

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité/Option : Infectiologie

Département : des Sciences Biologiques

Thème :

**Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques de la
plante *Calligonum azel* Maire du Sahara Algérien**

Présenté par :

Messaadia Amin

Saadna Sarra

Devant le jury composé de :

Présidente : Mme. ABDAOUI W.

M.A.A

Université de Guelma

Examinatrice : Mme. AMRI S.

M.C.B

Université de Guelma

Encadreur : Mme. BOUSSADIA M.I.

M.C.B

Université de Guelma

Juin 2018

Remerciements

Nous remercions avant tout ALLAH tout puissant et miséricordieux, qui nous a guidé toutes les années d'étude et qui nous a donné la volonté, la patience et le courage pour réaliser ce travail à terme.

Nous tiens à remercier vivement

Mme. Boussadia M I. Maître assistante à la faculté de science de la nature et de la vie à l'université 08 Mai 1945 Guelma., nous est satisfaite de vos qualités exceptionnelles de bonne enseignante dont votre simplicité et votre amour du travail ont fait de vous une enseignante admirable dont l'exemple à suivre. Recevez ici, chère Mme notre sentiments de gratitude pour votre disponibilité, pour nous avoir encadrée, votre aide, votre orientations, votre conseils, votre corrections sérieuses, votre patience au long de la réalisation de ce travail.

On tient à exprimer Nos remerciements et nos gratitudes à Mme Abdaoui W et Mme AMRI S Maîtres assistantes à l'université de 08 Mai 1945 pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Sans oublier les personnels de laboratoire

En dernier lieu, nos remerciements aussi pour tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à élaborer cette étude.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde mes chers parents qui m'ont permis de continuer mes études dans les meilleures conditions.

Je dédie aussi cette modeste réalisation à :

Mes chères sœurs et mes frères

A mes amis les plus proche : Hssainia Ayoub et Mebarki Marwane.

A tous mes collègues de la promotion :

Mebarki Med Lamine, Kedadra youcef, Hadji Yasmine, Safri Nassereddine, Ouarti Lotfi, Boukgaabene Zaki, Boursseuse Abedelrahmane, Tebani Saif eddine.

A mes camarades de la promotion de Master Infectiologie.

A mes enseignants et professeurs de primaire à l'université.

A tous ceux qui adorent la science et participent à son évolution

Amin

Dédicaces

Aux deux êtres les plus chers au monde qui ont souffert nuit et jour

Pour nous couvrir de leur amour : mes parents

A ma source de bonheur la prunelle de mes yeux ma chère mère.

A Mon père pour sa patience avec moi et son encouragement.

A ma tante Alima, pour l'affection et l'amour qu'elle n'a donné le courage et la force dans les moments les plus difficiles.

A ma grande mère

A mes chères frères : Mehdi, Ammar, Saif eddin

A mes chères sœurs : Wafa et Rima

A mes nièces : Arig et Malek

A toute ma famille

A tous mes amis et mes collègues

A tous ceux qui aiment la science

Je dédie ce modeste travail

Sarra

Tables de matière

Les titres	N° Page
Remerciements	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	01
Partie 01 : Synthèse Bibliographique	
Chapitre I : Phytothérapie et Plantes Médicinales	
I. La phytothérapie	03
I.1. Différents types de la Phytothérapie	03
I.2. Les avantages de la phytothérapie	05
I.3. Les inconvénients et les risques de la phytothérapie	06
II. Les plantes médicinales	06
II.1. Les éléments actifs dans les plantes médicinales	07
II.1.1. Métabolites primaires	07
II.1.2. Métabolites secondaires	07
II.1.2.1. Les polyphénols	07
II.1.2.1.1. Acides phénoliques simples	08
II.1.2.1.2. Quinones	08
II.1.2.1.3. Les Tannins	09
II.1.2.1.4. Coumarines	10
II.1.2.1.5. Lignanes	10
II.1.2.1.6. Flavonoïdes	11
II.1.2.1.7. Anthocyanes	11
II.1.2.2. Les terpènes et Stéroles	12
II.1.2.3. Saponosides	13
II.1.2.4. Alcaloïdes	13
II.1.2. Intérêt de l'étude des plantes médicinales	14
III. Activités biologiques des extraits de plantes médicinales	14
III.1. Activité antioxydant	14

III.1.1. Définition	14
III.1.2. Classification et mécanisme d'action	15
III.1.2.1. Capture directe des radicaux libres	16
III.1.2.2. Neutralisation des radicaux formés	16
III.1.2.2.1. Acide Ascorbique (Vitamine C)	17
III.1.2.2.2. Vitamine E	17
III.1.2.2.3. Les caroténoïdes	18
III.1.2.2.4. Les polyphénols	18
III.1.2.2.5. Les flavonoïdes	19
III.2. Activité antibactérienne	19
III.2.1. Utilisation des plantes médicinales dans le traitement des infections bactériennes	20
III.2.2. Exemples des infections traitées par les plantes médicinales	21
Chapitre II : Les plantes sahariennes Algériennes	
I. La flore saharienne Algérienne	22
I.1. Caractéristiques de la végétation des milieux sahariens Algériens	22
II. Généralité sur la plante investiguée	32
II.1. La famille des polygonacées	32
II.2. Le genre <i>Calligonum</i>	32
II.2.1. <i>Calligonum azel</i> Maire	33
II.2.1.1. Description botanique	33
II.2.1.2. Localisation	33
II.2.1.3. Caractéristique botanique	34
II.2.1.4. Nomenclature de la plante	34
II.2.1.5. Composition chimique	35
II.2.1.6. Propriété pharmacologique	35
II.2.1.7. Usage traditionnelle	35
Partie 02 : Etude Expérimentale	
Chapitre I : Matériel et Méthodes	
I. Choix de la plante <i>Calligonum azel</i>	36
II. Collecte et préparation de l'extrait végétal	36

III. Screening phytochimique et caractérisation spectroscopique des métabolites secondaires	38
III.1. Mise en évidence des flavonoïdes	38
III.2. Mise en évidence des tanins	39
III.3. Mise en évidence des saponosides	39
III.4. Mise en évidence des mucilages	40
III.5. Mise en évidence des coumarines	40
III.6. Mise en évidence des alcaloïdes	40
III.7. Mise en évidence des glycosides	41
III.8. Mise en évidence des stérols et triterpènes	41
III.9. Dosage des polyphénols	41
III.10. Dosage des flavonoïdes	42
IV. Activités biologiques de l'extrait de <i>C. azel</i> Maire	42
IV.1. Evaluation de l'activité antibactérienne	42
IV.1.1. Espèces bactériennes sélectionnées	42
IV.1.2. Milieux de culture utilisés	45
IV.1.3. Test du méthanol (MeOH) et/ou DMSO	46
IV.1.4. Technique d'antibiogramme	46
IV.1.5. Activité antibactérienne de l'extrait	47
IV.1.5.1. Technique des puits	48
IV.1.5.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	48
IV.1.5.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide	49
IV.2. Evaluation de l'activité anti-oxydante par la méthode au DPPH	50
Chapitre II : Résultats et discussions	
I. Résultats de l'étude phytochimique	52
I.1. Test préliminaires de la composition chimique	52
I.2. Rendement d'extraction du <i>Calligonum azel</i>	55
I.3. Teneur des polyphénols	56
I.4. Teneur des flavonoïdes	58
II. Activités biologiques de l'extrait de <i>C. azel</i> Maire	59
II.1. L'activité antibactérienne	59
II.1.1. Test du méthanol (MeOH) et/ou DMSO (control négatif)	59

II.1.2. Antibiogramme ou control positif	60
II.1.3. L'activité antibactérienne de l'extrait	66
II.1.3.1. Méthode de diffusion dans puits	66
II.1.3.2. Méthode de micro-dilution sur microplaque	70
II.2. L'Activité antioxydant	72
Conclusion générale et perspectives	75
Références Bibliographiques	79
Annexes	
Résumé	

Liste des figures

N° de Figure	Les titres des figures	N° Page
01	Equilibre entre les oxydants et les antioxydants (état physiologique)	15
02	Régénération de la vitamine E et de la vitamine C	17
03	Calligonum azel	33
04	Localisation du site du prélèvement de l'espèce Calligonum azel	37
05	Technique diffusion d'extrait par puits sur MH	48
06	plaque a multipuits	49
07	La forme réduite DPPH et la forme radical DPPH	50
08	Résultats des tests préliminaires	53
09	Droite d'étalonnage de l'acide gallique.	56
10	Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes	58
11	Photographies de l'effet du DMSO exercé sur les différentes souches bactériennes	59
12	Photographies du test méthanol exercé sur les différentes souches bactériennes	60
13	Antibiogramme des souches testées	61
14	Antibiogramme des souches testées	63
15	Diamètres d'inhibition des souches testées	66
16	Aromatogramme des souches bactériennes (10mg/ml d'extrait)	67
17	Aromatogramme des souches bactériennes (20mg/ml d'extrait)	68
18	Pourcentages d'inhibition du DPPH* en fonction des concentrations de l'acide ascorbique et en fonction des concentrations de l'extrait méthanolique du C.azel	73

Liste des tableaux

Numéro	Titre	N° page
01	Mécanisme d'action des antioxydants d'origine enzymatique	16
02	Inventaire, catégorie, symptômes traités et parties utilisées des espèces spontanées médicinales inventoriées au Sahara septentrional algérien	24
03	caractéristiques et les maladies de la souche testées.	43
04	les Diamètre critique des antibiotiques utilisés	47
05	Screening phytochimique de la plante Calligonum azel	52
06	Rendement de la plante après extraction	55
07	Mécanismes de résistance bactérienne	65
08	Valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB) et le rapport CMB/CMI	70

Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : degré Celsius

µg : Microgramme

µl : microlitre

¹O₂ :Oxygène singulet

Ac₂O : Anhydride d'Acétate

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

AMC : Amoxicilline /Acide clavulanique

ATCC : American Type Culture Collection

BN : Bouillon nutritif

C : *Calligonum*

C : Chloramphénicol

C :Carbone

C₁₀H₁₆ : Monoterpènes

C₁₅H₂₄ : Sesquiterpènes

C₂₀H₃₂ : Diterpènes

C₄₀H₅₆ :carotène

C₅H₈ : Polyterpènes

CAT :Catalase

CMB : Concentration minimale Bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CN : Gentamicine

DMSO : Diméthyle sulfoxyde

DO : Densité optique

DPPH : 2, 2- diphenyl-1- picrylhydrazyl.

EC₅₀ : la concentration efficace qui réduit la concentration initiale de DPPH de 50 %

EOR : Espèces Oxygénées Réactives

ERO : Espèces réactives de l'oxygène.

FeCl₃ : Perchlorure de Fer

g : Gramme

GHS : Glutathion réduit

GN : Gélose nutritive

GSH-Px : Glutathion Peroxydase

H : Hydrogène

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène.

H₂SO₄ : acide sulfurique

H₃PMo₁₂O₄₀ : Acide phosphomolybdic

H₃PW₁₂O₄₀ : Acide phosphotungstic

HCl : Alcool Chlorhydrique

IC₅₀ : Concentration permettant d'inhiber 50% du radical DPPH

m : la masse

m₀ : la masse initiale

MeOH : Méthanol

mg EAG/g Ps : Milligramme d'équivalent acide gallique par gramme du poids sec de la plante.

mg EQ/g Ps : Milligramme d'équivalent quercitine par gramme du poids sec de la plante.

MH : Mueller Hinton

ml : Milligramme

mm : Millimètre

N : Normalité

Na₂CO₃ : carbonate de sodium

NaCl : Chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

NH₄OH : Hydroxyde d'ammonium

O₂• : Radical Superoxyde

P/V : poids volume

R : le rendement en %

ROOH : Hydro Peroxyde Lipidique

ROS : Reactive Oxygen Species

SFM : Société Française de Microbiologie

SOD EC 1.15.1.1 : Superoxyde dismutase

UFC : unité Formante Colonie

UNESCO : Organisation des Nations unies pour l'éducation, la science et la culture

UV : Ultra Violet

VA : Vancomycine

Introduction

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales dans l'objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes (**Iserin, 2001**), sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques, il était difficile de définir les molécules responsables de l'action pharmacologique.

Au cours des dernières années, plusieurs raisons ont mené au rétablissement de l'usage des plantes médicinales. Elles sont d'abord d'un coût inférieur aux médicaments de synthèse, puis elles arrivent à un moment où le public est désillusionné devant la médecine moderne.

Par ailleurs, actuellement, la maîtrise des infections bactériennes et fongiques devient complexe à cause d'une utilisation anarchique, abusive des antibiotiques en santé humaine et animale. L'émergence de bactéries et de champignons résistants à de nombreux antibiotiques conventionnels pose un grave problème de santé publique. Ces agents infectieux multirésistants sont néfastes surtout chez les sujets vulnérables tels que les enfants, les vieillards et les personnes immunodéprimées. La problématique de la résistance aux antibiotiques interpelle les communautés scientifiques car il est important de trouver de nouveaux agents antimicrobiens naturels en se référant aux plantes utilisées dans le traitement de maladies infectieuses en médecine traditionnelle.

La valeur médicinale des plantes est de plus en plus démontrée scientifiquement, ce qui constitue un argument de taille pour leur utilisation en médecine. Ainsi, l'industrie des plantes médicinales est devenue, en peu de temps, le secteur de l'industrie pharmaceutique connaissant la plus forte croissance annuelle avec 15 à 20 % (**Segnou et al., 1992**). Certes, la médecine restera toujours, et fort heureusement à la fois un art et une forme particulière de relation directe entre deux êtres, le malade et son médecin, ce qu'aucun ouvrage ne saurait remplacer, mais, dans le même temps, elle bénéficie de plus en plus, et de manière accélérée, des acquis des autres sciences de la recherche (**Petit Larousse de la médecine, 2002**).

De nos jours, nous comprenons de plus en plus, que les principes actifs des plantes médicinales sont souvent liés aux produits des métabolites secondaires, qui sont largement utilisés en thérapeutique, comme des agents préventifs anti-inflammatoires, antimicrobien, antiseptiques, diurétiques, Mais essentiellement antioxydant qui défendent contre le stress oxydatif (**Bourgaud et al., 2001 ; Kar, 2007**).

Introduction

Dans un pays regorgeant d'une richesse très importante en flore comme l'Algérie, la valorisation de la filière des plantes médicinales est devenue indispensable. Le Sahara, le plus vaste et le plus chaud des déserts du monde, possède dans sa partie Nord, le Sahara septentrional, une végétation diffuse et clairsemée (**UNESCO, 1960 ; Ozenda, 1991**). L'usage de plantes médicinales est traditionnel de milliers d'années et surtout au Sahara (**Beggat, 2012**). Certaines d'entre elles ont fait l'objet d'études phytochimiques et ont abouti à l'identification de principes actifs (**Moussaoui et al., 2010 ; Babaamer et al., 2012 ; Sekkoum et al., 2014**). C'est dans le cadre de la valorisation de notre patrimoine naturel que s'inscrit notre étude.

L'espèce que nous avons étudiée est : *Calligonum azel* de la famille des *Polygonaceae*. Cette plante est surtout reconnue en thérapeutique traditionnelle pour leurs propriétés remarquables (antimicrobienne et antioxydante) et leur richesse en produits du métabolisme secondaire et particulièrement en polyphénols et flavonoïdes.

Notre travail a pour objectif principal d'étudier l'effet antioxydant et l'effet antibactérien de la plante *Calligonum azel* sur des souches bactériennes connues par leur pathogénicité après avoir déterminé au préalable leur composition chimique.

La démarche poursuivie dans la réalisation de ce mémoire consiste à faire un travail comportant :

- ✚ Une analyse bibliographique élargie sur :
 - la phytothérapie et les plantes médicinales
 - les plantes sahariennes Algériennes
 - l'activité antioxydante et antimicrobienne.
 - un rappel des données botaniques sur la plante testée.
- ✚ La partie expérimentale avec la description du matériel végétal et les méthodes utilisées. Celles-ci comprennent :
 - le screening phytochimique
 - une analyse quantitative de différents composés chimiques (polyphénols et des flavonoïdes) susceptibles d'avoir une activité pharmacologique
 - Evaluation de l'activité antibactérienne par différents tests bactériologiques.
 - Evaluation de l'activité antioxydante.
- ✚ Résultats et discussion et enfin, nous terminerons par une conclusion.

Partie 01 :
Synthèse
Bibliographique

Chapitre I

La Phytothérapie et les Plantes Médicinales

I. La phytothérapie

Ce mot vient du grec phuton qui signifie « plante » et therapeia qui signifie « Traitement ». C'est donc une technique de soins qui utilise les plantes pour venir à bout des causes et symptômes de diverses maladies. C'est l'une des plus anciennes thérapeutiques (**Catier et Roux, 2007**). Elle peut se définir aussi, comme étant une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes ou de préparations à base de plantes (**Wichtel et Anton, 2003**).

Une phytothérapie efficace repose sur la qualité de la plante utilisée : plante fraîche, plante sèche, sur son extrait, et aussi sur sa teneur et sa richesse en actifs. De plus, un produit à base de plante, doit – pour avoir une efficacité optimale – rétablir toute la complexité moléculaire qui est à l'origine de son activité thérapeutique (**Iesv, 2018**).

La phytothérapie fait partie des médecines parallèles, ou médecines douces. Dans la plupart des pays, notamment en Occident, seuls les médecins ont le droit de pratiquer la phytothérapie sous forme de consultation, et seuls les pharmaciens et les herboristes sont habilités à donner des conseils au moment de l'achat [1].

I.1 Différents types de la Phytothérapie

Tout d'abord se place la phytothérapie traditionnelle. C'est une thérapie de substitution qui a pour but de traiter les symptômes d'une affection. Ses origines peuvent parfois être très anciennes et elle se base sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement (**Prescrire, 2007**). Les indications qui s'y rapportent sont de première intention, propres au conseil pharmaceutique (**Leclerc, 1999**). Elles concernent notamment les pathologies saisonnières depuis les troubles psychosomatiques légers jusqu'aux symptômes hépatobiliaires, en passant par les atteintes digestives ou dermatologiques. On peut citer pour exemple les graines de Chardonmarie (*Silybum marianum* L.) qui sont utilisées pour traiter les troubles fonctionnels digestifs attribués à une origine hépatique. En effet cette drogue se distingue par sa propriété hépato-protectrice et régénératrice des cellules hépatiques associées à une action cholérétique [1].

La seconde forme existante est la phytothérapie clinique. C'est une médecine de terrain dans laquelle le malade passe avant la maladie. Une approche globale du patient et de son environnement est nécessaire pour déterminer le traitement, ainsi qu'un examen clinique complet (**Moreau, 2003**). Son mode d'action est basé sur un traitement à long terme agissant sur le système neuro-végétatif. Cette fois-ci les indications sont liées à une thérapeutique de complémentarité. Elles viennent compléter ou renforcer l'efficacité d'un traitement allopathique classique pour des pathologies aiguës d'importance modérée (infection grippale, pathologies O.R.L...). On va principalement agir sur les effets secondaires. On peut citer par exemple l'utilisation chez un vagotonique de la Lavande (*Lavandula angustifolia* Mill.) en usage interne pour ses effets anti-stress, calmant, et pour ses actions contre les crampes musculaires, ainsi que contre les troubles du sommeil (**Jean-Yves, 2010**).

De nos jours et dans les pays occidentaux, il existe plusieurs spécialités, éventuellement combinées entre elles, qui utilisent les plantes à des fins médicales :

- **L'aromathérapie** : est une thérapeutique qui utilise les essences des plantes, ou huiles essentielles, substances aromatiques sécrétées par de nombreuses familles de plantes telles que, par exemple, les astéracées, les laminacées ou les opiacées, et extraites par distillation. Ces huiles sont des produits complexes à utiliser avec précaution et en respectant les doses prescrites, car ils ne sont pas totalement sans danger. La voie d'administration la plus intéressante, car la plus rapide et la moins toxique, est la voie percutanée (à travers la peau) [1].
- **La gemmothérapie** : se fonde sur l'utilisation d'extraits alcooliques et glycéринés de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les racines appartenant à environ 60 plantes différentes. Les préparations sont présentées diluées au dixième. Chaque extrait est réputé avoir une affinité pour un organe ou une fonction. Par exemple, le macérat glycéринé de bourgeons de *Ribes nigrum*, ou cassis, dilué au dixième, agit en tant que stimulant de la zone corticale des glandes surrénales, c'est-à-dire de la même manière que la cortisone (**Besançon, 2012**).
- **L'herboristerie** : correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne, elle se sert de la plante fraîche ou séchée ; soit entière, ou une partie de celle-ci (écorce, fleur, fruit, racine). La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération. Ces préparations sont bues ou

inhalées, appliquées sur la peau ou ajoutées à l'eau d'un bain. Elles existent aussi sous forme plus moderne de gélules de poudre de plantes sèches, que le sujet avale. Cette présentation a l'avantage de préserver les principes actifs, qui sont fragiles. Pour que le traitement soit efficace en profondeur, les prises doivent s'étaler sur une période allant de 3 semaines à 3 mois (**Besançon, 2012**).

○ **L'homéopathie** : a recours aux plantes d'une façon prépondérante, mais non exclusive : les trois quarts des souches sont d'origine végétale, le reste étant d'origine animale et minérale : c'est à partir des alcoolats que sont préparées des dilutions qui servent à imprégner les grains de saccharose et de lactose que sont les granules et les globules. La teinture mère la plus utilisée est celle de *Calendula officinalis*, ou fleur de souci [1].

○ **La phytothérapie chinoise** : fait partie d'un ensemble appelé « médecine traditionnelle chinoise » qui inclut l'acupuncture et la diététique chinoise. Cette phytothérapie vise à modifier les quantités de différentes énergies ou le circuit de ces énergies dans l'organisme (**Strang, 2006**).

○ **La phytothérapie pharmaceutique** utilise des produits d'origine végétale obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présentés comme toute autre spécialité pharmaceutique sous forme de sirop, de gouttes, de suppositoires, de gélules, de lyophilisats, de nébulisats (extraits de plantes desséchées par la chaleur), etc. Les concentrations sont assez élevées et la non-toxicité de ces médicaments est parfois relative [2].

I.2 Les avantages de la phytothérapie

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments décroît. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs (**Iserin et Masson, 2001**).

Le grand intérêt de la phytothérapie est la bonne tolérance des plantes, lorsque celles-ci sont utilisées aux bonnes posologies. Les effets secondaires, sont généralement mieux connus que pour les molécules de synthèse (**Arnal-Schnebelen, 2004**).

Généralement, les plantes médicinales d'usage courant ne provoquent que très peu d'effet indésirable, de plus, l'usage est simple et à domicile et l'effet recherché est pratiquement immédiat (**Robert, 2010**).

I.3 Les inconvénients et les risques de la phytothérapie

Certaines plantes peuvent s'avérer dangereuses (allant jusqu'à provoquer la mort) mais elles ne seront jamais prescrites, même à de faibles doses. Parmi les risques rencontrés face à cette discipline, on peut citer :

- Surdosage ;
- Allergie ;
- Contaminations par des toxiques divers (métaux lourds, micro-organismes) ;
- Présence d'une substance allopathique dans la préparation ;
- Interaction avec d'autres plantes ou traitements en particuliers allopathique ;
- Modification des doses absorbées (**Cavalier *et al.*, 2015**).

II. Les plantes médicinales

Une plante médicinale est définie par la pharmacopée française comme une « drogue végétale au sens de la pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses ». Une « drogue végétale » est une plante ou une partie de plante, utilisée, soit le plus souvent sous la forme desséchée, soit à l'état frais (**Sofowora, 2010**). Elles sont présentées pour leurs propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales (**Moreau, 2003 in Ghabrier, 2010**).

Ce sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Leur action provient de leurs composés chimiques (métabolites primaires ou secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents (**Sanago, 2006**).

II.1 Les éléments actifs dans les plantes médicinales

La plante est le siège d'une activité métabolique aboutissant à la synthèse des métabolites primaires et secondaires (**Hartmann, 2007**).

II.1.1 Métabolites primaires

Ils sont indispensables à l'existence de la plante, se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie, ils sont classés en quatre grandes familles, à savoir, **les glucides, les lipides, les acides aminés (Protéines) et les acides nucléiques**. Ils sont caractérisés par leur caractère nécessaire et vital à la survie de la cellule ou de l'organisme (**Diallo, 2005**).

- Les glucides représentent une source d'énergie surtout au niveau des parois cellulaires (cellulose).
- Les lipides constituent aussi une source d'énergie présente dans les membranes cellulaires.
- Les aminoacides représentent une source primaire de construction des protéines.

II.1.2 Métabolites secondaires

Ils sont des produits du métabolisme secondaire (exclusivité du monde végétal), ayant une répartition limitée et sont d'une grande variété structurale. Les métabolites secondaires sont divisés principalement en trois grandes familles, les **polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes** (**Abderrazak et Joël, 2007**).

II.1.2.1 Les Polyphénols

Regroupent un vaste ensemble de plus de 8000 molécules (**Bahorun, 1997**). Les polyphénols sont synthétisés par deux voies biosynthétiques : celle du shikimate, et celle issue de l'acétate (**Bruneton, 2009**).

