

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

**Ecole Nationale Polytechnique**  
**Département : Génie de l'Environnement**



**MEMOIRE DE PROJET DE FIN D'ETUDE**

Pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Génie de l'Environnement

**THEME :**

**Extraction, Analyse et Evaluation de l'Activité  
Antibactérienne d'Extraits de *Galactites Tomentosa***

**Présenté Par :**

**BOUABIBSA Ikram**

**Soutenu le : 10/09/2020**

**Devant le jury composé de :**

<b>Présidente :</b>	Mr. A. CHERGUI	<b>Professeur à l'ENP</b>
<b>Examinatrice :</b>	Mme S. AROUA.	<b>Maitre de Conférences B à l'ENP</b>
<b>Encadreur:</b>	Mr. B.Boughrara.	<b>MCB U. Chadli Bendjedid. El Tarf</b>
<b>Co-encadreur :</b>	Mme L.DIDAOUI	<b>Professeur à l'ENP</b>

**ENP 2020**



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

**Ecole Nationale Polytechnique**  
**Département : Génie de l'Environnement**



**MEMOIRE DE PROJET DE FIN D'ETUDE**

Pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Génie de l'Environnement

**THEME :**

**Extraction, Analyse et Evaluation de l'Activité  
Antibactérienne d'Extraits de *Galactites Tomentosa***

**Présenté Par :**

**BOUABIBSA Ikram**

**Soutenu le : 10/09/2020**

**Devant le jury composé de :**

**Présidente :** Mr. A. CHERGUI

**Professeur à l'ENP**

**Examinatrice :** Mme S. AROUA.

**Maitre de Conférences B à l'ENP**

**Encadreur:** Mr. B.Boughrara

**MCB U. Chadli Bendjedid. El Tarf**

**Co-encadreur :** Mme L.DIDAOU

**Professeur à l'ENP**

**ENP 2020**

# Dédicace

*J'ai le grand honneur de dédier ce modeste travail à :*

*Mon père Mostefa, l'homme génial qui m'a donné la force et le  
courage.*

*Ma mère Nacira, la femme qui m'a appris la foi et le bonheur,*

*Mes chers frères : Fateh, Monaam, Seif Eddine et Mohammed Anis.*

*Mes grand-mères qui m'ont soutenu avec les prières .*

*Mes précieuses tantes qui ont toujours été là pour moi.*

*Tout mes amies et mes collègues que j'ai l'honneur de les connaitre.*

*Ikram...*

## Remerciements

*En préambule à ce mémoire je remercie **ALLAH** de m'avoir donné la patience, le courage et la force d'accomplir ce travail.*

*Je remercie vivement **Monsieur Boudjemaa BOUGHRARA** et **Madame Linda DIDAOU**, d'avoir accepté d'être mes encadreurs. Leurs remarques et conseils, tous très constructifs, m'ont beaucoup aidée.*

*Je tiens à remercier **Mr A. CHERGUI**, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique, pour l'honneur qu'il me fait de présider ce jury.*

*Mes remerciements s'adressent à **Mme S. AROUA**, pour le temps qu'elle a accordé à l'évaluation de ce modeste travail.*

*Je remercie également **Monsieur Boudjemaa BOUGHRARA** et l'ensemble du personnel de la Faculté des Science de la Nature et de la Vie, Département de biologie de l'Université Chadli Bendjedid – El Tarf, pour leurs accueils chaleureux afin de réaliser la partie expérimentale de ce travail ainsi pour leurs aides et leurs conseils.*

*Je tiens à remercier vivement, **Dr ARRARI**, directeur et médecin biologiste au sein de **laboratoire des analyses médicales ARRARI** pour son accueil.*

*Je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.*

*Enfin, mes profondes reconnaissances à tous les enseignants de l'Ecole Nationale Polytechnique et particulièrement ceux qui ont contribué de près ou de loin à notre formation, avec beaucoup de compétence et de dévouement.*

## ملخص:

العمل المنجز في هذه المذكرة عبارة عن تثمين لنبتة برية، تُعرف باسم نبتة حليب الشوك الأرجواني (*Galactites tomentosa*), تتواجد بكثرة في الحظيرة الوطنية القالة وفي حوض البحر الابيض المتوسط عموماً. يهدف هذا العمل لاستخلاص المواد النشطة الطبيعية ودراسة مكوناتها ونشاطها كمضادة للبكتيريا. يعتبر هذا العمل مدخل للصناعة الصيدلانية بمواد طبيعية وعن طريق التنمية المستدامة.

**الكلمات المفتاحية:** حليب الشوك الأرجواني, استخلاص صلب-سائل, الانشطة المضادة للبكتيريا, الحظيرة الوطنية القالة.

## Abstract:

The work presented in this thesis is a valorisation of a wild plant, known by Purple Milk Thistle (*Galactites tomentosa*), which is abundant in National Parc of El-Kala and the Mediterranean basin, the aim of this work is to extract the bioactive substances and study its antibacterial activity.

This work is considered an introduction to the natural pharmaceutical and sustainable industries.

**Keywords:** Purple Milk Thistle, solid-liquid extraction, antibacterial activity, National Parc of El-Kala, *Galactites tomentosa*

## résumé:

Ce travail présenté dans ce mémoire est une valorisation d'une plante sauvage, connue par chardon-marie pourpre (*Galactites tomentosa*), très abondante dans le Parc National d'El-Kala et le bassin Méditerranéen. L'objectif de ce travail est d'extraire les substances bioactives, analyser les extraits par spectrophotométrie (dosage des sucres, des protéines et des polyphénols) et de faire une évaluation de l'activité antibactérienne.

Ce travail est considéré comme une introduction à l'industrie pharmaceutique naturelle et durable.

**Mots clés:** chardon laiteux pourpre, *Galactites tomentosa*, extraction solide-liquide, activités antibactérienne, Parc National El-Kala.

# Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
<b>Introduction générale</b>	<b>10</b>
<b>Chapitre 1: Etude bibliographique</b>	<b>12</b>
<b>1.1. La phytothérapie et les plantes</b>	<b>13</b>
1.1.1. Définition de la phytothérapie	13
1.1.2. Historique	13
1.1.3. Les plantes aromatiques et médicinales et formes d'utilisation	14
1.1.4. Interaction entre plantes et médicaments	16
1.1.5. Les principes actifs	16
1.1.6. Tests phytochimiques	17
<b>1.2. Galactites tomentosa</b>	<b>22</b>
1.2.1. Description botanique	22
1.2.2. Nomenclature et classification	22
1.2.3. Ecologie et habitat	22
1.2.4. Utilisation de galactites tomentosa	23
<b>1.3. Extraction solide-liquide</b>	<b>23</b>
1.3.1. Choix de la méthode d'extraction	23
1.3.2. Techniques d'extraction des substances naturelles	26
<b>1.4. Généralités sur les souches bactériennes utilisées</b>	<b>29</b>
1.4.1. <i>Serratia odorifera</i>	30
1.4.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	30
1.4.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	30
1.4.4. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	31
<b>Chapitre 2: Matériel et méthodes</b>	<b>32</b>
<b>2.1. Matériel végétal</b>	<b>33</b>
2.1.1. Origine géographique et période de récolte de la plante	33
2.1.2. Identification botanique	34
2.1.3. Préparation des échantillons	34
<b>2.2. Matériel utilisé:</b>	<b>35</b>
2.2.1. Matériel de laboratoire	35
<b>2.3. Screening phytochimique</b>	<b>36</b>
2.3.1. Les alcaloïdes	36
2.3.2. Les saponosides (test de mousse)	36
2.3.3. Les flavonoïdes	37
2.3.4. Les tannins	37
2.3.5. Les huiles volatiles	37

2.3.6. Quinones libres	37
<b>2.4. Les dosages par spectrophotomètre</b>	<b>38</b>
2.4.1. Dosage des sucres	38
2.4.2. Dosage des Protéines	38
2.4.3. Dosage des pigments chlorophylliens (Arnon et Mc Kinney)	38
2.4.4. Dosage des polyphénols	39
<b>2.5. Extraction solide-liquide</b>	<b>40</b>
2.5.1. Extraction par Soxhlet	40
2.5.2. Extraction des polyphénols par macération à froid	40
<b>2.6. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince</b>	<b>40</b>
<b>2.7. Activité antibactérienne</b>	<b>42</b>
2.7.1. La concentration minimale inhibitrice (CMI)	42
<b>Chapitre 3: Résultats et discussion</b>	<b>45</b>
<b>3.1. Screening phytochimique</b>	<b>46</b>
<b>3.2. Les dosages par spectrophotomètre</b>	<b>47</b>
<b>3.3. Rendement d'extraction solide-liquide par Soxhlet (matière grasse) et par macération (polyphénols) de la plante</b>	<b>49</b>
<b>3.4. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM)</b>	<b>51</b>
<b>3.5. Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait polyphénolique.</b>	<b>53</b>
<b>Conclusion Générale</b>	<b>56</b>
Références bibliographiques	57
Annexes	62

## Liste des abréviations

**CCM:** Chromatographie sur Couche Mince.

**DMSO:** Diméthylsulfoxyde.

**DMF:** Diméthylformamide.

**HMPT:** Hexaméthylphosphoramide.

**HE:** Huile essentiel.

**PNEK:** Parc National El-kala.

**D.O:** Densité optique.

**CMI:** Concentration Minimale Inhibitrice .

**MS:** Matière sèche.

**BSA :** Bovin Sérum Albumine.

**UV :** Ultra-Violet.

**Rf:** Rapport frontal.

**PAM:** Plantes aromatiques et médicinales.

## Liste des figures

Figure 1 : Structure de la molécule Morphine et la Quinine.	17
Figure 2 : Structure de base des Flavonoïdes.	18
Figure 3 : Structure chimique de la Solanine, une saponine rencontrée chez toutes les Solanaceae.	18
Figure 4 : Structure des Tanin.	19
Figure 5 : Structure de la coumarine Warfarine	19
Figure 6 : Structure de la Cardénolide Digitoxine.	19
Figure 7 : Numérotation du squelette carboné des stéroïdes.	20
Figure 8 : Structure du Cholestérol.	20
Figure 9 : Structure du Géraniol.	20
Figure 10 : Structure : 3,5- diglucoside de malvidine.	21
Figure 11 : Structure d'Hypericin.	21
Figure 12: Hydrodistillateur.	26
Figure 13: Entraînement à la vapeur.	27
Figure 14: Expression à froid.	27
Figure 15: Appareillage Soxhlet.	28
Figure 16: Extraction par micro-ondes.	29
Figure 17: Galactites tomentosa.	33
Figure 18 : Localisation géographique du site de prélèvement (Google Earth, 2020).	33
Figure 19: Séchage de la plante par l'étuve.	34
Figure 20: Chromatographie sur couche mince.	42
Figure 21: Préparation des disques avec différentes dilutions.	43
Figure 22: Préparation des tests antibactériens avec extraits méthanolique.	44
Figure 23: Courbes d'étalonnages.	47
Figure 24 : Teneur en polyphénols, en sucres et protéines en mg/100g	48
Figure 25: Rendement d'extraction des extraits	50
Figure 26: Résultats de chromatographie sur couche mince.	51
Figure 27: Résultats des concentrations minimales inhibitrice (CMI).	54

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Équipements utilisés dans le laboratoire.	35
Tableau 2 : Réactifs utilisés dans le laboratoire.	35
Tableau 3: Solvants utilisés.	36
Tableau 4: Tests phytochimiques	46
Tableau 5: Résultats des densités optiques.	47
Tableau 6: Concentration des sucres solubles, des protéines, des polyphénols et des pigments chlorophylliens.	48
Tableau 7: Rendement d'Extraction de la matière grasse et des polyphénols	50
Tableau 8: Rf des taches pour l'éluant (hexane/acétate d'éthyle).	52
Tableau 9: Rf des taches pour l'éluant (toluène /acétate d'éthyle).	52
Tableau10: Activité antibactérienne d'extraits du <i>Galactites tomentosa</i> .	53

### **Introduction générale**

Durant des siècles et même des millénaires, l'homme puise dans son environnement les connaissances nécessaires à sa survie et à son bien-être. Il pouvait transmettre l'expérience de la médecine et de tous types de remèdes naturels pour finalement créer un lien de complémentarité avec la nature et élaborer ce que nous appelons aujourd'hui la médecine traditionnelle.

La médecine moderne et surtout la thérapie chimique présente un risque contre l'équilibre de la santé de l'être humain, par ses effets secondaires dont résultent d'autres maladies. De ce fait l'être humain a souvent eu recours à la médecine traditionnelle qui présente généralement moins de toxicité, moins de contre indications et peu de risques de sur dosage, elle est basée sur l'utilisation des plantes médicinales et leurs substances actives [1].

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments, elles sont considérées comme source de matières premières essentielles pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments [2].

Les plantes contiennent des centaines, voire des milliers de substances chimiques actives. Souvent déterminer en détail l'action d'une plante est très difficile [3]. Les végétaux utilisés pour le développement de nouveaux principes actifs, doivent faire l'objet de travaux scientifiques rigoureux d'investigation qui nécessitent un travail d'équipes pluridisciplinaires (chimistes, biologistes, pharmaciens, etc...) [4].

En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides et acides nucléiques), elles synthétisent également une foule importante d'autres métabolites indirectement essentiels à la vie des plantes, dits « métabolites secondaires ».

Terme proposé par Albrecht Kossel en 1891, pour désigner tous les composés qui sont produits par les plantes et pour lesquels on ne connaissait pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal (croissance, développement, reproduction...). Ces métabolites, sont largement employés par les plantes pour leur défense, leur pollinisation et jouent ainsi un rôle majeur dans l'adaptation des végétaux à leur environnement. L'évaluation de leurs valeurs thérapeutiques ayant fait l'objet de nombreuses recherches et amené à l'identification des principaux éléments actifs des plantes [5].

## Introduction générale

---

La recherche de molécules bioactives à partir des plantes peut s'effectuer selon plusieurs stratégies : une approche ethno-pharmacologique qui consiste à utiliser le savoir des médecines traditionnelles, une approche chimio-taxonomique qui s'intéresse à des taxons connus pour renfermer des métabolites secondaires particuliers, ou encore un criblage systématique des espèces, ou toute combinaison des précédentes [6].

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 6377 espèces de plantes sont utilisées en Afrique, dont plus de 4000 sont des plantes médicinales, ce qui constitue 90% de la médecine traditionnelle en Afrique [7].

L'Algérie est caractérisée par sa diversité florale : Méditerranéenne, Saharienne et une flore Paléo-Tropicale, estimée à plus de trois milles espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Ces espèces sont pour la plus part spontanées avec un nombre non négligeable (15%) d'espèces endémiques [6].

