

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Ecole Nationale Polytechnique**



**Département de Génie de l'Environnement**

**Projet de Fin d'Etudes**

**En vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Génie de l'Environnement**

Thème :

**Etude de l'effet antibactérien des extraits végétaux**

Etudié par :

**M<sup>lle</sup> Asma GREICHI**

Soutenu le 17 Juin 2015 devant le jury composé de :

<b>Président :</b>	Mr H. GRIB	Professeur, ENP
<b>Examineur :</b>	Mr R. BOUARAB	Professeur, ENP
<b>Encadrants :</b>	Mr N. MAMERI	Professeur, ENP
	Mr M. KHERAT	Doctorant-Chercheur, ENP

**JUIN 2015**

# Remerciements

*Je tiens d'abord à remercier les honorables membres du jury de ma soutenance, d'avoir accepté de consulter et de juger mon travail : Pr. Grib et Pr. Bouarab, ainsi que mes promoteurs : Pr. Mameri et Mr Kherat pour leur précieux conseils et remarques*

*Toute ma reconnaissance va également à tout le corps professoral que j'ai connu à l'École nationale Polytechnique, pour la qualité de la formation que j'ai eue, mais je n'oublie d'exprimer ma gratitude au Pr. Hayahem, le directeur de l'École Préparatoire aux Sciences et Techniques de Annaba, ainsi que Messieurs Daradji, Laalem, Tyah et Madame Djeghaba, mes professeurs de la même école pour les deux années de sciences fondamentales qui me resteront gravées à jamais dans l'esprit.*

*J'adresse aussi mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser ce modeste travail : Kacuthar, Cherifa, Radia et Nihad, ainsi que tous mes amis et camarades de la promotion 2015 du Génie de l'environnement.*

*À toute ma famille, sans qui je ne serai celle que je suis aujourd'hui,*

*MÉRCI*

# Dédicaces

*À mes très chers parents sans qui je ne serais où j'en suis aujourd'hui*

*À mon oncle préféré Hamid et son épouse Samia*

*À la mémoire de ma tante Nadia*

*À mes chers frères Nazim, Rachdi et Walid*

*À mon unique et adorable sœur Nihad*

*À mes belles sœurs*

*Mon neveu Amir Saidet ma nièce Chiraz*

*Les chouchous de la famille Racim, Sarah, Lotfi, Neïla et Doria*

*Mes amies : Kacouther, Cherifa, Hadjer, Khadidja et Rokia*

*Asma*

## Table des matières

Introduction générale :	2
I L'activité antibactérienne des plantes :	5
I.1 Les bactéries :	5
I.1.1 Définition :	5
I.1.2 Description des souches utilisées :	6
I.2 Les antibiotiques :	9
I.2.1 Classification des antibiotiques :	10
I.2.2 Les antibiotiques dans les plantes :	11
II Les plantes médicinales :	13
II.1 La médecine traditionnelle :	13
II.2 L'état des plantes médicinales dans le monde :	14
II.3 Cueillettes des plantes :	15
II.4 Composition chimique des plantes médicinales :	15
II.5 Importance des plantes :	19
II.6 Les plantes choisies :	20
II.6.1 <i>Thymus vulgaris</i> :	20
II.6.2 <i>Origanum majorana</i> :	22
II.6.3 <i>Maclura pomifera</i> :	24
III Extraction des plantes :	28
III.1 Définition de l'extraction :	28
III.2 Mécanisme d'extraction solide-liquide :	28
III.3 Quelques techniques d'extraction :	28
III.3.1 Extraction par Soxhlet :	29
III.4 Les paramètres influant sur l'extraction :	30
III.5 Les facteurs influençant l'extraction :	32
III.5.1 Influence du solvant et du pH :	32
III.5.2 Température :	33
III.5.3 Le temps d'extraction :	33
III.5.4 La taille des particules :	33
III.5.5 L'agitation du fluide :	33
III.5.6 Le taux de l'humidité du solide :	34
III.6 Limites des techniques d'extraction :	34

III.6.1	Le solvant .....	34
III.6.2	Température.....	34
IV	Matériels et méthodes : .....	37
IV.1	Introduction : .....	37
IV.2	Matériel végétal : .....	37
IV.2.1	<i>Thymus vulgaris et Origanum majorana</i> : .....	37
IV.2.2	<i>Maclura pomifera</i> : .....	38
IV.3	Matériels et solvants utilisés pour les extractions : .....	38
IV.3.1	Matériel : .....	38
IV.3.2	Verrerie : .....	38
IV.3.3	Solvants : .....	39
IV.4	Matériel pour l'analyse antibactérienne : .....	39
IV.4.1	Les souches utilisées : .....	39
IV.4.2	Matériel utilisé : .....	40
IV.5	Préparation des extraits : .....	40
IV.5.1	Extraction par soxhlet : .....	40
IV.6	L'étude de l'activité antibactérienne : .....	46
V	Résultats et discussion .....	51
V.1	Étude de l'activité antibactérienne : .....	51
V.2	Méthode de mesure : .....	51
V.3	Effets des différents extraits : .....	51
V.3.1	Résultats de l'activité antimicrobienne des différents extraits : .....	52
V.3.2	Tableaux exprimant les diamètres d'inhibition : .....	53
V.4	Comparaison des effets antibactériens des différents extraits : .....	58
V.5	Comparaison de l'activité des plantes sur les différentes espèces bactériennes : .....	60
	Conclusion générale .....	64
	ملخص: .....	65
	Résumé : .....	65
	Abstract: .....	66
	Bibliographie	

## Liste des tableaux :

Tableau I-1 : Classification des antibiotiques (SCHMID, 2005) .....	10
Tableau IV-1 : Caractéristiques des solvants utilisés lors de l'extraction.....	39
Tableau IV-2 : Tableau récapitulatif des procédés d'extraction par soxhlet.....	41
Tableau IV-3 : les conditions opératoires de la concentration .....	42
Tableau IV-4 : Tableau récapitulatif des procédés d'extraction par macération .....	44
Tableau V-1 : Effet des solvants sur les souches bactériennes (diamètres donnés en mm).....	54
Tableau V-2 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits hexaniques.....	55
Tableau V-3: Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits chloroformiques.....	56
Tableau V-4 : Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits éthanoïques.....	57

## Liste des figures:

Figure I-1 : <i>Staphylococcus aureus</i> [1,2].....	6
Figure I-2 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [3,4] .....	7
Figure I-3 : <i>Escherichia coli</i> [5,6] .....	8
Figure II-1 : Jardin royal des plantes médicinales (KELLER-DIDIER, 2004) .....	13
Figure II-2 : Molécule de Mucilage (PENGELLY, 2006).....	16
Figure II-3 : Tanin (PENGELLY, 2006) .....	16
Figure II-4 : Amer (PENGELLY, 2006) .....	17
Figure II-5 : Saponine (PENGELLY, 2006).....	17
Figure II-6 : Flavonoïde (PENGELLY, 2006).....	18
Figure II-7 : Alcaloïde (PENGELLY, 2006).....	18
<b>Figure II-8 : plante de <i>Thymus vulgaris</i>[7].....</b>	<b>20</b>
Figure II-9 : le <i>Thymus</i> [8] .....	21
Figure II-10 : état de <i>Thymus</i> dans la nature [9,10] .....	21
<b>Figure II-11 : <i>Origanum majorana</i> [11].....</b>	<b>22</b>
Figure II-12 : l'état de la marjolaine dans la nature [12] .....	23
Figure II-13 : Fruit et feuille de <i>Maclura pomifera</i> [13].....	24
Figure II-14 : L'abondance des <i>Maclura</i> dans la nature [14,15].....	25
Figure III-1 : procédé de macération [16].....	29
Figure III-2 : L'appareillage expérimental de l'extraction par Soxhlet [17] .....	30
Figure IV-1 : <i>Origanum majorana</i> Figure IV-2 : <i>Thymus vulgaris</i> .....	37
Figure IV-3 : <i>Maclura pomifera</i> .....	38
Figure IV-4 : Dispositif d'extraction par soxhlet.....	40
Figure IV-5 : Concentration de l'extrait par un rotavapeur .....	42
Figure IV-6 : macération des <i>Maclura Pomifera</i> .....	43
Figure IV-7 : procédé d'extraction des <i>Maclura pomifera</i> .....	45
Figure IV-8 : Schématisation de la mise en œuvre d'un antibiogramme .....	46
Figure IV-9 : les disques imprégnés de solutions d'extraits .....	47
Figure IV-10 : dépôts des disques dans les milieuxensemencés par une souche.....	48
Figure IV-11 : Boîtes inoculées.....	48
Figure V-1 : Effet antibactérien de <i>Thymus vulgaris</i> .....	52
Figure V-2 : Effet antibactérien d' <i>Origanum majorana</i> .....	52
Figure V-3 : Effet antibactérien de <i>Maclura pomifera</i> .....	53
Figure V-4 : Effet antibactérien des solvants.....	54
Figure V-5 : Pouvoir inhibiteur des solvants .....	58
Figure V-6 : sensibilité de <i>S. aureus</i> Figure V-7 : sensibilité de <i>P.aeruginosa</i> .....	59
Figure V-8 : sensibilité d' <i>E.coli</i> .....	59
Figure V-9 : Comparaison de l'effet antibactérien des extraits d'hexane .....	60
Figure V-10 : Comparaison de l'effet antibactérien des extraits de chloroforme.....	61
Figure V-11 : Comparaison de l'effet antibactérien des extraits d'éthanol.....	61