L'élément structural fondamental qui caractérise les polyphénols est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (Ester, Méthyle ester, Glycoside...) (**Bruneton, 1999**). Les polyphénols sont classés selon le nombre d'atomes de carbone

dans le squelette de base (**Dacosta, 2003**). Il existe plusieurs classes de polyphénols, principalement : les acides phénoliques simples, les coumarines, les tanins, les quinones, les flavonoïdes, et les lignanes.

II.1.2.1.1 Acides phénoliques simples

Le terme d'acide phénolique peut s'appliquer à tous les composés possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique, on distingue :

- **Acides hydroxy-benzoïques**

Les acides hydroxy-benzoïques sont des dérivés de l'acide benzoïque. Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

- **Acides hydroxy-cinnamiques**

Dérivent de l'acide cinnamique, ils existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. On rencontre aussi des composés formés de plusieurs acides hydroxy-cinnamiques conjugués avec un acide quinique, comme l'acide 3,5-O-dicaféylquinique (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

La liste des acides phénoliques présents dans les plantes ne s'arrête pas là, nous tenons à mentionner, en particulier, l'acide méthylgallique, l'acide rosmarinique, l'acide carnosique et le carnosol (**Dacosta, 2003**). Les acides phénoliques sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae...), le plus souvent à l'état de glucoside du diphenol (arbutoside) ou de son monométhyléther. On connaît également des alcénylphénols (Urushiol) et des monoterpènes phénoliques (Thymol) (**Beddou, 2015**).

II.1.2.1.2 Quinones

Les quinones constituent une série de diènes (hydrocarbures qui contiennent deux doubles liaisons) plutôt que des composés aromatiques comportant un noyau de benzène (C6) comme benzoquinones, sur lequel deux atomes d'hydrogène sont remplacés par deux atomes d'oxygène formant deux liaisons carbonyles (dicétones éthyléniques conjuguées cycliques). Ce sont des composés oxygénés qui correspondent

à l'oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques. Ils sont caractérisés par un motif 1,4-dicéto cyclohexa-2,5-diéniq (Paraquinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa-3,5-diéniq (Ortho-quinones) (**Bruneton, 1993**). Les quinones sont utilisées dans les colorants, médicaments et fongicides.

II.1.2.1.3 Les Tannins

Les tannins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire. Les tannins sont des molécules fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux (**Alkurd et al., 2008**). ayant la propriété de tanner la peau c'est-à-dire de la rendre imputrescible (l'empêche de pourrir), composés solubles dans l'eau (**Sweeney et al., 2001**).

On distingue :

Les tanins hydrolysables ou tanins « galliques », Ce sont des esters d'acides phénoliques (acide gallique ou ellagique) associés à un polyol (habituellement le glucose) (**Clifford, 2000**). Ils sont divisés en ellagitannins et gallotannins (**Vivas de Gauljac, 2001**).

Les tanins condensés ou tanins catéchiques non hydrolysables, ils ont une structure voisine des flavonoïdes mais ne comportent pas de sucre dans leur molécule. Ils ont tendance à se polymériser pour donner des produits de coloration rouge ou brune (**Catier et Roux, 2007**). Largement présents dans le règne végétal, et que l'on rencontre dans de nombreux produits alimentaires (fruit, légumes, boissons....) (**Peronny, 2005**).

Les applications des drogues à tanins sont restreintes, et sont dues à leur affinité pour les molécules protéiques. Par voie interne ils ont un effet anti diarrhéique. En usage externe ils imperméabilisent les couches les plus externes de la peau et des muqueuses, protégeant ainsi les couches sous-jacentes et en empêchant les agressions externes, les tanins favorisent la régénération des tissus en cas de blessures superficielles ou de brûlures. Ils ont un effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels d'où leur propriété astringente.

Quelle que soit la voie d'administration l'effet antiseptique, antibactérien et antifongique, est intéressant, notamment pour les diarrhées infectieuses et les dermatoses. D'une façon générale se sont des inhibiteurs enzymatiques.

Certains tanins, aux structures voisines de celles des flavonoïdes, ont des propriétés vitaminiques P (protecteur capillaire) et veinotonique (**Catier et Roux, 2007**).

II.1.2.1.4 Coumarines

Les coumarines sont aussi les dérivés de C₆-C₃, appartiennent au groupe des composés connus par des benzo- α -pyrone (**O'kennedy et Thornes, 1997**). Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres. Elles sont produites en grande quantité en réponse à une attaque biotique ou abiotique et semblent constituer un moyen de défense de type phyto-alexine.

Les coumarines possèdent des propriétés physiologiques et antimicrobiennes. La warfarine est une coumarine utilisée comme anticoagulant qui posséderait également des propriétés antivirales (**Cowan, 1999**).

II.1.2.1.5. Lignanes

Ce sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques (C₆-C₃). Leur distribution botanique est large, ils se trouvent souvent dans le bois des gymnospermes et dans les tissus soumis à lignification chez les angiospermes (**Krief, 2003**). Les graines de lin sont la source la plus importante de lignanes, viennent ensuite, les lentilles, les haricots blancs, les graines de céréales et certains légumes (**Mazur *et al.*, 1998 cité par Dacosta, 2003**).

II.1.2.1.6. Flavonoïdes

Les flavonoïdes au sens large sont des pigments quasiment universels des végétaux (**Rice-Evans *et al.*, 1996**). On les retrouve dans toutes les plantes vasculaires, dans divers organes : racine, tiges, feuilles et fruits (**Bruneton, 1999**). Ils sont synthétisés au niveau du chloroplaste et participent à la phase lumineuse de la photosynthèse comme transporteurs d'électrons, certains quittent le chloroplaste et s'accumulent dans les vacuoles (**Elicoh-Middleton, 2000**).

Les flavonoïdes se rencontrent libre (Aglycones ou génines), soit sous forme d'hétérosides C- ou O-glycosides comme l'hyperoside et la rutine (Glycoside entre la quercétine de flavonol et le rutinose de disaccharide) (**Dacosta, 2003**).

Ils se répartissent en plusieurs classes : flavones (Apigénine, Luteoline), flavonols (Quercétrine, Kaempférol, Myricétine et Catéchine), flavanones (Naringénine), dihydroflavonols, flavanes, flavanonols, flavan-3-ols (Epicatéchine), flavylum, chalcones, aures et anthocyanines (Pélargonidine, cyanidine et péonidine), les chalcones (Butéine et phlorétine) et les isoflavonoïdes (Isoflavones, roténoïdes) et les coumaranochromones (**Bruneton, 2009**).

Les flavonoïdes sont surtout abondants chez les plantes supérieures, particulièrement dans certaines familles : Polygonacées, Rutacées, Légumineuses, Ombellifères (Paris et Hurabielle, 1980). Les membres de cette famille possèdent la structure C6-C2-C6. Ce sont des phytoalexines ; composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux (**Krisa, 1997**).

II.1.2.1.7. Anthocyanes

Les anthocyanes (du grec anthos, fleur et Kuanos, bleu violet) terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés. Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, ce sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange. Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu. A l'origine de la couleur des fleurs, des fruits et des baies rouges ou bleues, elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplies d'eau. On trouve également

les anthocynes dans les racines, tiges, feuilles et graines. En automne, les couleurs caractéristiques des feuilles des arbres sont dû aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle (*Bassas et al., 2007*).

II.1.2.2 Les terpènes et Stéroïdes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels de structure cyclique ou de chaîne ouverte, largement répandus dans le règne végétal, provenant de la voie de l'acide mévalonique (*Bhat et Nagasampagi, 2005*). Leur particularité structurale est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C_5H_8) dérivées du 2-méthylbutadiène (*Bakkali et al., 2008*).

La famille des terpènes comprend des hormones (Gibbérellines et acide abscissique), des pigments caroténoïdes (Carotène et xanthophylle), des stérols (Ergostérol, sitostérol, cholestérol), des dérivés de stérols (Hétérosides digitaliques), le latex (qui est à la base du caoutchouc naturel) ainsi qu'une grande partie des huiles essentielles qui confèrent aux plantes leur parfum ou leur gout (*Hopkins, 2003*).

Selon *Hernandez-ochoa, 2005*, Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en :

- **Monoterpènes** : formés de deux isoprènes ($C_{10}H_{16}$).
- **Sesquiterpènes** : formés de trois isoprènes ($C_{15}H_{24}$).
- **Diterpènes** : formés de quatre isoprènes ($C_{20}H_{32}$).
- **Tétraterpènes** : formés de huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes.
- **Polyterpènes** : formés de (C_5H_8) n, ou, (n de 9 à 30).

Les stéroïdes sont des triterpènes tétracycliques, possèdent moins de 30 atomes de carbone, synthétisés à partir d'un triterpène acyclique. Chez toutes les plantes on trouve ces composés liés avec un groupement alcool qu'ils nommés **les stérols** ; prenant une forme plane, glycosylée, analogues du cholestérol qui ne diffèrent de celui-ci que par leur chaîne latérale comme : B-Sitostérol, Stigmastérol (*Hopkins, 2003*).

II.1.2.3 Saponosides

Les saponosides sont des hétérosides de stérols ou de triterpènes dont les solutions aqueuses ont des propriétés tensioactives et un pouvoir moussant. Présents dans tous les organes, ce sont des hétérosides de poids moléculaire élevé qui libèrent par hydrolyse un ou plusieurs oses et une génine appelée sapogénine. Difficilement cristallisables, ils sont solubles dans l'eau et dans l'alcool dilué. (**Catier et Roux, 2007**).

L'action dominante est irritante sur les cellules ce qui peut expliquer l'effet expectorant de certains drogues (réglisse, polygala, lierre), un effet diurétique pour d'autres (petit houx), et la toxicité pour les animaux à sang froid. Les saponosides ont également une action veinotrope et même des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et anti-œdémateuses ce qui justifier leur emploi dans les manifestations de l'insuffisance veineuse, le traitement des signes fonctionnels de la crise hémorroïdaire et dans les troubles de la fragilité capillaire (**Catier et Roux, 2007**).

II.1.2.4 Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organique, le plus souvent d'origine végétale, azotées, basiques donnant des réactions de précipitation avec certains réactifs (appelés réactifs des alcaloïdes) et doués à faible dose, de propriétés physiologiques marquées.

Sur le plan chimique ils constituent un groupe très hétérogène, possédant cependant quelque propriété physico-chimique commune. Ils portent tous la terminaison « ine » (**Zenk et Juenger, 2007**). Ils constituent un des plus grands groupes de près de 10000 à 12000 structures (**Stöckigt et al., 2002**). On distingue généralement :

- **Alcaloïdes vrais**, dérivés d'acides aminés, et qui présentent au moins un hétérocycle.
- **Proto-alcaloïdes**, qui dérivent d'acides aminés, dont l'azote n'est pas inclus dans le système hétérocyclique.
- **Pseudo-alcaloïdes**, présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais mais ne sont pas des dérivés des acides aminés (**Beddou, 2015**).

II.2 Intérêt de l'étude des plantes médicinales

La plupart des espèces végétales contiennent des substances qui peuvent agir, à un niveau ou un autre, sur l'organisme humain et animal. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie. Elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus (**Iserin, 2001**).

La raison fondamentale est que les principes actifs végétaux proviennent de processus biotiques répandus dans tout le monde vivant, alors que l'essentiel des médicaments de synthèse sont des xénobiotiques aux effets secondaires très mal maîtrisés (**Bruneton, 2009**). Les plantes médicinales sont donc importantes pour la recherche pharmaceutique et l'élaboration des médicaments, directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matière première pour la synthèse des médicaments ou comme modèle pour les composés pharmaceutiquement actifs (**Decaux, 2002**).

III. Activités biologiques des extraits de plantes médicinales

III.1 Activité antioxydante

III.1.1 Définition

Un antioxydant est défini comme étant une substance chimique qui présente, à des faibles concentrations par rapport à un substrat oxydant, la capacité de ralentir ou inhiber l'oxydation de ce dernier (lipides ou autres molécules) (**Halliwell *et al.*, 1992 ; Gutteridge, 1993 ; Pokorny *et al.*, 2001 et Magalha *et al.*, 2008**), et le transformer en un composé plus stable. Un antioxydant est caractérisé par sa grande affinité pour un radical donné (**Simonoff et Simonoff, 1991 ; Pelli et Marika, 2003**) et peut prévenir ou réparer les dommages oxydatifs au niveau de la cellule, en réduisant ainsi les risques des maladies oxydatives chroniques (**Dimistrios, 2006 ; Suganya *et al.*, 2007**).

L'oxygène est un élément indispensable à la vie dont le métabolisme cellulaire aboutit à la formation continue de faibles quantités d'espèces oxygénées réactives (E.O.R) appelés «radicaux libres» qui sont des molécules ou des atomes possédants sur leurs couches externes un électron célibataire. L'action des antioxydants est régie par une balance équilibrée par la production et la destruction des

E.O.R. (Fig.1). Elles sont produites de façon permanente et contrôlée par un système d'antioxydants enzymatiques (Dimistrios, 2006 ; Hui-Yin *et al.*, 2007).

Les antioxydants d'origine naturelle semblent contribuer de manière significative à la prévention des maladies telles que le cancer ou encore des maladies cardio- vasculaires et neurodégénératives (Prior et Gu, 2005).

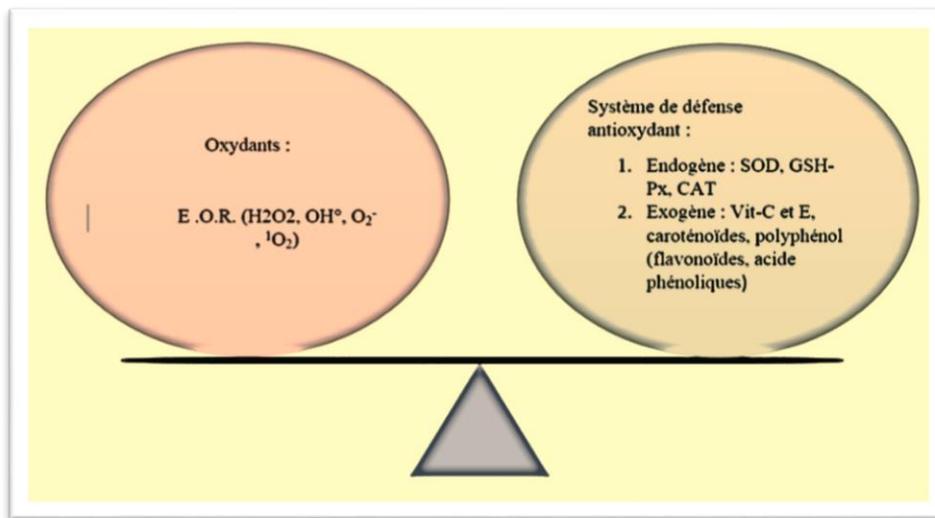


Figure 01: Equilibre entre les oxydants et les antioxydants (état physiologique) (Prior et Gu, 2005).

III.1.2 Classification et mécanisme d'action

Afin de prévenir l'accumulation excessive des E.O.R, la plante développe un système de défense enzymatique et un autre non enzymatique. Cette protection est basée sur plusieurs mécanismes d'action (Zhang *et al.*, 2008):

- Capture directe des radicaux libres assurée par les enzymes antioxydantes;
- Neutralisation des radicaux formés par les antioxydants naturels, incluant (Chao-Chin *et al.*, 2008 ; Magalh *et al.*, 2008): piégeage des E.O.R et leur transformation en produits plus stables, chélation métallique responsable de la production des E.O.R, inhibition des enzymes oxydatives, extinction des E.O.R

III.1.2.1 Capture directe des radicaux libres

Ce mécanisme représente le système de défense endogène chez l'animal et la plante; les enzymes intervenant dans cette opération sont regroupées dans le tableau 01.

Tableau 01: Mécanisme d'action des antioxydants d'origine enzymatique.

Enzyme	Mécanisme d'action	Références
Superoxyde dismutase (SOD EC 1.15.1.1)	C'est une métalloprotéine contenant du manganèse, cuivre et de zinc. Elle élimine le radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$ en le transformant en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).	Pokorny et al., 2001 ; Gapińska et al., 2008 ; Iriti et Faoro-Water, 2008
Glutathion peroxydase (GSH-Px)	Elimination du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le hydro peroxyde lipidique (ROOH), en association avec le glutathion pour donner respectivement une molécule d'eau et (ROH).	
Catalase (CAT)	Transformation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en simple molécule d'eau	
Glutathion réductase	Régénération du glutathion réduit (GHS).	Aurousseau, 2002

III.1.2.2. Neutralisation des radicaux formés

Ce groupe d'antioxydants est uniquement exogène, il comprend les métabolites secondaires d'origine végétale en particuliers: des polyphénols (flavonoïdes, acides phénoliques, coumarines, des tannins condensés, etc...), caroténoïdes, terpénoides, et vitamines (C et A).

III.1.2.2.1. Acide Ascorbique (Vitamine C)

L'acide ascorbique, appelée également vitamine C, est principalement présent dans les légumes et les fruits. Il possède un effet antioxydant car il :

- Protège efficacement les protéines sans protéger les lipides (**Kraus et al., 1997**).
- Intervient pour régénérer la vitamine E (**Fig.2**) (**Iriti et Faoro-Water, 2008**).
- Piège le superoxyde au niveau du cytoplasme (**Aurousseau, 2002**)

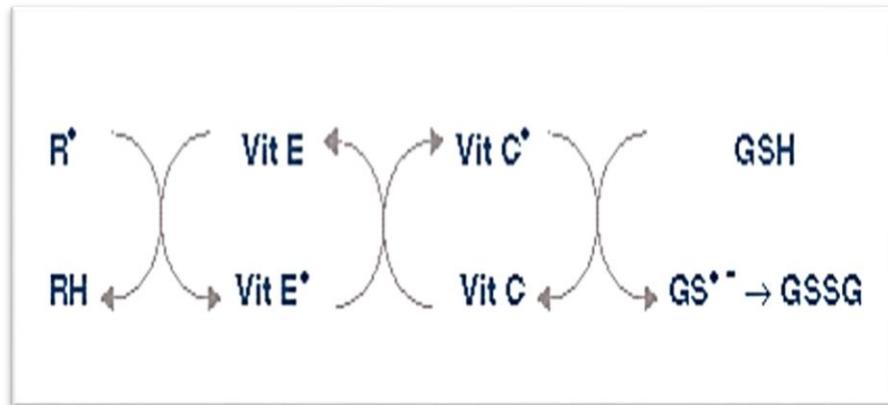


Figure 02: Régénération de la vitamine E et de la vitamine C (**Pincemail et al., 1999**)

III.1.2.2.2. Vitamine E

La vitamine E ou α tocophérol est une vitamine liposoluble membranaire, abondante dans l'alimentation où elle se trouve en quantité importante dans les huiles végétales, et en particulier dans le germe de blé (**Pokorny et al., 2001**).

L' α tocophérol est un donneur de H, et permet la formation de peroxydes lipidiques (ROOH), ou de produit stable, pendant que lui-même se transforme en quinone (α TH, α tocophérylquinone (TQ)), selon les réactions suivantes (1 et 2) (**Simonoff et Simonoff, 1991**):



Par son caractère hydrophobe, la vitamine E est un antioxydant très puissant qui peut s'insérer au sein de la membrane biologique où elle agit :

❖ **De façon directe :**

- Elle intervient dans la protection des acides gras insaturés, très sensibles à l'oxydation du fait de leur structure.
- Elle empêche ainsi la formation des radicaux peroxydes.
- Elle participe également à la protection des structures lipidiques, notamment celles des membranes des cellules et celles des lipoprotéines (**Kraus et al., 1997**).
- Elle inhibe la peroxydation lipidique par piégeage d'oxygène singulet (**Pokorny et al., 2001**).

❖ **De façon indirecte :**

Du fait de leur grande affinité pour les radicaux libres, les lipides insaturés protègent les protéines en se comportant en piège à radicaux libres, tandis que leur régénération par la vitamine E maintient cette protection (**Cheesman, 1987**).

III.1.2.2.3. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles jaunes, oranges ou rouges, dont la structure de base est une ossature de carotène $C_{40}H_{56}$ formés de 8 unités isoprènes (tétraterpènes). On distingue plusieurs types de caroténoïdes parmi eux : les carotènes et les xanthophylles (**Pokorny et al., 2001**). Les Caroténoïdes sont des antioxydants naturels efficaces contre les dommages oxydatifs. Leurs principaux mécanismes d'action sont (**Smirnoff, 2005 ; Chao-Chin et al., 2008**):

- Piégeage de l'oxygène singulet 1O_2 ;
- Inhibition de la peroxydation lipidique.

III.1.2.2.4. Les polyphénols

Les polyphénols constituent un groupe important des métabolites secondaires, très largement répandus dans le règne végétal. Ils sont reconnus pour leurs multiples propriétés biologiques: anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antifongiques

,anticancéreuses incluant l'activité antioxydante. Ce sont des antioxydants naturels puissants impliqués dans la défense contre les dommages oxydatifs au niveau de la cellule car ils possèdent des structures chimiques idéales. L'activité antioxydante des polyphénols est plus puissante que celle des tocophérols et de l'acide ascorbique (**Ozsoy *et al.*, 2008**).

Les actions protectrices des polyphénols peuvent comprendre (**Magalha *et al.*, 2008**):

- inhibition des E.O.R ($^1\text{O}_2$) ;
- Piégeage des radicaux libres ;
- Chélation des ions métalliques responsables de la production des E.O.R ;
- Inhibition des enzymes responsables de la production des E.O.R (exemple : xanthine oxydase et cyclo-oxygénase).

III.1.2.2.5. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés naturels qui constituent un groupe majeur de polyphénols. Ces composés sont reconnus pour leurs activités antioxydantes. Ils agissent par (**Halliwell, 1994**):

- Piégeage direct des radicaux libres;
- Inhibition de la peroxydation lipidique;
- Inhibition des enzymes responsables de la production des E.O.R;
- Chélation des ions métalliques responsables de la production des E.O.R.

III.2 Activité antibactérienne

Une infection bactérienne est un ensemble de troubles qui résultent de la pénétration d'une bactérie pathogène dans un organisme. Elle peut être :

- locale, lorsqu'elle se manifeste uniquement au niveau où les germes ont pénétré ;
- générale, lorsqu'un germe franchit les barrières opposées par l'organisme à son entrée (peau, muqueuses) ou au niveau des ganglions, il pénètre dans le sang et se dissémine par celui-ci dans tout l'organisme ;
- focale : c'est l'infection en foyer dans les tissus ou organes où les germes sont apportés par la circulation sanguine (**Pocidalo *et al.*, 1989 ; Marc *et al.*, 2004**).

qui ont toujours constitué une source d'inspiration dans les recherches médicales (Ali-Shtayeh et al., 1998).

Il est connu que le traitement des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. Mais, la consommation à grande échelle de ces « médicaments » a entraîné la sélection de souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouveaux substituts, surtout les végétaux

III.2.1 Utilisation des plantes médicinales dans le traitement des infections bactériennes

Les remèdes à base de plantes constituent une alternative dans les systèmes de soins primaires et donc, une voie prometteuse pour le développement des médicaments traditionnellement améliorés. Récemment, beaucoup de chercheurs s'intéressent aux plantes médicinales pour leur richesse en antioxydants naturels à savoir les polyphénols, les flavonoides, les tanins, ... etc. qui possèdent des activités antimicrobiennes. De ce fait, l'exploitation de nouvelles molécules bioactives ayant des effets secondaires limités ou inexistantes depuis des sources naturelles et leur adoption comme une alternative thérapeutique aux molécules synthétiques sont devenues des objectifs prioritaires pour les recherches scientifiques et les industries alimentaires et pharmaceutiques.

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement dues à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les micro-organismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité (Cowan, 1999). Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des micro-organismes (Scalbert, 1991).

Les flavane-3-ols, les flavonols et les tanins ont reçu plus d'attention du à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols, à leur capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne telle que l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes ainsi qu'à leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques (Daglia, 2011).

La quercétine et la naringénine sont rapportés être des inhibiteurs de *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus nervous*, *Staphylococcus epidermis* et *Saccharomyces cerevisiae* (Sandhar et al., 2011). En outre, la morine-3-O-lyxoside, morine-3-O-arabinoside et la quercétine-3-O-arabinoside possèdent une action bactériostatique sur les bactéries pathogènes contaminant les denrées alimentaires y compris *Bacillus stearothermophilus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enteric*, *Staphylococcus aureus* et *Vibrio cholera*.

Les flavonones ayant un groupement de sucre ont aussi montré une activité antimicrobienne, tandis que certaines flavonolignanes n'ont montré aucune activité inhibitrice envers les micro-organismes (Sandhar et al., 2011).

III.2.2 Exemples Des infections traitées par les plantes médicinales

Soigner une infection urinaire : les bactéries responsables des cystites sont le plus souvent d'origines digestives (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter...*). Aussi faut-il être particulièrement vigilant à l'équilibre de sa flore intestinale par la prise de probiotiques et également lutter contre la constipation qui encourage le passage des bactéries d'un système à l'autre.