Dans cette étude, il s'agissait pour nous de contribuer à une meilleure connaissance de la plante de la famille des *Asteraceae* (*Galactites tomentosa*) qui pousse dans la région Nord Est de l'Algérie (El-Taref) à l'état sauvage.

Notre travail est présenté comme suit :

Le premier chapitre est essentiellement bibliographique, il est consacré à une présentation générale sur la phytothérapie et les plantes, une description botanique de l'espèce *Galactites tomentosa*, l'extraction solide –liquide et nous donnons quelques généralités sur les souches bactériennes testées.

Le deuxième chapitre est expérimental, il consiste à la réalisation d'un screening phytochimique de la partie aérienne de cette plante, un dosage par spectrophotométrie UV des polyphénols, des sucres et des protéines, l'analyse des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM) et enfin une évaluation de l'activité antibactérienne de cette espèce.

Le troisième chapitre est réservé pour la discussion des résultats obtenus.

# **Chapitre 1: Etude bibliographique**

## **1.1. La phytothérapie et les plantes**

### **1.1.1. Définition de la phytothérapie**

La phytothérapie désigne la médecine fondée sur les extraits des plantes et les principes actifs naturels. Ce mot vient du grec « *phytos* » qui signifie plante et « *therapeuo* » qui signifie soigner. C'est l'une des formes de traitement les plus anciennes qui continue à jouer un rôle important en Afrique et en Asie par l'usage des plantes médicinales[8].

### **1.1.2. Historique**

L'art de guérir par les plantes est connu et pratiqué en Afrique depuis bien longtemps, car il exploite des savoirs transmis oralement de génération en génération à certaines catégories d'individus initiés que sont les tradipraticiens de santé et les herboristes.

Les plantes médicinales et les connaissances relatives aux plantes médicinales et aux médecines traditionnelles sont un patrimoine important du continent africain[9].

En survolant l'histoire à partir des anciennes civilisations, on s'aperçoit que les égyptiens furent parmi les premiers hommes qui ont enregistré sur leurs papyrus, datant du 3ème millénaire leurs connaissances sur les vertus des plantes médicinales, ils citaient le ricin, l'anis, le blé, le lotus, et ils faisaient appel à quelques 400 drogues dont la majorité était d'origine végétale. Les babyloniens eux, nous ont laissé des tablettes d'argiles cuites portant des listes de drogues soigneusement établies, les substances utilisées entre le Tigre et l'Euphrate, étaient presque les mêmes que celles des égyptiens, et les habitants de Babylone utilisaient plus de 64 espèces de plantes médicinales qu'ils cultivaient. En plus des égyptiens et des babyloniens, certains historiens racontent que les mésopotamiens connaissaient environ 250 drogues d'origine végétale, et ces produits ont été intégralement repris par le monde antique, surtout par les grecs et les herboristes du moyen âge.

Plusieurs empires ont basé sur les plantes dans leurs remèdes. Et après la chute des empires romains et Perses, les musulmans héritèrent des connaissances accumulées dans l'extrême orient et dans la Méditerranée, car comme pour les grecs, l'extension de l'islam par les arabes dans un grand espace allant de l'Inde à l'Europe, et c'est durant cette période que beaucoup de livres ont été traduits du grec, du latin et du perse.

Parmi les musulmans qui ont largement opéré ces traductions, qui sont en nombre de 230 manuscrits il faut citer[10]:

- Abou Bakr Mohamed Ibn Zakaria El Razi ( 865-925 ) le livre El Haoui (Les contenances)

- Abu Ali Ibn Sina ( 980-1037 ) livre intitulé El Kanoun fi Tib , traduite partout dans le monde.
- Abdel Razak Ibn Haadouche El Djazairi (1695-1785) à qui on doit un livre intitulé liste des plantes médicinales qui fut traduit durant la période coloniale de l'arabe au français.

### **1.1.3. Les plantes aromatiques et médicinales et formes d'utilisation**

La plante médicinale est une plante utilisée pour ses propriétés thérapeutiques, qui contient une ou des substances susceptibles d'un traitement médical d'une maladie ou à réduire l'incidence de la ou des matières premières utilisées dans la préparation de matériel médical. Leur efficacité relève de leurs composés très nombreux et très variés en fonction des espèces, qui sont autant de principes actifs différents.

La plante aromatique contient suffisamment de molécules aromatiques avec plusieurs organes producteurs comme les feuilles, les fruits, les racines et l'écorce[10].

Dans plusieurs pays en voie de développement, une grande partie de la population fait confiance à des médecins traditionnels et à leurs collections de plantes aromatiques médicinales pour se soigner. Les PAM ont eu une infinie diversité d'emplois, à signaler le domaine thérapeutique, alimentaire, cosmétique, industriel,.....

Les plantes aromatiques et médicinales ont une valeur thérapeutique importante et l'intérêt de ces plantes ne cesse de grandir. Exemple : Foeniculum vulgare est utilisée pour le remède des douleurs abdominales et les graines de cette espèce sont utilisées pour la production d'un médicament pour soigner les troubles digestifs[11,12].

On utilise les plantes aromatiques et médicinales souvent sous forme de:

- **Tisane**

Préparation aqueuse buvable, obtenue à partir d'une ou plusieurs drogues végétales. Les tisanes sont obtenues par macération, infusion ou décoction en utilisant de l'eau[13].

- **Poudre**

Les plantes préparées sous forme de poudre obtenue par pulvérisation, dans un mortier ou dans un moulin, peuvent s'utiliser pour un soin interne ou externe[14].

- **Teinture**

Les teintures présentent essentiellement deux avantages : elles peuvent se conserver pendant trois ans et les principes actifs qu'elles contiennent sont rapidement absorbés par l'organisme. Le principe de la teinture consiste à capter les principes actifs de plante en la faisant macérer dans l'alcool ou un mélange alcool-eau, pendant plusieurs semaines. Il

vaut mieux mettre des plantes sèches à macérer, car certaines plantes fraîches peuvent être toxiques[15].

- **Huile**

On obtient une huile végétale en mettant une poignée d'herbes séchées ou non dans un flacon contenant de l'huile d'olive, amande ou noix. Bien fermer le contenant et laisser pendant 2 ou 3 semaines[14].

On obtient une huile essentielle par distillation à la vapeur, pour cela il faut un ballon, un alambic et un récipient pour recueillir le distillat, cette huile n'est pas grasses, et concentre l'essence de plante, autrement dit son parfum[15].

- **Sirop**

Dissolution de 180 g de sucre dans 100g d'eau à laquelle est incorporé le principe thérapeutique voulu[14].

- **Lotion**

La lotion est définie comme étant un liquide obtenue par infusion ou décoction de plante émolliente ou vulnérable, utilisée sur la partie à soigner par un léger passage à l'aide d'un coton hydrophiles ou linge fin imbibé[14].

- **Pommade (Onguent)**

La pommade est préparée à l'aide d'un mélange de plante choisie, sous forme de poudre ou suc, avec une substance grasse comme la vaseline, huile de coco, huile d'olive, huile d'amande ou même des graisses animales[14].

- **Crème**

Pour la crème, le principe est le même que pour la préparation de l'onguent, puisqu'on utilise la même méthode et les mêmes ingrédients. La seule différence est l'ajout de l'eau[15].

- **Fumigation**

La fumigation est excellente pour soigner les affections des voies respiratoires et la zone ORL. L'herbe est plongée dans l'eau bouillante. Son utilisation nécessite le recouvrement de la tête, épaules et récipient avec une même serviette pour mieux concentrer la vapeur. La vapeur est inspirée puis expirée profondément pendant 15 minutes. En effet, le brûlage des plantes a pour but de purifier l'air d'une pièce[1].

- **Gargarisme**

L'herbe est préparée par infusion ou décoction. Le liquide obtenu est introduit dans la bouche par une petite gorgée sans l'avalier après refroidissement. Ce dernier est recraché après, pour éliminer les toxines et germes[14].

#### **1.1.4.Interaction entre plantes et médicaments**

Lorsque les plantes médicinales et les médicaments (offerts sur ordonnance ou en vente libre) sont utilisés conjointement, ils peuvent interagir à l'intérieur du corps et provoquer des changements dans le mode d'action des plantes et/ou des médicaments. Nous appelons ce genre de changement une interaction plante-médicament. Les interactions plantes-médicaments peuvent avoir un impact sur votre santé et l'efficacité de vos traitements. Par exemple, certaines plantes médicinales pourraient :

- accroître le nombre d'effets secondaires des médicaments et provoquer des toxicités
- réduire l'effet thérapeutique des médicaments et provoquer l'échec du traitement

(Dans le cas des combinaisons antirétrovirales, une telle interaction peut aussi favoriser l'émergence de résistances médicamenteuses et, de ce fait, réduire le nombre d'options thérapeutiques futures.)

- modifier l'action des médicaments et entraîner des complications
- augmenter excessivement l'effet thérapeutique des médicaments (sur-médication)

Les médicaments livrés sur ordonnance et ceux offerts en vente libre peuvent également modifier la façon dont votre corps réagit aux plantes médicinales[8].

#### **1.1.5.Les principes actifs**

C'est une molécule présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'homme ou l'animal. Le principe actif est contenu dans une drogue végétale ou une préparation à base de drogue végétale.

Une drogue végétale en l'état ou sous forme de préparation est considérée comme un principe actif dans sa totalité, que ses composants ayant un effet thérapeutique soient connus ou non [16].

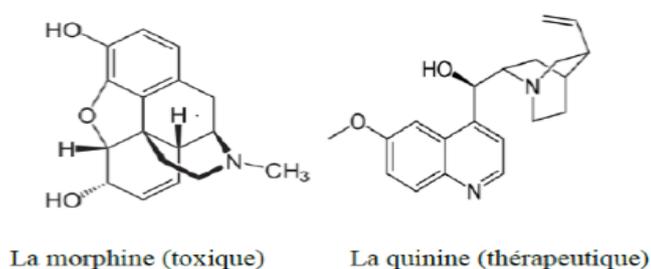
### 1.1.6. Tests phytochimiques

Des tests préliminaires pour identifier le principe actif de la plante, ou bien un ensemble des réactions de caractérisation des différentes classes des composés chimiques [17], les classes chimiques recherchées dans les plantes : les flavonoïdes, les alcaloïdes, saponosides, etc... Par contre, le screening phytochimique, il ne permet pas d'identification ou de déterminer la structure chimique des composés présentes [18].

Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais les principaux sont les polyphénols totaux y compris les flavonoïdes, les anthocyanes, les tannins, les coumarines, les alcaloïdes, les saponosides, les stéroïdes, les stérols, les terpènes... etc [19].

- **Les alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées et basiques, généralement hétérocycliques, d'origine végétale dotées de propriétés physiologiques remarquables (toxiques ou thérapeutiques), telle que :

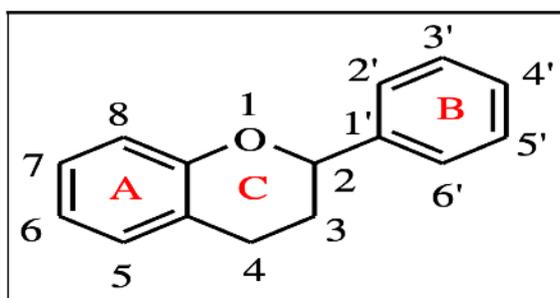


**Figure 1 :** Structure de la molécule Morphine et la Quinine.

- **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes désignent une très large gamme des composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, au bien sont des substances très répandues dans le règne végétal. Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane, formant une structure C6-C3-C6 [20]. Ce sont les composés les plus abondants

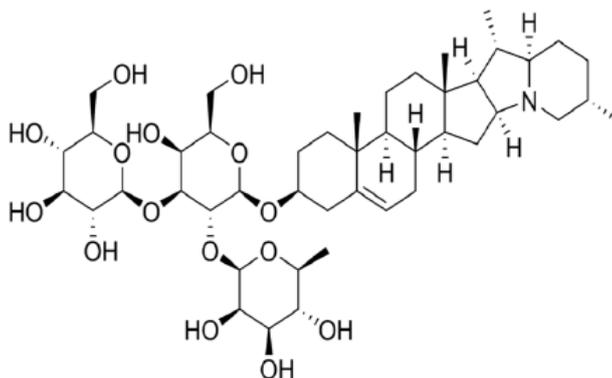
parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes [21]. Les flavonoïdes sont présents dans une grande variété d'aliments (fruits et légumes, céréales, jus de fruits, thé et vin, etc...).



**Figure 2 :** Structure de base des Flavonoïdes.

- **Les saponosides**

Les saponines sont généralement connues comme des composés non-volatils tensio-actifs qui sont principalement distribués dans le règne végétal[22] , structurellement les saponines peuvent être classés en deux groupes selon la nature de la génine, saponine stéroïdique et saponine triterpénique.

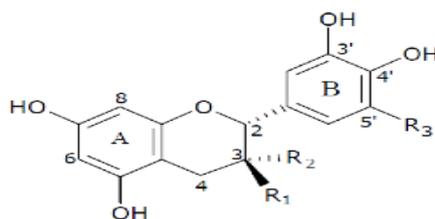


**Figure 3 :** Structure chimique de la Solanine, une saponine rencontrée chez toutes les Solanaceae.

- **Les tanins**

les tanins, ou acides tanniques sont des composés organiques complexes présents dans pratiquement toutes les plantes à des concentrations diverses. Ils sont souvent contenus dans l'écorce ou dans les feuilles, ce qui leur donne un goût piquant désagréable et le rend immangeables pour le bétail. Les tanins peuvent former des complexes

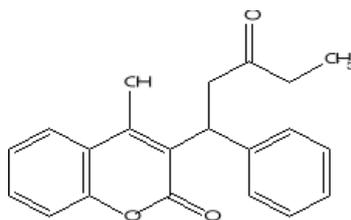
indestructibles avec certains tissus corporels- comme la peau- ce qui permet de les resserrer. En conséquence, ces substances peuvent être utilisées pour tanner le cuir ou encore à des fins thérapeutiques pour traiter la diarrhée ou les irritations cutanées[23,24].



**Figure 4 :** Structure des Tanin.

- **Les coumarines**

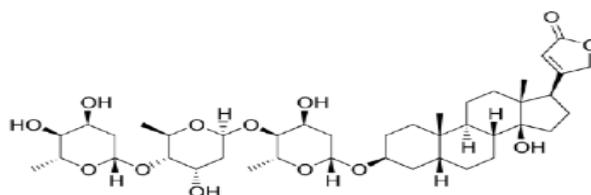
sont des composés phénoliques constitués d'un benzène et des noyaux à-pyrènes[25], les coumarines possèdent des propriétés physiologiques et antimicrobiennes. Les coumarines se trouvent dans nombreuse espèces végétales, et des substances naturelles organiques aromatiques.