# *Introduction générale*

## Introduction générale :

La présence de nombreux polluants dans l'environnement (dans les eaux destinées à la boisson, les sols et également dans les milieux hospitaliers) provoque le développement de nombreuses espèces bactériennes dont un grand nombre sont dangereuses pour l'homme et provoquent des infections qui peuvent être mortelles. (Jean-Philippe Lavigne, 2008)

Ces infections bactériennes se produisent lorsque des bactéries pathogènes pénètrent et se développent dans le corps humain. Il est également possible qu'il y ait infection lorsque des bactéries de la flore naturelle du corps se multiplient de façon incontrôlable. (Caumes, 2008)

Ces maladies peuvent être généralement traitées avec des antibiotiques, ces derniers agissent de manière spécifique en ne tuant que les bactéries ou en les empêchant de se reproduire et de se propager. Différents types d'antibiotiques sont efficaces pour le traitement de certains types de bactéries (F. Barbut, 2014 ). Aussi, l'utilisation abusive d'antibiotiques a engendré l'apparition de souches résistantes qui provoquent des infections difficiles à traiter. Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles biomolécules possédant des propriétés bactéricides et qui ne présentent pas de dangers pour les cellules humaines.

Une source particulièrement intéressante de biomolécule, et qui est également utilisée depuis des siècles, est le monde végétal. En effet, les plantes contiennent des milliers de biomolécules différentes qui possèdent de nombreuses activités biologiques. Il est cependant nécessaire d'effectuer des tests afin d'identifier ces molécules et d'étudier leurs effets.

Dans ce présent travail, nous nous intéressons à l'évaluation de l'activité antibactérienne de certains extraits végétaux. Notre choix s'est porté sur les extraits de *Thymus vulgaris*, *Origanum majorana* et les *Maclura pomifera*. Trois espèces qui se développent facilement en Algérie.

Nous avons évalué l'effet de ces extraits (obtenus en utilisant différents solvants) sur trois espèces bactériennes qui sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* en utilisant la méthode de Kirby-Bauer.

Dans la première partie de ce document des détails concernant les bactéries et les infections bactériennes seront donnés. Cette partie sera suivie d'une description des plantes choisies et des méthodes d'extraction des biomolécules.

Dans la deuxième partie du document, nous décrirons les méthodes utilisées pour la préparation des extraits végétaux et les protocoles suivis pour évaluer leur activité antimicrobienne.

Les résultats obtenus seront présentés et commentés dans la dernière partie.

*Chapitre 1 :*

*L'activité antibactérienne*

*des plantes*

# **I L'activité antibactérienne des plantes :**

## **Introduction**

Les plantes sont utilisées depuis l'antiquité par l'homme pour traiter diverses maladies. Ces végétaux ont l'avantage d'être constitués d'un éventail de composés qui possèdent potentiellement de nombreuses activités biologiques. (Badiaâ ER-ROUISSI, 2014). Parmi ces activités, nous allons nous concentrer sur les activités antimicrobiennes, ces dernières présentent un intérêt particulier dans plusieurs domaines tel que le domaine médical, l'industrie pharmaceutique, l'agroalimentaire et le cosmétique. (Maria C. Rota, 2008)

## **I.1 Les bactéries :**

### **I.1.1 Définition :**

Les bactéries sont des organismes unicellulaires en moyenne 10 à 100 fois plus petits qu'une cellule humaine. Leur taille se situe entre 0.5 et 5µm (Linder, 2010). Son matériel génétique ne se trouve pas dans un noyau comme c'est le cas chez les cellules animales ou végétales. Pour cette raison, on appelle les bactéries des procaryotes (« avant le noyau »). Les cellules à noyau (comme les cellules humaines) sont quant à elles dénommées des eucaryotes (Singleton, 1999)

En raison de leur taille, on ne peut observer leurs constituants et leur structure qu'en utilisant un microscope électronique. Le microscope optique ne permet que l'observation générale de la forme des cellules à l'état frais ou après coloration.(Singleton, 1999), (C.Nauciel et J.-L. Vildé , 2005)

Quand on parle de bactéries, on pense immédiatement aux maladies, aux infections et à une multitude d'événements négatifs liés à ces microbes. Les épidémies de peste ou de choléra ont marqué et marquent encore notre histoire. Le retour de la tuberculose sur le devant de la scène, les difficultés de traitement suite aux résistances multiples aux antibiotiques font bien souvent la une des journaux. Pourtant seule une infime minorité des bactéries est pathogène. L'immense majorité des bactéries est bénéfique et indispensable aux processus biologiques. (Linder, 2010) En effet, les trois espèces qui ont été utilisées sont responsables de nombreuses infections nosocomiales.

## I.1.2 Description des souches utilisées

### I.1.2.1 *Staphylococcus aureus* :

- **Caractère bactériologique :**

*Staphylococcus aureus* est une coccobactérie Gram positif, catalase positive appartenant à la famille des *Staphylococcaceae*. C'est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Elle a un diamètre d'environ 0,5 à 1,5  $\mu\text{m}$ , est immobile, asporulé et facultativement anaérobique (sauf *S. aureus anaerobius*); ils se divisent sur plusieurs plans pour former des amas habituellement disposé en grappes, d'où leur nom (en grec staphylos signifie grappe). *Staphylococcus aureus* fait partie de la flore humaine et est surtout présent dans le nez et sur la peau.(C. Bouchiat, 2015)



**Figure I-1 : *Staphylococcus aureus* [1,2]**

- **Habitat et transmission :**

*S. aureus* est un microorganisme commensal qui colonise environ 20% des humains et 60% des individus de façon intermittente tout au long de leur vie. *S. aureus* réside souvent sur les surfaces de la peau et des muqueuses, les aisselles et le périnée. Le microorganisme peut être transféré par contact de personne à personne ou par l'environnement, *S. aureus* a été connu pour survivre sur les surfaces sèches. (Timothy J. Foster, 2015)