Du côté des plantes, lors d'infections déclarées, on utilisera en priorité la busserole (*Arctostaphylos uva-ursi*) en infusion (12 g pour un litre d'eau bouillante, à infuser 15 minutes), à raison d'un litre par jour pendant 10 jours. Pour plus de commodité, vous pouvez prendre des spécialités de pharmacie avec la même plante (par exemple, Elusane 3 gélules 3 fois par jour pendant 10 jours).

En prévention des récives, privilégiez-la prise au long cours de canneberge (*Vaccinium macrocarpon*) dont les proanthocyanidols inhibent l'adhérence des bactéries à l'épithélium de l'arbre urinaire.

Chapitre II

Les plantes médicinales saharienne Algérienne

I. Choix de la plante *Calligonum azel* Maire

Le choix de la plante n'est pas basé sur le seul hasard, mais selon un choix bien ciblé. Le plus visé est la valorisation des plantes médicinales sahariennes en vue de leur exploitation dans des activités thérapeutiques diverses (activités antimicrobiennes, cytotoxiques, anti-inflammatoires.....). Il est à noter que l'un des buts essentiels de l'examen phytochimique est la détection des composés existants dans la plante ce qui constitue la première étape dans la recherche des molécules bioactives.

II. Collecte et préparation de l'extrait végétal

La cueillette, de l'espèce *Calligonum azel* Maire (partie aérienne) appartenant à la famille des polygonacées a été effectuée le mois de Janvier 2018 dans une station géographique située dans le grand erg oriental saharien. Ce dernier s'étend dans le bassin des anciennes rivières Igharghar et Ghir qui coulaient vers le nord depuis le massif de l'Ahaggar dans la grande dépression du Chott Melrhir. Les limites du Grand Erg Oriental sont : au sud, le plateau du Tinrhert, la hamada al Hamra en Libye, à l'est, et la grande dépression du Chott Melrhir et du Chott el Djérid au nord, dont des parties se trouvent en dessous du niveau de la mer.

Les coordonnées de la station de prélèvement se situent entre les latitudes 30° 05' N et 30° 25' N et la longitude de 007 20' E et 007° 50' E. à environ 215 km au sud-est de la ville de Hassi Messaoud- Wilaya d'Ouargla- Algérie (**fig. 4**).

La plante a été débarrassée de tous éléments étrangers, et placée dans des sacs en plastique. L'identification de l'espèce a été faite par Pr. Zaafour, Université Badji-Mokhtar, Annaba (Algérie). Au laboratoire l'espèce végétale a été rincée à l'eau distillée, séchée à l'abri de la lumière, ensuite broyée en poudre par un moulin électrique, puis conservée dans des bocaux en verre sombre fermé hermétiquement en vue des tests phyto-chimiques et biologiques.

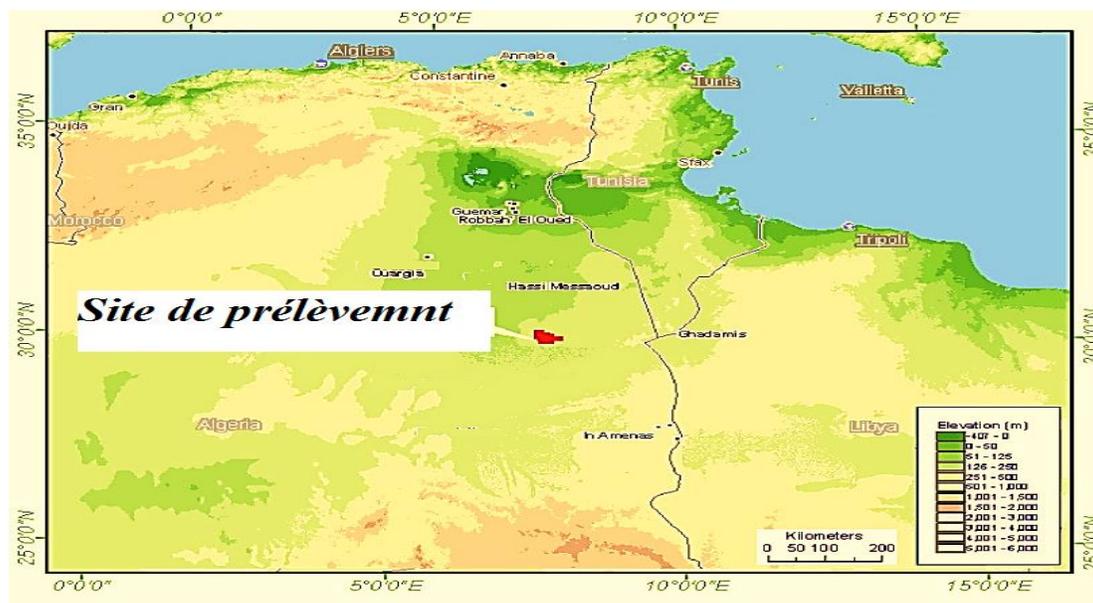


Figure 04 : Localisation du site du prélèvement de l'espèce *Calligonum azel*

La poudre végétale a subi une macération dans le méthanol à 85% à raison de 25% (P/V) pendant 24h à température ambiante. Le macérât, par la suite est filtré, la partie sédimentaire est mise à deux autre macérations successives avec le même solvant à raison de 50% (P/V).

Les trois filtrats sont mélangés et évaporés à basse température (40°C) avec un Rot à vapeur (R-215), le résidu est récupéré dans des flacons hermétiquement fermés, puis lyophilisés (Mbodj, 2003). Le lyophilisat récupéré est pesé afin de calculer le rendement de l'extraction. Ce dernier est le rapport entre le poids de l'extrait obtenu et le poids initial de la plante utilisée, il est exprimé en pourcentage et calculé selon la formule suivante :

$$R = 100 m / m_0$$

R : le rendement en %.

m : la masse de l'extrait.

m₀ : la masse initiale de la poudre végétale.

III. Screening phytochimique et caractérisation spectroscopique des métabolites secondaires

III.1 Mise en évidence des flavonoïdes

On met 3 g de la poudre avec 75 ml d'eau distillée dans une fiole. Le mélange est porté à ébullition pendant 15 minutes. On filtre et on laisse refroidir (**Mbodj, 2003**).

- **Coloration en milieu alcalin**

En milieu alcalin, les flavonoïdes se dissolvent facilement en donnant des colorations allant du jaune au brun. A 2 ml de l'extrait, on ajoute quelques millilitres de soude au 1/10 dans un tube à essai.

On a eu une coloration jaune orangé, donc le test est positif (**Mbodj, 2003**).

- **Coloration par le perchlorure de fer (FeCl₃)**

Les flavonoïdes, du fait de la présence de fonctions phénoliques dans leur génies, donnent des colorations variées avec des diluées de FeCl₃. A 2 ml de solution extractive on ajoute 2 à 3 gouttes d'une solution de FeCl₃ diluée à 2%.

L'apparition d'une coloration verdâtre, indique que le test est positif (**Mbodj, 2003**).

- **Réaction de cyanidine**

En solution alcoolique, en présence d'hydrogène naissant, produit *In situ* par action de chlorhydrique sur du magnésium, les flavonoïdes donnent des colorations variées allant du rouge-oranger au violet. On introduit dans un tube 2 ml de l'extrait. On ajoute 2 ml d'alcool chlorhydrique (alcool à 96° = 2 volume ; eau = 2 volume ; HCl concentré = 1 volume).

Coloration orange, puis violette, donc la réaction est positive (**Mbodj, 2003**).

III.2 Mise en évidence des tanins

Dans un Erlenmeyer, on met 5 g de poudre dans 100 ml d'eau bouillante. Après infusion pendant 15 mn, on filtre et on complète le filtrat à 100 ml avec de l'eau distillée.

On introduit 5 ml d'infusé à 5 % dans un tube à essais, puis on ajoute 1 ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 1 %. En présence de tanin, il se développe une coloration verdâtre ou bleu noir (Edeoga1 *et al.*, 2005).

- **Tanins cathéchiques**

A 5 ml de solution à 5% on ajoute 5 ml d'HCl concentré. L'ensemble est porté à ébullition pendant 15mn puis on filtre sur papier filtre. En présence de tanins catéchiques, il se forme un précipité rouge (Edeoga1 *et al.*, 2005).

- **Tanins galliques : réaction de stiasny**

A 30 ml de solution à 5% on ajoute 15 ml de réactif de stiasny (10 ml de formol à 40% et 5 ml de HCl concentré), puis on chauffe au bain-marie à 90°C pendant 15 mn environ. Après filtration le filtrat est saturé par 5 g d'acétate de sodium. On ajoute alors 1 ml goutte à goutte d'une solution de FeCl_3 (à 1%) l'observation d'une teinte bleu noire montre la présence de tanins galliques non précipité par réactif de stiasny (Edeoga1 *et al.*, 2005).

III.3 Mise en évidence des saponosides

On porte à ébullition 100 ml d'eau distillée dans un erlenmeyer de 250 ml puis on ajoute 1 g de la poudre ensuite on maintient une ébullition pendant 15 mn. Après filtration, on ajuste le filtrat à 100 ml. On remplit 1ml du décocté à 1 % préparé dans un tube à essais et on ajuste le volume à 10 ml avec de l'eau distillée. Ensuite, on agite le tube. Pour confirmer la présence des saponosides, il faut qu'une mousse apparait après avoir laissé au repos pendant 15 minute le tube à essai (Karumi *et al.*, 2004).

III.4 Mise en évidence des mucilages

On introduit 1 ml du décocté à 10 % dans un tube à essais et on ajoute 5 ml d'éthanol absolu. Après une dizaine de minutes, l'obtention d'un précipité floconneux dans le mélange, indique la présence de mucilages (**Karumi et al., 2004**).

III.5 Mise en évidence des coumarines

On place 1 g de l'échantillon de la poudre dans un tube à essais, on recouvert le tube avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et on place dans un bain-marie pendant quelques minutes. On ajoute 0,5 ml de NH₄OH (10%), on met deux taches sur un papier filtre et on examine sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines (**Rizk, 1982**).

III.6 Mise en évidence des alcaloïdes

○ Macération

On met 10 g de la poudre végétale dans un erlenmeyer de 250 ml+ 50 ml de H₂SO₄ dilué au 1/10 (50 ml). On laisse macérer pendant 24 heures à la température du laboratoire. On filtre sur papier lavé à l'eau distillée de manière à obtenir environ 50 ml de filtrat (**Dohou et al., 2003**).

○ Réactions de caractérisation

1 ml de filtrat + 5 gouttes du réactif de MAYER (5 g de KI et 1,358 g de HgC₁₂ solubilisés dans 100 ml d'eau distillée) s'il apparaît un précipité c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes (Précipité blanc-jaunâtre).

1 ml de filtrat + 5 gouttes de réactif de WAGNER (2 g de KI et 1,27g d'I₂ solubilisés dans 100 ml d'eau distillée) s'il apparaît un précipité brun c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes filtrat (**Dohou et al., 2003**).

- **Test de confirmation**

Nous procédons à une extraction de la poudre végétale en milieu acide. Dans un ballon de 500 ml contenant 5 g de poudre végétale on verse 25 ml d'acide chlorhydrique 0,05 N. Le mélange est laissé en macération sous agitation magnétique à la température du laboratoire (environ 25° C) pendant 24 heures ; puis filtré et lavé à l'eau distillée. La solution obtenue est ensuite ajustée à 20 ml avec de l'eau distillée, et après on réalise les tests de caractérisation précédents filtrat (**Dohou et al., 2003**).

III.7 Mise en évidence des glycosides

5 g de plante, mise en poudre, on y ajoute 50 ml d'une solution de l'acide tartrique 2% dans l'éthanol, on chauffe à reflux durant 2 h, après filtration et lavage par l'éthanol, on met le filtrat dans l'eau chaude. Dans un tube à essai, on ajoute à 2 ml du filtrat 2 gouttes de la liqueur de Fehling, on chauffe, la réaction de la liqueur de Fehling montre la présence des glycosides (**Chaouch, 2001**).

III.8 Mise en évidence des stérols et triterpènes

5 g de plante, mise en poudre, a été mis dans 20 ml de chloroforme. Après filtration la solution obtenue est répartie entre deux tubes à essais (l'un servira de référence). On ajoute d'abord anhydride d'acétate (Ac_2O) ; ensuite nous avons ajouté 1 ml d' H_2SO_4 au fond du tube sans agiter. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et d'une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence des stérols et des triterpènes. C'est la réaction de Liebermann-Buchard (**Benzahi, 2001 ; Chaouch, 2001**).

III.9. Dosage des polyphénols

La teneur en composés phénoliques de l'extrait de *C.azel* a été estimée par la méthode de Folin-ciocalteu selon (**Li et al., 2007**) basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstic (WO_4^{-2}) phosphomolybdic (MoO_4^{-2}) du réactif de Folin par les groupement oxydables des composés polyphénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un

maximum d'absorption dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (**Georgé *et al.*, 2005**). Brièvement, 1 ml de réactif de Folin (dilué 10 fois) est ajouté à 200 µl d'échantillon ou de standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables, Après 4 min, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (0,75%) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 heures d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de la droite d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-200 µg/ml) et est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.

III.10. Dosage des flavonoïdes

L'évaluation quantitative des flavonoïdes dans l'extraits selon la méthode du trichlorure d'aluminium (**Bahorun *et al.*, 1996**). Brièvement, l'échantillon est préparés par la dissolution de 1mg (extrait)/ml (méthanol). 1 ml de l'échantillon est ajouté 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2%, dans le méthanol). Dix minutes après le début de la réaction, l'absorbance est lue à 430 nm.

Une gamme étalon est établie séparément avec la quercétine (0-40 µg/ml) pour calculer la concentration des flavonoïdes dans l'extrait. Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme d'équivalent quercétine par gramme d'extrait.

IV. Activités biologiques de l'extrait de *C. azel* Maire

IV.1 Evaluation de l'activité antibactérienne

IV.1.1 Espèces bactériennes sélectionnées

L'activité antibactérienne de l'extrait hydro-méthanolique de l'espèce cible a été évaluée sur 21 souches bactériennes : trois souches de références ATCC (American Type Culture Collection) : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, ATCC 43300) et 18 souches cliniques, l'ensemble est procuré

des 2 hôpitaux : Ibn Zohr et El Hakim el Okbi- wilaya de Guelma. Les principales caractéristiques des souches impliquées sont présentées dans le tableau 03.

Tableau 03 : Principales caractéristiques des souches cibles.

Morphologie et Gram	Espèces	Référence	Source	Code	Habitat	Pathogénicité
Bacille Gram⁻	<i>E. coli</i>	2278 Clinique	Urines	<i>E.Coli</i> 2278(U)	Humain	Diarrhée Suppuration
	<i>E. coli</i>	379 Clinique	Urines	<i>E.Coli</i> 397(U)	Animale Environnement (eau, aliment)	Infection urinaire et génitale bactériémie méningite toxi-infection alimentaire
	<i>E. coli</i>	ATCC 25922	-	-		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	328 Clinique	Infection Homme	<i>P.aeruginosa</i> 328 (IH)	Humain Environnement	Bactérie souvent Multi-résistante
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	423 Clinique	Infection Femme	<i>P.aeruginosa</i> 423 (IF)	(Eau, sol, végétaux)	aux antibiotiques surinfections de plaies, ulcères, suppurations
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Clinique	Infection homme	<i>K.pneumoniae</i> (IH)	Humain Environnement	Suppuration bactériémie
	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemas e</i>	Clinique 408	Urines	<i>KPC</i> (U)	(Eau, sol, végétaux)	Pneumopathie Infection urinaire
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	325 Clinique	Urines	<i>K.oxytoca</i> 325(U)		

	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	380 Clinique	Urines	<i>K.pneumoniae</i> 380 (U)		
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	312 Clinique	Infection homme	<i>A.baumannii</i> (IH)	Humain (peau et muqueuses)	Bactériémie
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	312 Clinique	Infection Femme	<i>A.baumannii</i> (IF)	Environnement al (eau, sol)	Pneumopathie
	<i>Proteus sp.</i>	Clinique	Urée	<i>Proteus spp</i> (Ur)	Humain Animale Environnement (Sol, eau)	Bactériémie Infection urinaire
	<i>Citrobacter koseri</i>	Clinique	Infection Femme Pus	<i>C.koseri</i> (IF)	Humain Animale Environnement (eaux et	Infection urinaire Septicémie Surinfection de l'arbre respiratoire
	<i>Citrobacter koseri</i>	Clinique	Pus lingerie homme	<i>C.koseri</i> (IH)	aliments pollués)	
	<i>Enterobacter cloacae</i>	PPL372	Infection Femme	<i>E.cloacae</i> (IF)	Humain Animale	Suppuration bactériémie
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Clinique	Service Infect (homme)	<i>E.cloacae</i> (IH)	Environnement (Sol, eau, végétaux)	Pneumopathie Infection urinaire
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	-		Humain (peau,	

Cocci Gram +					rhinopharynx, vagin)	Staphylococcie : Infection de La peau et des parties molles (plaie, brûlure) Pneumopathie Bactériémie, septicémie Infection urinaire Infection osteo-articulaire Infection sur cathéter et sur prothèse Toxi-infection alimentaire
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 43300	-		Environnement (Poussières, aliments)	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Clinique	Extraction vaginale	<i>S.epidermidis</i> (EV)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Clinique	Service Infection (homme)	<i>S.aureus</i> (IH)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	358 Clinique	Pus	<i>S.aureus</i> 358(P)		

IF :Infection Femme ;**IH** :Infection Homme ;**U** :Urine ;**Ur** :Urée ;**P** :Pus ;**EV** :Extraction Vaginale.

IV.1.2 Milieux de culture utilisés

Selon les techniques employées, les milieux de culture utilisés sont les suivants :

- Gélose nutritive (GN) : un milieu d'isolement non sélectif, utilisé dans le but de repiquer la bactérie ou de la purifier si elle est contaminée.
- Le milieu Muller Hinton (MH) : reconnu par tous les experts comme étant le milieu de référence pour l'étude de la sensibilité des germes aux antibiotiques et toutes autres substances qui possèdent une activité antimicrobienne comme les extraits.

- Le bouillon nutritif : constitue un milieu d'utilisation générale pour un grand nombre de microorganismes ne présentant pas d'exigences particulières
- **Préparation de l'inoculum**

Une culture de 18 à 24 h de la souche à tester sur bouillon nutritif a été préalablement préparée à une concentration égale à 10^8 UFC/ml en mesurant la DO à 620 nm entre 0,08 et 0,1 (Larif *et al.*, 2013). Ensuite les souches sont ensemencées sur gélose Müller-Hinton par écouvillonnage selon les recommandations de CLSI (CLSI, 2011).

IV.1.3 Test du méthanol (MeOH) et/ou DMSO

Après ensemencement du MH par la suspension bactérienne (0.5 Mc Farland), des puits de 6 mm de diamètres sont créés en surface, par la suite un volume de 100 μ l du solvant (méthanol à 85% et DMSO testé à deux concentrations 10 et 100%) sont introduits dans les puits, les boîtes ainsi, sont incubées durant 24 heures à 37°C. Après incubation, les diamètres d'inhibitions formés sont mesurés (Mbata *et al.*, 2006). Deux répétitions sont réalisées pour chaque diluant.

IV.1.4. Technique d'antibiogramme

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. Dans la présente étude 4 antibiotiques sont sélectionnés (tab.4).

Tableau 4 : Diamètres critiques des antibiotiques utilisés (SFM, 2013)

Antibiotiques	Charge de disques	Diamètre critique	
		Sensibles	Résistants
chloramphénicol (C)	30µg	≥23	<19
Gentamicine (CN)	30µg	≥16	<14
Amoxiclave (AMC)	20µg+10µg	≥21	<14
Vancomycine (VA)	30µg	>17	<17

➤ **Réalisation de l'antibiogramme**

Nous avons mis à profit la méthode de diffusion en milieu gélosé préconisée par Vandepitte *et al.*, (1994).

➤ **Principe :**

Une suspension bactérienne du germe à tester estensemencée dans des boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller Hinton. Des disques d'antibiotiques sont ensuite déposés sur la gélose ; puis les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C. Après 24 h d'incubation, on procède à la lecture des résultats par la mesure des diamètres d'inhibition autour des disques (disque inclus). 2 répétitions sont réalisées pour chaque antibiotique.

IV.1.5 . Activité antibactérienne de l'extrait

Le test de susceptibilité de l'extrait a été effectué selon deux méthodes différentes: la méthode des puits en milieu Mueller-Hinton comme un test préliminaire permettant la mise en évidence de l'activité antibactérienne et la méthode des micro dilutions qui a pour but de déterminer la concentration inhibitrice minimale CMI à partir d'une gamme de concentrations.

IV.1.5.1 Technique des puits

L'activité antibactérienne de l'extrait a été évaluée par la technique des puits (Mbata *et al.*, 2006). Chaque puit de 6 mm de diamètre a été rempli par 100 μ l d'extrait (dissous préalablement dans le DMSO) à raison de 2 concentrations : 10 et 20 mg/ml. 3 répétitions ont été réalisées pour chaque concentration. Après incubation de 24 h à 37°C, des zones d'inhibition (en mm) autour des puits ont été mesurées (fig.5). Selon Tekwu *et al.*, (2012) Les bactéries sont classées selon le diamètre d'inhibition dans l'une des deux catégories suivantes : **Non sensible** : <10 ; **Sensible** : \geq 10

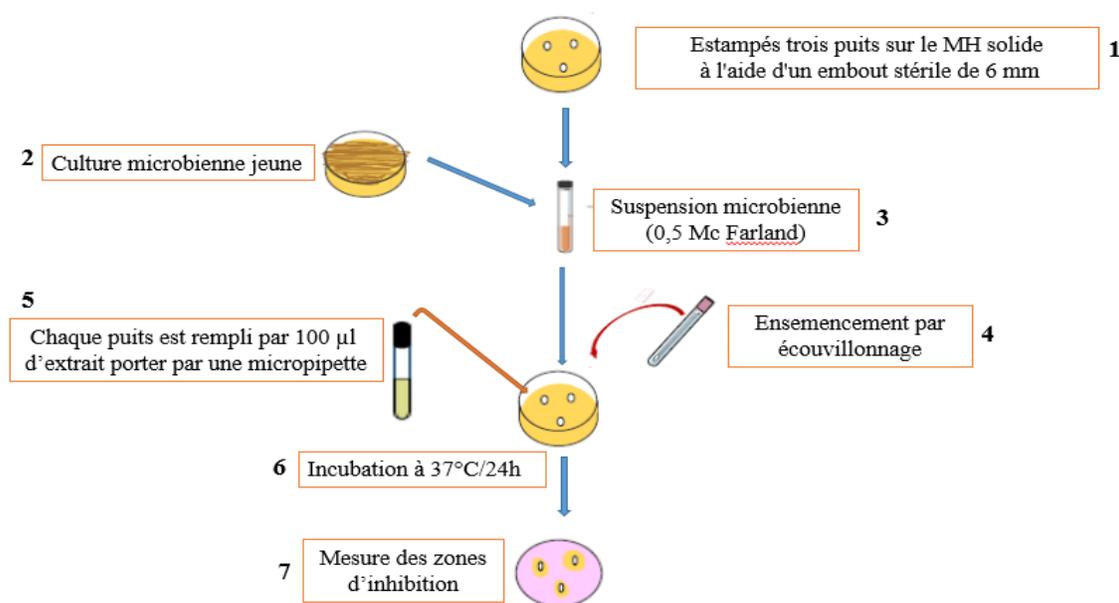


Figure 05 : Essai de l'activité antibactérienne de l'extrait par méthode de puits.

IV.1.5.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice de l'extrait de lazelle a été déterminée selon la méthode de microdilution (Mann *et al.*, 1998). Dans une plaque de 96 puits stériles (Fig.6), 100 μ l d'extrait (préparé à une concentration de 20 mg/ml dans le DMSO), sont dilués dans le milieu Mueller-Hinton. En effet, à partir de cette

concentration, des dilutions en cascades ont été réalisées (par le milieu MH) pour obtenir des concentrations de finales de 20000 à 10 µg/ml. La suspension bactérienne (100 µL) a été ensuite ajoutée aux puits. Le volume final dans chaque puits était de 200 µL. 2 puits témoins ont été préparés, l'un avec du milieu de culture mélangé avec du DMSO, et additionnée de la suspension bactérienne et l'autre été exempté de cette dernière, ce puit est considéré comme témoin de stérilité.

Les plaques d'ELISA (**fig.6**) sont par la suite incubées à 37°C pendant 24 h. La CMI est déterminée par observation visuelle de la turbidité. La CMI est la concentration la plus faible d'extraits, ne montrant aucune précipitation de dépôt bactérien au fond du puit. L'expérience a été effectuée 3 fois.