**Figure 5 :** Structure de la coumarine Warfarine

- **Les cardénolides**

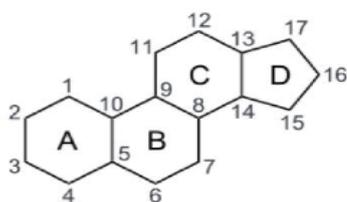
les cardénolides sont des composés chimiques appartenant au groupe des hétérosides cardiotoniques. Cette famille chimique est connue depuis de nombreuses années, notamment grâce aux digitaliques[26] . L'utilisation de ces composées a débuté par la découverte des vertus thérapeutiques des plantes à hétérosides comme la digitale, puis l'étude chimique de ces plantes a permis la présence des cardénolides comme composés actifs.



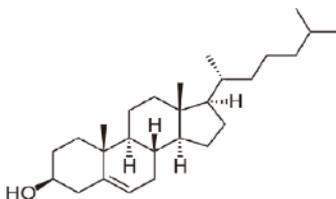
**Figure 6 :** Structure de la Cardénolide Digitoxine.

- **Les stérols**

les stérols sont des lipides neutres possédant une structure rigide, ce sont également des molécules amphiphiles.[27] La structure spatiale d'un stérol et la numérotation du squelette carboné sont présentées en **figure 7**, les stérols sont composés de 4 cycles hydrocarbonés nommés A, B, C et D qui forment une structure plane et rigide de nature apolaire. Les stérols végétaux ont un effet bénéfique sur la santé humaine, ils jouent en effet un rôle hypocholestérolémiant fort à plusieurs niveaux. Ces stérols végétaux sont peu absorbés au niveau des entérocytes, et les stérols qui pénètrent sont rapidement dégradés en sels biliaires dans le foie, ce qui résulte en une très faible concentration de stérols végétaux dans le plasma, le cholestérol est environ 500 à 1000 fois plus concentré[28].



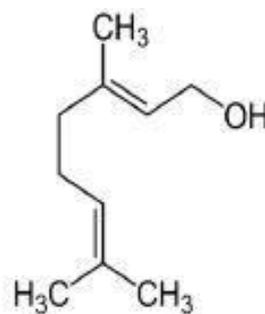
**Figure 7** : Numérotation du squelette carboné des stérols.



**Figure 8** : Structure du Cholestérol.

- **Les huiles essentielles**

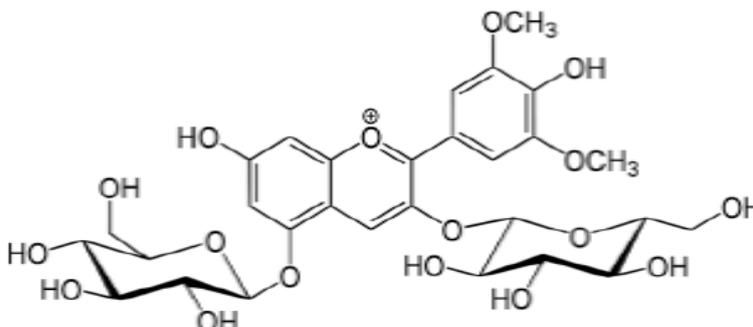
H.E appelées aussi essences, sont des mélanges des substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches, les bois. Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal. Elles sont odorantes et très volatiles, c'est-à-dire qu'elles s'évaporent rapidement dans l'air[29].



**Figure 9** :Structure du Géraniol.

- **Les anthocyanes**

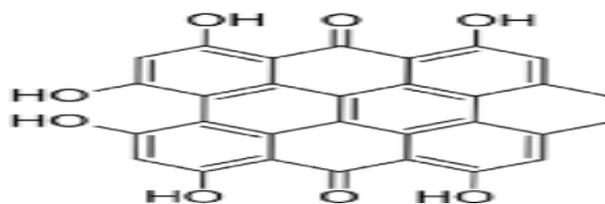
ont une structure de base commune, le cation flavylum ou 2-phényl-1-benzopyrilium. L'aglycone de l'anthocyane est appelé anthocyanidine. Harborne et Williams (2001) ont rapporté 18 structures d'anthocyanidines[30]. Les anthocyanes subissent des transformations structurelles réversibles avec le changement de pH, manifestées par des spectres d'absorption différents. La forme colorée (oxonium) prédomine à pH=1,0 et la forme incolore (hémicétal) à pH=4, 5. La méthode du différentiel de pH est basée sur cette réaction et permet une mesure rapide et précise des anthocyanes totaux[13].



**Figure 10** : Structure : 3,5- diglucoside de malvidine.

- **Les quinones libres**

sont des molécules très réactives, à noyaux aromatique, avec deux substitutions cétoniques[25], les quinones sont des composés qui régénèrent des radicaux libres et par conséquent, se complexant irréversiblement aux acides aminés nucléophiles des protéines[31], les quinones sont ubiquitaires et possèdent généralement des propriétés antimicrobiennes[32], leurs principales cibles dans la cellule microbienne sont les adhésines, les polypeptides et les enzymes membranaires. Aljabre, ont décrit le thymoquinone isolé de l'extrait de *Nigella sativa* comme responsable des propriétés antidermatophytiques de cette plante vis-à-vis de *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* et *Microsporum canis*. L'hypericine, une anthraquinone isolée de *Hypericum perforatum*, possède également des propriétés antifongiques[25].



**Figure 11** : Structure d'Hypericin.

## 1.2. *Galactites tomentosa*

### 1.2.1. Description botanique

*Galactites tomentosa* est très épineuse et d'une hauteur, très variable qui va de 20 à 80 cm, sa tige est très ramifiée en haut, tomenteuse. Les feuilles sont longues, étroites, profondément dentées, presque ailées, épineuses, cotonneuses en dessous et vertes en dessus, mais chargées de taches laiteuses. Les capitules des fleurs de *G.*



tomentosa sont assez grands (3 cm de diamètre environ), avec un involucre formé de nombreuses bractées érigées, terminées par de longues épines, souvent entourées d'un voile arachnéen. Toutes les fleurs sont tubulées. Les extérieures sont grandes et rayonnantes, de couleur pourprée ou violacée (il existe aussi des spécimens à fleurs presque blanches), stériles, profondément découpées en cinq lanières rigides alors que les intérieures sont plus petites. Les fruits sont des akènes bruns et glabres, à peu près cylindriques, portant des aigrettes à soies plumeuses [33].

### 1.2.2. Nomenclature et classification

Appelé aussi le Chardon laiteux, *Galactite cotonneux* ou encore *Galactites*, en arabe « *Rasse Elfarhi* - راس الفرحي », est une espèce de plante herbacée d'origine méditerranéenne de la famille des Asteraceae. Le nom scientifique du genre évoque en grec le lait, allusion à la couleur laiteuse des tiges et surtout aux nervures blanchâtres des feuilles des *Galactites*.

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Genre	Galactites
Espèce	Tomentosus

L'espèce la plus connue est *Galactites tomentosa* Moench découverte pour la première fois en 1794 par le botaniste allemand *Conard Moench*. La plante se classe comme suit[33].

### 1.2.3. Ecologie et habitat

Cette plante est présente beaucoup plus dans l'ouest du bassin méditerranéen ; elle est moins fréquente le long des côtes atlantiques. Elle préfère les terrains sablonneux et secs, avec une légère appréciation des sols acides. La floraison a lieu au mois d'avril à août.

#### **1.2.4.Utilisation de *galactites tomentosa***

*Galactites tomentosa* Moench est très connue dans l'agriculture par sa composition riche en protéines et suc laiteux et pour cela cette plante est la nourriture principale pour les animaux en lactation, elle est aussi très appréciée par les abeilles.

### **1.3. Extraction solide-liquide**

#### **1.3.1.Choix de la méthode d'extraction**

La diversité et la complexité des substances bioactives naturelles rendent le choix des processus d'obtention délicat. La méthode choisie ne doit pas conduire à la discrimination entre les composés polaires et apolaires, ni induire de réactions biochimiques, de dégradations thermiques, d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse, de changement de pH ou entraîner une perte de composés volatils. Pour cela, différents paramètres et propriétés sont à prendre en compte [34].

##### **1.3.1.1)Principaux paramètres d'extraction**

Les principaux paramètres à prendre en compte dans les opérations fondamentales d'extraction de matières premières naturelles aromatiques sont[34]:

- La volatilité ;
- La solubilité ;
- La taille et la forme des molécules constitutives ;

##### **1.3.1.2)Paramètres influençant l'extraction**

###### **a.Matière Végétale**

- Choix des plantes : Seules les plantes saines de l'espèce recherchée doivent être récoltées.
- Mode de cueillette : On peut cueillir les fleurs, feuilles, bourgeons et petites baies en les arrachant simplement de la plante à la main. Puis on récolte les tiges, les racines et écorces de préférence avec un petit couteau ou un sécateur. Cette méthode est plus écologique et permet d'obtenir des huiles essentielles de meilleure qualité.
- Provenance (région d'origine) : Le sol dans lequel pousse la plante et le climat qui règne dans une région donnée déterminent et différencient en grande partie la qualité de l'essence que produit cette région par rapport à l'essence de la même plante provenant d'une autre région.
- Stade végétatif : La récolte doit avoir lieu pendant le stade végétatif quand la plante est plus riche en essence. Ce moment varie d'une plante à une autre.

- Période de la journée : La qualité de l'essence d'une plante varie en fonction de la période de la journée où elle est récoltée. C'est dès l'aube, lorsque la rosée s'évapore, que la concentration des huiles essentielles est la plus élevée dans les plantes, car les gouttelettes de rosée empêchent encore l'évaporation des huiles. A défaut, on peut récolter en fin d'après-midi ou en début de soirée, au moment où les plantes exhalent le moins leur parfum.
- Partie de la plante distillée : Les diverses parties d'une même plante (fleur, feuille, tige, écorce, racine, etc.) peuvent produire des essences différentes [34].

### **b.Nature et état du solide et du soluté**

La nature et l'état physique du soluté ont une importance primordiale et déterminent le mécanisme de transfert de matière. Le soluté contenu dans ces corps est soit un solide, soit un liquide, stable ou non à la chaleur ou à l'atmosphère. Il est réparti uniformément en des teneurs variables dans le solide.

Si le soluté est dispersé uniformément dans le solide, les parties superficielles sont dissoutes en laissant derrière elles un solide poreux. Le solvant doit ensuite pénétrer cette couche extérieure avant d'atteindre le soluté situé en profondeur. Le chemin du solvant est rendu de plus en plus difficile, traduisant ainsi une diminution de la vitesse superficielle.

Lorsque la teneur en soluté est importante dans le solide, la structure poreuse peut être détruite par broyage. La dissolution ultérieure du soluté devient plus facile. Dans les matières végétales, le soluté est généralement occlus dans des cellules d'où il est extrait par un mécanisme de dialyse ou de diffusion capillaire à travers des parois cellulaires. L'ordre de grandeur expérimentale de la diffusivité d'une huile est de  $10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s dans le solvant libre et de  $10^{-14}$  m<sup>2</sup>/s dans le tissu cellulaire intact[34].

### **c.Nature, concentration et volume du solvant**

Le choix du ou des solvants est très important. Il doit être d'une grande pureté et avoir un faible point d'ébullition pour pouvoir être éliminé facilement en limitant la perte de composés volatils. Il ne doit pas interférer avec la méthode d'analyse utilisée. Il doit pouvoir extraire les composés polaires et apolaires ou bien être sélectif. Le choix est fonction de la matrice et des composés à étudier. Il faut tenir compte de la polarité des composés, de leurs températures d'ébullition et de la miscibilité avec les autres solvants[34].

### **Méthode, durée, Température et pression.**

La réduction de la pression de marche provoque un abaissement des températures d'ébullition et de condensation. Inversement, toute augmentation de pression entraîne une élévation de ces températures.

L'élévation de la température permet l'accroissement de la solubilité et de la diffusivité du soluté et la diminution de la viscosité. Elle doit être limitée pour éviter les risques d'extraction des composés nuisibles et la dégradation thermique du soluté.

La durée de l'extraction (longue ou prolongée) permet de recueillir l'ensemble des fractions «de tête» et «de queue» dans le cas de la distillation. Elle dépend du procédé d'extraction utilisé et de l'objectif de l'extraction[34].

#### **1.3.1.3) les solvants organiques**

##### **Classification des solvants selon leur composition**

Les solvants inorganiques: Ce sont des solvants ne contenant pas de carbone. L'eau, les solutions aqueuses contenant des additives (tensioactifs, solution tampon...) et l'acide sulfurique concentré sont les solvants inorganiques les plus connus.

Les solvants organiques : Ce sont des solvants contenant du carbone.

Ils sont classés en trois familles :

- Les solvants hydrocarbures :
  - Les hydrocarbures aliphatiques : alcanes, alcènes
  - Les hydrocarbures aromatiques : benzène, toluène, xylène.
- Les solvants oxygénés :
  - Les alcools : éthanol, méthanol
  - Les cétones : acétone
  - Les acides : acide acétique
  - Les esters : acétate d'éthyle
  - Les éthers : éther... mais aussi les éthers de glycol
  - Les autres solvants oxygénés : DMF, DMSO et HMPT.
- Les solvants halogénés: Les hydrocarbures halogénés (fluorés, chlorés, bromés ou iodés): perchloroéthylène, trichloréthylène, dichlorométhane Chloroforme, tétrachlorométhane (nocifs pour la couche d'ozone).

## Quel solvant choisir ?

Les solvants polaires sont capables d'interagir avec les solides ioniques et les solides polaires afin de favoriser leur dissolution tandis que les solvants apolaires sont plus efficaces pour dissoudre les solides moléculaires apolaires.

### 1.3.2. Techniques d'extraction des substances naturelles

Les substances naturelles sont obtenues de diverses manières. Le choix de la technique dépend de la localisation histologique de l'huile dans le végétal et de son utilisation.

#### 1.3.2.1) Méthodes traditionnelles d'extraction des substances bioactives

Ces techniques d'extraction reposent toutes sur le même principe, basé sur l'entraînement des molécules volatiles de la plante par la vapeur d'eau. Le degré de contact entre la plante et l'eau est le seul paramètre qui diffère.

#### Hydrodistillation

Dans le cas de l'hydrodistillateur (**figure 12**), la plante se trouve dans un réacteur où elle est en contact direct avec l'eau bouillante. Selon la densité ou la quantité de la plante utilisée, elle peut flotter ou être complètement immergée dans l'eau. Elle est généralement conduite à pression atmosphérique. Le chauffage permet l'éclatement et la libération des molécules volatiles contenues dans la matière végétale. La vitesse de vaporisation des composés volatiles des Plantes Aromatiques Médicinales par l'hydrodistillation est connue par la variation de leur concentration en fonction de la résistance à la diffusion de l'HE dans les tissus cellulaires et également selon la solubilité des molécules volatiles dans l'eau[35].