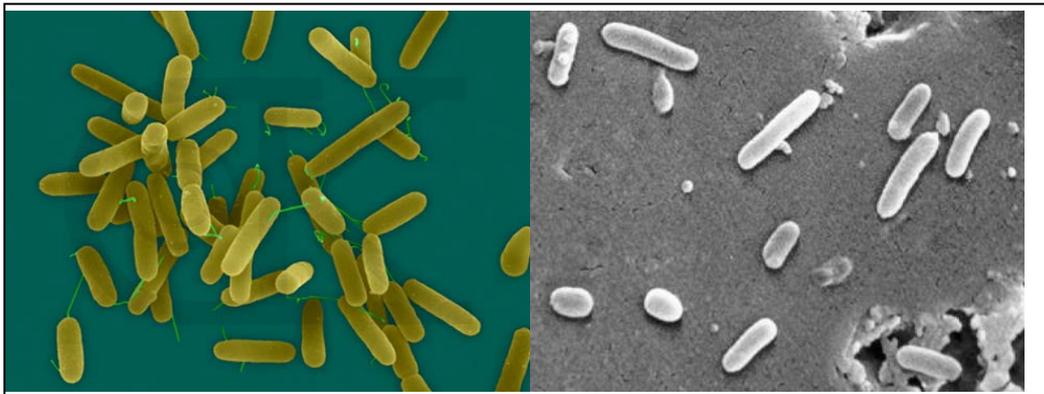
- **Pouvoir pathogène :**

Les staphylocoques ont un pouvoir pathogène opportuniste extrêmement large qui s'exerce avec une grande fréquence en milieu hospitalier. L'espèce *S.aureus* est responsable des suppurations localisées (Les infections cutanées, les infections ORL, diverses infections des séreuses, les infections osseuses et les infections viscérales), des manifestations digestives (les toxi-infections alimentaires et les entérocolites staphylococciques), ainsi que des septicémies et les endocardites et le syndrome de choc toxique. (Leclerc, 1995)

### ***Pseudomonas aeruginosa* :**

- **Caractère bactériologique :**

Il s'agit d'un petit bacille, mobile grâce à son flagelle simple qui appartient à la famille des Pseudomonadaceae. C'est une bactérie Gram négatif de 1,5 µm sur 0,5 et aérobic stricte. *Pseudomonas aeruginosaa* a pour caractéristique la production d'un pigment bleu gris, la pyocyanine, d'où il tire son nom de bacille pyocyanique. Il est non sporulé (sans spore) et a une forme droite ou légèrement incurvée.(Leclerc, 1995)



**Figure I-2 : *Pseudomonas aeruginosa* [3,4]**

- **Habitat :**

On les retrouve partout dans la nature, dans l'eau, le sol, les plantes, les animaux et l'homme. Cette bactérie préfère les milieux humides et on la trouve quelquefois au niveau de la peau, de l'appareil respiratoire supérieur, de l'oreille externe et du tube digestif chez l'individu sain. (Stephanie Rolsma, 2015)

- **Pouvoir pathogène :**

Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* sont le plus souvent des infections d'origine nosocomiale. En milieu hospitalier il est à l'origine de surinfections et de suppurations locales ou profondes, isolé essentiellement chez des patients présentant une immunodéficience locale ou générale (brûlés, cancéreux, etc.), et très fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales (infections pulmonaires, cutanées...). De même qu'il est phytopathogène avec beaucoup d'autres espèces du même genre. (Xavier Bertrand, 2011)

### ***Escherichia coli* :**

- **Caractère bactériologique :**

*Escherichia coli*, est une espèce type de la tribu *Escherichieae*, qui possède les caractères bactériologiques classiques de la famille des Entérobactériacées. *Escherichia coli* est un bacille à gram négatif, de forme non sporulée, de type anaérobie facultative. Elle est généralement mobile grâce à ses flagelles, sa longueur varie de 2 à 6  $\mu\text{m}$ , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5  $\mu\text{m}$ . (Leclerc, 1995)



**Figure I-3 : *Escherichia coli* [5,6]**

- **Habitat :**

*E.coli*, constitue la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme (10 / g de selles), et de nombreux animaux; elle est un indicateur de contamination fécale dans les milieux naturels, dans l'eau et les aliments. (Leclerc, 1995)

- **Pouvoir pathogène :**

Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néo-natales. D'autres souches appartiennent à la flore commensale et peuvent être responsables d'infections opportunistes variées, surtout chez les sujets aux défenses immunitaires affaiblies (Szapiro-Manoukian, 2011)

## **I.2 Les antibiotiques :**

Les antibiotiques sont des substances capables d'inhiber spécifiquement la croissance de microorganismes ou de les détruire. (Singleton, 1999) Leur utilisation durant les dernières décennies a provoqué la sélection de nombreuses souches présentant des résistances à un ou plusieurs antibiotiques.

Une Bactérie Multirésistante aux antibiotiques (BMR) est une bactérie qui n'est plus sensible qu'à un très petit nombre d'antibiotiques. Toutes les bactéries peuvent développer une multirésistance, qu'elles soient impliquées dans les infections communautaires ou dans les infections nosocomiales. (SCHMID, 2005) D'où l'intérêt de la recherche continue de nouvelles molécules qui possèdent un effet antibactérien.

Les plantes sont une excellente source de molécules bioactives et potentiellement antibactériennes. Dans la plante (prenons le cas de l'écorce de saule qui contient justement l'aspirine), il y a un grand nombre de molécules différentes qui agissent en harmonie. Cela repose sur le choix des plantes qui entrent dans leur composition. Il faut sélectionner de manière très rigoureuse l'espèce, la partie active de la plante (racine, sommité fleurie, tige, feuille, fruit), les conditions de culture (exposition au soleil, sol, climat) et la période adéquate pour la cueillette. Ensuite les plantes sont contrôlées en subissant de nombreuses analyses (bactéricides et pesticides), mais aussi la teneur en principes actifs qui doit être reproductible quel que soit l'arrivage. (Sukhdev Swami Handa, 2008)

Dans le prochain chapitre nous allons décrire les caractéristiques des plantes et leur importance.

## I.2.1 Classification des antibiotiques

Tableau I-1 : Classification des antibiotiques (SCHMID, 2005)

<b>Antibiotiques polyosidiques</b>	Aminosides	Streptomycine (médecine), kasugamycine(fongicide du riz)
<b>Lactones macrocycliques</b>	Macrolides Antibiotique à structure Polyénique Ansamycines	Erythromycine (médecine) Primaire (fromage)  Rifamycine(tuberculose)
<b>Quinones et antibiotiques proches</b>	Tétracyclines  Anthracycline	Tétracycline, chlorotétracycline (médecine, alimentation) Doxorubicine (oncologie)
<b>Glycopeptides</b>	Dérivés des acides aminés  Antibiotiques- $\beta$ -lactamiques Antibiotiques peptidiques  Chromopeptides Glycopeptides	Ciclosoprine (transplantation) Phosphinotricine (agriculture)  Péniciline,céphalosporine (médecine) Bacitracine(médecine) ,virginiamycine(élevage)  Actinomycine (oncologie) Bléomycine(oncologie),vancomycine(médecine),a voparcine(élevage).
<b>Hétérocycles Contenant N</b>	Antibiotiques à base de nucléosides	Polyoxine ,blasticidine S (fongicide dans l'agriculture)
<b>Hétérocycles Contenant O</b>	Antibiotiques à base de polyéthers	Monensine(élevage de volailles)
<b>Antibiotiques à structure alicyclique</b>	Antibiotiques à base de cycloalcanes	Cycloheximide (fongicide de feuillage )
<b>Antibiotiques à structure aromatique</b>	Antibiotiques à base d'un noyau benzénique	Chloramphénicol (médecine) Griséofulvine (fongicide)

### **I.2.2 Les antibiotiques dans les plantes :**

Les extraits naturels issus des plantes utilisées en médecine traditionnelle contiennent une variété de molécules biologiquement actives. (L. Hambaba, 2012)

Beaucoup de recherches concernant l'activité antibactérienne sur les extraits végétaux issus des plantes médicinales ont prouvés que 43% des plantes étudiées exercent leur effet antibactérien sur les bactéries pathogènes contenues dans nos aliments. Où certains extraits et huiles essentielles de plantes se sont montrés efficaces pour contrôler la croissance d'une grande variété de microorganismes, y compris des champignons filamenteux, des levures et des bactéries. L'usage pratique de ces activités a été suggéré pour l'homme et les animaux, ainsi que dans l'industrie alimentaire. (SOUZA, 1995)

Dans le prochain chapitre nous expliquons la valeur thérapeutique des plantes en citant des exemples concrets des plantes qu'on a testées.