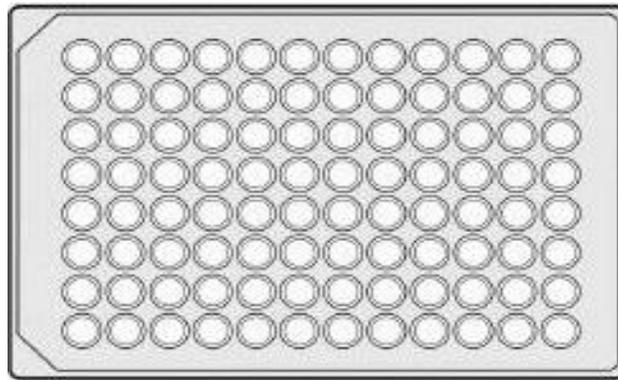


Figure 06 : plaque multipuits

IV.1.5.3 Détermination de la concentration minimale bactéricide

La concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en extrait capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Elle définit l'effet bactéricide d'un extrait. Des prélèvements sont effectués à partir du puit témoin et de chacun des puits dépourvus de culot bactérien, puis ensemencés par stries sur gélose MH. Les boîtes ensemencées sont incubées durant 24 heures à 37°C (**Bousseboua, 2001 ; 2006**).

IV.2 Evaluation de l'activité anti-oxydante par la méthode au DPPH

○ Principe

Le DPPH est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété anti radicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (**Sanchez-Moreno, 2002**).

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation et la figure 07 :



Où : (AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picryl hydrazine (jaune) (**Brand-William et al., 1995**).

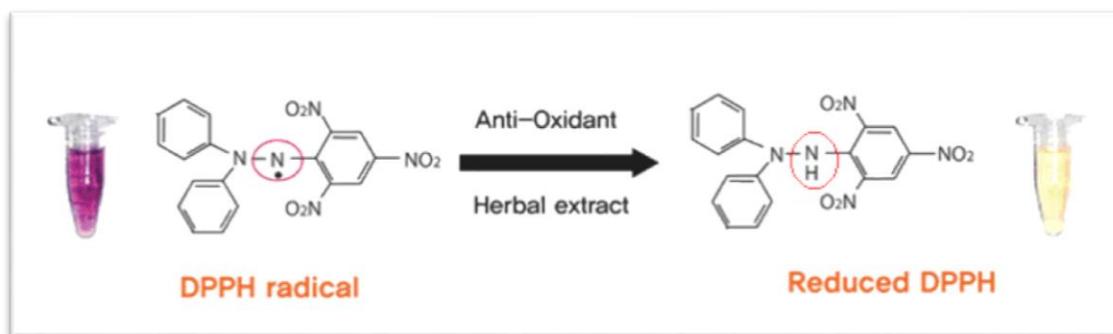


Figure 07 :La forme réduite DPPH et la forme radical DPPH (**Molyneux, 2004**)

- **Mode opératoire**

1ml de solution méthanolique de DPPH (6×10^5 mmol) est ajouté à 1ml de la solution d'extraits, le mélange est vigoureusement agité, puis les tubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes.

Le blanc est représenté par le méthanol, Le témoin négatif est composé de 1 ml de la solution méthanolique de DPPH et 1 ml de méthanol, Le témoin positif est représenté par une solution méthanolique d'un antioxydant standard : la vitamine C ou acide ascorbique. La longueur d'onde d'absorption maximale a été préalablement déterminée. Toutes les lectures sont effectuées à 517 nm. Deux répétitions sont effectuées pour l'extrait végétal.

- **Expression des résultats**

Pour obtenir la concentration efficace EC_{50} qui réduit la concentration initiale de DPPH de 50 % (**Heilerová et al., 2003**), les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition.

%Inhibition = $\{(Abs\ controle - Abs\ test) / Abs\ controle\} \times 100$ (Wang et Mazza, 2002)

Tels que :

Abs : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.

La valeur EC_{50} (autrement appelée la valeur IC_{50}) a été déterminée pour l'extrait, est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH. Ou encore, c'est la concentration de l'échantillon exigé pour donner une diminution de 50 % de l'absorbance de la solution contrôle constitué de DPPH. Les valeurs EC_{50} ont été calculées par les régressions linéaires, où l'abscisse est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée par le pourcentage d'inhibition (**Mensor, 2001**).

Partie 02
Etude Expérimentale

Matériels et Méthodes

I. Choix de la plante *Calligonum azel* Maire

Le choix de la plante n'est pas basé sur le seul hasard, mais selon un choix bien ciblé. Le plus visé est la valorisation des plantes médicinales sahariennes en vue de leur exploitation dans des activités thérapeutiques diverses (activités antimicrobiennes, cytotoxiques, anti-inflammatoires.....). Il est à noter que l'un des buts essentiels de l'examen phytochimique est la détection des composés existants dans la plante ce qui constitue la première étape dans la recherche des molécules bioactives.

II. Collecte et préparation de l'extrait végétal

La cueillette, de l'espèce *Calligonum azel* Maire (partie aérienne) appartenant à la famille des polygonacées a été effectuée le mois de Janvier 2018 dans une station géographique située dans le grand erg oriental saharien. Ce dernier s'étend dans le bassin des anciennes rivières Igharghar et Ghir qui coulaient vers le nord depuis le massif de l'Ahaggar dans la grande dépression du Chott Melrhir. Les limites du Grand Erg Oriental sont : au sud, le plateau du Tinrhert, la hamada al Hamra en Libye, à l'est, et la grande dépression du Chott Melrhir et du Chott el Djérid au nord, dont des parties se trouvent en dessous du niveau de la mer.

Les coordonnées de la station de prélèvement se situent entre les latitudes 30° 05' N et 30° 25' N et la longitude de 007 20' E et 007° 50' E. à environ 215 km au sud-est de la ville de Hassi Messaoud- Wilaya d'Ouargla- Algérie (**fig. 4**).

La plante a été débarrassée de tous éléments étrangers, et placée dans des sacs en plastique. L'identification de l'espèce a été faite par Pr. Zaafour, Université Badji-Mokhtar, Annaba (Algérie). Au laboratoire l'espèce végétale a été rincée à l'eau distillée, séchée à l'abri de la lumière, ensuite broyée en poudre par un moulin électrique, puis conservée dans des bocaux en verre sombre fermé hermétiquement en vue des tests phyto-chimiques et biologiques.

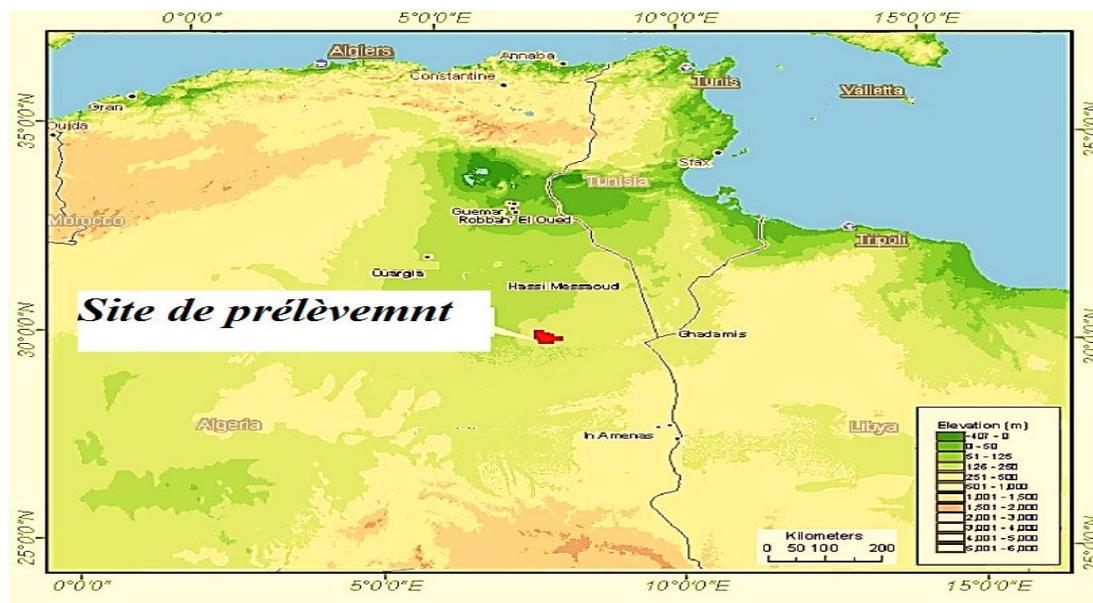


Figure 04 : Localisation du site du prélèvement de l'espèce *Calligonum azel*

La poudre végétale a subi une macération dans le méthanol à 85% à raison de 25% (P/V) pendant 24h à température ambiante. Le macérât, par la suite est filtré, la partie sédimentaire est mise à deux autre macérations successives avec le même solvant à raison de 50% (P/V).

Les trois filtrats sont mélangés et évaporés à basse température (40°C) avec un Rot à vapeur (R-215), le résidu est récupéré dans des flacons hermétiquement fermés, puis lyophilisés (Mbodj, 2003). Le lyophilisat récupéré est pesé afin de calculer le rendement de l'extraction. Ce dernier est le rapport entre le poids de l'extrait obtenu et le poids initial de la plante utilisée, il est exprimé en pourcentage et calculé selon la formule suivante :

$$R = 100 m / m_0$$

R : le rendement en %.

m : la masse de l'extrait.

m₀ : la masse initiale de la poudre végétale.

III. Screening phytochimique et caractérisation spectroscopique des métabolites secondaires

III.1 Mise en évidence des flavonoïdes

On met 3 g de la poudre avec 75 ml d'eau distillée dans une fiole. Le mélange est porté à ébullition pendant 15 minutes. On filtre et on laisse refroidir (**Mbodj, 2003**).

- **Coloration en milieu alcalin**

En milieu alcalin, les flavonoïdes se dissolvent facilement en donnant des colorations allant du jaune au brun. A 2 ml de l'extrait, on ajoute quelques millilitres de soude au 1/10 dans un tube à essai.

On a eu une coloration jaune orangé, donc le test est positif (**Mbodj, 2003**).

- **Coloration par le perchlorure de fer (FeCl₃)**

Les flavonoïdes, du fait de la présence de fonctions phénoliques dans leur génies, donnent des colorations variées avec des diluées de FeCl₃. A 2 ml de solution extractive on ajoute 2 à 3 gouttes d'une solution de FeCl₃ diluée à 2%.

L'apparition d'une coloration verdâtre, indique que le test est positif (**Mbodj, 2003**).

- **Réaction de cyanidine**

En solution alcoolique, en présence d'hydrogène naissant, produit *In situ* par action de chlorhydrique sur du magnésium, les flavonoïdes donnent des colorations variées allant du rouge-oranger au violet. On introduit dans un tube 2 ml de l'extrait. On ajoute 2 ml d'alcool chlorhydrique (alcool à 96° = 2 volume ; eau = 2 volume ; HCl concentré = 1 volume).

Coloration orange, puis violette, donc la réaction est positive (**Mbodj, 2003**).

III.2 Mise en évidence des tanins

Dans un Erlenmeyer, on met 5 g de poudre dans 100 ml d'eau bouillante. Après infusion pendant 15 mn, on filtre et on complète le filtrat à 100 ml avec de l'eau distillée.

On introduit 5 ml d'infusé à 5 % dans un tube à essais, puis on ajoute 1 ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 1 %. En présence de tanin, il se développe une coloration verdâtre ou bleu noir (Edeoga1 *et al.*, 2005).

- **Tanins cathéchiques**

A 5 ml de solution à 5% on ajoute 5 ml d'HCl concentré. L'ensemble est porté à ébullition pendant 15mn puis on filtre sur papier filtre. En présence de tanins catéchiques, il se forme un précipité rouge (Edeoga1 *et al.*, 2005).

- **Tanins galliques : réaction de stiasny**

A 30 ml de solution à 5% on ajoute 15 ml de réactif de stiasny (10 ml de formol à 40% et 5 ml de HCl concentré), puis on chauffe au bain-marie à 90°C pendant 15 mn environ. Après filtration le filtrat est saturé par 5 g d'acétate de sodium. On ajoute alors 1 ml goutte à goutte d'une solution de FeCl_3 (à 1%) l'observation d'une teinte bleu noire montre la présence de tanins galliques non précipité par réactif de stiasny (Edeoga1 *et al.*, 2005).

III.3 Mise en évidence des saponosides

On porte à ébullition 100 ml d'eau distillée dans un erlenmeyer de 250 ml puis on ajoute 1 g de la poudre ensuite on maintient une ébullition pendant 15 mn. Après filtration, on ajuste le filtrat à 100 ml. On remplit 1ml du décocté à 1 % préparé dans un tube à essais et on ajuste le volume à 10 ml avec de l'eau distillée. Ensuite, on agite le tube. Pour confirmer la présence des saponosides, il faut qu'une mousse apparait après avoir laissé au repos pendant 15 minute le tube à essai (Karumi *et al.*, 2004).

III.4 Mise en évidence des mucilages

On introduit 1 ml du décocté à 10 % dans un tube à essais et on ajoute 5 ml d'éthanol absolu. Après une dizaine de minutes, l'obtention d'un précipité floconneux dans le mélange, indique la présence de mucilages (**Karumi et al., 2004**).

III.5 Mise en évidence des coumarines

On place 1 g de l'échantillon de la poudre dans un tube à essais, on recouvert le tube avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et on place dans un bain-marie pendant quelques minutes. On ajoute 0,5 ml de NH₄OH (10%), on met deux taches sur un papier filtre et on examine sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines (**Rizk, 1982**).

III.6 Mise en évidence des alcaloïdes

○ Macération

On met 10 g de la poudre végétale dans un erlenmeyer de 250 ml+ 50 ml de H₂SO₄ dilué au 1/10 (50 ml). On laisse macérer pendant 24 heures à la température du laboratoire. On filtre sur papier lavé à l'eau distillée de manière à obtenir environ 50 ml de filtrat (**Dohou et al., 2003**).

○ Réactions de caractérisation

1 ml de filtrat + 5 gouttes du réactif de MAYER (5 g de KI et 1,358 g de HgC₁₂ solubilisés dans 100 ml d'eau distillée) s'il apparaît un précipité c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes (Précipité blanc-jaunâtre).

1 ml de filtrat + 5 gouttes de réactif de WAGNER (2 g de KI et 1,27g d'I₂ solubilisés dans 100 ml d'eau distillée) s'il apparaît un précipité brun c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes filtrat (**Dohou et al., 2003**).

- **Test de confirmation**

Nous procédons à une extraction de la poudre végétale en milieu acide. Dans un ballon de 500 ml contenant 5 g de poudre végétale on verse 25 ml d'acide chlorhydrique 0,05 N. Le mélange est laissé en macération sous agitation magnétique à la température du laboratoire (environ 25° C) pendant 24 heures ; puis filtré et lavé à l'eau distillée. La solution obtenue est ensuite ajustée à 20 ml avec de l'eau distillée, et après on réalise les tests de caractérisation précédents filtrat (**Dohou et al., 2003**).

III.7 Mise en évidence des glycosides

5 g de plante, mise en poudre, on y ajoute 50 ml d'une solution de l'acide tartrique 2% dans l'éthanol, on chauffe à reflux durant 2 h, après filtration et lavage par l'éthanol, on met le filtrat dans l'eau chaude. Dans un tube à essai, on ajoute à 2 ml du filtrat 2 gouttes de la liqueur de Fehling, on chauffe, la réaction de la liqueur de Fehling montre la présence des glycosides (**Chaouch, 2001**).

III.8 Mise en évidence des stérols et triterpènes

5 g de plante, mise en poudre, a été mis dans 20 ml de chloroforme. Après filtration la solution obtenue est répartie entre deux tubes à essais (l'un servira de référence). On ajoute d'abord anhydride d'acétate (Ac_2O) ; ensuite nous avons ajouté 1 ml d' H_2SO_4 au fond du tube sans agiter. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et d'une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence des stérols et des triterpènes. C'est la réaction de Liebermann-Buchard (**Benzahi, 2001 ; Chaouch, 2001**).

III.9. Dosage des polyphénols

La teneur en composés phénoliques de l'extrait de *C.azel* a été estimée par la méthode de Folin-ciocalteu selon (**Li et al., 2007**) basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstic (WO_4^{-2}) phosphomolybdic (MoO_4^{-2}) du réactif de Folin par les groupement oxydables des composés polyphénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un

maximum d'absorption dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (**Georgé *et al.*, 2005**). Brièvement, 1 ml de réactif de Folin (dilué 10 fois) est ajouté à 200 µl d'échantillon ou de standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables, Après 4 min, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (0,75%) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 heures d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de la droite d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-200 µg/ml) et est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.

III.10. Dosage des flavonoïdes

L'évaluation quantitative des flavonoïdes dans l'extrait selon la méthode du trichlorure d'aluminium (**Bahorun *et al.*, 1996**). Brièvement, l'échantillon est préparé par la dissolution de 1mg (extrait)/ml (méthanol). 1 ml de l'échantillon est ajouté 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2%, dans le méthanol). Dix minutes après le début de la réaction, l'absorbance est lue à 430 nm.

Une gamme étalon est établie séparément avec la quercétine (0-40 µg/ml) pour calculer la concentration des flavonoïdes dans l'extrait. Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme d'équivalent quercétine par gramme d'extrait.

IV. Activités biologiques de l'extrait de *C. azel* Maire

IV.1 Evaluation de l'activité antibactérienne

IV.1.1 Espèces bactériennes sélectionnées

L'activité antibactérienne de l'extrait hydro-méthanolique de l'espèce cible a été évaluée sur 21 souches bactériennes : trois souches de références ATCC (American Type Culture Collection) : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, ATCC 43300) et 18 souches cliniques, l'ensemble est procuré

des 2 hôpitaux : Ibn Zohr et El Hakim el Okbi- wilaya de Guelma. Les principales caractéristiques des souches impliquées sont présentées dans le tableau 03.

Tableau 03 : Principales caractéristiques des souches cibles.

Morphologie et Gram	Espèces	Référence	Source	Code	Habitat	Pathogénicité
Bacille Gram⁻	<i>E. coli</i>	2278 Clinique	Urines	<i>E.Coli</i> 2278(U)	Humain	Diarrhée Suppuration
	<i>E. coli</i>	379 Clinique	Urines	<i>E.Coli</i> 397(U)	Animale Environnement (eau, aliment)	Infection urinaire et génitale bactériémie méningite toxi-infection alimentaire
	<i>E. coli</i>	ATCC 25922	-	-		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	328 Clinique	Infection Homme	<i>P.aeruginosa</i> 328 (IH)	Humain Environnement	Bactérie souvent Multi-résistante
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	423 Clinique	Infection Femme	<i>P.aeruginosa</i> 423 (IF)	(Eau, sol, végétaux)	aux antibiotiques surinfections de plaies, ulcères, suppurations
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Clinique	Infection homme	<i>K.pneumoniae</i> (IH)	Humain Environnement	Suppuration bactériémie
	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemas e</i>	Clinique 408	Urines	<i>KPC</i> (U)	(Eau, sol, végétaux)	Pneumopathie Infection urinaire
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	325 Clinique	Urines	<i>K.oxytoca</i> 325(U)		

	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	380 Clinique	Urines	<i>K.pneumoniae</i> 380 (U)		
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	312 Clinique	Infection homme	<i>A.baumannii</i> (IH)	Humain (peau et muqueuses)	Bactériémie
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	312 Clinique	Infection Femme	<i>A.baumannii</i> (IF)	Environnement al (eau, sol)	Pneumopathie
	<i>Proteus sp.</i>	Clinique	Urée	<i>Proteus spp</i> (Ur)	Humain Animale Environnement (Sol, eau)	Bactériémie Infection urinaire
	<i>Citrobacter koseri</i>	Clinique	Infection Femme Pus	<i>C.koseri</i> (IF)	Humain Animale Environnement (eaux et	Infection urinaire Septicémie Surinfection de l'arbre respiratoire
	<i>Citrobacter koseri</i>	Clinique	Pus lingerie homme	<i>C.koseri</i> (IH)	aliments pollués)	
	<i>Enterobacter cloacae</i>	PPL372	Infection Femme	<i>E.cloacae</i> (IF)	Humain Animale	Suppuration bactériémie
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Clinique	Service Infect (homme)	<i>E.cloacae</i> (IH)	Environnement (Sol, eau, végétaux)	Pneumopathie Infection urinaire
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	-		Humain (peau,	

Cocci Gram +					rhinopharynx, vagin)	Staphylococcie : Infection de La peau et des parties molles (plaie, brûlure) Pneumopathie Bactériémie, septicémie Infection urinaire Infection osteo-articulaire Infection sur cathéter et sur prothèse Toxi-infection alimentaire
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 43300	-		Environnement (Poussières, aliments)	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Clinique	Extraction vaginale	<i>S.epidermidis</i> (EV)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Clinique	Service Infection (homme)	<i>S.aureus</i> (IH)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	358 Clinique	Pus	<i>S.aureus</i> 358(P)		

IF :Infection Femme ;**IH** :Infection Homme ;**U** :Urine ;**Ur** :Urée ;**P** :Pus ;**EV** :Extraction Vaginale.

IV.1.2 Milieux de culture utilisés

Selon les techniques employées, les milieux de culture utilisés sont les suivants :

- Gélose nutritive (GN) : un milieu d'isolement non sélectif, utilisé dans le but de repiquer la bactérie ou de la purifier si elle est contaminée.
- Le milieu Muller Hinton (MH) : reconnu par tous les experts comme étant le milieu de référence pour l'étude de la sensibilité des germes aux antibiotiques et toutes autres substances qui possèdent une activité antimicrobienne comme les extraits.

- Le bouillon nutritif : constitue un milieu d'utilisation générale pour un grand nombre de microorganismes ne présentant pas d'exigences particulières
- **Préparation de l'inoculum**

Une culture de 18 à 24 h de la souche à tester sur bouillon nutritif a été préalablement préparée à une concentration égale à 10^8 UFC/ml en mesurant la DO à 620 nm entre 0,08 et 0,1 (Larif *et al.*, 2013). Ensuite les souches sont ensemencées sur gélose Müller-Hinton par écouvillonnage selon les recommandations de CLSI (CLSI, 2011).

IV.1.3 Test du méthanol (MeOH) et/ou DMSO

Après ensemencement du MH par la suspension bactérienne (0.5 Mc Farland), des puits de 6 mm de diamètres sont créés en surface, par la suite un volume de 100 μ l du solvant (méthanol à 85% et DMSO testé à deux concentrations 10 et 100%) sont introduits dans les puits, les boîtes ainsi, sont incubées durant 24 heures à 37°C. Après incubation, les diamètres d'inhibitions formés sont mesurés (Mbata *et al.*, 2006). Deux répétitions sont réalisées pour chaque diluant.

IV.1.4. Technique d'antibiogramme

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. Dans la présente étude 4 antibiotiques sont sélectionnés (tab.4).

Tableau 4 : Diamètres critiques des antibiotiques utilisés (SFM, 2013)

Antibiotiques	Charge de disques	Diamètre critique	
		Sensibles	Résistants
chloramphénicol (C)	30µg	≥23	<19
Gentamicine (CN)	30µg	≥16	<14
Amoxiclave (AMC)	20µg+10µg	≥21	<14
Vancomycine (VA)	30µg	>17	<17

➤ Réalisation de l'antibiogramme

Nous avons mis à profit la méthode de diffusion en milieu gélosé préconisée par Vandepitte *et al.*, (1994).

➤ Principe :

Une suspension bactérienne du germe à tester estensemencée dans des boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller Hinton. Des disques d'antibiotiques sont ensuite déposés sur la gélose ; puis les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C. Après 24 h d'incubation, on procède à la lecture des résultats par la mesure des diamètres d'inhibition autour des disques (disque inclus). 2 répétitions sont réalisées pour chaque antibiotique.

IV.1.5. Activité antibactérienne de l'extrait

Le test de susceptibilité de l'extrait a été effectué selon deux méthodes différentes: la méthode des puits en milieu Mueller-Hinton comme un test préliminaire permettant la mise en évidence de l'activité antibactérienne et la méthode des micro dilutions qui a pour but de déterminer la concentration inhibitrice minimale CMI à partir d'une gamme de concentrations.