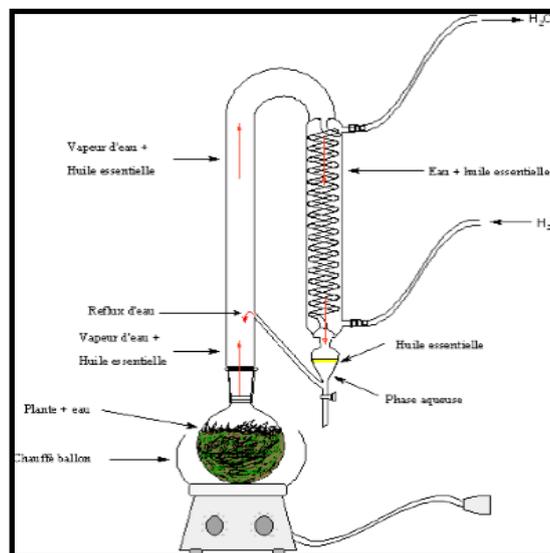
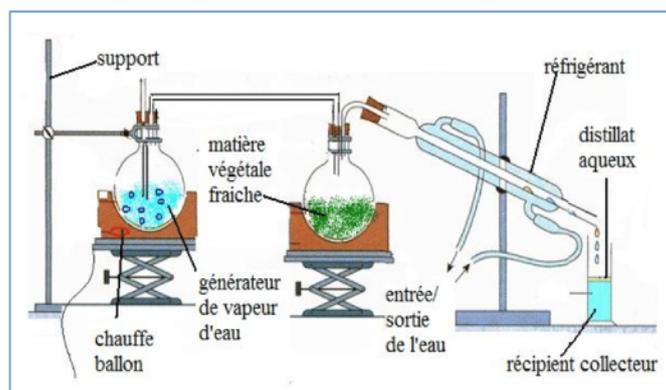


Figure 12: Hydrodistillateur.

## Entraînement à la vapeur

C'est le moyen le plus répandu pour extraire les molécules volatiles des Plantes Aromatiques Médicinales. Le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau, mais la vapeur d'eau produite par une chaudière est injectée et traverse la matière végétale de bas en haut, éclate les cellules et entraîne les molécules volatiles.



**Figure 13:** Entraînement à la vapeur.

Entraînement à la vapeur d'eau ascendante (**figure 13**), en traversant un tube réfrigérant, la vapeur d'eau saturée en composés volatils se condense en un mélange hétérogène composé d'HE et d'hydrolat. On peut également récupérer la phase aqueuse, comportant une faible proportion de composés aromatiques, qui porte alors le nom d'eau florale [35,36].

## Expression à froid

C'est une technique "physique" simple où les écorces des agrumes (citron, orange,...) sont pressées à froid (**figure 14**) pour extraire leurs huiles essentielles en utilisant des rouleaux ou des éponges. Aucune source de chaleur n'est utilisée, laissant ainsi à l'huile une odeur très proche de l'original. Le principe de cette méthode consiste à faire éclater par différents procédés mécaniques (compression, perforation) les poches qui sont situées à la superficie de l'écorce de ces fruits renfermant l'HE. L'huile libérée est ensuite recueillie par un courant d'eau [35].



**Figure 14:** Expression à froid.

### 1.3.2.2)Extraction par solvant organique sur appareillage Soxhlet.

La colonne de distillation génère des vapeurs de solvant qui sont condensées; ce solvant pur et chaud alimente la cartouche contenant le solide inerte et le soluté.

Lorsque la cartouche est pleine, la solution obtenue (solvant et soluté) se vide automatiquement par siphonage (lixiviation) puis retourne dans le bouilleur où le solvant est de nouveau porté à l'ébullition. La lixiviation peut également être opérée par passage continu du solvant ou par vidanges manuelles successives.

Le solvant peut être également alimenté en une seule « passe » pour l'infusion puis l'extrait obtenu est soutiré manuellement. Le choix du solvant est influencé par des paramètres techniques et économiques : sélectivité, stabilité, inertie chimique et température d'ébullition pas trop élevée pour permettre son élimination totale[35].

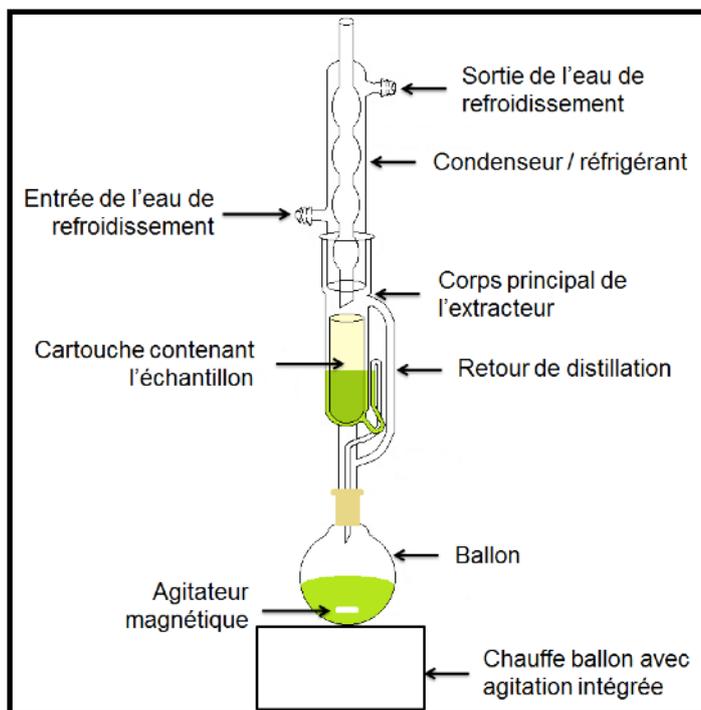


Figure 15: Appareillage Soxhlet.

### 1.3.2.3)Méthodes innovantes d'extraction des substances bioactives

#### Hydrodistillation assistée par ultrasons.

Il s'agit dans ce cas précis d'un traitement de la plante «pré» ou «post» opératoire. En effet, la structure des parois des plantes et les tissus cellulaires se désorganisent, sous l'effet des ondes ultrasonores et les micros cavitations générées par les ultrasons [37]. Ainsi, ces changements favorisent la diffusion de l'eau dans les tissus cellulaires, ce qui peut également influencer sur la cinétique d'extraction des molécules aromatiques des HEs. Les principaux avantages de ce procédé sont l'accélération de la cinétique d'extraction et l'amélioration du rendement[35].

### Extraction assistée par micro-ondes.

C'est une technique récente développée dans le but d'extraire des produits naturels comparables aux huiles essentielles et aux extraits aromatiques. Dans cette méthode, la plante est chauffée par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle : les molécules volatiles sont entraînées dans le mélange azéotrope formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée [38]. Ce chauffage, en vaporisant l'eau contenue dans les glandes oléifères, crée à l'intérieur de ces dernières une pression qui brise les parois végétales et libère ainsi le contenu en huile.

Les auteurs de ce procédé lui attribuent certains avantages tels que le temps d'extraction (dix à trente fois plus rapide), l'économie d'énergie et une dégradation thermique réduite[35].

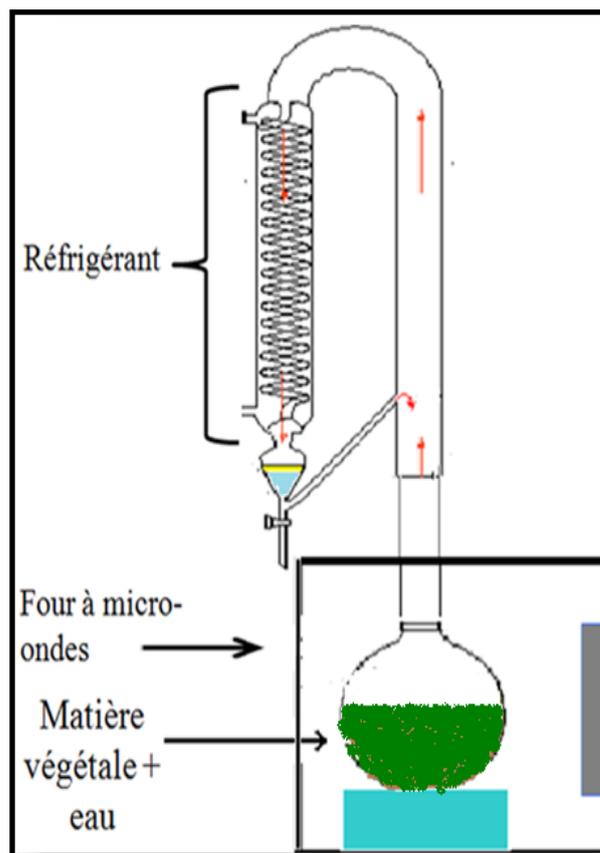


Figure 16: Extraction par micro-ondes.

### 1.4. Généralités sur les souches bactériennes utilisées

Depuis l'antiquité, les extraits aromatiques de plantes ont été utilisés dans différentes formulations, comme les médicaments et la parfumerie. Les huiles essentielles ont été considéré comme agents antimicrobiens les plus efficaces dans ces plantes.

Les qualités microbiologiques des plantes aromatiques et médicinales sont connues. Toutefois, la première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix. Depuis, de nombreuses extraits végétaux ont été définis comme antibactériens.[39].

### **1.4.1. *Serratia odorifera***

*Serratia* est un genre de bactérie à coloration gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*.

Cette bactérie est rarement pathogène, mais elle est fréquemment présente dans l'environnement hospitalier et certaines souches sont responsables d'infections nosocomiales (infections urinaires, suppurations diverses, septicémies...).

### **1.4.2. *Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* est le principal représentant du genre *Klebsiella*. Ce sont de gros bacilles à Gram négatif, en forme de bâtonnet court de 1 à 2µm sur 0,3, ils sont polymorphes, parfois cocciformes, immobiles, entourés d'une capsule et appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* [40].

Les *Klebsiella* sont très répandues dans la nature. On les retrouve dans l'eau, le sol, la poussière. Ce sont aussi des bactéries commensales du tube digestif de l'homme et des animaux [41].

*Klebsiella pneumoniae* est responsable d'infections opportunistes chez des malades hospitalisés [41] :

- Infections broncho-pulmonaires en réanimation qui évoluent parfois sur un mode épidémique.
- Infections urinaires souvent consécutives à des manœuvres instrumentales.
- Infections généralisées (septicémies ou bactériémies), qui peuvent être responsables d'un choc endotoxinique. Le taux de mortalité est alors élevé.
- Infections méningées post-traumatiques ou post-chirurgicales.

### **1.4.3. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* est un *cocci* (coque) à Gram positif qui se trouve sous forme d'amas. C'est un germe ubiquitaire très résistant, il se trouve dans l'environnement ; dans l'air, l'eau, le sol et dans les aliments ; chez l'homme et les animaux : la peau et les muqueuses (nasale, périnée, oropharynx). En outre, il y a 25% de porteurs sains permanents chez l'homme et 25% de porteurs occasionnels. Il se transmet de trois façons [42] :

- Par manuportage,
- Transmission indirecte : matériels hospitaliers, stéthoscopes,
- Par l'alimentation.

*Staphylococcus aureus* peut provoquer [42] :

- Des lésions suppuratives et nécrotiques: peau et muqueuse (furoncle), os (ostéomyélite), arthrites, tissus.
- Des septicémies et des endocardites.
- Des pneumopathies secondaires ou nosocomiales.
- Des intoxications alimentaires dues aux entérotoxines.
- Le syndrome toxique (toxic shock syndrome)

#### ***1.4.4. Streptococcus pneumoniae***

Le genre *Streptococcus* regroupe de nombreuses espèces cocci à Gram positif en diplocoque et chaînette et qui sont aéro-anaérobies avec des métabolismes fermentatifs. Les bactéries du genre *Streptococcus* se trouvent dans plusieurs habitats : muqueuse respiratoire, intestins et peau. Ce sont des hôtes normaux ou pathologiques de l'homme et des animaux [42].

## **Chapitre 2: Matériel et méthodes**

## 2.1. Matériel végétal

### 2.1.1. Origine géographique et période de récolte de la plante

#### - zone d'étude :

Notre travail de recherche a été réalisé au sein du laboratoire de chimie au niveau de la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université Chadli Bendjedid .El-tarf

#### - Matériel végétal et site de récolte :

L'espèce sélectionnée *Galactites Tomentosa Moench* (figure 17) a été récoltée au mois de février 2020 avant floraison dans la région de Rmal souk à environ 30 Km à l'est de la wilaya de El-tarf qui fait parti du parc national d'Elkala (Algérie) (figure 18).



Figure 17: *Galactites tomentosa*.

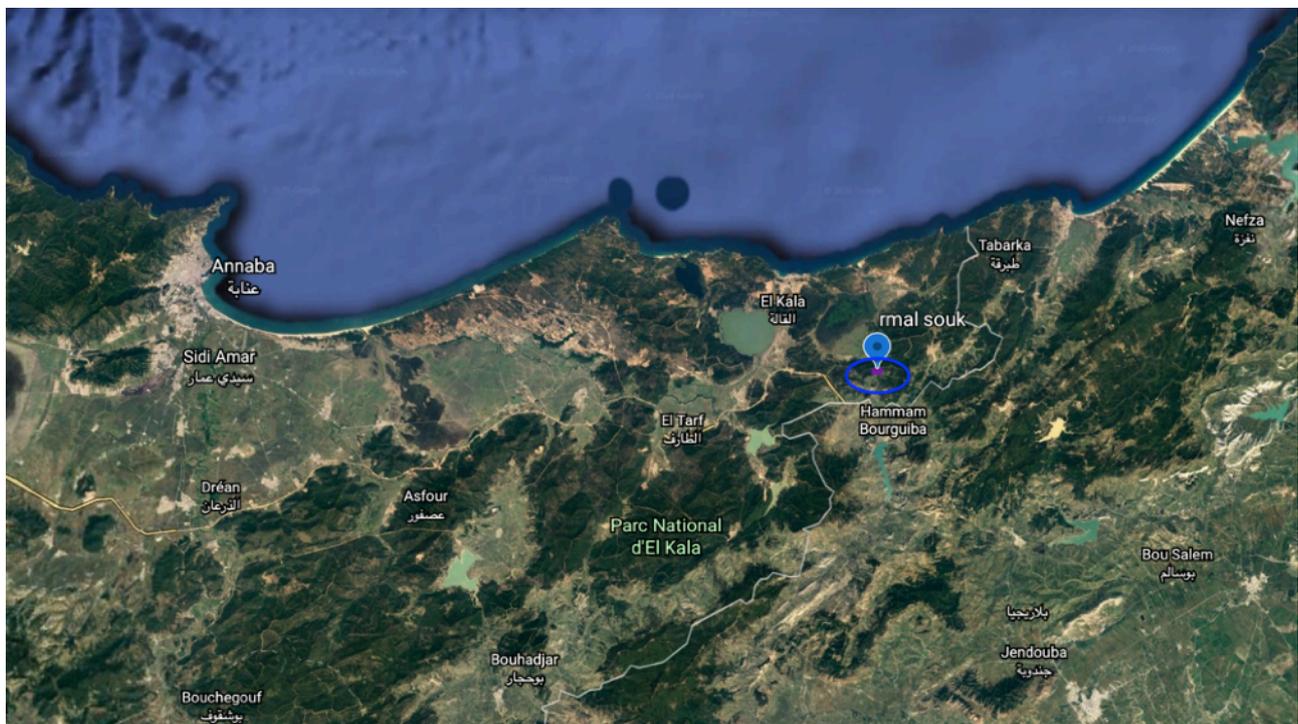


Figure 18 : Localisation géographique du site de prélèvement (Google Earth, 2020).