### **Conclusion :**

L'activité antimicrobienne démontrée par des extraits ouvre une possibilité de leur utilisation dans les cas des toxi-infections alimentaires. Au vu de la résistance de certaines souches bactériennes à des antibiotiques, les extraits des plantes présentent une alternative qui peut s'utiliser en amont dans la conservation des aliments et comme additif alimentaire. (M. Oba Samoussa, 2011)

*Chapitre 2 :*

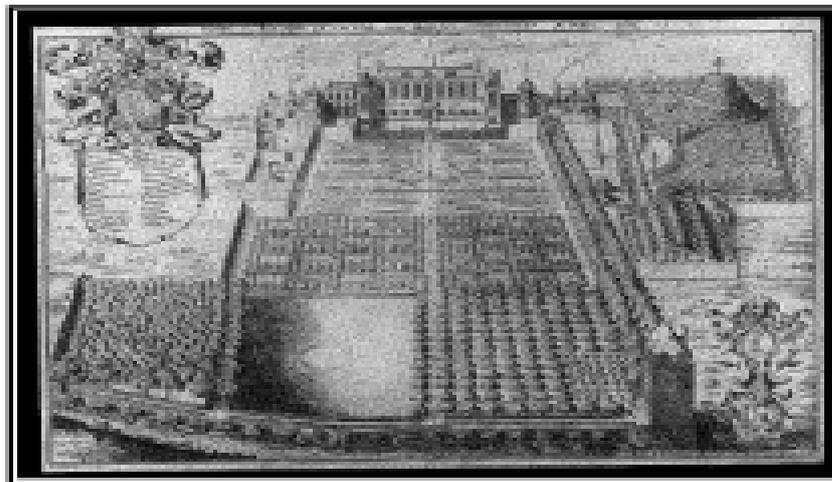
*Les plantes médicinales*

## II Les plantes médicinales

### II.1 La médecine traditionnelle :

**La phytothérapie est une médecine vieille comme le monde :** Les fruits, les racines, les plantes et autres substances naturelles ont toujours été connues pour leurs propriétés nutritives, mais aussi pour leurs vertus curatives. Le premier texte écrit sur la médecine par les plantes est gravé sur des tablettes en argile en caractère cunéiforme et date de la civilisation sumérienne ,3000 ans avant Jèsus-Christ. Durant des milliers d'années, la phytothérapie a constitué la principale source de remèdes contre de nombreuses maladies. (PHARMACEUTIQUES, 2007)

Jusqu'au 5<sup>ème</sup> siècle chaque monastère possédait son hortulus composé d'au moins seize simples estimées nécessaires à la thérapeutique. En 1635, le célèbre Jardin royal des plantes médicinales riche de plus de 2300 espèces végétales se crée à Paris.(KELLER-DIDIER, 2004)



**Figure II-1 : Jardin royal des plantes médicinales (KELLER-DIDIER, 2004)**

Au 18<sup>ème</sup> siècle le concept de « médecine traditionnelle » est inventé. C'est la synthèse de l'expérience de longues générations de préparateurs, physiciens et praticiens ayant développé des médicaments extraits de plantes destinés à un usage thérapeutique.

(Zhang, 2000).

A partir des années 50, les plantes médicinales jouent un grand rôle dans le développement des nouveaux médicaments, environ 100 médicaments à base de grandes plantes qui sont introduites dans le marché médical en USA entre 1950 et 1970.

(Agrawal, 2009 )

De nos jours, l'identification de nouveaux principes actifs, la découverte de nouvelles propriétés pharmacologiques, et l'augmentation des effets néfastes de certains médicaments de synthèse ont contribué à faire de la phytothérapie une médecine à part entière et à faire comprendre que les plantes pouvaient être d'authentiques médicaments. (Debuigne, 1984)

## **II.2 L'état des plantes médicinales dans le monde :**

Depuis 5000 ans les plantes médicinales ont été utilisées par les indiens, chinois, égyptiens, grecs, romains et syriens. L'Inde est le vaste dépôt de plantes médicinales qui sont utilisées dans des traitements médicaux traditionnelles. Près de 20.000 espèces de plantes médicinales y ont été récemment recensées. (Agrawal, 2009 )

Actuellement 80% de la population mondiale dépend de la médecine d'origine végétale pour des soins de santé. Des molécules tel que les opiacés qui sont utilisés pour traiter les douleurs fortes, la digitaline utilisée pour traiter les insuffisances cardiaques, et de nombreux alcaloïdes tel que l'atropine sont toutes d'origine végétale. Au siècle dernier, environ 121 produits pharmaceutiques ont été formulées sur la base des connaissances traditionnelles obtenus à partir de diverses sources. (Ross, 2005 ).

- **Dans le nord-africain :**

Le nord-africain qui comprend l'Algérie, l'Égypte, la Libye, le Maroc et la Tunisie. Il se compose d'un biote des mers, avec divers écosystèmes constituant environ 10.000 espèces de plantes vasculaires. Le bassin méditerranéen est l'un des 25 bassins les plus reconnus au monde par sa biodiversité et son extraordinaire variété de plantes et espèces. (Karan Vasisht, 2004 )

Environ 70% des espèces trouvées dans la nature possèdent un pouvoir thérapeutique ou aromatique et autres. Plus de 10% de ceux-ci peuvent être exploités commercialement comme une source de médicaments et produits pharmaceutiques. (Sofowora, 2010)

- **En Algérie :**

En Algérie, il y a environ 3.164 espèces de plantes vasculaires, ces dernières ont été utilisées par les communautés locales. Où le code du 23 octobre 1976 établi par la santé publique algérienne a officiellement interdit la pratique de la médecine sans permis. Par contre les herboristes sont autorisés à la pratiquer en vertu de la section 364 du code qui a été conservé et enrichi par la loi 85-05 du 16 février 1985 relative à la protection et la promotion de la santé, qui a remplacé le code de 1976 par le ministère de santé algérienne. Le libellé général de dispositions contenues dans l'article 214 souligne l'exclusion de la médecine traditionnelle. (Karan Vasisht, 2004 )(A. ABDELGUERFI, 2003)

### **II.3 Cueillettes des plantes**

Pour pouvoir cueillir les plantes il faut disposer d'un certain nombre d'informations concernant la plante elle-même tel que :

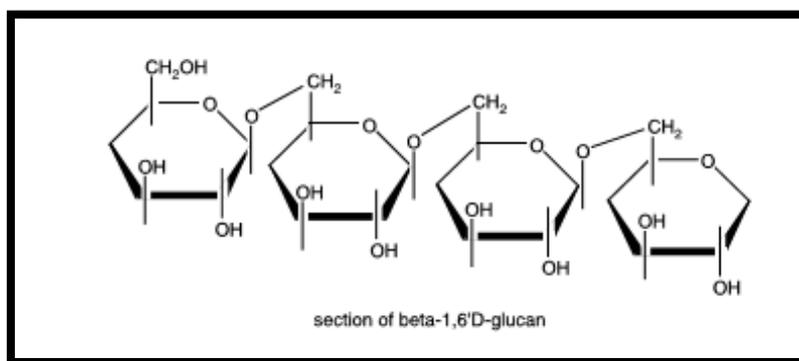
- Le lieu de la cueillette.
- le type d'espèce : si elle est sauvage ou cultivée, ou les deux.
- La poussée de la plante : si la plante pousse facilement sur le terrain, ou s'il lui faut plusieurs années pour atteindre la maturité.
- La situation géographique d'une plante : une plante poussant dans un pays à l'état sauvage n'a pas nécessairement les mêmes composants si elle pousse dans un autre pays. Ainsi que son activité biologique peut ne pas être la même. (Sofowora, 2010)

### **II.4 Composition chimique des plantes médicinales:**

Les éléments actifs contenus dans les plantes médicinales varient d'une espèce à une autre. Pour comprendre les actions de ces végétaux sur l'organisme, il est important de déterminer leurs composants. Nous citerons à titre d'exemple quelques familles de composés actifs parmi celles fréquemment rencontrés : (PENGELLY, 2006)(Hensel, 2008)