IV.1.5.1 Technique des puits

L'activité antibactérienne de l'extrait a été évaluée par la technique des puits (Mbata *et al.*, 2006). Chaque puit de 6 mm de diamètre a été rempli par 100 μ l d'extrait (dissous préalablement dans le DMSO) à raison de 2 concentrations : 10 et 20 mg/ml. 3 répétitions ont été réalisées pour chaque concentration. Après incubation de 24 h à 37°C, des zones d'inhibition (en mm) autour des puits ont été mesurées (fig.5). Selon Tekwu *et al.*, (2012) Les bactéries sont classées selon le diamètre d'inhibition dans l'une des deux catégories suivantes : **Non sensible** : <10 ; **Sensible** : \geq 10

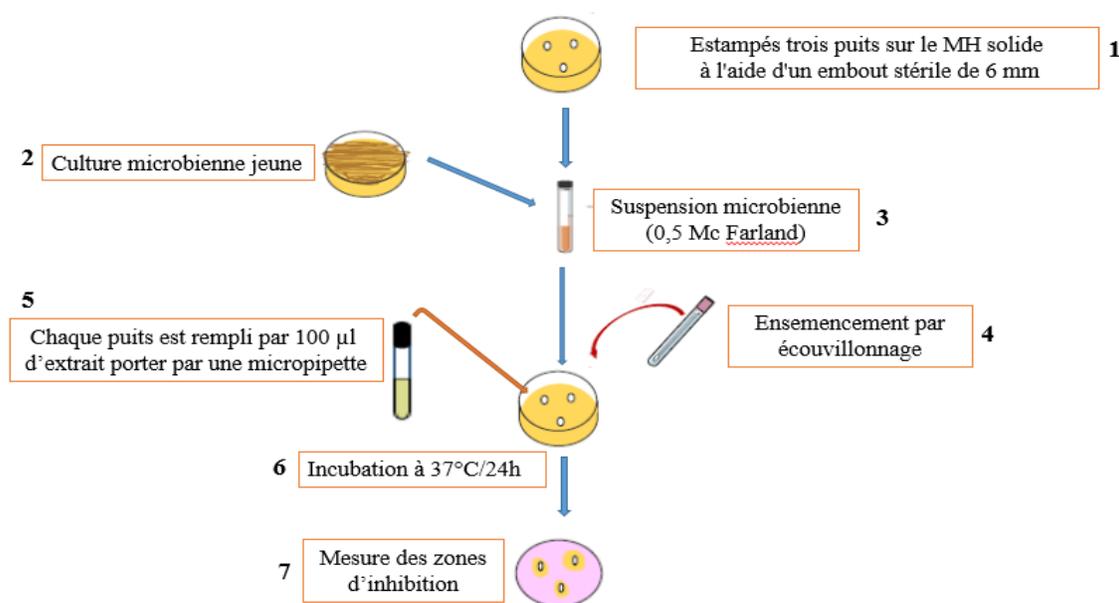


Figure 05 : Essai de l'activité antibactérienne de l'extrait par méthode de puits.

IV.1.5.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice de l'extrait de lazelle a été déterminée selon la méthode de microdilution (Mann *et al.*, 1998). Dans une plaque de 96 puits stériles (Fig.6), 100 μ l d'extrait (préparé à une concentration de 20 mg/ml dans le DMSO), sont dilués dans le milieu Mueller-Hinton. En effet, à partir de cette

concentration, des dilutions en cascades ont été réalisées (par le milieu MH) pour obtenir des concentrations de finales de 20000 à 10 µg/ml. La suspension bactérienne (100 µL) a été ensuite ajoutée aux puits. Le volume final dans chaque puits était de 200 µL. 2 puits témoins ont été préparés, l'un avec du milieu de culture mélangé avec du DMSO, et additionnée de la suspension bactérienne et l'autre été exempté de cette dernière, ce puit est considéré comme témoin de stérilité.

Les plaques d'ELISA (**fig.6**) sont par la suite incubées à 37°C pendant 24 h. La CMI est déterminée par observation visuelle de la turbidité. La CMI est la concentration la plus faible d'extraits, ne montrant aucune précipitation de dépôt bactérien au fond du puit. L'expérience a été effectuée 3 fois.

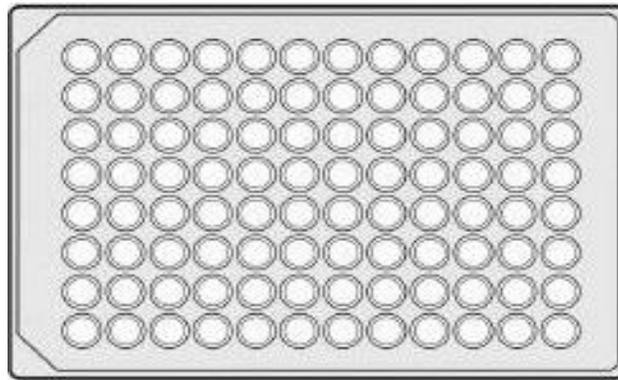


Figure 06 : plaque multipuits

IV.1.5.3 Détermination de la concentration minimale bactéricide

La concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en extrait capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Elle définit l'effet bactéricide d'un extrait. Des prélèvements sont effectués à partir du puit témoin et de chacun des puits dépourvus de culot bactérien, puis ensemencés par stries sur gélose MH. Les boîtes ensemencées sont incubées durant 24 heures à 37°C (**Bousseboua, 2001 ; 2006**).

IV.2 Evaluation de l'activité anti-oxydante par la méthode au DPPH

○ Principe

Le DPPH est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété anti radicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002).

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation et la figure 07 :



Où : (AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picryl hydrazine (jaune) (Brand-William *et al.*, 1995).

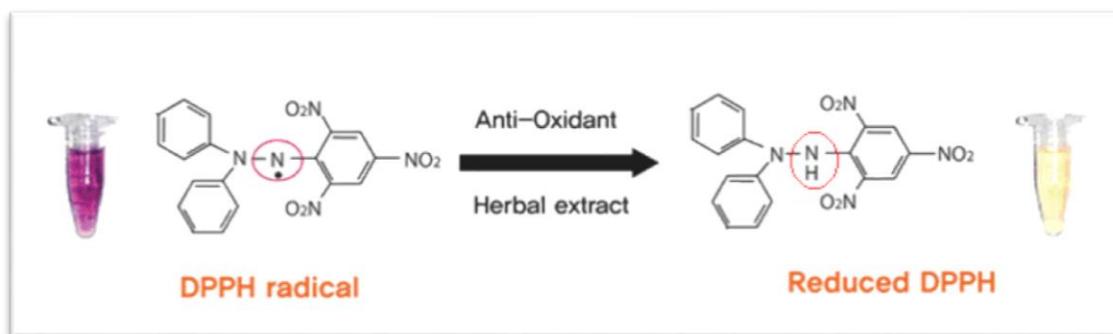


Figure 07 :La forme réduite DPPH et la forme radical DPPH (Molyneux, 2004)

- **Mode opératoire**

1ml de solution méthanolique de DPPH (6×10^5 mmol) est ajouté à 1ml de la solution d'extraits, le mélange est vigoureusement agité, puis les tubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes.

Le blanc est représenté par le méthanol, Le témoin négatif est composé de 1 ml de la solution méthanolique de DPPH et 1 ml de méthanol, Le témoin positif est représenté par une solution méthanolique d'un antioxydant standard : la vitamine C ou acide ascorbique. La longueur d'onde d'absorption maximale a été préalablement déterminée. Toutes les lectures sont effectuées à 517 nm. Deux répétitions sont effectuées pour l'extrait végétal.

- **Expression des résultats**

Pour obtenir la concentration efficace EC_{50} qui réduit la concentration initiale de DPPH de 50 % (**Heilerová et al., 2003**), les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition.

%Inhibition = $\{(Abs\ controle - Abs\ test) / Abs\ controle\} \times 100$ (Wang et Mazza, 2002)

Tels que :

Abs : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.

La valeur EC_{50} (autrement appelée la valeur IC_{50}) a été déterminée pour l'extrait, est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH. Ou encore, c'est la concentration de l'échantillon exigé pour donner une diminution de 50 % de l'absorbance de la solution contrôle constitué de DPPH. Les valeurs EC_{50} ont été calculées par les régressions linéaires, où l'abscisse est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée par le pourcentage d'inhibition (**Mensor, 2001**).

Résultats et Discussion

I. Résultats de l'étude phytochimique

I.1. Test préliminaires de la composition chimique

Les tests préliminaires de la composition phytochimique consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la poudre du *Calligonum azel* par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés. Les résultats obtenus sont indiqués dans la figure (08) et répertoriés dans le tableau suivant :

Tableau 05 : Screening phytochimique de la plante *Calligonum azel*.

Composés	Résultats
Flavonoïdes	+
Saponosides	+
Mucilages	+
Coumarines	-
Tanins	+
Glycosides	-
Stérols et triterpènes	-
Alcaloïdes	-

(+) : présence ; (-) : absence



Figure 08: Résultats de tests préliminaire (a: Flavonoïdes , b: Test de conformation des flavonoïdes c: Coumarines, d: Saponosides, e: Glycosides, f: Alcaloïdes, g: Stérols et triterpènes, h: Mucilages, i: Tanins, i1: Tanins gallique,

Le screening phytochimique montre que l'espèce *Calligonum azel* est très riche par plusieurs classes de métabolites secondaires notamment les flavonoïdes, les saponosides, les tanins et les mucilages. Une absence marquée des coumarines, alcaloïdes, glycosides, stérols et triterpènes est signalée chez la plante.

La présence des flavonoïdes, des tanins et des saponosides confère à cette plante des propriétés biologiques très importantes et pourrait expliquer leur utilisation traditionnelle pour soigner de nombreuses maladies :

- **Des flavonoïdes** : ils constituent un groupe de substances très importantes qui présentent un grand intérêt dans beaucoup de domaines. Leurs propriétés anti-oxydante, antivirale, antibactérienne, les prédestinent à des utilisations dans les industries pharmaceutiques, agroalimentaires, cosmétiques (**Pietta, 2000**) et souvent présentés comme anti-inflammatoires, antiallergiques, hépatoprotecteurs, et diurétiques, (**Bruneton, 2009**)

- **Des tanins** : sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides. Ces tanins permettent aussi de stopper les hémorragies (**Iserin, 2001**). Les applications des drogues à tanins sont assez restreintes et découlent de leur affinité pour les molécules protéiques. Par voie externe, elles imperméabilisent les couches les plus externes de la peau et des muqueuses, protégeant ainsi les couches sous-jacentes ; elles ont aussi un effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels. Par voie interne, ils exercent un effet antidiarrhéique certain. Quelle que soit la voie d'administration, l'effet est antiseptique – antibactérien et antifongique (**Bruneton, 2009**)

- **Des saponosides** : La présence des saponosides confère aux plantes des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et anti-œdémateuse (**Roux et al., 2007**). *In vivo*, les saponosides assurent la défense du végétal contre l'attaque microbienne ou fongique. Quasiment dépourvus d'activité antibactérienne, les saponosides sont parfois actifs, *In vitro*, sur des virus (**Bruneton, 2009**).

Le travail de **Bannour et al., (2016)** sur la même espèce étudiée en Tunisie confirme les familles chimiques détectées dans notre étude. Par ailleurs, Une analyse faite par

Beddou, (2015) sur les extraits méthanoliques de l'espèce *Rumex vesicarius L* de la famille des polygonacées affirme la présence des mêmes groupes chimiques détectés dans la présente étude, à l'exception des alcaloïdes, stéroïdes et triterpènes et coumarines.

I.2. Rendement d'extraction du *Calligonum azel*

L'extraction de 250 g du matériel végétal avec du méthanol à 85% et lyophilisation a permis d'obtenir un résidu sec, dont le rendement est présenté dans le tableau 06.

Tableau 06 : Rendement de la plante après extraction.

La quantité d'extrait à partir de 250 g	<i>Calligonum azel</i>
Rendement (g)	28,60
Rendement %	11,44

La préparation de l'extrait méthanolique de la poudre de la plante *Calligonum azel* a donné un rendement de l'ordre de 28,60 g, ce qui correspond à un pourcentage de 11,44 %. Selon **Lee et al., (2003)**, les teneurs en extraits secs varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille mais également en fonction du solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion du solvant, est aussi peut être due à la différence des techniques d'extractions utilisées qui affectent ainsi le taux total en phénols et flavonoïdes. D'autres facteurs, comme le pH, la température, le rapport quantité de matière au volume du solvant, les intervalles de temps, le nombre et les étapes d'extractions individuelles, jouent également un rôle important dans cette procédure.

Dans la présente étude, le déroulement de cette extraction par la méthode de macération à une température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'obtenir le maximum des composés et de prévenir leur dénaturation ou toutes modifications probables dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

Les travaux de **Legu, (2010)** ; **Saffidine, (2015)** rapportent que par comparaison au mélange hydro-éthanolique, le mélange méthanol-eau s'avère être un très bon solvant et facilite l'évaporation, ce qui étaye le bon rendement obtenu dans notre étude.

En Outre, **Clara *et al.*, (2010)** ont montré que la polarité du solvant a une grande importance, ainsi, la variation des rendements des divers extraits peuvent être attribués aux polarités des différents composés. L'action des solvants sur le rendement d'extraction a été signalés dans de nombreuses études (**Hayouni *et al.*, 2007; Ben El Hadj *et al.*, 2014**).

I.3.Teneur des polyphénols

La teneur en polyphénols a été estimée par la méthode colorimétrique de folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols, dans les plantes médicinales. L'acide gallique est le standard le plus souvent employé dans cette méthode. La courbe d'étalonnage linéaire a été tracée pour cet objectif et déterminés par l'équation de type : $y = a x + b$ (**Fig.09**) et les quantités des polyphénols correspondantes ont été exprimées en milligramme d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'Ext).

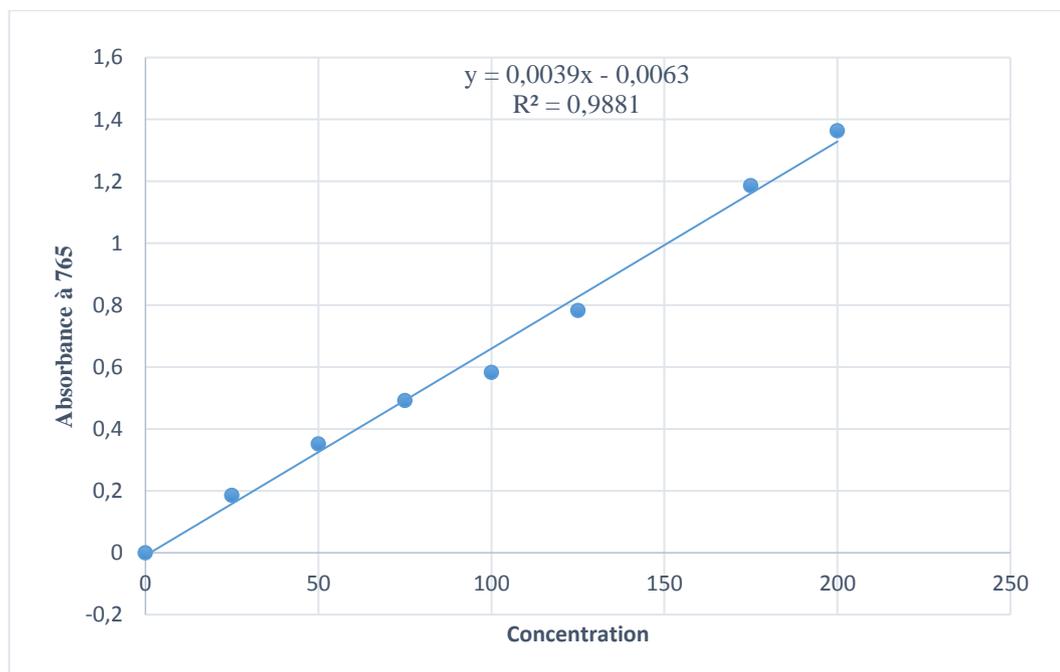


Figure 09 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

Sur la base des valeurs d'absorbance de la solution de L'extrait méthanolique, qui réagisse avec le réactif de Folin-Ciocalteu et par rapport aux solutions standards d'équivalents de l'acide gallique, une teneur élevée en polyphénols a été trouvée (225.93 ± 14.19 mg EAG/g d'Ext). Il est à noter que la teneur en composés polyphénoliques de l'extrait varie dans le même sens que leur rendement, autrement dit plus le rendement est important plus le taux en polyphénols est élevé.

Les résultats de l'analyse colorimétrique des composés polyphénoliques montrent que la plante *Calligonum azel* est riche en polyphénols. Jusqu'ici peu d'études ont été réalisées sur la quantification des polyphénols dans les extraits du *Calligonum azel*. Cependant, l'étude de **Bannour et al., (2016)** montre que l'extrait méthanolique de la partie aérienne du *Calligonum azel* collectée du Sahara Tunisienne donne un taux en polyphénols égale à (240.3 ± 5.2 mg EAG / g d'Ext) pour les fleurs et (129.2 ± 69.7 mg EAG / g d'Ext) pour les feuilles et (147.5 ± 24.4 mg EAG / g d'Ext) pour la tige. Cette différence de résultats peut être expliqué d'une part que le solvant d'extraction emporte des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique (**Djeridane et al., 2006**) et d'autre part, par le faite que le dosage par le réactif de Folin-Ciocalteu donne une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (**Tawaha et al., 2007**).

En se référant à la bibliographie et dans l'objectif de comparer les taux en polyphénols dans les deux études plusieurs facteurs doivent être pris en considération et qui peuvent influencer le contenu polyphénolique .En effet, la teneur polyphénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétiques) (**Miliauskas et al., 2004**), et extrinsèques (conditions climatiques, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (**Ebrahimi et al., 2008 ; Podsedek, 2007**).

A la lumière de ces résultats, on peut en déduire que notre extrait est très riches en polyphénols. Ce test, basé sur une réaction d'oxydo-réduction, peut être également considéré comme une méthode permettant d'évaluer l'activité antioxydante (**Prior et al., 2005**). De ce fait, l'extrait riche en composés phénoliques peut être également considéré comme un antioxydant.

I.4. Teneur des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes déterminée par la méthode de trichlorure d'aluminium (**Bahorun et al., 1996**) au moyen des dosages spectrophotométriques, une courbe d'étalonnage (**Fig.10**) et déterminés par l'équation de type: $y = a x + b$ a été tracée, établie avec la quercétine utilisant comme standard à différentes concentration. Des mesures de densité pour chaque fraction réalisées à 430 nm. Les quantités des flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en équivalent milligramme de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ /g d'Ext).

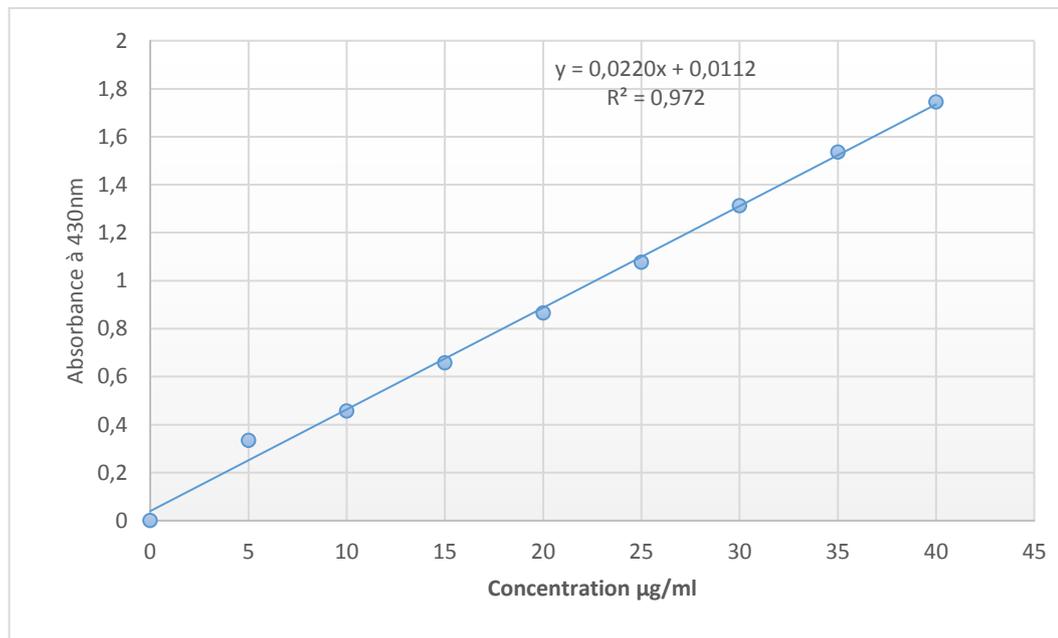


Figure 10 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes

Le test préliminaire a indiqué la présence des flavonoïdes dans l'extrait de la plante, mais le résultat du dosage quantitatif de ces éléments révèle que l'extrait méthanolique du *Calligonum azel* contient ($8,733 \pm 0.354$ mg EQ /g d'Ext).

Il faut cependant noter que la quantité des flavonoïdes obtenue dans la présente étude sont nettement inférieure à ceux trouvés par **Bannour et al., (2016)** qui reportent un taux en flavonoïdes égale à (226.3 mg EQ /g \pm 12.2) pour les fleurs et (187.6 mg EQ /g \pm 17.4) pour les feuilles et (154.1 mg EQ /g \pm 10.1) pour la tige. Bien qu'ils aient utilisé un procédé extractif similaire de celui que nous avons utilisé.

Lee *et al.*, (2003) ont toutefois signalé que l'utilisation de différentes méthodes de dosage, La différence entre les méthodes d'extraction, d'évaluation et d'expression des résultats entre les auteurs explique la différence entre les résultats obtenus.

II. Activités biologiques de l'extrait de *C. azel* Maire

II.1. L'activité antibactérienne

Pour surmonter le problème de résistance des micro-organismes vis-à-vis des antibiotiques, la plupart des travaux sont orientés actuellement vers d'autres agents antimicrobiens possédant un mode d'action tout à fait spécifique. Afin de mettre en évidence l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique du *Calligonum azel*, des bactéries causant pour la plupart des infections urinaires et de maladies nosocomiales ont été testées.

II.1.1. Test du méthanol (MeOH) et/ou DMSO (control négatif)

Le test de l'effet antibactérien du méthanol à 85% et le DMSO sur les bactéries sélectionnées montre que les deux solvants n'ont aucun effet sur ces micro-organismes (figures 11 et 12).

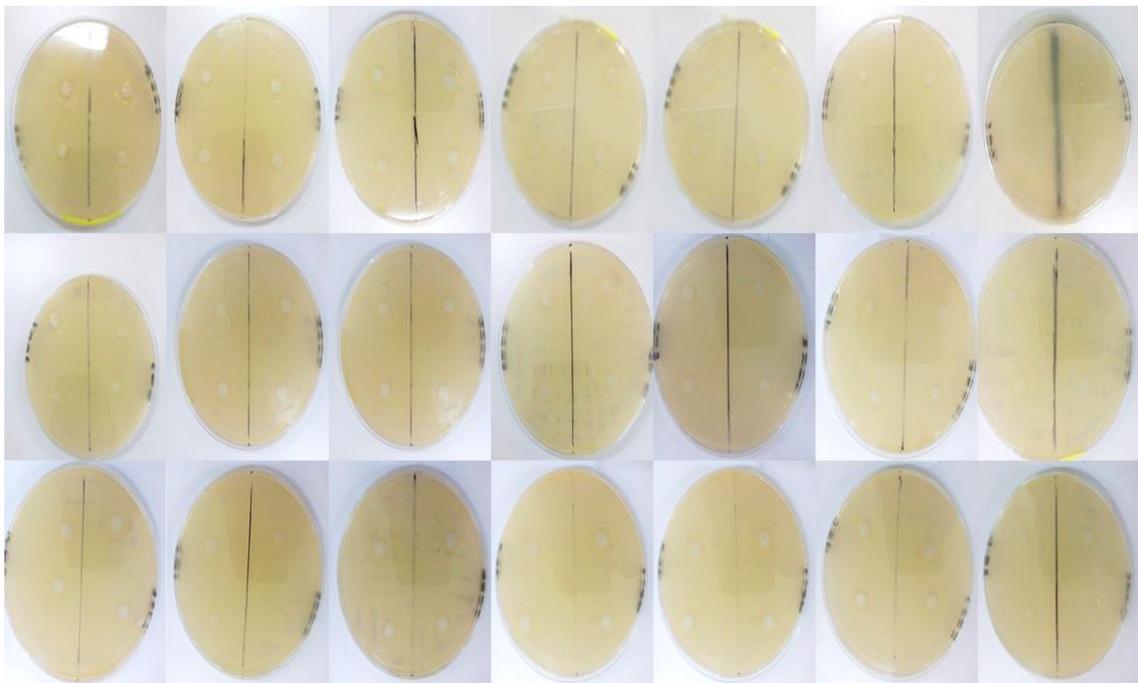


Figure 11 : Photographies de l'effet du DMSO exercé sur les différentes souches bactériennes

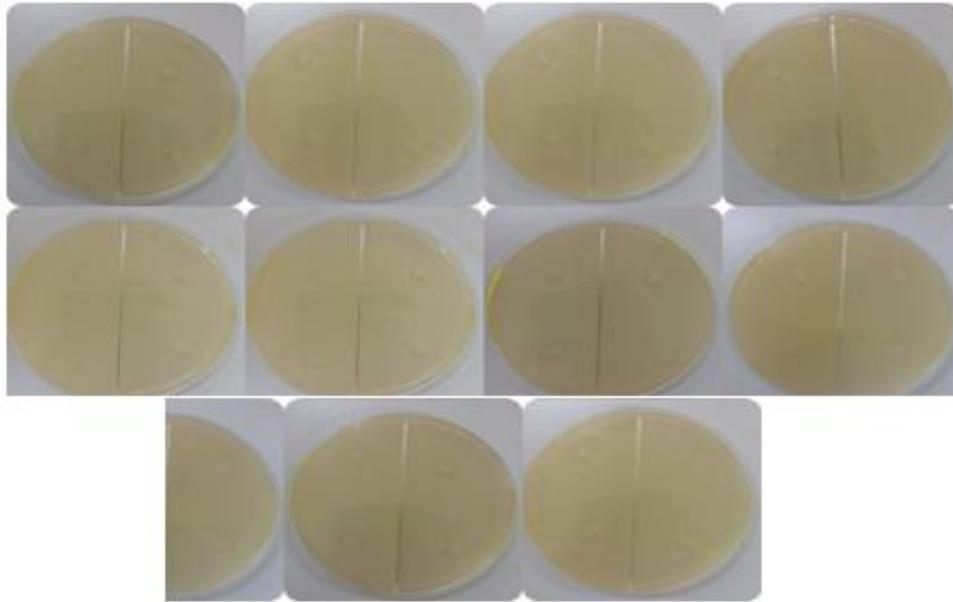


Figure 12 : Photographies du test méthanol exercé sur les différentes souches bactériennes

II.1.2. Antibiogramme ou control positif

Afin de connaître les comportements des souches isolées vis-à-vis des 4 antibiotiques : chloramphénicol (C), Gentamicine (CN), Amoxiclave (AMC), Vancomycine (VA), un antibiogramme a été réalisé. Les résultats de l'évaluation de l'action antibactérienne de ces agents antibactériens testés sur les 21 souches cibles sont consignés dans les figures 13 ,14 ci-dessous.