### **2.1.2. Identification botanique**

L'espèce a été identifiée par l'inspecteur des forêts, ***BERREDJEM Ahcène*** chef de conservation (PNEK) W. El-Tarf.

### **2.1.3. Préparation des échantillons**

**séchage** : Il y a deux méthodes pour le séchage des plantes médicinales :

***a-Méthode naturelle*** : l'exposition de la partie étudiée de la plante au soleil, dans un endroit où il y a un local aéré, ombrage et d'autres conditions favorables.

***b-Méthode artificielle*** : le séchage se fait directement par l'étuve.

La plante ***Galactites Tomentosa Moench*** est saturée de l'eau, le séchage naturel prend beaucoup de temps donc on le remplace par le séchage artificiel.

Après la récolte de la plante et le nettoyage, on la met dans l'étuve pendant 48h à 50 °C.



**Figure 19:** Séchage de la plante par l'étuve.

#### **conservation :**

Après le séchage, la meilleure façon de conserver les plantes séchées est de les placer dans un enveloppe, les ranger à l'abri de la lumière et de l'humidité. Dans ces conditions de conservation, les plantes peuvent garder toutes leurs propriétés jusqu'à la date d'extraction ou d'autres tests.

## 2.2. Matériel utilisé:

### 2.2.1. Matériel de laboratoire

Le reste d'équipements, les photos, les réactifs et les conditions expérimentales de nos expériences sont indiqués dans l'annexe.

**Tableau 1 :** Équipements utilisés dans le laboratoire.

Matériel	Utilisation
Broyeur électrique	Pour obtenir une poudre
Balance électrique	Pour peser des échantillons du poudre
Bain marie	Pour évaporer les solutions et accélérer les réactions chimiques
Spectrophotomètre	Lecture des D.O
Agitateur électrique	Pour mélanger nos solution
Filtre à papier	Pour filtrer nos infusés
Rota vapeur	Pour la séparation solvant extrait
Appareil de soxhlet (marque Gernardt)	Pour l'extraction de la matière grasse

**Tableau 2 :** Réactifs utilisés dans le laboratoire.

Réactifs	Utilités
Hydroxyde d'ammoniac ( $\text{NH}_4\text{OH}$ )	Test des éléments chimiques.
Reactif de Mayer	Test des éléments chimiques.
Éther de pétrole	Test des éléments chimiques.
Alcool 20 et 80%	Test des éléments chimiques.
Réactif de Bradford	Test des éléments chimiques.
Bovin Sérum Albumine (BSA)	Calibrage du spectromètre.
Réactif d'anthrone	Test des éléments chimiques.

**Tableau 3:** Solvants utilisés.

Solvant	Formule chimique	T d'ébullition (°C)	Masse Volumique (g.ml <sup>-1</sup> )	Polarité
Hexane	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	69	0,655	Moins polaire  Plus polaire
toluène	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	110,58	0,867	
Diéthyle éther	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	34,6	0,713	
chloroforme	CHCl <sub>3</sub>	62	1,4798	
Acétate d'éthyle	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	77,1	0,924	
Méthanol	CH <sub>3</sub> -OH	65	0,791	

## 2.3. Screening phytochimique

### 2.3.1. Les alcaloïdes

En suivant le protocole suivant[11]:

- On mélange 1g de la poudre de la plante séchée et broyée avec 10ml d'HCl à 5% dans un récipient.
- Après une demi-heure de macération. On filtre le mélange et on additionne au filtrat quelques gouttes de réactif de Mayer.
- l'apparition d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes.

### 2.3.2. Les saponosides (test de mousse)

En suivant le protocole suivant[43]:

- On met 1g de la poudre sèche dans une fiole dans laquelle 10ml d'eau distillée sont ajoutés
- On met dans un bain marie pendant 5mn.
- Après filtration du mélange, on ajoute 2,5ml du filtrat à 10ml d'eau distillée dans un tube à essai.
- Le tube est secoué vigoureusement pendant 30s puis on laisse reposer une demi-heure.
- Une mousse alvéolaire révèle la présence des saponines

### **2.3.3.Les flavonoïdes**

En suivant le protocole suivant [11]:

- On macère 10g de la poudre dans 150ml d'HCl à 1% pendant 24h.
- Après avoir filtré le mélange, on procède au test suivant :
- On prend 10ml du filtrat, on le rend basique par l'ajout du  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,
- Après trois heures, l'apparition d'une couleur jaune clair dans la partie supérieure du tube à essai indique la présence des flavonoïdes

### **2.3.4.Les tannins**

En suivant le protocole suivant[43]:

- on place 10g de poudre sèche dans 100ml de NaOH à 80%.
- Après 15mn d'agitation, les extraits sont filtrés et mis dans des tubes.
- L'ajout de gouttes d'une solution de  $\text{FeCl}_3$  à 1% permet de détecter la présence ou non des tannins.
- La couleur bleu ou vert indique la présence des tannins.

### **2.3.5.Les huiles volatiles**

En suivant le protocole suivant [43]:

- On macère 10g de la poudre dans 40ml d'eau distillée avec agitation constante 30mn,
- Après filtration de l'extrait. 2ml du filtrat sont secoués avec 0,1ml de NaOH dilué et une petite quantité de HCl dilué
- Un précipité blanc est formé avec les huiles volatiles.

### **2.3.6.Quinones libres**

En suivant le protocole suivant:

- On place 1g de la poudre broyée dans un tube avec 15 à 30ml d'éther de pétrole.
- Après agitation et un repos de 24h, l'extrait est filtré puis concentré au rotavapeur,
- la présence des quinones est confirmée par l'ajout de quelques gouttes de NaOH 1/10 lorsque la phase aqueuse vire au jaune rouge ou violet.

## **2.4. Les dosages par spectrophotomètre**

Tous les dosages sont faits par le spectrophotomètre « jenway 3600spectrophotometer »

### **2.4.1. Dosage des sucres**

On prend 100mg de poudre de la plante avec 3ml d'éthanol à 80%. On laisse le tout à une température ambiante pendant 48h, ensuite l'éthanol est évaporé à l'aide d'un bain marie à 100°C, puis on ajoute 20ml d'eau distillée au résidu sec. Dans un tube à essai contenant 2ml de l'extrait obtenu on met 4ml de réactif d'anthrone ensuite il est placé au bain marie à 62°C

pendant 8min (la solution vire alors légèrement au bleu vert) après refroidissement dans un bain de glace, le tube est mis au repos à l'obscurité pendant 30min, la lecture est faite au spectrophotomètre à 585 nm[12].

La quantification se fait d'après l'équation de la courbe d'étalonnage suivante :  $Y=ax+b$  ( $\mu\text{g/g}$  de MS). Qui fait du glucose un standard et les teneurs en sucres solubles sont exprimées finalement en g/100g MS[44].

### **2.4.2. Dosage des Protéines**

On prend 1g de poudre de la plante à la quelle on ajoute 5ml d'eau distillée ; pour le dosage, 200 $\mu\text{l}$  de l'extrait est ajouté à 2ml de réactif de Bradford, le tube est agité et laissé reposer pendant 5min jusqu'à stabilisation de la coloration.

La lecture se fait par spectrophotométrie à 595nm après étalonnage de l'appareil par une solution témoin contenant 200 $\mu\text{l}$  de BSA (Bovin Sérum Albumine) et 2ml de réactif de Bradford. Les résultats sont exprimés en g de protéines par 100g de produit sec [45].

### **2.4.3. Dosage des pigments chlorophylliens(Arnon etMc Kinney)**

Mettre successivement dans un mortier:

- 100mg rondelles de feuilles (découper à l'emporte pièce).
- une pointe de spatule de sable et une pointe de spatule de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ )
- 5 ml d'acétone à 80%.
- Broyer avec un pilon, 1ml de filtrat est ajouté à 9ml d'acétone 80% (dilution de 1/10) et mesurer la DO.

Arnon et Mc Kinney ont établi des systèmes d'équations qui permettent de calculer les concentrations en chlorophylles et en caroténoïdes à partir des mesures d'absorbance à 663 , 645 et 460 nm d'un extrait acétonique à 80%.

$$\text{chl a} = (0,0127 \times \text{DO663}) - (0,00269 \times \text{DO645}) \text{ (mg/ml)}$$

$$\text{chl b} = (0,0229 \times \text{DO645}) - (0,00468 \times \text{DO663}) \text{ (mg/ml)}$$

Les concentrations en chlorophylle (a et b) exprimées en  $\mu\text{g/g}$  MF sont déterminées selon les formules suivantes :

$$\text{Chl a (mg/l)} = 12,7 \times \text{DO663} - 2,59 \times \text{DO645} \text{ En (mg/ml)}$$

$$\text{Chl b (mg/l)} = 22,9 \times \text{DO645} - 4,68 \times \text{DO663} \text{ (mg/ml)}$$

$$\text{CH a (mg/gMF)} = \text{chl a} \times d \times V / (W) .$$

$$\text{CH b (mg/gMF)} = \text{chl b} \times d \times V / (W) .$$

$$\text{CH t} = \text{CH a} + \text{CH b}$$

D : dilution

V : volume de la solution extraite en mL

W : masse de la matière fraîche de l'échantillon en g

#### **2.4.4. Dosage des polyphénols**

*(Détermination de la teneur en polyphénols totaux):*

On introduit 3 g de poudre de la plante dans un mortier, avec 150 ml de mélange méthanol-eau (60/40), après une macération de 24h le mélange obtenu est filtré par un papier filtre Whatman, la phase aqueuse récupérée est concentrée au Rota vapeur à 45°C. On obtient ainsi un extrait visqueux qui est récupéré dans 3ml de méthanol.

La teneur en polyphénols totaux de la plante *Galactites tomentosa* est déterminée selon la méthode de Folin Ciocalteu[46].

Dans un tube en verre, on introduit 0.5ml de l'extrait obtenu et 0.5 ml de réactif de Folin Ciocalteu, on mélange correctement pendant 5mn, on ajoute 5 ml de solution aqueuse de carbonate de sodium à 7% et 12.5ml d'eau distillée, Le mélange est agité au vortex et conservé à température ambiante à l'abri de la lumière pendant une heure, on mesure l'absorbance à 750 nm. Le blanc est représenté par l'eau distillée. La concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard.

## **2.5. Extraction solide-liquide**

### **2.5.1. Extraction par Soxhlet**

- On met 20 g de la matière sèche dans la cartouche de soxhlet.
- On place dans un extracteur soxhlet, (marque Gerhardt bonn App Nr.451260) la cartouche.
- Notre extraction va dérouler selon 3 étapes avec 3 solvants de différentes polarités:  
(Diethyle éther/ chloroforme / acétate d'éthyle):
  - on verse dans un ballon rond à col rodé 250 ml de diethyle éther
  - Conduire le chauffage T°: 60°-70°C de façon d'obtenir 8 distillations
  - Après 5 heures d'extraction, on évapore le diethyle éther à l'aide d'une rotavapeur (heidolph type laborota 4000) pour éliminer le solvant.
  - On garde la cartouche avec la matière végétale pour le 2ème solvant.
  - Pour une nouvelle cartouche, on refait l'extraction en utilisant l'hexane.

### **2.5.2. Extraction des polyphénols par macération à froid**

Il s'agit d'une extraction solide-liquide. Le solvant utilisé dans cette présente étude est le méthanol pur (99%) [14,38]. Celui-ci possède l'avantage d'être éliminé facilement sous vide. Il donne en plus un meilleur rendement d'extraction dépassant celui de l'eau [17,47]. Le rendement d'extraction en polyphénols augmente aussi avec le temps de contact.

On introduit 3 g de poudre de la plante dans un mortier, avec 150 ml de mélange méthanol pure, après une macération de 48h environ le mélange obtenu est filtré par un papier filtre Whatman, la phase aqueuse récupérée est concentrée au Rota vapeur à 45C°. On obtient ainsi un extrait visqueux qui est récupéré dans 3ml de méthanol.

## **2.6. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince**

La chromatographie sur couche mince est une méthode de séparation des composés qui permet d'analyser la complexité d'un mélange. Cette technique a été utilisée pour visualiser la séparation des molécules des deux extraits [48].

### **Principe :**

La chromatographie sur couche mince repose sur les phénomènes d'adsorption, d'interactions et de polarité. Un mélange de composés est placé sur un support solide (phase stationnaire) plongé dans un solvant (phase mobile) qui se déplace par capillarité le long de la phase stationnaire. La phase mobile va entraîner les composés qui migrent à une hauteur variant en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile. On peut ainsi caractériser les composés selon leur Rf [48].

## **Mode opératoire**

### **A. Préparation de la phase mobile :**

La cuve de migration est partiellement remplie du mélange de solvant (phase mobile) afin qu'elle soit saturée en vapeur d'éluant ce qui facilite et améliore la migration. La phase mobile est constituée d'un mélange de solvants. Différents systèmes solvants ont été essayés pour définir celui qui donne une meilleure séparation.

L'analyse des 5 extraits du *G.tomentosa* a été réalisée par deux systèmes de séparation:

Éluant 1: (Hexane/acétate d'éthyle )(70%/30%)(v/v),

Éluant 2: (toluène/acétate d'éthyle) (70%/30%)(v/v).

### **B. la phase stationnaire :**

La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur des plaques pré-étalées de gel de silice sur des plaques en aluminium.