- **Mucilages :**

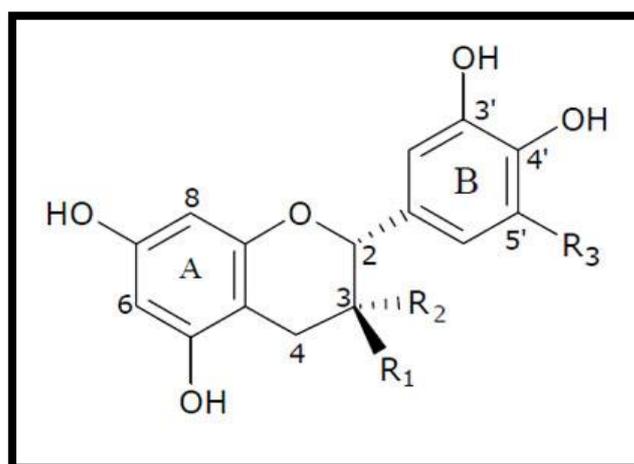
Les mucilages des plantes médicinales ont une structure chimique variée, mais contiennent toujours des molécules de glucose qui se combinent à des acides végétaux ou à d'autres substances. Ils sont tous en mesure d'absorber de grandes quantités d'eau ce qui les fait gonfler.(Hensel, 2008)



**Figure II-2 : Molécule de Mucilage (PENGELLY, 2006)**

- **Tanins :**

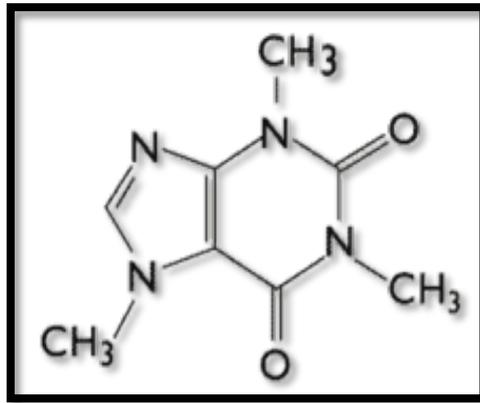
Le nom de ce groupe de substances relativement complexes provient du fait qu'elles entrent en combinaison non soluble avec les protéines animales : Le tannage transforme les peaux animales en cuir. (PENGELLY, 2006)



**Figure II-3 : Tanin (PENGELLY, 2006)**

- **Amers :**

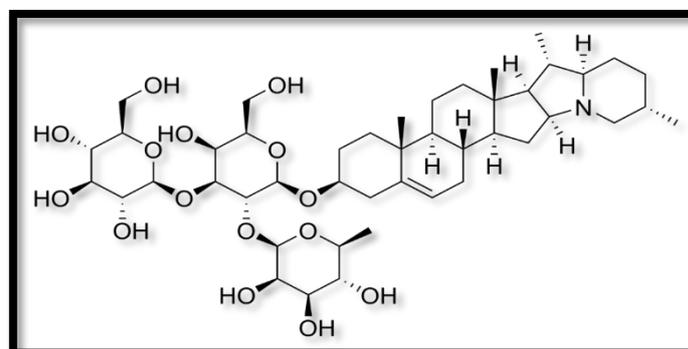
Les amers ne sont pas chimiquement uniformes, mais ont tous plus ou moins un gout amer, d'où leur nom. (Hensel, 2008)



**Figure II-4 : Amer (PENGELLY, 2006)**

- **Saponines :**

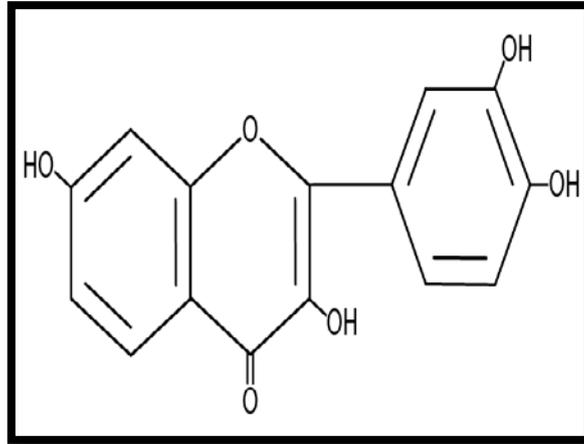
Les saponines se composent de glucides et de molécules aromatiques qui moussent dans l'eau. Les saponines sont toxiques à forte concentration car elles attaquent les membranes cellulaires. (PENGELLY, 2006)



**Figure II-5 : Saponine (PENGELLY, 2006)**

- **Flavonoïdes :**

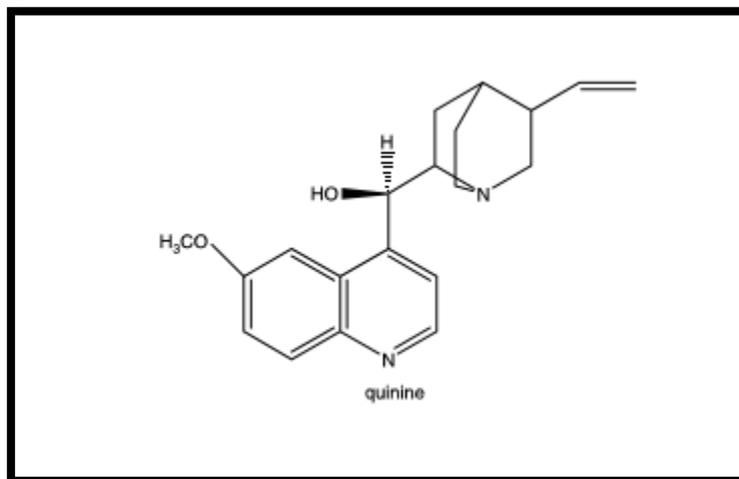
Chimiquement, il s'agit de substances de combinaison aromatiques en anneau, liées aux molécules de glucose et à d'autres molécules. (Hensel, 2008)



**Figure II-6 : Flavonoïde (PENGELLY, 2006)**

- **Alcaloïdes :**

Ce groupe de substances comprend des molécules azotées en anneau existant dans différentes compositions. On connaît plus de 7000 alcaloïdes. Ce sont des substances végétales particulièrement toxiques. La nicotine, morphine, strychnine, atropine de l'aconit font partie de ce groupe. (PENGELLY, 2006)



**Figure II-7 : Alcaloïde (PENGELLY, 2006)**

- **Alcaloïdes pyrrolizidiniques :**

Cette forme spécifique d'alcaloïdes se trouve dans plusieurs espèces de plantes, Ils faisaient partie de remèdes jusqu'à ce qu'une expérience mette en évidence leur toxicité pour le foie et leur propriétés cancérigènes. Dans certains cas, comme chez le tussilage, on cultive à présent des variétés sans alcaloïdes. (Hensel, 2008)

- **Glucosides cardiotoniques :**

En médecine, on appelle également ce groupe de substances glucosides de digitale, car il fut découvert dans la digitale. Du point de vue de la structure, les glucosides varient légèrement les uns des autres, mais tous sont basés sur une structure de stéroïdes ; « gluco » signifie que des sucres sont toujours liés à ces substances. (PENGELLY, 2006)

## **II.5 Importance des plantes:**

Les plantes médicinales font partie intégrante de la médecine ethno-vétérinaire. Depuis les temps immémoriaux, ces plantes ont été utilisées dans pratiquement toutes les cultures comme ressource de soin et de thérapie. L'utilisation de remèdes à base de plantes et préparations à base d'herbes traditionnelles est une pratique courante qui remonte à des temps aussi anciens que la bible. (Hota, 2007)