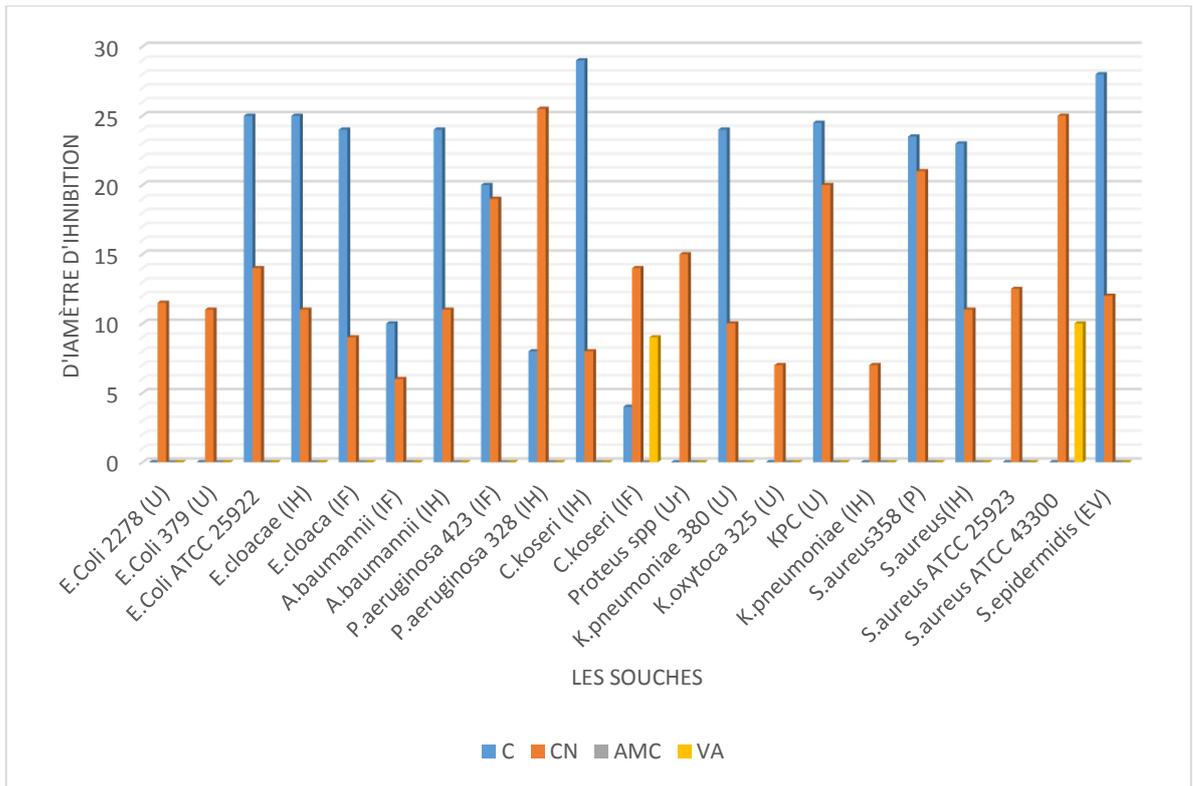
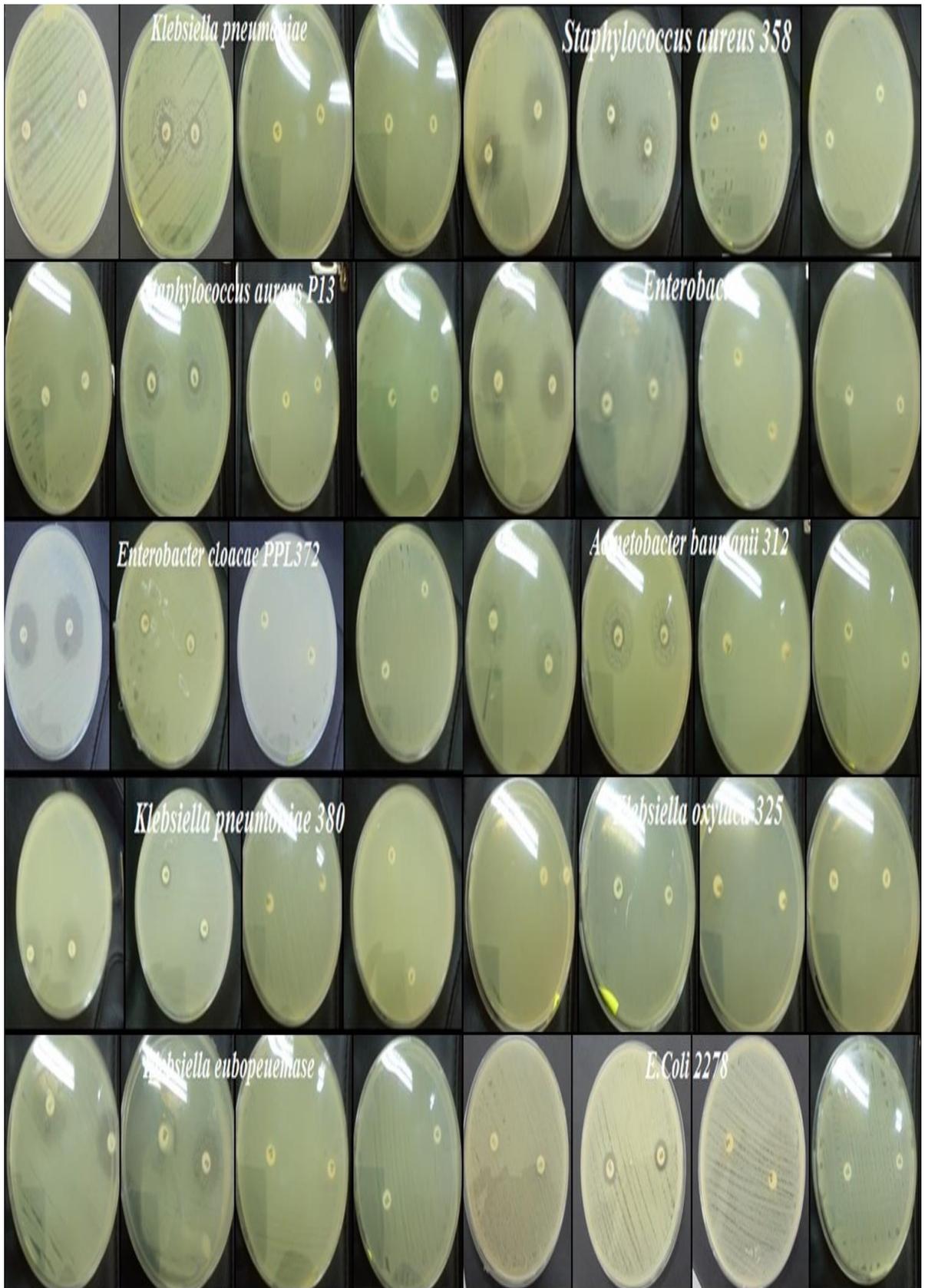


Figure 13 : Antibiogramme des souches testées

(C) Chloramphénicol (AMC) Amoxicilline /Acide clavulanique(CN) Gentamicine (VA)
Vancomycine



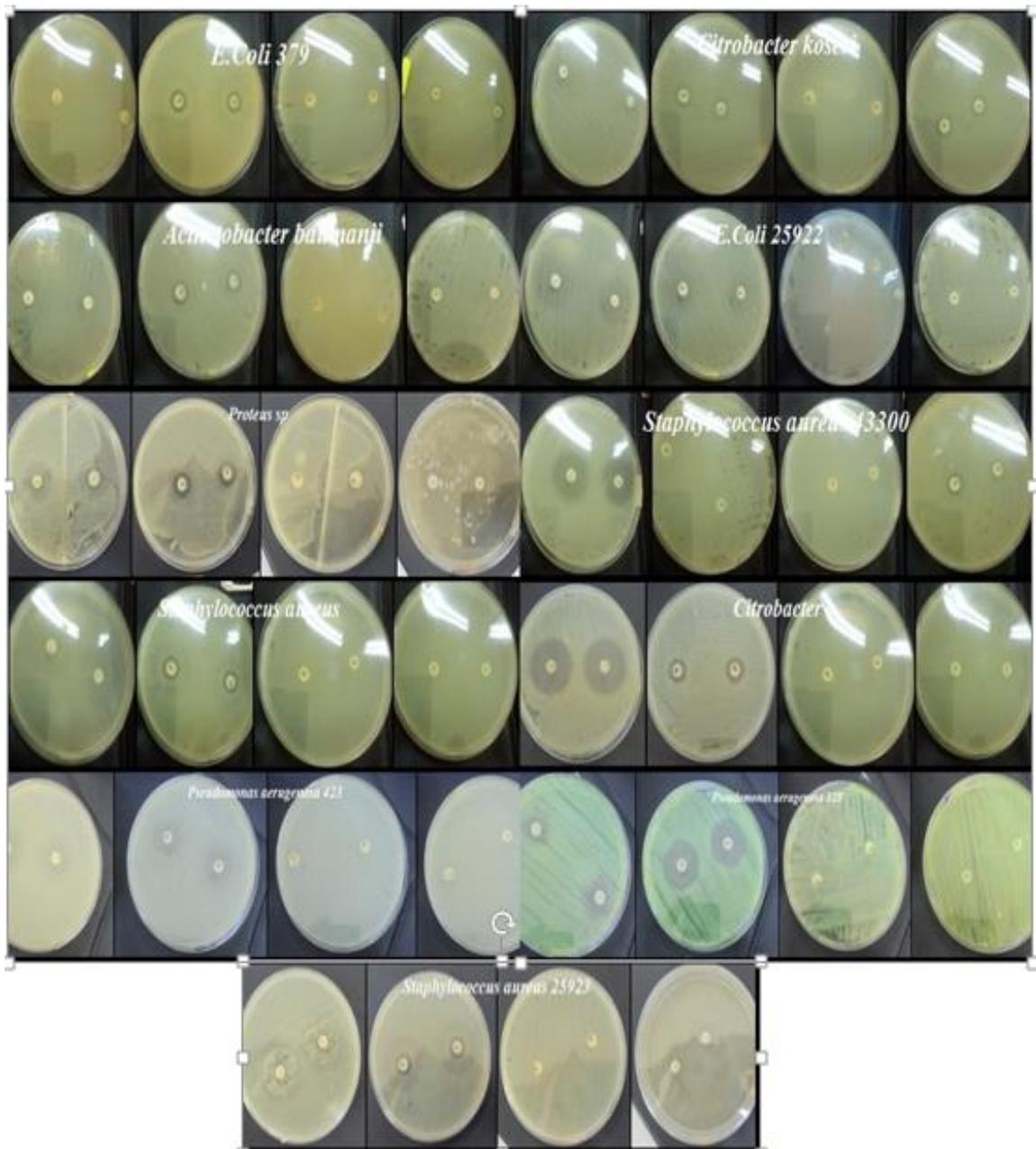


Figure 14 : Antibiogramme des souches testées

Selon les diamètres critiques des antibiotiques (SFM, 2013), on remarque que les souches bactériennes suivantes : *C.koseri* (IH), *S.epidermidis* (EV), *E.Coli* ATCC 25922, *KPC* (U), *E.cloacae* (IH), *E.cloacae* (IF), *A.baumani* (IH), *K.pneumoniae* 380 (U), *S.aureus* 358 (P), *S.aureus* (IH), *P.aerugenosa* 423 (IF) sont sensibles au chloramphénicol avec des diamètres variés. Le plus grand a été enregistré sur *C.Koseri* (IH) (29 mm), et le plus petit (20 mm) est enregistré sur *S.aureus* (IH). En revanche les souches : *E.coli* 2278 (U), *E.coli* 379 (U), *Proteus.spp* (Ur), *K.oxytoca* 325 (U), *P.aerugenosa* 328(IH), *C.Koseri* (IF), *K.pneumoniae* (IH), *S.aureus* ATCC 25923, *S.aureus* ATCC 43300, *A.baumani* (IF) montrent une résistance vis-à-vis de cet antibiotique.

Par ailleurs, les souches : *P.aerugenosa* 423 (IF), *KPC* (U), *S.aureus* 358 (P), *S.aureus* ATCC 43300, *P.aerugenosa* 328 (IH) sont révélées sensible à la Gentamicine avec des diamètres d'inhibition respectifs de 19, 20, 21, 25 et 25,5 mm.

On remarque aussi que les deux antibiotiques : Amoxicilline /Acide clavulanique (Amoxiclave) et Vancomycine n'ont aucun effet sur l'ensemble des souches sélectionnées.

Ces mécanismes de réponse différentiels entre les souches cibles vis-à-vis des antibiotiques dépendent principalement de l'état cellulaire de la bactérie. Le chloramphénicol est un antibiotique bactériostatique de la famille des phénicolés qui agit principalement sur les bactéries à Gram+ et Gram-, la résistance à l'égard de cette antibiotique est due à l'imperméabilité de la membrane extérieure (pour les bactéries à Gram négatif) ou la membrane cytoplasmique (pour toutes les bactéries), et l'inactivation C'est le mécanisme le plus souvent responsable de la résistance plasmidique par transférase qui acétyle la molécule.

Pour la Gentamicine, ce bactéricide de la famille des Aminosides et Aminocyclitol agit principalement sur les bactéries à Gram+ (*Staphylococcus aureus* méti-R, *Staphylococcus aureus* méti-S) et Gram⁻. La résistance naturelle des bactéries vis-à-vis la Gentamicine est due à l'imperméabilité.

En ce qui concerne la vancomycine, ce bactéricide de la famille des glycopeptides est un antibiotique actif sur les bactéries à Gram⁺ dont l'usage est réservé aux hôpitaux pour la prise en charge d'infections dues à des germes multi-résistants

pour lequel il présente le dernier rempart thérapeutique. La vancomycin inhibe la formation de la paroi bactérienne en bloquant la synthèse des peptidoglycanes.

Résistance des entérobactéries est expliquée par leur capacité à produire des bêta-lactamases, enzymes qui inactivent les antibiotiques bêta-lactamines par ouverture du cycle bêta-lactame. Ce mécanisme fait partie des mécanismes classiques de résistance bactérienne, comme en font également partie l'imperméabilité membranaire et la modification de la molécule-cible sur laquelle se fixe l'antibiotique.

Les gènes de résistance des bêta-lactamases se situent soit au niveau du chromosome bactérien, soit sur des éléments extra-chromosomiques ce qui explique la résistance des souches de la famille des entérobactéries (*E. coli*, *E. cloacae*, *C. koseri*, *K. oxytoca* 325, *KPC*, *K. pneumoniae*, *Proteus.spp*) envers l'amoxiclave.

En ce qui concerne la multi-résistance du genre *Pseudomonas*, elle peut être due à la présence de pompe capable de reconnaître et expulser plusieurs classes d'antibiotiques, les mécanismes de résistance probables sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 07 : Mécanismes de résistance bactérienne (Van Bmbeke et tulkenns, 2008).

Antibiotique	Modification enzymatique de l'ATB	Altération membranaire	Altération de la paroi	Efflux	Altération Des ribosomes
B-lactamine	Résistance plasmique / résistance chromosomique	Résistance chromosomique	Mode de résistance non décrit	Résistance chromosomique	Mode de résistance non décrit

II.1.3. L'activité antibactérienne de l'extrait

II.1.3.1. Méthode de diffusion dans puits

Pour caractériser l'activité antibactérienne de notre extrait, nous avons utilisé la méthode de diffusion des puits. C'est une technique qualitative basée sur la mesure du diamètre d'inhibition apparent autour des puits chargés d'extrait végétale.

Les résultats de l'action de l'extrait du *Calligonum azel* sur les souches bactériennes testées sont représentés dans les figures ci-dessous

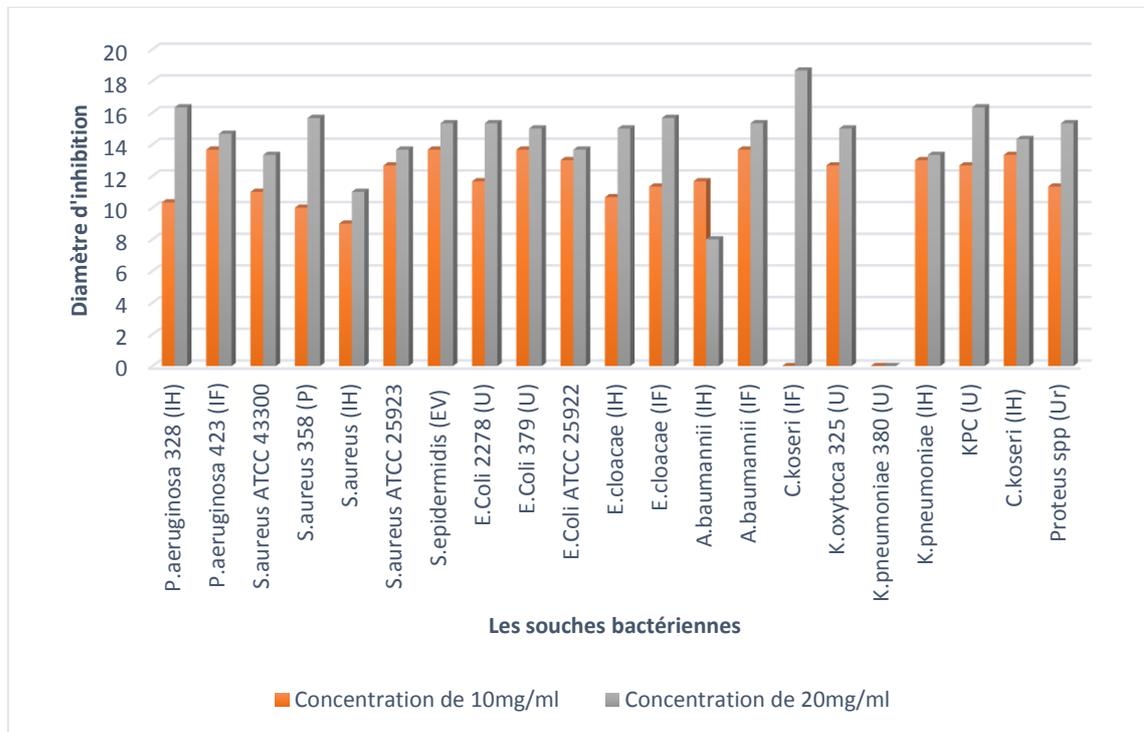


Figure 15 : Diamètres d'inhibition des souches testées

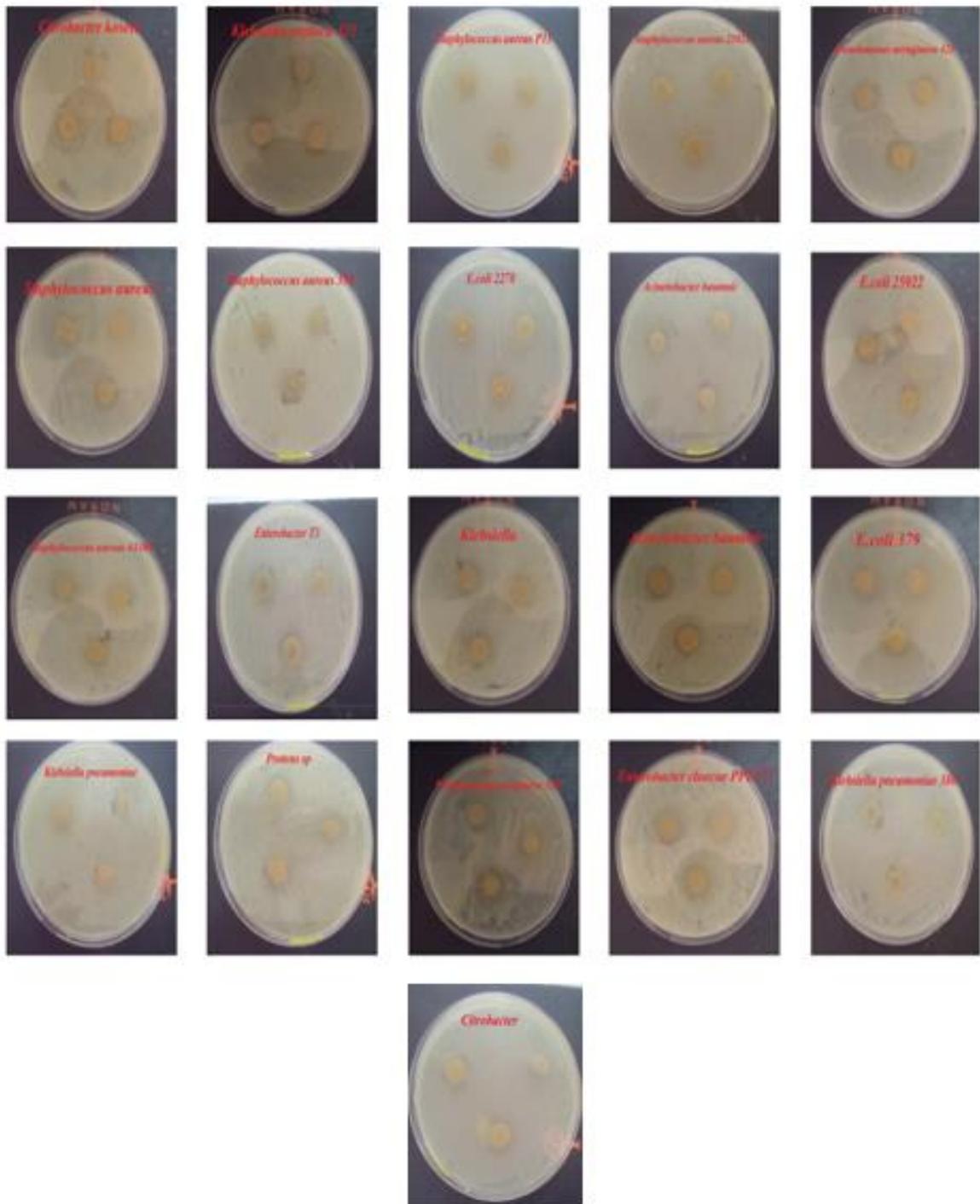


Figure 17 : Aromatogramme des souches bactériennes (20mg/ml d'extrait)

Nos résultats montrent que l'extrait de la plante testée sur les différentes souches bactériennes a un effet positif meilleur en augmentation visuelle des diamètres d'inhibitions avec la concentration de 20 mg/ml par rapport à la concentration de 10 mg/ml qui présente un effet restreint à certaines souches bactérienne.

Dans la littérature, un extrait est considéré comme actif lorsqu'il induit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10 mm (Tekwu *et al.*, 2012).

Pour la concentration de 10 mg/ml de DMSO on observe que l'ensemble des souches bactériennes sont classées dans les catégories sensible (10 à 13.6 mm) ce qui signifie une activité inhibitrice. Cette activité semble être reliée à la présence des composés polyphénoliques dans la plante qui sont considérés comme agents antibactériens (Franky *et al.*, 1993 ; Leclerc, 1995). En revanche, aucune activité inhibitrice n'a été relevée pour les bactéries : *C.koser* (IF), *K.pneumoniae* 380 (U) et *S.aureus* (IH).

En augmentant la concentration de notre extrait à 20 mg/ml on a constaté la sensibilité des souches : *S.aureus* ATCC 43300, *S.aureus* (IH), *S.aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *k.pneumoniae* (IH), *K.oxytoca* 325 (U), *KPC* (U), *A.baumannii* (IF), *P.aeruginosa* 328 (IH), *P.aeruginosa* 423 (IF), *S.aureus* 358 (P), *S.epidermidis* (EV), *E. Coli* 2278 (U), *E. Coli* 379 (U), *E.cloacae* (IH), *E.cloacae* (IF), *C.koseri* (IH), *C.koseri* (IF), *Proteus.spp* (UR) dont les diamètres d'inhibitions varient de 11 à 18,66 mm.