### **C. Le dépôt des échantillons :**

Les plaques sont découpées aux dimensions voulues. Les deux extraits ont été dissous dans le solvant qu'on a utilisé pour l'extraction. Le dépôt de quelques gouttes de chaque extrait se fait avec une micro-seringue d'une façon perpendiculaire et linéaire, à 1,5cm du bord inférieur de la plaque, et à 1,3cm à partir des bords latéraux, avec 1cm d'espacement.

### **D. Développement des plaques :**

Chaque plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs du système solvant approprié, l'échantillon à étudier sera plus ou moins entraîné par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque (chromatographie ascendante).

### **E. Révélation du chromatogramme :**

Les plaques sont bien séchées, si les constituants sont colorés, ils seront directement visibles sur la plaque, sinon la révélation peut se faire sous UV.

On détermine alors, pour chaque constituant, le Rapport frontal  $R_f$  :

$$R_f = \frac{\text{distance entre l'origine (depot) et le centre de la tache du produit}}{\text{distance entre l'origine (depot) et le front du solvant}}$$



**Figure 20:** Chromatographie sur couche mince.

## 2.7. Activité antibactérienne

Les tests antibactériens ont été réalisés sur des souches provenant du laboratoire des analyses médicales ARRARI . Elles étaient conservées sur gélose inclinée ; nous avons procédé à des repiquages sur bouillon nutritif en tubes. Voici la liste des bactéries utilisées :

Bactéries Gram+ :

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pneumoniae*

Bactéries Gram- :

- *Klebsiella pneumoniae*
- *Serratia odorifera*

### 2.7.1. La concentration minimale inhibitrice (CMI)

Elle permet de déterminer la plus petite concentration (exprimée en microgrammes/ml) capable d'inhiber la croissance de la bactérie considérée (concentration minimale inhibitrice ou CMI).

Fondée sur des gradients de concentration, c'est la méthode manuelle la plus couramment

utilisée. Elle est fondée sur le fait qu'un disque imprégné d'antibiotique dans des dilutions décroissantes (p  $\frac{1}{2}, \frac{1}{4}, \frac{1}{8} \dots 1/64$  ) et «déposé» sur une gélose (MH) préalablement inoculée par la suspension bactérienne à tester, va diffuser suivant un gradient de concentration, et que la bactérie ne se développera pas au pourtours des disques contiennent des concentrations égales ou supérieures à la concentration minimale inhibitrice.

Le procédé emploie des disques de 6 mm de diamètre dont le papier a été imprégné de l'extrait à concentration connue.

**Mode opératoire :**

• Préparation de l'inoculum :

Cultiver les quatre souches bactériennes séparément dans des boites de pétri contenant un milieu de TSA (milieu gélosé de peptone de caséine et de soja) à une température comprise entre 30-37°C pendant une durée d'incubation appropriée pour chaque souche. Transférer avec une anse de platine des colonies bien isolées dans des tubes stériles contenant un bouillon non sélectif

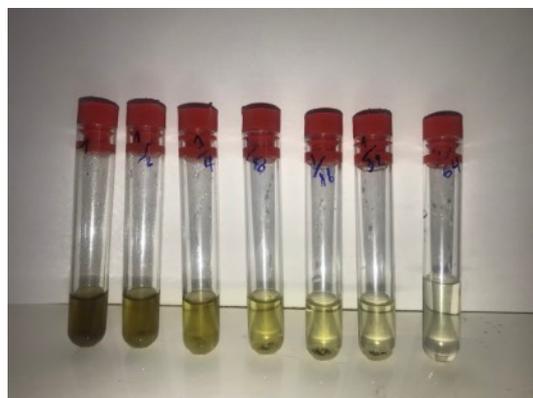
• Préparation du milieu de culture :

Le milieu de culture est constitué d'une couche de gélose Mueller Hinton :

Couler une couche de 2mm d'épaisseur (15 à 20ml) répartie uniformément dans des boites de pétri et laisser solidifier.

• Préparation des dilutions :

L'extrait méthanolique est préparé à différentes concentrations, on a une solution mère de 6mg/ml à partir de laquelle on fait des dilutions :  $1/2$  ;  $1/4$  ;  $1/8$  jusqu'à  $1/64$  qui sont dissoutes dans le DMSO.



**Figure 21:** Préparation des disques avec différentes dilutions.

- Préparation des disques :

Des disques de 6mm de diamètre ont été découpés sur du papier buvard.

Dans chaque tube des dilutions on ajoute 5 disques, on va avoir des disques qui sont chargés par les concentrations préparées précédemment.

- Test antimicrobien

Le test de susceptibilité a été effectué selon la méthode de diffusion des disques[49,50,51].

À l'aide d'un écouvillon qu'on imbibe dans notre suspension microbienne déjà préparée et on fait un ensemencement vertical, horizontal et au pourtour de la gélose.

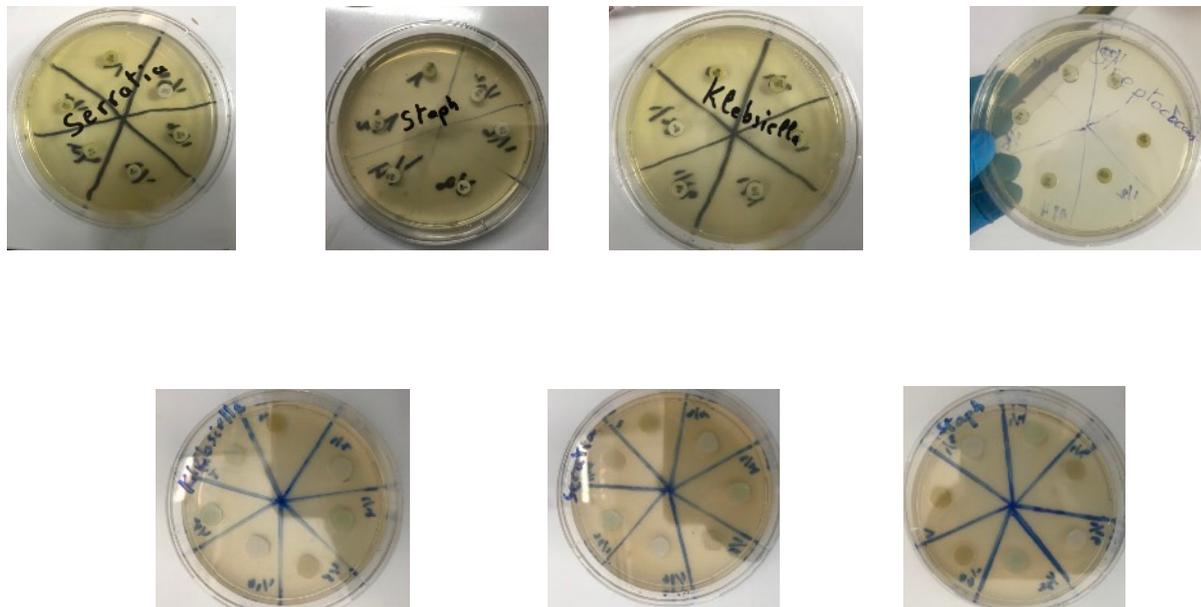
À l'aide d'une pince stérile et sous une hôte bien propre et stérilisée, les disques ont été déposés sur la surface du milieu ensemencé.

- Incubation :

L'incubation se fait à 37°C pendant 18-24H.

Les tests sont répétés deux fois.

**Remarque :** tout le travail se fait devant le bec benzène.



**Figure 22:** Préparation des tests antibactériens avec extraits méthanolique.

## **Chapitre 3: Résultats et discussion**

### 3.1. Screening phytochimique

Les résultats du screening phytochimique sont représentés en annexe.

**Tableau 4:** Tests phytochimiques

Métabolites secondaires	Test
Saponines	++
Huiles volatiles	-
Tanins	++
Coumarines	+
Flavonoïdes	+
Alcaloïdes	-
Quinones libres	+

Signification des symboles :

(++) Abondamment présent

(+) Présence

( - )Absence

L'examen du tableau fait ressortir la présence et l'absence de ces substances bioactives au niveau de notre plante, on peut constater que : les saponines et les tannins sont très abondantes, suivis des autres composants : coumarines , flavonoïdes, quinones libres et l'absence des alcaloïdes et des huiles volatiles.

le screening phytochimique nous donne des informations primaires sur notre plante, et en basant sur ces résultats, nous avons choisi les méthodes d'extraction. A titre d'exemple, nous n'avons pas fait l'hydrodistillation pour extraire les huiles volatiles.

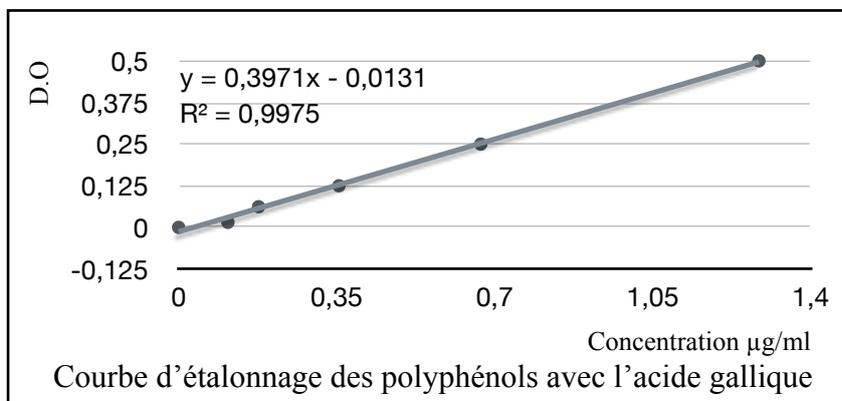
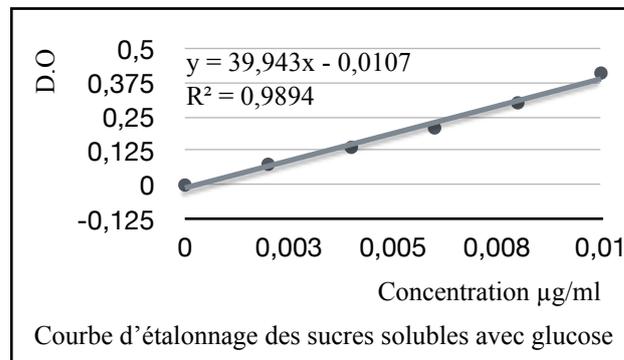
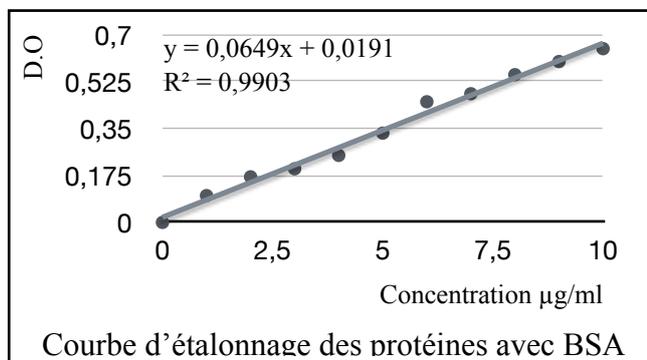
### 3.2. Les dosages par spectrophotomètre

Les résultats des densités optiques lus par spectrophotomètre sont présentés dans le tableau 5.

**Tableau 5:** Résultats des densités optiques.

Dosage	Longueur d'onde (nm)	densité optique
Dosage des sucres « dilution 1/12 »	585	0,296 ± 0,002
Dosage des protéines	595	0,405 ± 0,020
Dosage des polyphénols « dilution 1/6 »	750	0,212 ± 0,010
Dosage des pigments chlorophylliens	460	0,115 ± 0,010
	645	0,097 ± 0,010
	663	0,033 ± 0,010

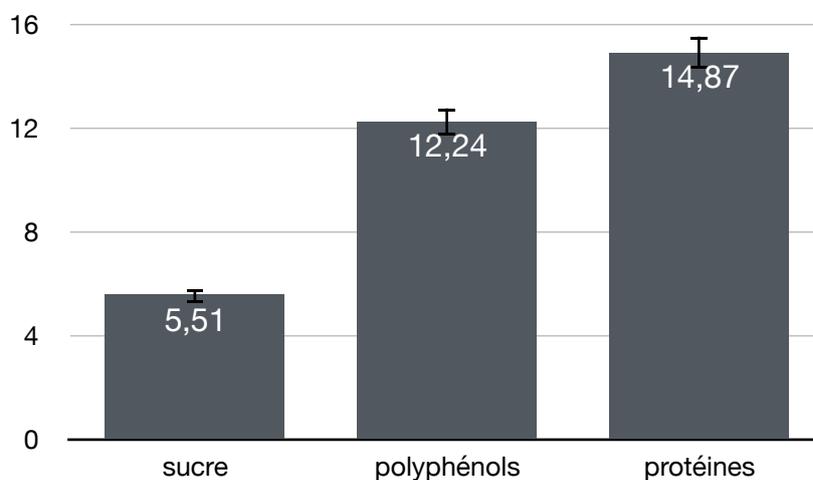
Nous avons fait des courbes d'étalonnage pour déterminer la concentration des polyphénols, protéines et sucres solubles. Les pigment chlorophylliens sont calculés par le système établi par Arnon et Mc Kinny. Les résultats sont présentés dans le tableau 6.



**Figure 23:** Courbes d'étalonnages.

**Tableau 6:** Concentration des sucres solubles, des protéines, des polyphénols et des pigments chlorophylliens.

Dosage par spectrophotométrie UV	Concentration
Sucre soluble	5,51 ± 0,04 mg/100g MS
Protéine	14,86 ± 0,30 mg/100g MS
Polyphénols	12,24 ± 0,10 EAG mg/100g MS
Pigments chlorophylliens	1,13 ± 0,20 mg/g MS



**Figure 24 :** Teneur en polyphénols, en sucres et protéines en mg/100g

Les résultats représentés par la figure 24, montrent que les protéines constituent le composant majeur de la plante, avec une concentration proche de 14,87 mg/100g MS. Les polyphénols sont abondamment présents avec une concentration de 12,24mg EAG/100g MS et une concentration de 5,51 mg/100g MS des sucres totaux.

Les protéines végétales sont constituées des mêmes acides aminés que les protéines animales. Dans l'organisme, les protéines jouent des rôles essentiels :

- Elles jouent un rôle structural et participent au renouvellement des tissus musculaires, des phanères (cheveux, ongles, poils), de la matrice osseuse, de la peau, etc.

- Elles participent à de nombreux processus physiologiques, par exemple sous la forme d'enzymes digestives, d'hémoglobine, d'hormones, de récepteurs ou d'immunoglobulines (anticorps).

Elles constituent, par ailleurs, l'unique source d'azote de l'organisme.