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales a été généralisée et trouve sa place même dans les sociétés industrialisées. Les extraits issus de ces plantes sont à l'origine du développement de plusieurs médicaments et soins chimio-thérapeutiques. En outre, dans ces sociétés, les remèdes à base de plantes sont devenus plus populaires dans le traitement des affections mineures, notamment à cause de l'augmentation des coûts des soins par les médicaments conventionnels. La médecine traditionnelle est très répandue dans des pays tels que la Chine, l'Inde, le Japon, le Pakistan, le Sri Lanka et la Thaïlande. En Chine, par exemple, où environ 40 % de la consommation totale de médicaments revient aux médicaments traditionnelles. Cette tendance est plus marquée au Japon où les préparations médicinales à base de plantes sont plus demandées que les produits pharmaceutiques. (Iqbal Ahmad, 2006) L'Afrique est aussi une riche source de plantes médicinales. L'espèce la plus connue est *Phytolacca dodecandra*. Les extraits de cette plante sont utilisés comme molluscicide efficace pour lutter contre la schistosomiase. (Sofowora, 2010) D'autres

exemples notables sont les *Catharanthus roseus*, qui donnent des agents anti-tumoraux tels que la vinblastine et la vincristine.(Hota, 2007)

De tout ce qui a été dit dans les paragraphes précédents, il devient clair que Les plantes médicinales constituent la base des systèmes de santé traditionnels dans de nombreux pays en voie de développement, ou mêmes quelques pays développés, comme le montre si bien l'estimation de l'Organisation mondiale de la Santé.

(Agrawal, 2009 )(Oliver Kayser, 2007 )

## II.6 Les plantes choisies :

### II.6.1 *Thymus vulgaris* :

- **Description :**

Le *thymus* appartient à la famille des lamiacées, et est également connu sous le nom de Farigoule des garrigues provençales (Debuigne, 1984)

C'est une plante ligneuse, formant souvent des coussinets. Rameaux serrés, grêles, plus ou moins dressés et velus, recouverts de feuilles opposées, effilées courtement pétiolées, glabres, mais légèrement ciliées à la base, un peu enroulées sur les bords ; limbe ponctué (vue à la loupe) ; très glanduleux, mesurant 1 à 2 cm de long de 2 à 3 cm de large.

Les feuilles florales sont peu différentes lancéolées et égalant ou dépassant les calices. Fleures rosées, en capitules terminaux avec un calice glanduleux, glabre ou légèrement velu, long de 5 à 6 mm à 2 lèvres égales. Corolle dépassant de très peu le calice, bilabée, à lobe médian plus grand. (BELOUED, 2005)

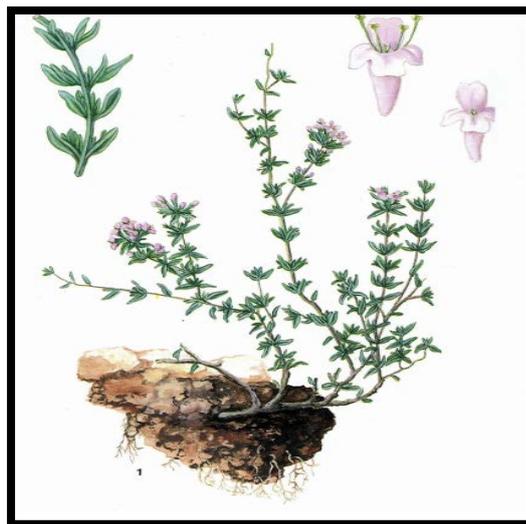
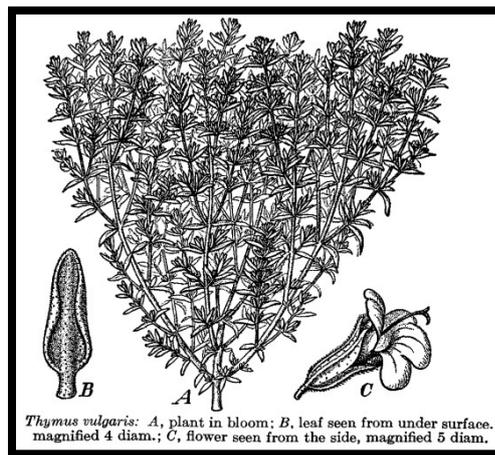


Figure II-8 : plante de *Thymus vulgaris*[7]

- **Historique :**

L'origine "thymus" décrit un groupe de plantes aromatiques avec des aspects similaires qui ont été utilisés comme des stimulants de fonctions vitales. Beaucoup de noms populaires dans les langues romanes sont dérivées du nom latin de la plante.

(Elisabeth Stahl-Biskup, 2002 )



**Figure II-9 : le *Thymus* [8]**

- **Habitat :**

Cette plante spontanée pousse abondamment dans les lieux arides, caillouteux et ensoleillés, des bordes de mer à la montagne. (C. PERROTI, 1999)

En l'Algérie : Pelouses et rocailles des régions montagneuses du tell. Rare ailleurs.  
Floraison : Avril- Juin. (BELOUED, 2005)



**Figure II-10 : état de *Thymus* dans la nature [9,10]**

- **Composition chimique**

Le thymus contient des huiles essentielles dont les principales composantes sont le thymol et carvacrol, des tanins, des principes amers, des saponines et des antiseptiques végétaux. (BELOUED, 2005)

- **Propriétés thérapeutiques :**

Le thymus est un amer astringent, stomachique, diaphorétique, antispasmodique et stimulant. Ces propriétés sont utilisées pour soigner les infections pulmonaires. Il est spasmolytique et calme les toux quinteuses de la coqueluche et de l'emphysème.

Le thym agit sur la rhinorrhée en diminuant les sécrétions nasales. Outre son activité pulmonaire, le thym se révèle aussi efficace pour soulager les problèmes intestinaux : ballonnements et aérophagie, en association avec le charbon végétal. Son action antiseptique s'exerce également sur le système digestif et notamment en cas de diarrhée. Le thym a des vertus stimulantes et antivirales et peut à ce titre être utilisé pour prévenir les récurrences d'herpès ou de zona. (PHARMACEUTIQUES, 2007)

### ***II.6.2 Origanum majorana :***

- **Description :**

Plante herbacée vivace à tiges dressées, ramifiées, haute de 20 à 30cm. Toute la plante est velue à aspect cendré, les feuilles sont opposées, ovales, longues de 0.9cm sur 0.3cm de larges, inflorescences très rameuses et situées au sommet des tiges poussant en grappes denses pédonculées à l'aisselle des feuilles, fleurs blanches à lèvre supérieure orbiculaire et à lèvre inférieure plus ou moins bidentée, 4 étamines divergentes. Les fruits sont des tétrakènes.(BELOUED, 2005)



**Figure II-11 : *Origanum majorana* [11]**

- **Historique :**

Déjà employée comme condiment dans l'Égypte ancienne, elle était aussi utilisée par les prêtres comme remède contre les migraines et le nervosisme. Elle fut étudiée au xvii<sup>e</sup> siècle par le Danois Simon Paulli.(Debuigne, 1984). Les Grecs appelaient cette plante« la joie de la Montagne» et l'utilisaient pour faire des couronnes et des guirlandes pour les mariages et les funérailles (Kirtland Chardon Road, 2005).