L'extrait du *C.azel* été efficace contre le *Staphylococcus aureus*. Ibiri, (2005) rapporte que cette bactérie a la réputation d'être en général très résistante à toutes sortes d'agents antimicrobiens et aux antibiotiques. Il est établi que l'inhibition de cette bactérie par des agents antimicrobiens, nécessite des concentrations considérables externes (Plotowski, 1987). En revanche, la souche *K.pneumoniae* 380 (U) reste non sensible vis-à-vis des deux concentrations testées. Il est important, de préciser qu'un résultat observé lors de l'évaluation d'un extrait est la composante de deux paramètres : l'activité intrinsèque des produits actifs et la diversité quantitative et/ou qualitative des composés présents dans ces extraits. Par exemple, une activité avérée d'un extrait peut aussi bien être le reflet d'une faible quantité de constituants très actifs que d'une grande

quantité de constituants peu actifs, ou à certains constituants qui démontrent un synergisme (Chaibi. Et al., 1997)

Il est à signaler que le produit actif qui se présente dans la plante peut être : soit actif sans être métabolisé et aura ainsi une activité *In vitro et In vivo* ; soit actif après métabolisation et dans ce cas il sera inactif *In vitro* et actif *In vivo* (Chaibi et al., 1997)

Il en ressort de cette analyse que chaque composé agit différemment sur les micro-organismes. C'est-à-dire, qu'un composé peut avoir une action très importante sur un germe ou une action moindre, voire même nulle sur un autre.

II.1.3.2. Méthode de micro-dilution sur microplaque

La détermination des paramètres d'inhibition (CMI et CMB) nous permet non seulement de confirmer, quantifier et comparer les activités, mais aussi de caractériser la nature de l'effet révélé par un extrait sur un micro-organisme donné. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 08.

Tableau 08 : Valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB) et le rapport CMB/CMI.

Souches bactériennes	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CMB/CMI
<i>P.aeruginosa</i> 328 (IH)	10	5	0.5
<i>P.aeruginosa</i> 423 (IF)	5	2,5	0.5
<i>S.aureus</i> ATCC 43300	0,625	-	-
<i>S.aureus</i> 358 (P)	0,07	-	-
<i>S.aureus</i> (IH)	0,15	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	0,31	-	-
<i>S.epidermidis</i> (EV)	0,625	-	-
<i>E.Coli</i> 2278 (U)	0,07	-	-
<i>E. Coli</i> 379 (U)	5	-	-
<i>E. Coli</i> ATCC 25922	0,625	-	-
<i>E.cloacae</i> (IH)	0,625	-	-
<i>E.cloacae</i> (IF)	5	2,5	0.5
<i>A.baumannii</i> (IF)	2,5	-	-

<i>C.koseri</i> (IH)	0,31	-	-
<i>K.oxytoca</i> 325 (U)	0,039	-	-
<i>K.pneumoniae</i> 380 (U)	0,039	-	-
<i>K.pneumoniae</i> (IH)	0,039	-	-
KPC (U)	0,625	-	-
<i>A.baumannii</i> (IH)	0,07	-	-
<i>C.koseri</i> (IF)	0,31	-	-
<i>Proteus .spp</i> (Ur)	0,039	-	-

- : pas de CMB ; $CMB/CMI \leq 4$: Pouvoir bactéricide ; $CMB/CMI > 4$: Pouvoir bactériostatique

L'évaluation des pouvoirs bactéricides et bactériostatiques des extraits ayant révélé une activité antibactérienne, a été effectuée en utilisant la technique de microdilution sur microplaque. Les CMI et CMB sont déterminées après observation des cultures. La CMB (99,99% de destruction microbienne), a été déterminée par comparaison à une boîte témoin ensemencée avec différentes dilutions de l'inoculum bactérien

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la concentration la plus basse rapportée pour donner une inhibition complète des bactéries testées après 48 heures d'incubation (**Wan et al., 1998 ; Canillac et Mourey, 2001**).

Une interprétation globale des résultats montre que les valeurs des CMI concordent d'une manière générale avec celles des diamètres d'inhibition ; l'extraits ayant induit une importante zone d'inhibition présentent les plus petites CMI sur les souches correspondantes.

Nos résultats présentés par le tableau 10 montrent que les CMI s'échelonnent entre 0,039 et 10 mg/ml. Tandis que, les CMB varient de 2.5 à 5 mg/ml. Cependant, les extraits ayant une CMI inférieure à 500 µg/ml sont considérés actifs, l'activité antibactérienne est modérée à des concentrations de CMI comprises entre 500 et 1000 µg/ml, et faible au-delà de 1000 µg/ml (**Rios et Recio, 2005 ; Molina Salinas et al., 2007 ; Toyang et al., 2012**).

Les souches les plus sensibles sont celles qui présentaient des CMI plus basses, par ordre de sensibilité croissante on distingue : *Proteus.spp* (Ur), *K.pneumoniae* (IH), *K. pneumoniae* 380 (U) et *K.oxytoca* 325 (U) avec une CMI qui égale à 0,039 mg/ml, suivies par *S.aureus* 358 (IH), *E.coli* 2278 (U) et *A.baumannii* (IH) avec une CMI=0,07 mg/ml) dans ce cas une CMI inférieure à 5mg/ml est considérés actifs. en ce qui concerne *E.cloacae* (IF) , *E.coli* 379 (U) , *P.aeruginosa* 423 (IF) et *P.aeruginosa* 328 (IH), l'activité antibactérienne est modérée parce que les CMI sont comprises entre 5 et 10 mg/ml.

D'après le même tableau nous avons marqué la présence des CMB pour les souches bactériennes *E.cloacae* (IF), *P.aeruginosa* 423 (IF) et *P.aeruginosa* 328 (IH), avec des valeurs respectives de 2.5, 2.5 et 5 mg/ml. Concernant les autres souches bactériennes testées, aucune CMB n'a été déterminée.

Le pouvoir bactéricide est confirmé à partir du rapport CMB/CMI. L'extrait est validé comme bactéricide lorsqu'il est inférieur ou égal à 4 et bactériostatique, lorsqu'il est supérieur à 4 (**Carbomelle, 1987 ; Marmonier, 1990 ; Berche et al, 1991**).

L'extrait de la partie aérienne de *Calligonum azel* montre un pouvoir bactéricide uniquement sur les souches *P.aeruginosa* 328 (IH), *P.aeruginosa* 423 (IF), *E.cloacae* (IF). L'effet bactériostatique est par contre démontré avec les souches restantes.

II.2. L'Activité antioxydant

L'activité antioxydante d'extrait issu de la plante étudiée a été évaluée *In vitro* par la méthode de piégeage du radical libre DPPH (**radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)**). Ce dernier est l'un des substrats le plus utilisé généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa solubilité et la simplicité de l'analyse (**Bozin et al., 2008**). Il est employé pour le criblage des molécules douées d'activités antioxydantes présentes dans les extraits des végétaux (**Yi et al., 2008**).

La capacité antioxydante d'extrait méthanolique de la plante est mesurée en termes de capacité de piégeage des radicaux en suivant la réduction de l'absorbance d'une solution alcoolique du DPPH qui s'accompagne par un passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517nm. L'intensité de cette

couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu fournisseur de protons (Maisuthiasakul *et al.*, 2007).

L'évaluation de l'activité antioxydante est basée sur le pouvoir inhibiteur des extraits sur le DPPH*. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de DPPH*. Ce pourcentage de DPPH* permet d'utiliser le paramètre CI_{50} qui est défini comme la concentration de substrat qui cause une perte de 50% d'activité du DPPH*.

Après mesures spectrophotométriques, les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH en sa forme non radicalaire. A partir de ces courbes nous pouvons déterminer les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations utilisées ainsi que la valeur de l' IC_{50} (EC_{50}) pour notre extrait. Plus la valeur de l' IC_{50} est petite, plus l'extrait possède une bonne activité antioxydante.

Les résultats de mesure des pourcentages d'inhibition de l'acide ascorbique et de l'extrait méthanolique de *Calligonum azel* sont illustrés dans la figure 18

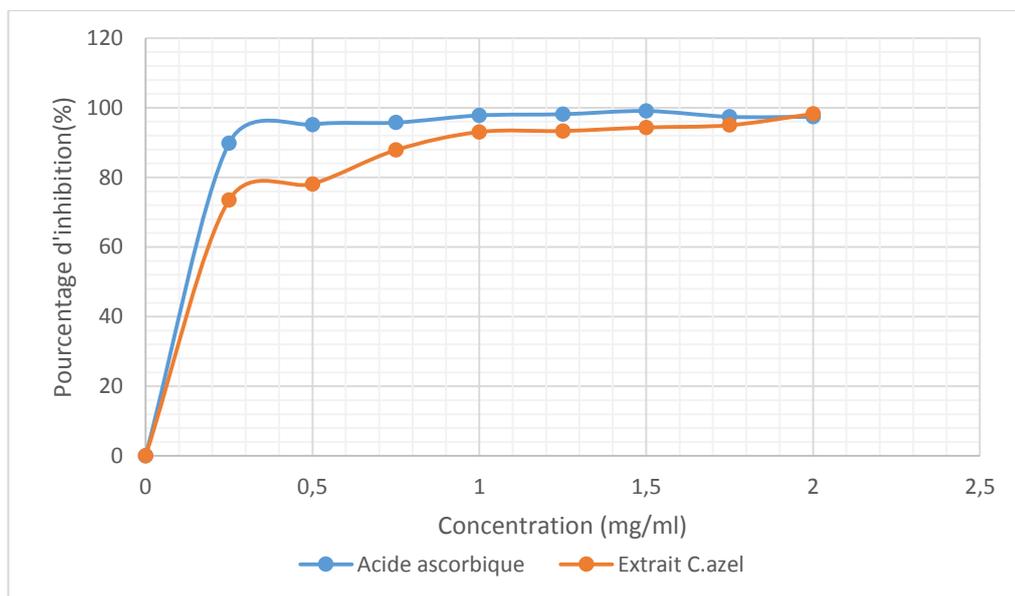


Figure 18 : Pourcentages d'inhibition du DPPH* en fonction des concentrations de l'acide ascorbique et en fonction des concentrations de l'extrait méthanolique du C.azel

D'après la présentation graphique ci-dessus, on remarque que le pourcentage d'inhibition est fortement dépendant des concentrations en substrat, et ce pour l'extrait obtenu avec le méthanol de la partie aérienne de *Calligonum azel*. Plus précisément

l'augmentation en concentration de l'échantillon provoque l'élévation du pourcentage d'inhibition du radical libre et par conséquent l'augmentation de l'activité antiradicalaire. Cet examen est justifié par la valeur de la concentration qui permet d'inhiber l'effet de 50% des radicaux libre IC_{50} qui égale à 0.15 mg/ml .

L'activité antioxydante de l'acide ascorbique, pris comme antioxydant de référence, est mesurée par la même méthode en respectant le même mode opératoire. on assiste à une augmentation du pourcentage d'inhibition et cette augmentation est proportionnelle à la concentration de la solution jusqu'à la fin de l'expérimentation où le pourcentage d'inhibition arrive à se stabiliser. Ce dernier a manifesté une capacité puissante sur le radical libre DPPH* aussi proche de l'extrait méthanolique de lazel , dont la CI_{50} = 0.13 mg/ml .

Nos résultats corroborent avec l'étude de **Bannour et al., (2016 b)** qui démontre que les graines, les feuilles, les tiges et les extraits racinaires de *C. azel* Maire du sahara Tunisienne possèdent des activités antioxydantes importantes, évaluées par le piégeage des radicaux DPPH essai. Ainsi, les quatre organes analysés ont montré de faibles concentrations inhibitrices (IC_{50}), indiquant un important potentiel antiradicalaire . En Outre, **Gomes et al., (2015)** ont précédemment signalé que les boutons floraux de *Calligonum polygonoides* sont chargés avec des pigments et des substances aromatiques, et que ces plantes sont une source importante d'antioxydants et de composés anti-stress. (**Khan et al., 2015**), a également indiqué que *C. polygonoides* possède des composés bioactifs antioxydants, antifongiques et cytotoxiques importants

D'après **Boulekbache-Makhlouf et al., (2013)**, les composés phénoliques sont des antioxydants à propriétés redox qui permettent d'agir comme agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et désactivateurs d'oxygène singulet, et aussi le rendement et l'activité antioxydante des extraits naturels dépendent du solvant utilisé pour l'extraction. **Torres et al., 2007 et Falleh ; al., (2008)** rajoutent que les polyphénols ayant un nombre élevé de groupements hydroxyles présentant ainsi, une activité antioxydante très importante.

Sur la base des résultats issus on peut déduire que notre plante saharaienne *Calligonum azel* Maire est dotée d'un excellent pouvoir antioxydant aussi proche de la vitamine C , ce qui suggère son exploitation dans le traitement des maladies de stress.

Conclusion

De nos jours, un grand nombre de plantes médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

Les bactéries, les champignons et les radicaux libres sont à l'origine de réels problèmes de santé publique à cause de leur implication dans de nombreuses maladies. C'est dans ce cadre que notre travail de recherche vise à découvrir des agents antioxydants et antibactériens naturels, à partir d'une plante saharienne médicinale qui représentent un réservoir de molécules bioactives encore peu exploré.

Le screening phytochimique, de l'espèce *Calligonum azel* a permis de détecter différents composés notamment des flavonoïdes, des mucilages, des tanins et des saponosides. Une absence des alcaloïdes est signalée

Après extraction méthanolique et lyophilisation de la partie aérienne du matériel végétale, un rendement égale à (11,4 %) est déterminé, et que les différentes méthodes de dosage des polyphénols et des flavonoïdes montrent que l'extrait méthanolique du *Calligonum azel* est riche principalement en polyphénols.

L'évaluation de l'activité antibactérienne de quatre antibiotiques sur 21 souches montre la résistance de l'ensemble vis-à-vis de l'amoxiclave et de la vancomycine. Pour la gentamicine seules les souches : *P.aerugenosa* 423 (IF), *KPC* (U), *S.aureus* 358 (P), *S.aureus* ATCC 43300, *P.aerugenosa* 328 (IH) sont avérées sensibles. En ce qui concerne le chloramphénicol, un effet positif est marqué pour les souches ; *C.koseri* (IH), *S.epidermidis* (EV), *E.Coli* ATCC 25922, *KPC* (U), *E.cloacae* (IH), *E.cloacae* (IF), *A.baumani* (IH), *K.pneumoniae* 380 (U), *S.aureus* 358 (P), *S.aureus* (IH), *P.aerugenosa* 423 (IF)

Le pouvoir antibactérien de l'extrait du *C.azel* évalué par la méthode de puits révèle des effets variables de l'extrait testé par deux concentrations 10 mg/ml et 20 mg/ml vis-à-vis des souches bactériennes. En effet la concentration de 20 mg/ml exerce

Conclusion et Perspectives

un effet plus puissant sur la majorité des souches testées, dont le plus grand diamètre d'inhibition ($18,66 \pm 1.52$ mm) a été enregistré sur *C.koseri* (IF).

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait sur 21 souches bactériennes réalisée par méthode de puits, indiquent que *Calligonum azel* possède un effet inhibiteur de l'ensemble des souches testées, excepté la souche *K.pneumoniae* 380 (U) qui se manifeste résistante.

Les résultats de l'activité antibactérienne en milieu liquide par méthode de micro-dilution sur microplaque montrent que l'extrait méthanolique du *Calligonum azel* a une action inhibitrice sur les souches bactériennes testées. Toutefois, les CMI s'échelonnent de 0,039 à 10 mg/ml respectivement pour les souches : *K.oxytoca* 325 (U), *K.pneumoniae* 380 (U), *K.pneumoniae* (IH), *Proteus .spp* (Ur), *S.aureus* 358 (P), *E.Coli* 2278 (U), *A.baumannii* (IH), *S.aureus* (IH), *S.aureus* ATCC 25923, *C.koseri* (IH), *C.koseri* (IF), *S.aureus* ATCC 43300, *S.epidermidis* (EV), *E. Coli* ATCC 25922, *E.cloacae* (IH), *KPC* (U), *A.baumannii* (IF), *P.aeruginosa* 423 (IF), *E. Coli* 379 (U), *E.cloacae* (IF), *P.aeruginosa* 328 (IH). Une CMB varie de 2.5 à 5 mg/ml a été démontrée pour : *E.cloacae* (IF), *P.aeruginosa* 423 (IF) et *P.aeruginosa* 328 (IH). D'après la bibliographie ces valeurs de CMB sont inférieures aux valeurs de la CMI correspondantes, donc le rapport CMB/CMI est inférieur à 4 à cet effet on peut prononcer une action bactéricide.

A partir des résultats tirés de l'activité antioxydante du *Calligonum azel* évaluée par la méthode de réduction de radical libre DPPH et sur la base des résultats du dosage des polyphénols, on peut dire que l'extrait de lazelle est riche en composés phénoliques et effectivement, plus actif comme piègeurs du radical DPPH.

En effet, notre travail reste préliminaire et l'extrait de la plante constitue un réservoir très intéressant pour des recherches ultérieures qui vont nous ouvrir des horizons de recherche ciblés vers cette plante en raison du manque des études concernant cette plante par rapport à leur richesse par plusieurs composés chimiques importants dans le domaine de la médecine traditionnelle, notamment en termes de mise en évidence des principes actifs et évaluation de leurs activités biologiques.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être

Conclusion et Perspectives

exploitées par des recherches plus approfondies, plusieurs plans d'actions, projets et interventions devraient être entrepris:

- Réaliser des études sur la préservation de la biodiversité de la flore.
- Encourager les méthodes traditionnelles et les connaissances des populations rurales.
- Renforcer et améliorer la coopération entre les prestataires de la médecine traditionnelle et les intervenants sanitaires dans les communautés
- Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pouvant répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif de médicaments synthétiques.
- Développer des médicaments antibactériens à base des plantes.
- Développer des médicaments antioxydants à base des plantes.
- Orienter les recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires qui seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence.

En attendant, nous venons de prouver une fois de plus que les plantes médicinales ne relèvent pas seulement des pratiques mystiques ou magiques mais qu'elles possèdent bien une activité que nous pouvons vérifier par les méthodes modernes expérimentales.

Il est primordial de se rappeler que la nature reste encore, et sans aucun doute pour longtemps, le plus perfectionné de tous les laboratoires.

Références
Bibliographiques

Référence bibliographiques

- **Alkurd A., Hamed T. R., Al-Sayyed H., 2008.**Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 4: 265 – 274.
- **Aurousseau, 2002.**Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage conséquence sur la reproduction la physiologie et la qualité de leurs produits. INRA Prod. Anim., 15, 67–82.
- **Babaamer, Z. Y., Sakhri, L., Al-Jaber, H. I., AlQudah, M. A., Abu Zarga, M. H., 2012.**Two new taraxasterol-type triterpenes from *Pergularia tomentosa* growing wild in Algeria. *Journal of Asian Natural Products Research*, vol.14, n° 2, pp. 1137-1143.
- **Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, M. 1996.**Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*. 46: 1086-1089.
- **Bahroun T., 1996.** Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and agricultural research council, Réduit, Mauritius : pp 83-94.
- **Bannour, M., Aouadhi, C., Khalfaoui, H., Aschi-Smiti, S., & Khadhri, A. 2016b.** Barks Essential Oil, Secondary Metabolites and Biological Activities of Four Organs of Tunisian *Calligonum azel* Maire. *Chemistry and Biodiversity*, 13-1527-1536.
- **Bannour, M., Lachenmeier, D. W., Straub, I., Kohl-Himmelseher, M., Khadhri, A., Aschi-Smiti, S., Belgacem, H. 2016a.** Evaluation of *Calligonum azel* Maire, a North African desert plant, for its nutritional potential as a sustainable food and feed. *Food Research International*, 89, 558–564.
- **Beddou F.** Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss. & Dur. Thèse de doctorat en Biologie Cellulaire et Biochimie, Université de Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, 2015,144 p.
- **Ben el Hadj Ali I., Bahri R., Chaouachi M., Boussaïd M. and Harzallah-Skhiri F. 2014.** Phenolic content, antioxidant and allelopathic activities of various extracts of *Thymus numidicus* Poir. Organs. *Industrial Crops and Products*, 62, 188-195.
- **Benzahi K,** Contribution à l'étude des flavonoides dans la Plante cynodn *Dactylon-L* <<chindent>>, mémoires de Magister. Université d'Ouargla, 2001, P15-17.

- **Berche P., Gaillard J.L. and Simonet M. 1991.** Les bactéries des infections humaines. Editeur Flammarion, Médecine et Sciences, 660 p.
- **Besançon., 2012.** Progrès en dermatologie - Allergologie. Ed. John Libbey Eurotext. Paris : 111p.
- **Bessas, A ; Benmoussa, L ; Kerarma, M. 2007.** Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud Algérien. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en biologie.
- **Boulekbache-Makhlouf L., Medouni L., Medouni-Adrar S., Arkoub L. and Madani K. 2013.** Effect of solvents extraction on phenolic content and antioxidant activity of the byproduct of eggplant. *Industrial Crops and Products*, 49, 668-674.
- **Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E., 2001.** Production of plant secondary metabolites : à historical perspective. *Plant Science*. 161: 839-851.
- **Bousseboua H. 2001 ; 2006.** Eléments de microbiologie générale. 32, 160- 167.
- **Bozin B., Mimica-Dukic N., Bogavac M., Suvajdzic LJ., Simin N., Samojlik I., Couladis M., 2008.** Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Achillea collina* Bekker ex Heimerl s.l. and *A. pannonica* Scheele essential oils. *Molecules*. 13(9) :2058–2068.
- **Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C., 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol*. 28:25–30.
- **Bruneton, J. 2009,** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4^{ème} ed. Paris : Tec & Doc Lavoisier.
- **Canillac et Mourey, 2001. Canillac N., and Mourey A. 2001.** Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiol*. 18 : 261– 268.
- **Carbomelle B., Denis F., Mannonier A., Pinon G. et Vague R. 1987.** Bactériologie médicale : Techniques usuelles, SIVIRP (éd), Paris : 228–282.
- **Chahma, A, M.R Djebbar.** <<Les espèces médicinales spontanées du Sahara septentrional algérien : distribution spatio-temporelle et étude ethnobotanique>>, *Revue Synthèse*, N° 17, Janvier 2008, p, 36-37.
- **Chaibi A., Ababouch L.H., Belasri K. and Boucetta S. 1997** "Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* and *Clostridium botulinum* spores by essential oils". *Food Microbiology*. 14:161-174.

- **Chao-Chin H., Jau-Tien L., Fung -Jou L., Fen -Pi C. et Deng -Jye Y., 2008.** Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chemistry*, 109, 439–446.
- **Chaouch N.** Etude des alcaloïdes dans la coloquinte *Colocynthis vulgaris* (L) Schrad (cucurbitacées) Région de Oued N'sa (Wilaya de Ouargla). Mémoire de magister. Université d'Ouargla 2001, 44.
- **Cheeseman D., 1987.** Vitamin E protects proteins against free radical damage in lipid environments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 148, 1277-1282, cité par Arousseau, 2002.
- **Chehma A. et Hadjaiji F., 2005.** Les plantes spontanées (médicinales) du Sahara septentrional algérien, caractéristiques floristiques, répartition spatio-temporelle et abondance. Séminaire International sur la valorisation des Plantes Médicinales dans les zones arides. Ouargla (Algérie), 1, 2 et 3 février 2005
- **Chehma A., 1987.** Contribution à la connaissance du dromadaire dans quelques aires de distribution en Algérie. *Mém. Ingéniorat d'Etat, INA El Harrach*, 83 p
- **Clara et al. 2010. Clara G., Ana Cristina F., Jesus B., Ana M.M., Jose S.U., Jose G.B., Jose A.C. and Antonio M.F.P. 2010.** Composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* volatiles : Comparison between supercritical fluid extraction and hydrodistillation, 33, 2211-2218.
- **Clifford M.N. 2000,** Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. *J.Sci. Food Agric.*, 80, 1063-1072
- **Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. M100-S21 31.
- **Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests ; approved standard M02–A10, tenth ed. Author, Wayne, PA.
- **Demangeot J., 1981 -** Les milieux naturels désertiques. Ed. Imprimerie Jouve, 2^{ème} édition, Paris, 261 p.
- **Dhief, A., Gorai, M., Aschi-Smiti, S., & Neffati, M. 2009.** Comparative phenological and water potential patterns of three *Calligonum* species in the eastern great Erg of Tunisia. *Flora : Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 204(8), 581–592.