Les polyphénols sont une catégorie des molécules organiques largement répandues dans le règne végétal et dans nos aliments, réputés pour leurs propriétés antioxydants. Ils sont constitués d'un assemblage complexe de molécules plus petites, les phénols, comportant un noyau benzénique et des fonctions hydroxyle, ces substances ont un rôle très important pour le cycle de vie de la plante.

Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé. En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives. Ils sont également utilisés comme additifs pour les industries agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

Pour les pigments chlorophylliens, notre plante contient  $1,13 \pm 0,2$  mg/g MS. C'est une bonne valeur moyennement. Ces pigments absorbent la lumière utilisée par la photosynthèse.

### **3.3. Rendement d'extraction solide-liquide par Soxhlet (matière grasse) et par macération (polyphénols) de la plante**

Afin de pouvoir déterminer le meilleur solvant d'extraction, c'est-à-dire celui qui nous donne le meilleur rendement, nous avons procédé à l'extraction en utilisant l'appareillage Soxhlet avec différents solvants afin d'extraire la partie lipidique et en utilisant une macération à froid avec le méthanol pour la partie polyphénolique.

Après, nous avons calculé le rendement qui est le rapport entre la masse de l'extrait obtenue après évaporation et la masse de matière végétale sèche.

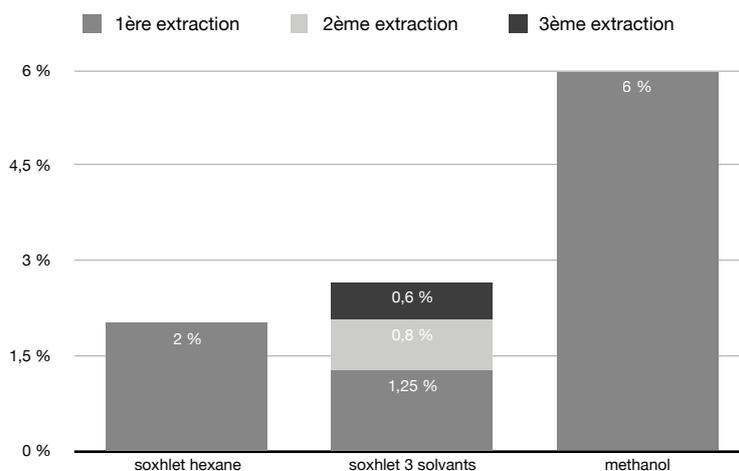
Après 5h heures d'extraction avec un appareil Soxhlet, nous avons pu obtenir un mélange solvant-extrait végétal. Nous avons par la suite, récupéré notre extrait en utilisant un rotavapeur. L'extrait obtenu est mis dans un flacon recouvert de papier aluminium pour bien le protéger de la lumière, puis le conserver au réfrigérateur.

L'extrait de *Galactites tomentosa* a une structure d'une pâte verte élastique.

Les rendements d'extraction sont donnés dans le Tableau 7 et représentés sur la figure 25.

**Tableau 7:** Rendement d'Extraction de la matière grasse et des polyphénols

Extraction par Soxhlet de « la matière grasse »				
Solvant	Diethyle éther	Chloroforme	Acétate d'éthyle	Hexane
Rendement	1,25%	0,80%	0,60 %	2,00 %
Total: 2,65%				
Extraction par macération « des polyphénols »				
Solvant	Méthanol			
Rendement	6,00 %			



**Figure 25:** Rendement d'extraction des extraits

Les résultats montrent que, la macération à froid avec le méthanol donne un rendement satisfaisant de 6,00 %.

Pour l'extraction par Soxhlet, nous observons que le rendement total des extractions successives avec trois différents solvants est relativement meilleur (2,65%) que celui obtenu en utilisant l'hexane comme solvant d'extraction (rendement de 2,00 %).

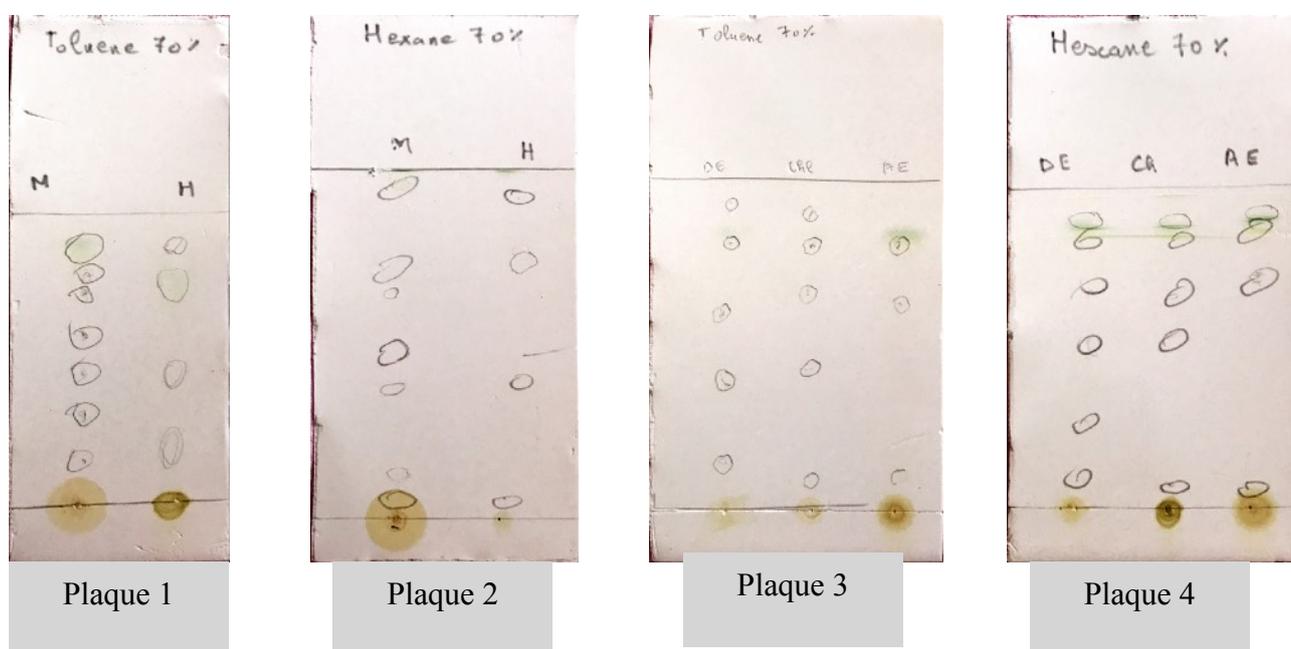
### 3.4. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM)

Dans notre étude, nous avons procédé à la chromatographie sur couche mince pour savoir la complexité de nos extraits.

Nous avons fait une séparation qualitative sur des plaques CCM des différents extraits en utilisant deux systèmes: Toluène/acétate d'éthyle et Hexane/ acétate d'éthyle.

Les chromatogrammes obtenus en utilisant deux systèmes d'éluant et ceci pour les différents extraits de notre plante sont illustrés sur la figure 26. Les Rf des taches sont regroupés dans les tableaux 8 et 9.

Les plaques ont été sous une lampe UV à une longueur d'onde de 254 nm.



**Figure 26:** Résultats de chromatographie sur couche mince.

Plaque 1: Eluant (toluène/acétate d'éthyle) les extraits:(M:méthanolique, H:hexane)

Plaque 2: Eluant (Hexane/acétate d'éthyle) les extraits:(M:méthanolique, H:hexane)

Plaque 3: Eluant (toluène/acétate d'éthyle) les extraits:(DE:diéthyle éther, Ch:chloroforme, AE: acétate d'éthyle )

Plaque 4: Eluant (Hexane/acétate d'éthyle) les extraits:(DE:diéthyle éther, Ch:chloroforme, AE: acétate d'éthyle )

**Tableau 8:** Rf des taches pour l'éluant (hexane/acétate d'éthyle).

Methanolique	Hexane	Diethyle éther	Chloroforme	Acétate d'éthyle
0.95				
0.71		0.92		
0.63		0.81	0.92	
0.47	0.94	0.70	0.81	0.92
0.37	0.72	0.50	0.70	0.81
0.13	0.46	0.25	0.50	0.70
0.05	0.05	0.08	0.08	0.08

**Tableau 9:** Rf des taches pour l'éluant (toluène /acétate d'éthyle).

Methanolique	Hexane	Diethyle éther	Chloroforme	Acétate d'éthyle
0.89				
0.79				
0.71		0.93	0.93	
0.58	0.89	0.82	0.82	0.92
0.45	0.75	0.67	0.67	0.82
0.32	0.46	0.4	0.4	0.67
0.15	0.21	0.15	0.15	0.15

La chromatographie sur couche mince en usage analytique, est le premier essai préalable fortement recommandé avant de commencer une séparation. Ce test nous a permis d'abord de connaître la complexité de chaque extrait.

L'extraction par Soxhlet en utilisant des solvants apolaires est sensé entrainer les composés apolaires comme les graisses et les cires.

La macération à froid par le méthanol est sensé entrainer les composés polaires comme les polyphénols.

Les résultats de l'analyse par chromatographie sur couche mince montre que:

- Une bonne séparation pour les deux systèmes d'éluants a été obtenue pour les différents extraits.
- L'extrait méthanolique est riche en molécules bioactives (7 taches).
- Pour le système d'éluant Hexane/acétate d'éthyle, l'extrait obtenu en utilisant le diéthyle éther comme solvant est plus riche (6 taches) comparativement aux extraits obtenus en utilisant l'acétate d'éthyle ou l'hexane (4 taches).

On note que, nous n'avons pas pu identifier les différents constituants de nos extraits à cause de la non disponibilité des standards (composés étalons).

### 3.5. Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait polyphénolique.

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait obtenu par macération à froid en utilisant le méthanol comme solvant sont reportés dans le Tableau 10.

**Tableau10:** Activité antibactérienne d'extraits du *Galactites tomentosa*.  
Les zone inhibitrice en mm en fonction des concentration en mg/ml

			Dilution de l'extrait méthanolique						
			1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Concentration (mg/ml)			6	3	1,5	0.75	0.39	0.19	0.09
Diamètre des zones inhibitrice en mm	Gram +	<i>Staphylococcus</i>	17 ± 1	14 ± 1	11 ± 0	8 ± 1	-	-	-
		<i>Streptococcus</i>	28 ± 2	17 ± 1	15 ± 2	13 ± 1	10 ± 1	-	-
	Gram -	<i>Klebsiella</i>	35 ± 2	28 ± 2	20 ± 1	15 ± 1	12 ± 1	-	-
		<i>Serratia</i>	20 ± 2	14 ± 1	13 ± 1	10 ± 1	8 ± 1	-	-

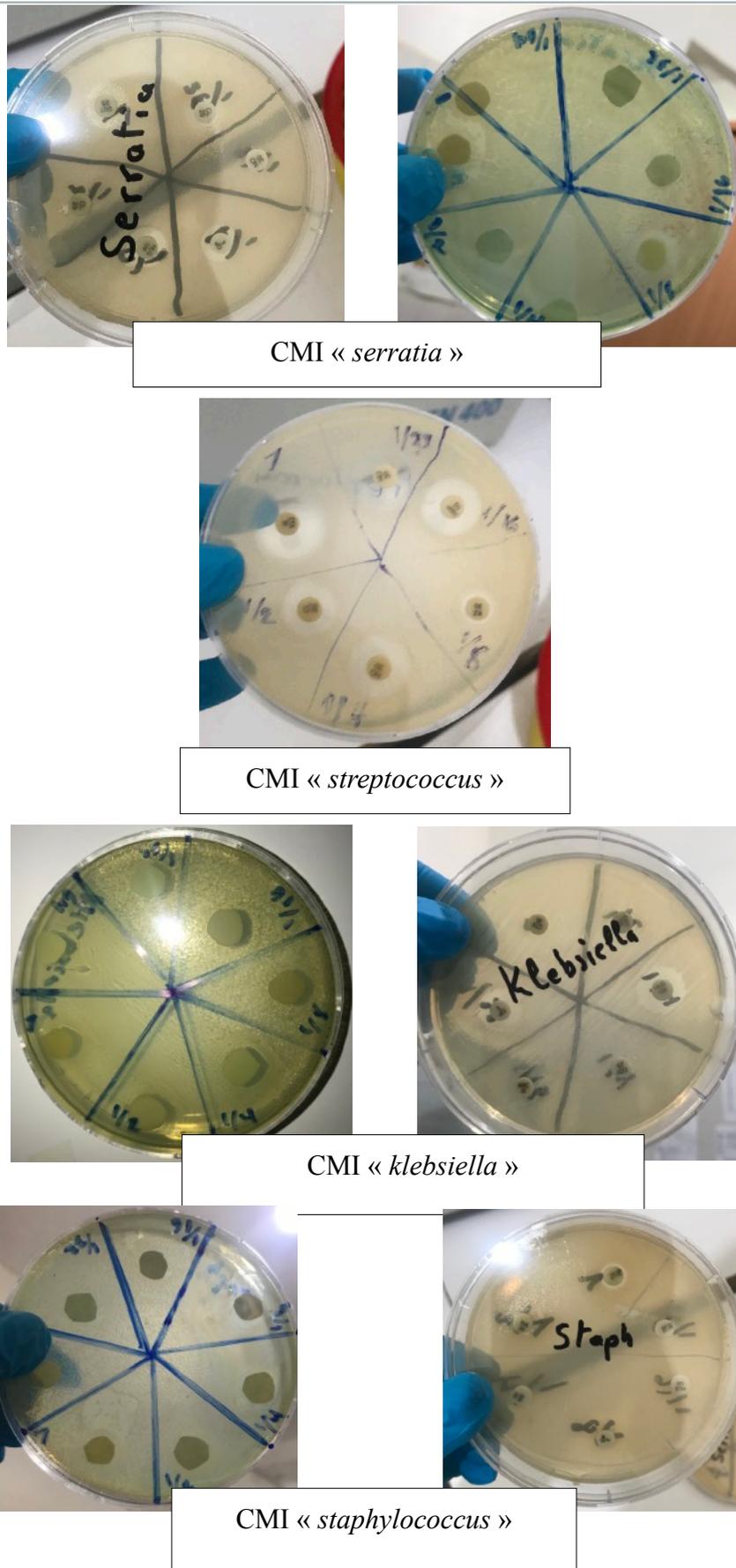


Figure 27: Résultats des concentrations minimales inhibitrice (CMI).

Les diamètres de la zone d'inhibition varient entre  $(8 \pm 1)$ mm et  $(35 \pm 2)$ mm.

Fortement inhibitrice :  $D > 28$ mm.

Modérément inhibitrice :  $16 < D < 28$ mm.

Légèrement inhibitrice :  $10 < D < 16$ mm.

