****	****	
2	A. niger	S. aspera	11,50000	****	****	
4	C. albicans	S. aspera	14,00000		****	

**Figure 15 :** Tables de l'ANOVA et Newman Keuls pour les résultats de l'activité antifongique à une concentration de 10000 µg/ml des deux extraits.