- **Dimitrios B., 2006.** Sources of phenolic antioxydants.Trend in food science and technology, 505-512.
- **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P. and Vidal N. 2006.**Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compound.Journal of Food Chemistry, 97, 654-660.
- **Dohou N et al., 2003.** Screening Phytochimique d'une Endémique IBERO-MAROCAINE : Thymelaea lythroides ; Bull. Soc. Pharm.Bordeaux.142 :61-78
- **Ebrahimi N-S., Hadian J., Mirjalili M-H., Sonboli A. et Yousefzadi M., 2008.** Essential oil composition and antimicrobial activity of Thymus caramanicus at different phonological stages. Food chemistry (110) : 927-931.
- **Edeoga1 H.O., Okwu D. E. et Mbaebie B.O., 2005.** Phytochemical constituent of some Nigerian medicinal plants. African Journal of biotechnology. 4(7) : 685-68.
- **Edzard E. 2001.**The desktop guide to complementary and alternative medicine, 2ème edition, Grande-Bretagne, Ed. Mosby.
- **FatakunC.A, Akoroda, M., Hahn,S. 1992.**"Studies on the reproductive biology of white yam (Dioscorea rotundata)".Euphytica.64(3) :197.
- **Faye B., 1997.**Guide de l'élevage du dromadaire. Ed. Sanofi. Santé Nutrition Animale. 126 p.
- **Franky R., Terras G.and Torrekens S. 1993.** "A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species". FEBS letters, 316 (3) :233-240
- **Gapińska M., Skłodowska M. et Barbara G., 2008.** Effect of short-and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots Acta Physiol Plant, 30, 11–18
- **Gauthier Pilters H., 1969.** Observations sur l'écologie du dromadaire en moyenne Mauritanie. Extrait du bulletin de l'I.F.A.N. série A. n°4
- **Georgé S., Brat P., Alter P et Amiot J.M., 2005.** Rapid determination of polyphénols and Vitamin C in plant-derived products. J. Agr. Food Chem. 53 :1370-1373.
- **Gomes, S.M.C., Fernandes, I.P.G., Shekhawat, N.S., Kumbhat, S., Oliveira-Brett, A.M. 2015.** *Calligonum* polygonoides Linnaeus Extract : HPLC-EC and Total Antioxidant Capacity. Electroanalysis, 27,293-301.
- **Gutteridge J. M., 1993.** Free radicals in disease processes : A compilation of cause and consequence. Free Radical Research, 19, 141–158.

- **Halliwell B., Gutteridge J. M. et Cross C. E., 1992.** Free radicals, antioxidants, and human disease : where are we now. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 119,598-620
- **Hancock, R. D., McDougall, G. J., & Stewart, D. 2007.** Berry fruit as „superfood“ : hope or hype. *Biologist*, 54(2), 73-79.
- **Hayouni E.A, Abedrabba M., Bouix M. and Hamdi M. 2007.** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105(3), 1126-1134.
- **Heilerová L., Bučková M., Tarapčík P., Šilhár S. et Labuda J. 2003.** Comparison of Antioxidative Activity Data for Aqueous Extracts of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.), Oregano (*Origanum vulgare* L.), Thyme (*Thymus vulgaris* L.), and Agrimony (*Agrimonia eupatoria* L.) obtained by Conventional Methods and the DNA-Based Biosensor. *Czech J. Food Sci.* 21 (2), 78–84.
- **Hui-Yin C., Yuh-Charn L. et Chiu-Lan H., 2007.** Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chemistry*, 104, 1418–1424.
- **Ibiri P.M. 2005.** "Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles". Thèse de doctorat. Ecole polytechnique fédérale, Lausanne (Suisse)
- **Iriti M. et Faoro-Water F., 2008.** Oxidative Stress, the Paradigm of Ozone Toxicity in Plants and Animals. *Air Soil Pollut.*, 187, 285–301.
- **Iserin P. 2001.** Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Identification, Préparations, soins. 2nd edition, Dorling Kindersley Limited, Londres.
- **Iserin P., 2001.** Encyclopédie des plantes médicinales : Identification, préparation, soin. Ed Larousse. P : 267.
- **Jean-Yves Chabrier., 2010.** Plantes Médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse de doctorat en Pharmacie, Université Henri Poincaré –Nancy 1
- **Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P.** Botanique systématique Une perspective phylogénétique. 1^{ère} Ed. Paris : De Boeck Supérieur, 2002.
- **Kang D.G., Yun C.K., and Lee H.S. 2003.** Screening and comparison of antioxidant activity of extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacol.* 87:231-236.
- **Kar A., 2007.** Pharmacognosy and Pharma biotechnologie ; 2^{ème} Ed : New Age International Publishers. pp. 1-30.

- **Karumi Y., Onyeili P.A., Ogugbuaja V.O., 2004.** Identification of active principal of *M.balsamina* (Balsam Apple) leaf exact. *J Med Sci.* 4(3) :179-182.
- **Khan, A., Khan, R.A., Ahmed, M., Mushtaq, N.2015.** In vitro antioxidant, antifungal and cytotoxic activity of methanolic extract of *Calligonum polygonoides*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 10, 316-320.
- **Khan, T.I. 1997.** Conservation of Biodiversity in Western India. *Environment*, 17, 283-287.
- **Khelifi D., Hamdi M., El Hayouni A., Cazaux S., Souchard J.P., Couderc F. and Bouajila J. 2011.** Global chemical composition and antioxidant and anti tuberculosis activities of various extracts of *Globularia alypum* L. (*Globulariaceae*) leaves. *Molecules*, 16, 10592-10603. Larousse. P : 267.
- **Kraus A., Roth H.P.etKirchgessner M., 1997.**Supplementation with vitamin C, vitamin E or b-carotène influences osmotic fragility and oxidative damage of erythrocytes of zinc-deficient rats.*J. Nutr.*, 127, 1290-1296 cités par Aurousseau, 2002.
- **Kumar, M., Tiwari, M., Mohil, P., Bharti, V., & Jain, U. 2015.** *Calligonum Polygonoides* linn : an Important Rare Shrub Species in Thar Desert of India. *Indian Journal of Plant Sciences*, 4(2), 63–66.
- **Larif, M., Ouhssine, M., Soulaymani, A., Elmidaoui, A., 2013.** Potential effluent oil mills and antibacterial activity polyphenols against some pathogenic strains. *Research on Chemical Intermediates*, 1-13.
- **Leclerc H. 1995.** "Microbiologie générale", Ed. Doin, Paris
- **Lee K-W., Kim Y-J., Lee H-J. et Lee C-Y., 2003.** Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 7292-7295.
- **Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F et Jiang Y., 2007.** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae.*Foodchem*. 102 : 771-776.
- **Longo H. F., Chehma A et Oulad Belkhir A., 1988.**Quelques aspects botaniques et nutritionnels des pâturages du dromadaire en Algérie. *Options méditerranéennes série séminaires*, n° 2, pp. 47-53
- **Magalhães L., Segundo M.,Reis S.et Lima Jose L.F.C, 2008.** Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica chimica acta*. 613,1–19.

- **Maisuthiasakul P., Pasuk S., Ritthiruangdej P., 2007.** Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *Journal of Food composition and analysis*. 21: 229-240.
- **Marc F., Davin A., Deglène-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M. et Fritsch P., 2004.** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *MEDECINE/SCIENCES* ; 20, 458-463.
- **Marmonier A. 1990.** Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. *Bactériologie Médicale, technique usuelles*, 227–236.
- **Mbata TI, Debiao L, Saikia A., 2006.** Antibacterial activity of the crude extract of Chinese Green Tea (*Camellia sinensis*) on *Listeria monocytogenes*. *Internet J. Microbiol.*2(2).
- **Mbojd N., 2003.** Etude de l'activité antidiabétique des extraits acetonique, méthanolique et hescniques de vernonia colorata (willd/darke composées chez des rats wistar, Thèse de docteur en pharmacie, Université de Cheikh Anta Diop de Dakar : pp53.
- **Mensor L. L., Menezes F. S., Leitão G. G., Reis A. S., Santos T. C., Coube C. S. et Leitão S. G. 2001.** Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant isoactivity by the use of DPPH free radical method. *Phy- tother. Res.* 15, 127-130.
- **Miliauskas G., Venskutonis P-R. et Van Beek T-A., 2004.** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry*, 85: 231-237.
- **Molina-Salinas G.M., Perez-Lopez A., Becerril-Montes P., Salazar-Aranda R., Said-Fernandez S. and de Torres N.W. 2007.** Evaluation of the flora of northern Mexico for in vitro antimicrobial and anti-tuberculosis activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(3) : 435–441.
- **Molyneux P. 2004.** The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Stimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin J Sce Technol.* 26(2) : 211-219.
- **Moussaoui, F., Zellagui, A., Segueni, N., Touil, A., Rhouati, S.** Flavonoid constituents from algerian *Launaea resedifolia* (O.K.) and their antimicrobial activity. *Records of Natural Products*, 2010, vol. 4, pp. 91-95.
- **Ozenda P., 1958.** La flore de Sahara septentrional et central. Ed. CNRS, Paris, 486 p.
- **Ozenda P., 1983.** Flore du Sahara, éd. C.N.R.S., Paris, 622p.
- **Ozenda P., 1991.** Flore de Sahara .3^{ème} édition. C.N.R.S. Paris, 662 p. + Cartes.
- **Ozenda, P., 1991.** Flore et végétation du Sahara. 3^{ème} édition. Paris : CNRS.

- **Ozsoy N., Can A., Yanardag R. et Akev N., 2008.** Antioxidant activity of Smilax excelsa L. leaf extracts. Food Chemistry, 110, 571–583.
- **Pelli K. et Marika L., 2003.** Les antioxydants dans l'alimentation. INRA VTT Biotechnology, 24, 4-28.
- **Peronny S. 2005.** La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta). Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle .Discipline Eco-Ethologie .151p
- **Petit Larousse de la médecine, 2002.** Larousse, VUEF.
- **Pietta P.G. 2000.** Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products, 63:1035–1042.
- **Pietta PG., 2000.** Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63:1035-1042.
- **Pincemail J., Meurisse M., Limet R. et Defraigne J.O., 1999.** Mesure et utilisation des antioxydants en médecine humaine MEDISPHERE, 1-4.
- **Plotowski M.C. 1987.** "Evaluation of technetium labelling effect on Pseudomonas aeruginosa surface properties", Ann. Ins. Pasteur/Microbiol. 183: 415-426.
- **Podsdek A., 2007.** Natural antioxidants capacity of Brassica vegetables. LWT. 40:1-11.
- **Pokorny J, Yanishlieva N et Gordon M. H., 2001.** Antioxidants in food: practical applications. Cambridge : Woodhead Publishing Limited. New York, USA p. 108-109.
- **Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005.** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 53, n° 10, pp. 4290-4302.
- **Quezel et Santa, 1962.** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques. EDITIONS DU' CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE. France – Paris. 636p.
- **Rauha, J.-P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P., 2000.** Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compound. International Journal of Food Microbiology, vol. 56, n° 1, pp. 3-
- **Rios J.L. and Recio M.C. 2005.** Medicinal plants and antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology, 100(1-2) : 80–84.
- **Rizk A.M., 1982.** Constituents of plants growing in Qatar. Fitoterapia. 52(2) : 35-42.

- **Rojas A., Hernandez L., Pereda-Miranda R., and Mata R. 1992.** Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 35: 275-283.
- **Roux D., Catier O., 2007.** Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. 3ème Edition, wolters Kluwer. P 141.
- **Saffidine, Karima.** Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus caeruleus L.* et de *Plantago major L.* Thèse de doctorat en science, Université de ferhat abbas, Setif ,2015. 92p
- **Sánchez-Moreno, C. 2002.** Review : Methods used to evaluate the freeradical scavenging activity in foods and biological systems. *Revista de Agaroy Tec de Alim* 8 (3) : 121-137.
- **Sekkoum, K., Belboukhari, N., Cheriti, A., 2014.** New flavonoids from bioactive extract of Algerian medicinal plant *Launea arborescens*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 4, pp. 267-271
- **SFM., 2013.**Comite de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Recommandations : pp60.
- **Simonoff M.et Simonoff G., 1991.** Le sélénium et la vie.MASSON, ed., Paris, p95-120
- **Singh, V., and Pandey, R.R. 1998.** „Ethnobotany of Rajasthan, India“. Jodhpur : Scientific Publishers. 4, 64, 80, 237 and 270.
- **Srivastava, R.L.2006.** Food from Forests in Arid Zone. Compiled by : Non-Wood Forest Products Division, Arid Forest Research Institute, Jodhpur, Designed & Published by : Dr. R.L. Srivastava (Director, AFRI), Printed by Rajputana Stationery Mart, Jodhpur.
- **Strang C. 2006.** Larousse medical. Ed Larousse.
- **Suganya T., Siriporn O.et Sombat C., 2007.**Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand : Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry*, 103, 381–388.
- **Sweeney S., Palmer B., Neill D., Krause D., 2001-** Microbial interaction with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 83-93.
- **Tawaha K., Alali F. Q., Gharaibeh M., Mohammad M. and El-Elimat T. 2007.** Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104, 4,1372-1378.

- **Tekwu, E. M., Pieme, A. C., Beng, V. P., 2012.** Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 142, n° 1, pp. 265-273.
- **Toyang N.J., Ateh E.N., Keiser J., Vargas M., Bach H., Tane P., Sondengam L.B., Davis H., Bryant J. and Verpoorte R. 2012.** Toxicity, antimicrobial and anthelmintic activities of *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae) crude extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 144: 700–704.
- **UNESCO. 1960.** Recherches sur la zone aride : Les plantes médicinales des régions arides. Paris 7e : ONU, vol. 13.
- **Van Bambeke F., Tulkens P. 2008.** Pharmacologie et Pharmacothérapie-Anti infectieux, Syllabus national belge de pharmacologie : pp 212.
- **Vandepitte J., Engbaek K., Piot P., 1994.** Bactériologie clinique : techniques de base pour le laboratoire. Genève : Organisation Mondiale de la Santé, p117.
- **Vivas DE GauleJjac N., 2001,** Vin et santé. Les bases scientifiques du French Paradox. Editions Féret, p.198.
- **Wan J., Wilcock A., and Coventry M.J. 1998.** The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonashydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol.* 84:152–158.
- **Wang J. et Mazza G. 2002.** Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on the Production of Tumor Necrosis Factor α in LPS/IFN- γ - Activated RAW 264.7 Macrophages. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4183-4189.
- **Yi Z., Yan Y., Liang Y., and Zeng B. 2008.** In vitro antioxidant and antimicrobial activities of *PericarpiumCitriReticulatae* of a new Citrus Cultivar and its main flavonoid. *LWT*, 41:597 603.
- **Zhang H., Xia Y., Wang G. et Shen Z., 2008.** Excess copper induces accumulation of hydrogen peroxide and increases lipid peroxidation and total activity of copper–zinc superoxide dismutase in roots of *Elsholtzia haichowensis*. *Planta*, 227, 465

Webographie

1. <http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/phytoth%C3%A9rapie/15365> (Consulté le 13/03/2018)
2. <http://phytotherapie-tp1s.e-monsite.com/pages/diffundefinedrents-types.html> (Consulté le 20/03/2018)
3. <https://www.complements-alimentaires.co/les-plantes-de-la-famille-des-polyg.....19/04/20180> (Consulté le 26/03/2018)
4. http://www.naturevivante.org/index.php?option=com_content&view=article&id=141:calligonum-azel-maire&catid=46:la-flore&Itemid=64 (Consulté le 22/03/2018)
5. <https://www.gbif.org/species/103121882> (Consulté le 20/03/2018)

Annexe 1

1. Matériel screening phytochimique

Les produits chimiques et les réactifs :

- Méthanol, H₂SO₄, FeCl₃, HCl, NaOH, NH₄OH, Ethanol
- Réactif de stiansy, Réactif de MAYER, réactif de WAGNER
- Réactif de Folin, Carbonate de sodium, acide gallique, AlCl₃, quercétine, acide ascorbique
- Acétate d'éthyle, eau distillée, Ninhydrine.

Les équipements :

- Balance de précision (Explorer[®]Pro).
- Balance (BB310) et (Sartorius).
- Verrerie.
- Agitateur vortex (Snijders 34524).
- Eppendorf.
- Rotavapor R-215 (Büchni).
- Lyophilisateur.
- Spectrophotomètre (JENWAY 6305).

2. Matériel bactériologique

Produit utilisés

- Méthanol, L'eau physiologique, BaCl₂
- Gélose Nutritive, gélose de Muller Hinton, Bouillant nutritif

Les équipements :

- Autoclave
- Four pasteur
- Etuve
- Verrerie
- Réfrigérateur

3. Matériel de l'activité antioxydant

Produit utilisés

- DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl),
- Méthanol MeOH
- BHA.

Les équipements :

- Verrerie
- Spectrophotomètre
- Tube

Annexe 2

1. Solution préparées

1.1 Préparation de la solution 0.5 Mac Farland

Cette solution représente le mélange d'une solution de BaCl_2 à 1% et de l'acide sulfurique à 1%

- **Solution de BaCl_2 à 1%**

1g de BaCl_2  100 ml d'eau distillée

- **Solution d' H_2SO_4 à 1%**

Prélever 1 ml d'acide sulfurique et compléter le volume jusqu'au 100 ml par l'eau distillée.

Prélever 0.5ml de la solution de BaCl_2 et le déposer dans une fiole ou une éprouvette, Compléter à 100 ml avec du H_2SO_4 a 1%.IL doit avoir une DO de 0.08 à 0.1 lue à 625nm.

Conserver cette solution dans un flacon ombré à température ordinaire.

1.2 L'eau physiologique

- L'eau physiologique est une solution à 9%.

9g de Nacl pour litre d'eau distillée.

Après préparation, stériliser cette solution de la conserver à 4°C jusqu'à son utilisation.

- Le DPPH 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$; M : 394.33),

0.04g de DPPH est solubilisé dans 100 ml méthanol à 85%.

2. Préparation des milieux de cultures

2.1 Gélose Nutritive

Suspendre 39g de la poudre dans un litre d'eau distillée, ensuite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min. Ensuite conserver dans un endroit frais en absence d'humidité.

2.2 Gélose de Muller Hinton

Gélose Muller Hinton (38g) plus d'eau distillée. Porté à ébullition avec agitations jusqu'à la dissolution complète de la poudre. La solution a ensuite été stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 30 min.

2.3 Bouillon nutritif

Mettre 20 g du milieu nutritif déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée. Agiter lentement jusqu'à dissolution complète. Répartir en flacons, ensuite stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min. Conserver au réfrigérateur pour un usage ultérieur.

Résumé

Résumé

Ce travail s'intéresse à l'étude phytochimique et à l'évaluation des activités antibactérienne et antioxydante de l'espèce *Calligonum azel* du Sud Algérien appartenant à la famille des polygonacées. L'étude biologique de lazél s'inscrit dans le cadre de la recherche d'une démarche de lutte contre l'émergence de micro-organismes résistants aux antibiotiques et de prévention contre le stress oxydatif.

Le screening phytochimique préliminaire de la plante révèle la présence des flavonoïdes, des saponosides, des mucilages et des tanins. L'absence d'alcaloïdes est toutefois signalée.

Le dosage des polyphénols par la méthode de Folin-Ciocalteu montre que l'extrait méthanolique est riche en polyphénols (225.93 ± 14.19 mg EAG / g d'Ext). En revanche les flavonoïdes déterminés par la méthode au trichlorure d'aluminium ne présentent que $8,733 \pm 0.354$ mg EQ /g d'Ext.

L'antibiogramme effectué avec les antibiotiques choisis révèle une sensibilité et/ou une résistance variable en fonction des souches, signalant tout fois la résistance marquée des souches bactériennes envers l'Amoxiclave attribuée à différents mécanisme de résistance acquise et naturelle chromosomique et /ou plasmidique

Le test antibactérien par la méthode de microdilutions montre une concentration minimale inhibitrice équivalente à 0,039 mg/ml pour les espèces *Proteus.spp* (Ur), *K.pneumoniae* (IH), *K. pneumoniae* 380 (U) et *K.oxytoca* 325 (U). Des CMI de l'ordre de 5 mg/ml sont notés pour les souches *P.aeruginosa* 423 (IF), *E. Coli* 379 (U), *E.cloacae* (IF). Une CMI égale à 10 mg/ml est relevée pour *P. aeruginosa* 328 (IH). Le rapport CMB/CMI calculé montre un pouvoir bactéricide de l'extrait du *C. azel* sur les souches *P.aeruginosa* 328 (IH), *P.aeruginosa* 423 (IF), *E.cloacae* (IF).

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique par méthode de réduction du radical libre DPPH montre une activité anti-radicalaire élevée avec une IC₅₀ équivalente à 0.15 µg/ml. Ce résultat conforte la capacité d'une espèce désertique à produire, naturellement, une grande quantité de métabolites antioxydants qui participent probablement à son adaptation dans un environnement extrême

Mots clés : *Calligonum azel* ; screening phytochimique ; polyphénols ; CMI ; CMB ; activité antioxydante.

Abstract

This work focuses on the phytochemical study and evaluation of the antibacterial and antioxidant activities of the species *Calligonum azel* from southern Algeria belonging to the polygonaceae family. The biological study of lazel is part of the search for an approach to combat the emergence of antibiotic-resistant micro-organisms and to prevent oxidative stress.

Preliminary phytochemical screening of the plant reveals the presence of flavonoids, saponosides, mucilages and tannins. However, the absence of alkaloids is reported.

The determination of polyphenols by the Folin-Ciocalteu method shows that the methanolic extract is rich in polyphenols (225.93 ± 14.19 mg EAG / g Ext). In contrast, flavonoids determined by the aluminum trichloride method have only 8.733 ± 0.354 mg EQ /g Ext.

The antibiotic susceptibility test performed with the selected antibiotics reveals variable susceptibility and/or resistance depending on the strains, however, indicating the marked resistance of the bacterial strains to Amoxiclave attributed to different mechanisms of acquired and natural chromosomal and/or plasmidic resistance.

The antibacterial test by the microdilution method shows a minimum inhibitory concentration equivalent to 0.039 mg/ml for the species *Proteus.spp* (Ur), *K.pneumoniae* (IH), *K. pneumoniae* 380 (U) et *K.oxytoca* 325 (U) CMI in the order of 5 mg/ml are noted for *P.aeruginosa* 423 (IF), *E. Coli* 379 (U), *E.cloacae* (IF). A MIC of 10 mg/ml was recorded for *P. aeruginosa* 328 (IH). The calculated CMB/CMI ratio shows bactericidal potency of *C. azel* extract on strains *P.aeruginosa* 328 (IH), *P.aeruginosa* 423 (IF), *E.cloacae* (IF).

The evaluation of the antioxidant activity of methanolic extract by free radical reduction method DPPH shows a high anti-radical activity with an IC₅₀ equivalent to 0.15 µg/ml. This result confirms the ability of a desert species to produce, naturally, a large quantity of antioxidant metabolites which probably contribute to its adaptation in an extreme environment.

Keywords : *Calligonum azel* ; phytochemical screening ; polyphenols ; CMI ; CMB ; antioxidant activity.

ملخص

يرتكز هذا العمل على الدراسة الفيتو كيميائية وتقييم الأنشطة المضادة للبكتيريا والمضادة للأكسدة للنوع *Calligonum Azel* المتواجدة جنوب الجزائر التي تعود لعائلة polygonacée. الدراسة البيولوجية ل *lazel* هي جزء من البحث لعملية المكافحة ضد ظهور الكائنات الحية الدقيقة المقاومة للمضادات الحيوية والوقاية ضد الأكسدة.

يكشف الفحص الكيميائي النباتي الأولي للنبتة عن وجود مركبات الفلافونويد، السابونوزيدات، الصمغ والتانينات. ومع ذلك، فقد تم الإبلاغ عن عدم وجود القلويدات. كشف تقدير كمية البوليفينول باستعمال طريقة Folin-Ciocalteu بينت أن مستخلص الميثانول غني بمادة البوليفينول (225.93 ± 14.19 ملغ / غ معادل حمض الغاليك من المادة الجافة). من ناحية أخرى، تظهر مركبات الفلافونويد التي تحدها طريقة ثلاثي كلوريد الألمونيوم 8.733 ± 0.354 ملغ / غ معادل كيرسيتين من المادة الجافة).

قابلية المضادة للميكروبات التي أجريت مع المضادات الحيوية المختارة يكشف عن حساسية و / أو مقاومة متغيرة بدلالة السلالات، مشيرا جميع الأوقات إلى مقاومة ملحوظة للسلالات البكتيرية نحو Amoxiclave تعود إلى آليات مختلفة من المقاومة المكتسبة و الطبيعية للكروموسومات و / أو البلازميد الإختبار المضاد للجراثيم باستعمال طريقة microdilution يظهر أدنى تركيز مثبت الذي يعادل 0.039 ملغ / مل بالنسبة للأنواع *Proteus.spp* (Ur) ، *K.pneumoniae* (IH) ، *K. pneumoniae* 380 (U) et *K.oxytoca* 325 (U) وكما لوحظ أيضا وجود أدنى تركيز مثبت في حدود 5 ملغ / مل بالنسبة للأنواع *P.aeruginosa* 423 (IF)، *E. Coli* 379 (U)، *E.cloacae* (IF) 10 ملغ / مل بالنسبة للنوع *P. aeruginosa* 328 (IH) النسبة CMB/CMI التي حسبت تظهر قدرة مستخلص C. *azel* القاتلة للأنواع التالية: *P.aeruginosa* 328 (IH)، *P.aeruginosa* 423 (IF) ، *E.cloacae* (IF) ، تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الميثانولي بواسطة طريقة إرجاع الجذر الحر DPPH يظهر نشاط مرتفع للمكافحة ضد الجذور الحرة مع IC_{50} يساوي 0.15 μg / مل. هذه النتيجة تعزز قدرة الأنواع الصحراوية على إنتاج، طبيعيا، كمية كبيرة من الأيضات المضادة للأكسدة التي من المحتمل أن تشارك في تكيفها في بيئة قاسية.

الكلمات المفتاحية: *Calligonum azel*، الفحص الكيميائي النباتي، البوليفينول، CMI، CMB، نشاط مضاد للأكسدة.