Non inhibitrice :  $D < 10$ mm.

Dans ce travail, les valeurs de CMI (la concentration inhibitrice minimale) ont été déterminées expérimentalement.

Pour le *staphylococcus aureus*, nous avons obtenu une CMI de 150 mg/ml pour une dilution de 1/4.

Pour le *streptococcies*, la CMI est de 75mg/ml avec une dilution de 1/8.

Pour le *klebsiella*, la CMI est de 38 mg/ml avec une dilution de 1/16.

Enfin, pour le *serratia*, on a relevé une CMI de 75mg/ml pour une dilution de 1/8.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique obtenu par macération à froid a une activité d'inhibition significative contre la croissance bactérienne avec un degré différent lié à la nature des souches bactériennes, ce qui confirme les résultats des tests phytochimiques. Donc la présence des molécules bioactives.

## Conclusion Générale

Ce travail représente une contribution à l'étude phytochimique de la plante de la flore algérienne *Galactites tomentosa* de la famille des *Asteraceae* poussant à El Taref.

Le screening phytochimique réalisé a révélé la présence des saponines, des tanins en quantités importantes et une présence modeste des flavonoïdes, des coumarines et des quinones libres, avec une absence des alcaloïdes et des huiles volatiles.

La présence de ces composés attribue à cette espèce plusieurs caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques.

L'extraction des molécules bioactives (polyphénols) par une macération à froid en utilisant le méthanol comme solvant extracteur a donné un rendement satisfaisant de 6,00 %.

Pour l'extraction de la matière grasse par Soxhlet, le rendement total des extractions successives avec trois différents solvants (chloroforme, acétate d'éthyle et diéthyle éther) est relativement meilleur (2,65%) que celui obtenu en utilisant l'hexane comme solvant d'extraction (rendement de 2,00 %).

L'analyse des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM) a montré que nos extraits sont riches en molécules bioactives et une bonne séparation a été obtenue pour les deux systèmes d'éluants (Hexane/acétate d'éthyle et Toluène/acétate d'éthyle).

L'étude de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique a révélé que la plante *Galactites tomentosa* présente une activité antibactérienne très prometteuse, se traduisant par des diamètres d'inhibition et des valeurs de CMI très intéressantes (08,0 à 35,0 mm ; 38,0 à 150,0 mg/ml) en fonction des espèces bactériennes testées.

Il serait donc intéressant de poursuivre ce travail expérimental, de faire une extraction sur une masse de matériel végétal plus importante et procéder à la séparation, la purification et la détermination structurale des différents métabolites secondaires de cette espèce en combinant différentes méthodes d'analyse.

## Références bibliographiques

- (1) H.ZEGHOUANE, Essai de Caractérisation Phytochimique des extraits de quelques plantes médicinales du Sahara Septentrional Est- Algérien, Mémoire master académique, filière: Biologie, spécialité : Biochimie Appliquée, Université Kasdi Merbah-Ouargla, faculté des sciences de la nature et de la vie, (2014).
- (2) M.AREF, M.HEDED, Contribution à l'étude phytochimique, les activités biologiques (antioxydante et antibactérienne) d'une plante médicinale *Cleome arabica* L (Région d'Oued Souf), Mémoire de Master Académique en Sciences biologiques, spécialité : Biochimie Appliquée, Université Echahid Hamma Lakhdar d'El-Oued, faculté des sciences de la nature et de la vie,(2015).
- (3) P.ISERIN, LAROUSSE Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation, soins, Edition : Larousse, 2ème édition, (2001).
- (4) R.TCHOKOUAHA, Etude Phytochimique et valorisation biologique d'ERYTHRINA MILDBRAEDII HARMS, plante médicinale du CAMEROUN de la famille des FABACEAE, Thèse de doctorat, spécialité : pharmacognosie-chimie des substances naturelles, option : sciences du médicament, Université de Rouen, Ecole doctorale Normande CHIMIE, décembre (2009).
- (5) S.HADJADJ, Analyses phytochimiques et activités biologiques des extraits de deux plantes médicinales du Sahara septentrional Est- Algérien, Thèse de doctorat en Sciences biologiques, Université Kasdi Merbah-Ouargla, faculté des sciences de la nature et de la vie, département des sciences biologiques, (2017).
- (6) A.BERREGHIOUA, Investigation Phytochimique sur des extraits bioactifs de deux BRASSICACEAE médicinales du Sud Algérien: *Moricandia arvensis* et *Zilla macroptera*, Thèse de doctorat, discipline : Chimie Organique, Université Abou Bakr Belkaid - Tlemcen, faculté des sciences, département de chimie, (2016).
- (7) B.AMADOU, Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Combretum glutinosum* Perr ex DC (COMBRETACEAE), Thèse de doctorat en pharmacie, Université de BAMAKO, faculté de médecine et de pharmacie et d'odontostomatologie, (2004).
- (8) AFNOR (Association Française de Normalisation) ., Recueil de normes françaises des produits dérivés des fruits et légumes jus de Fruits. Ed. AFNOR, (1982). 325 p

- (9) Sabiha Achat. Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Autre. Université d'Avignon, (2013). Français. NNT : 2013AVIG0248
- (10) BENSALD A, TRACHLI Y. Les plantes aromatiques et médicinales de la région de Mokrisset (NO du Maroc) , Licence d'Etude Fondamentale: Ecologie Appliquée et Valorisation des Ressources Naturelles , Tétouan: Université Abdelmalek Essaâdi, (2013), 65p
- (11) Harborne J.B. Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plants analysis (3rd ed.) London: Chapman & Hall. ISBN: 0412572702. (1998).
- (12) Mehdi GD., Vijayanand., Kulkarni VG, Ramana KVR. Effect of different pre-treatments and dehydration methods on quality characteristics and storage stability of tomato powder. LWT 40 (2007) : 1832–1840.
- (13) Nadiarid Jiménez Elizondo ; Impact des opérations thermiques agroalimentaires à hautes températures sur la dégradation des anthocyanes caractérisation et modélisation des cinétiques réactionnelles. Thèse doctorat Montpellier Supagro. France, (2011).
- (14) Diallo D., Sanogo R., Yasambou H., Traoré A., Coulibaly K., Maïga A., Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. C. R. Chimie 7, (2004). pp 1073–1080.
- (15) Messkigue M., Mon herbier de santé, Edition Robert Laffont S.A., Paris, (1975). pp 1-50.
- (16) Parekh J., et Chanda S. V. In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. Turkish journal of biology, 31 : (2007). 53-58
- (17) Vercauteren J., Cheze C., Triau J., Polyphenols 96. Edition : INRA, Paris : (1996). p 31-43.
- (18) BOUGHRARA B ; Inventaire et étude ethnobotanique et chimique des plantes à intérêts thérapeutique et nutritif du Parc national El- kala. Thèse de doctorat , Faculté des Sciences Université Badji Mokhtar -Annaba, (2016).
- (19) Bruneton J ; pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Lavoisier technique et documentation. Paris, 4ème Edition. (2009).
- (20) De Souza R.f., W.F., De Giovani. Antioxidant Properties of Complexes of Flavonoids with metal ions. (2004). Redox Report. 9(2): 97-104.

- (21) Korkina L.G., Afanas'ev I.B. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv. Pharmacol.* 38: (1997). 151–163.
- (22) Vincken; J.-P; Heng, L. DE Groot, A., Gruppen, H; Saponins classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* (2007). 68: 275-297
- (23) Guignard J ;*Biochimie végétale*. Lavoisier, Paris, (1996). 175-192P.
- (24) Hans W. Kothe ; *1000 Plantes aromatiques et médicinales*. (2007). 11-12P.
- (25) Cowan M ; *Plant Products as Antimicrobial Agents ; clinical microbiology Reviews*, Oct. (1999). p. 564.
- (26) Alba, Noël ; cardénolides : passé et future. Isolement et étude de l'activité biologique de cardénolides isolés de fruits d'une plante endémique des Mascareignes cassine orientalis, UFR Sciences pharmaceutique et biologiques, université Nantes, France. (2014).
- (27) Alexander Noiriël ;étude d'une famille de gènes d'Arabidosis thaliana homologues de la lécithine cholestérol acyltransférase humaine. Caractérisation d'une nouvelle phospholipase A1 et étude d'un stérol acyltransférase, université Louis pasteur-Strasbourg, France (2004).
- (28) Turley S.D. and Dietschy, J.M; Sterol absorption by the small intestine. *Curr. Opin. Lipidol.* (2003). 14, 233-240.
- (29) Padrini .F; Lucheroni M.T ; *le grand livre des huiles essentielles*. Ed. de Vecchi. (1996).
- (30) Camila Gomez ; étude des mécanismes de stockage des anthocyanes dans la baie de raisin : caractérisation fonctionnelle des genes impliqués dans ces mécanismes. Thèse doctorat, MONTPELLIER SUPAGRO. France, (2009). 14-15P
- (31) Stern J.L, Hagerman. A.E, Steinberg. P.D, Mason. P.K; Phlorotannin- protein interactions. *Journal of chemical ecology.* 22 (1996). P 1887-1899.
- (32) Kazmi. MA, Sakmar. T, Ostrer H; Mutation of a conserved cysteine in the X- linked cone opsins causes color vision deficiencies by disrupting protein folding and stability *investigative ophthalmol and vis sci*, 38: 1074-1081 (pub med). (1997).
- (33) BENKAHOUL MALIKA, Evaluation, Extraction et caractérisation de l'activité coagulante des protéases de deux chardons endémiques, Galactites tomentosa et Onopordum acanthium. Thèse DOCTORAT : Génie enzymatique , Université des Frères Mentouri Constantine,(2016),127p

- (34) Nabil Bousbia. Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Autre. Université d'Avignon, (2011). Français. <NNT: 2011AVIG0243>. <tel-00915117>
- (35) HERZI. Nejia, Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO<sub>2</sub>-supercritique et des techniques conventionnelles, these de doctorat: Génie des Procédés et de l'Environnement, Institut National Polytechnique de Toulouse, (2013), 193p
- (36) Isolement et élucidation structurale d'une flavanone, d'un acide phénolique et d'un hétéroside stéroïdique des fleurs de la plante *Anacyclus cyrtolepidioides* (Pomel) - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: [https://www.researchgate.net/figure/Figure-n-3-Montage-dentrainement-a-la-vapeur-deau\\_fig3\\_265163661](https://www.researchgate.net/figure/Figure-n-3-Montage-dentrainement-a-la-vapeur-deau_fig3_265163661) [accessed 29 Aug, 2020]
- (37) SANOGO.Rokia. Le Rôle des Plantes Médicinales en Médecine Traditionnelle, 6 au 10 juin (2006), 10ème école d'été de l'IEPF et du SIFEE.
- (38) Benakmoum A., Abbedou S., Ammouche A., Panagiotis K., Dimitrios G, Valorisation of low quality edible oil with tomato peel waste. Food Chemistry.(2008). 110 : 684- 690.
- (39) Daouda Toure. ETUDES CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DE QUATRE PLANTES AROMATIQUES MEDICINALES DE CÔTE D'IVOIRE. Chimie organique. Université Felix Houphoët Boigny, Côte d'Ivoire, (2015). Français. NNT : 29/2015
- (40) M. Bugnicourt, Dictionnaire de microbiologie générale. Ellipses édition marketing SA, (1995).
- (41) J.L. Fauchère, J.L. Avril, Bactériologie générale et médicale, Ellipses Marketing, (2002).
- (42) Cours de Bactériologie, DCEM1, Faculté de Médecine de Nantes, (2007).
- (43) Sofowora, E. A; Medical plant and traditional Medicine in Africa. (1994).
- (44) Sassi K., Abid G., Jemni L., Dridi-Al Mohandes B., Boubaker M., Étude comparative de six variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) vis-à-vis du stress hydrique. Journal of Animal & Plant Sciences, Vol.15, Issue .2: (2012). 2160 -2163.
- (45) Zidani S., Valorisation des pelures de tomates séchées en vue de leur incorporation dans la margarine. Diplôme Magister Technologie Alimentaire. Univ M'hamed Bougara-Boumerdes . (2009). P34, 47, 55-77.

- (46) Waterman PG and Mole S., Analysis of phenolics plant metabolite. Oxford Blackwell Scientific Publication. (1994). 83-91
- (47) Owen P.L, Johns T., Xanthine oxidase inhibitory activity of north eastern North American plant remedies used for gout. Journal of Ethnopharmacology, 64, (1999). pp 149-160
- (48) Abedini. A.. Évaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Thèse de doctorat. Université du Droit et de la Santé, Lille II. HAL. (2013/2014). p 84- 85.
- (49) Dulger B., et Gonuz A. Antimicrobial activity of some turkish medicinal plants. Pakistan journal of biological sciences, 7 (9) : (2004). 1559-1562.
- (50) Pelt J.-M. Les drogues. Leur histoire, leurs effets, Ed. Doin, (1980).
- (51) Rota M. C., Herrera A., Martinez R. M., Sotomayor J. A., et Jordán M. J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. Food control, 19 : (2008). 681-687.
- (52) LAHMER. Nadjat, MESSAI. Soumia, Étude phytochimique et biologique des extraits aqueux et méthanolique des écorces des racines du *Zizyphus lotus* (L), Mémoire de Master: Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine, (2017), 112p

## Annexes



saponine



HE



alcaloïdes



tanins



quinones  
libre



Flavanoides

Annexe 1:  
Résultats screening phytochimique



broyeur électrique



cartouche +  
matière sèche



appareillage soxhlet

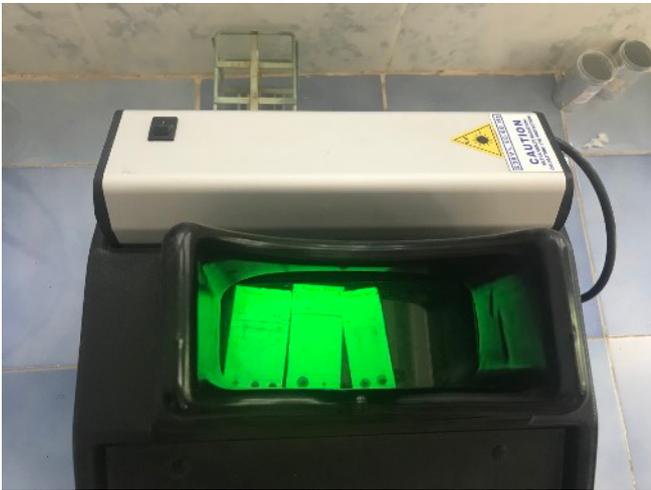


rotavapeur

Annexe 2: extraction avec soxhlet et évaporation avec rotavapeur



Annexe 3 : récupération de l'extrait végétal



Annexe 4: lampe UV