- **Habitat :**

Originnaire d'Afrique du nord et d'Asie du sud-ouest, souvent cultivée comme plante aromatique, et parfois subspontanée. Sa floraison se fait durant les mois de Juin et Juillet. (Hensel, 2008)(BELOUED, 2005)



**Figure II-12 : l'état de la marjolaine dans la nature [12]**

- **Composition chimique :**

La marjolaine contient des tanins, un principe amer, du pentosane, 0.3 à 0.4 % à l'état frais, et 0.7 à 0.8 % à l'état sec, une essence jaunâtre aromatique à saveur chaude qui constituée d'un mélange de terpinéol, de terpinène, de sabinène, avec des traces de sesquiterpènes. (BELOUED, 2005)

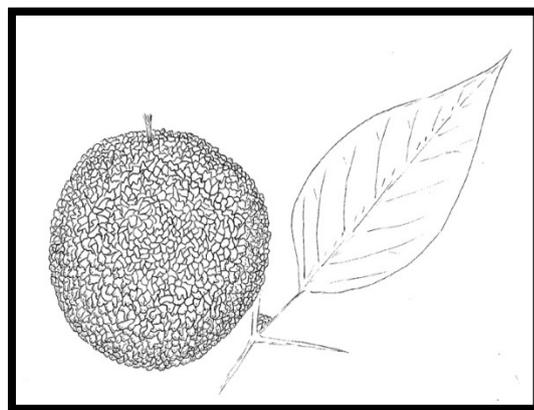
- **Propriétés thérapeutiques :**

Analgésique, antidépresseur, antifongique, anti-infectieux, anti-inflammatoire, antioxydant, antispasmodique, antiseptique, antiviral, stabilisateur de la tension artérielle, calmant, stimulant digestif, désinfectant, expectorant, mucolytique, neurotonique, favorise le péristaltisme intestinal, stimulant, vasodilatateur. De toutes ces propriétés, celle qui nous intéresse le plus dans notre travail est son action antiseptique. (Lawton, 2012)

### ***II.6.3 Maclura pomifera :***

- **Description :**

Le nom de cet arbre vient de William *Maclure* (1763- 1840) un géologue américain, et *pomifera* qui signifie «fruitière» pour les gros fruits qu'il produit sur les arbres femelles. Il est plus communément appelé *Oranger des Osages*, C'est un arbre de petite à moyenne taille 12 à 13m, avec une écorce profondément fissurée et des branches épineuses. Le tronc est généralement court et se divise en plusieurs branches importantes avec des branches arquées vers le haut. Le système racinaire est diffusé et couvre de grandes surfaces avec une propagation latérale. Les feuilles sont caduques, simples et alternes ou sont en grappes à la fin d'éperons courts. Leur forme varie de larges ovales à ovales-lancéolées. Les feuilles ont une taille de 2 à 5cm de long et de 0,75 à 2,5 cm en de large et ont des marges entières. Le limbe des feuilles sont vert foncé, lisse et cireuse sur le dessus ; vert plus pâle avec quelques poils sur la face inférieure. La couleur vire au jaune translucide à l'automne.(Mohamed Z.M. Salem, 2013)



**Figure II-13 : Fruit et feuille de *Maclura pomifera*[13]**

- **Histoire de la plante :**

Découvert en 1817, cultivé aux États-Unis, et exporté en Europe au **17<sup>ème</sup> siècle** par les Européens en amont du Mississipi, cet arbre moyen (jusqu'à 12 m) était déjà connu des indiens Osages, natifs de ce territoire.(Wynia, 2011)

- **Habitat:**

Très répandu sur une zone limitée de l'Amérique du Nord couvrant le Texas, l'Arkansas et l'Oklahoma, en Asie (Turquie et l'Inde) ainsi qu'en Afrique du nord, l'Égypte et l'Algérie. Le climat méditerranéen lui convient parfaitement et il s'y développe facilement (Mohamed Z.M. Salem, 2013)



**Figure II-14 : L'abondance des *Maclura* dans la nature [14,15]**

- **Composition chimique:**

La graine de *Maclura pomifera* a pour composition massique moyenne 6% d'humidité, 7% de cendres, 21% de glucides et de protéines brutes. Sa teneur en matière grasse rapportée à sa masse sèche est d'environ 33%. Cependant, le rendement en huile reste étroitement lié à la région où cette plante est cultivée. La composition minérale du *Maclura pomifera* a été étudiée par d'innombrables travaux, ses graines se sont avérées très riches en potassium, suivi par ordre décroissant de calcium, magnésium, phosphore, sodium, fer, zinc et cuivre. (Fatnassi Saloua, 2009)

- **Propriétés thérapeutiques :**

Le fruit n'est pas comestible à cause de son amertume. Les Indiens de la tribu des *Osages* (apparentée aux Sioux) se servaient du latex laiteux contenu dans le fruit (et dans les autres organes) pour se peindre le visage et teindre leurs vêtements. En effet, au contact de l'air, le latex jaunit (Douglas M.Griffith, 2003)

En Europe de l'Est, la médecine traditionnelle l'utilise contre les rhumatismes, pour la cicatrisation des blessures ou encore en tant qu'antibiotique, ainsi que pour stimuler l'activité cardiaque. [11]

**Conclusion :**

De nos jours, on peut facilement se procurer des préparations à base de plantes en pharmacies ou acheter ces dernières chez un herboriste.

Cependant, leur utilisation nécessite une extraction des biomolécules actives possédant cet effet guérisseur que nous détaillons dans le prochain chapitre.

*Chapitre 3 :*

*Extraction des plantes*

### **III Extraction des plantes :**

#### **III.1 Définition de l'extraction :**

L'extraction, est la séparation de la portion active des plantes de sa portion inerte par des techniques utilisant des solvants sélectifs. De nombreuses techniques d'extractions existent tel que l'infusion, la décoction, la macération, l'hydrodistillation, l'extraction par solvant (soxhlet) et par fluide supercritique. Après extraction on obtient un produit liquide impure, semi-solide et/ou une poudre. (Jean LEYBROS, 1990)

Le but de ces techniques est d'extraire les portions actives des plantes qui se constituent des biomolécules possédant une activité. (Sukhdev Swami Handa, 2008)

#### **III.2 Mécanisme d'extraction solide-liquide :**

Dans le cas typique de l'extraction des matières végétales, le soluté est localisé dans des cellules végétales à parois relativement peu perméables. L'extraction de ces matières, est un processus assez complexe, basé sur le phénomène de transfert de matière.

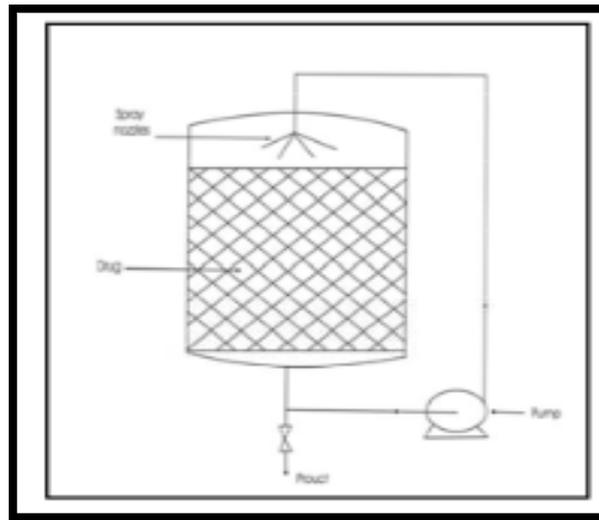
Ce processus peut être résumé en quatre étapes (Trambouz P, 1975):

- Pénétration du solvant dans le solide.
- Dissolution du soluté dans le solvant.
- Transfert de la solution obtenue vers l'interface solide-liquide.
- Diffusion du soluté contenu dans la solution au contact du solide vers la masse restante du solvant.

#### **III.3 Quelques techniques d'extraction :**

##### **III.3.1. La macération :**

La macération est un procédé d'extraction qui est basé essentiellement sur le trempage de la masse végétale réduite en poudre dans un solvant, qui est la plupart du temps organique. Cette masse est mise dans un récipient fermé, à une température ambiante lorsque il s'agit de l'extraction des composants thermolabiles, et mise sous agitation. Après cette étape d'extraction l'extrait est filtré, et une autre étape d'extraction peut intervenir. Cette technique nécessite souvent des temps d'extraction longs qui peuvent aller de plusieurs heures jusqu'à plusieurs jours (Sukhdev Swami Handa, 2008).



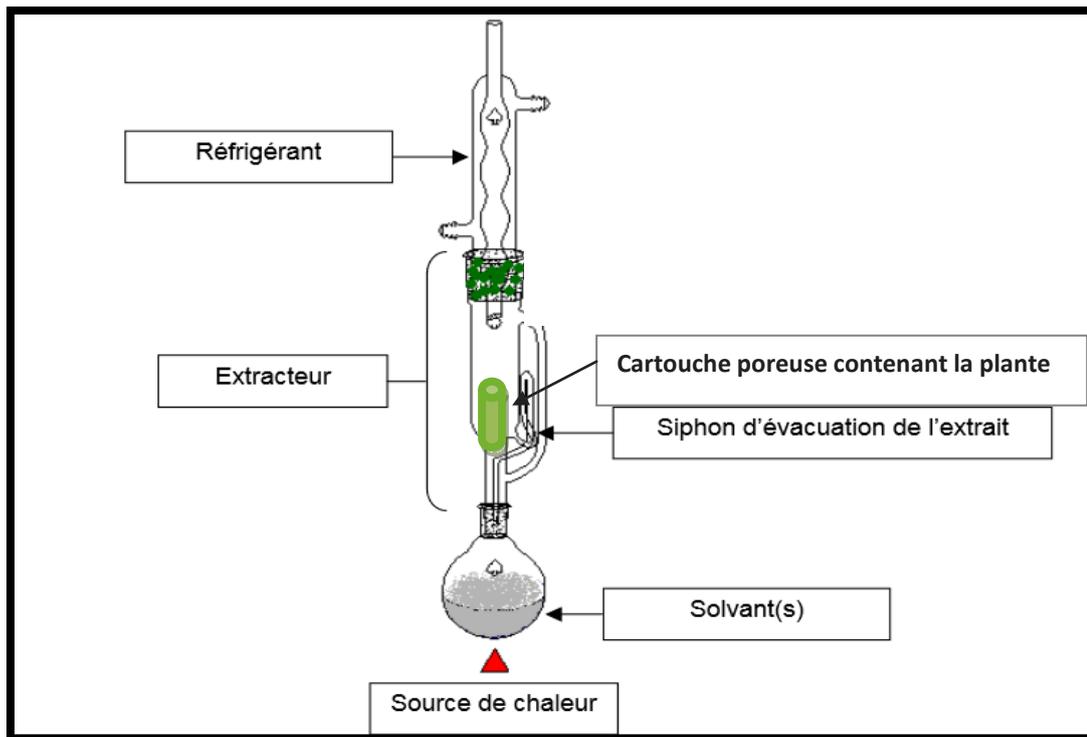
**Figure III-1 : procédé de macération [16]**

### **III.3.1 Extraction par Soxhlet :**

L'extraction par Soxhlet est une des méthodes les plus utilisées en raison de ses performances élevées. C'est une méthode de référence contrairement aux autres techniques d'extraction solide-liquide ou les nouvelles méthodes non conventionnelles.

(Lijun Wang, 2006)

La plante à extraire est placée dans un porte-dé (cartouche en silicium) poreux à l'intérieur du soxhlet. Un ballon contenant le solvant est placé au-dessous du soxhlet, et au-dessus de ce dernier se trouve un réfrigérant. Lorsqu'une chaleur est appliquée au ballon, le solvant s'évapore, il sera ensuite condensé dans le réfrigérant et coulera dans la cartouche. Le contact entre le solvant et la matière végétale entrainera une diffusion de molécules de la phase solide (la plante) vers la phase liquide (solvant). Dès que le niveau du solvant à l'intérieur du soxhlet atteint le siphon il retournera de nouveau dans le ballon et un nouveau cycle d'extraction sera amorcé. L'extraction se fait en continue et l'extrait obtenu est plus concentré que celui des autres techniques d'extraction par solvants. (Lijun Wang, 2006)



**Figure III-2 : L'appareillage expérimental de l'extraction par Soxhlet [17]**

Cette technique a plus d'avantages que d'inconvénients. Le solvant est mis en contact avec la matière solide à plusieurs reprises, ce qui améliore la performance d'extraction. Aussi, cette technique n'exige pas un passage par une filtration vu que la matière végétale est contenue dans une cartouche et n'est pas directement en contact avec le solvant.

(Temilola Oluseyi, 2011)

### **III.4 Les paramètres influant sur l'extraction :**

De nombreux paramètres peuvent avoir une grande influence sur le procédé d'extraction et ses performances, les plus importants sont : (Sukhdev Swami Handa, 2008)

**i) Le matériel végétal :**

- 1) L'authentification du matériel végétal doit être faite avant de procéder à l'extraction. Tout corps étranger doit être complètement éliminé. La plante doit également passer par une étape de contrôle de qualité et son âge ainsi que la saison et lieu de la collecte doivent être enregistrés.

- 2) La plante doit être séchée dans des conditions convenables qui dépendent largement de la nature de ses constituants chimiques.
- 3) Les méthodes de broyage doivent être précisées et les techniques qui génèrent de la chaleur doivent être évitées autant que possible.
- 4) Matériel végétal en poudre doit être passé à travers des tamis appropriés pour obtenir des particules de taille uniforme.

**ii) Nature des constituants :**

- 1) La nature du solvant dépend des molécules à extraire. Les solvants polaires sont utilisés pour extraire les molécules polaires et les solvants apolaires pour les molécules apolaires. Par exemple l'hexane qui est un solvant apolaire est généralement utilisé pour extraire les quinones présentes dans les plantes et le méthanol qui est un solvant polaire s'utilise pour l'extraction des constituants actifs tels les glycosides.
- 2) Pour les constituants thermolabiles il est préférable d'utiliser les techniques d'extraction à froid tel que la macération. Pour les constituants thermostables il vaut utiliser une technique à chaud comme l'extraction par Soxhlet à condition que le solvant utilisé soit non aqueux.
- 3) En cas d'extraction à chaud, les températures plus élevées que celles requises doivent être évitées. Certains glycosides sont susceptibles de se dégrader lors d'une exposition continue à des températures supérieures.
- 4) L'optimisation des temps d'extraction est importante.
- 5) Si le temps d'extraction est trop long, il existe un risque d'extraction de constituants indésirables.
- 6) Le nombre d'extractions nécessaires à l'extraction complète est aussi important que la durée de chaque extraction.

**iii) La qualité de l'eau ou du solvant utilisé doit être indiqué et contrôlée.**

**iv) Les procédures de concentration doivent assurer la stabilité des constituants actifs.**  
Une concentration sous pression réduite (par exemple en utilisant un Rotavapeur) est souvent préférée.

**v) La conception et le matériau de fabrication de l'extracteur sont également à prendre en considération.**

### **III.5 Les facteurs influençant l'extraction :**

Les phénomènes de transfert de soluté dans le solide, en l'occurrence la matière végétale, sont influencés par plusieurs facteurs qui interviennent de manière plus ou moins significative sur les performances de l'extraction, à savoir la vitesse d'extraction, la concentration de l'extrait et le rendement d'extraction. Nous pouvons citer : le type de solvant, le rapport de solvant à la matière végétale, la température, le temps et la structure de la matière (par exemple : taille des particules, organe végétal). (A. B. Golovanchikov t, 1998)

#### **III.5.1 Influence du solvant et du pH :**

L'extraction par solvant des composés phytochimiques dépend de la dissolution de chaque composé de la matière végétale et de leurs diffusions dans le solvant externe, ce qui nécessite un bon choix de solvant (Elias Kiassos, 2009). Le choix du solvant se fait selon :(CISSE, 2010) ( (Rachel, 2007)

- Sélectivité
- Température d'ébullition peu élevée
- Grande capacité de dissolution
- Faible viscosité.
- Sécurité de manipulation (point d'éclair, inflammabilité, toxicité).
- Bas prix et possibilité de recyclage.

Les solvants les plus utilisés sont l'eau, les alcools (méthanol, éthanol), les hydrocarbures (hexane), le CO<sub>2</sub> supercritique. (S Sasidharan, 2011). Certains solvants organiques tel que le méthanol sont efficaces pour l'extraction des composés phytochimiques à partir d'une matière végétale, et offrent des rendements élevés mais vu leur toxicité il est préférable de les remplacer par l'eau, l'éthanol, ou un mélange des deux.(Chew, 2011).

Le pH du solvant d'extraction peut être modifié pour améliorer l'extraction de certains composés bioactifs végétaux de manière sélective. En effets, la solubilité de certains composés dépend du pH. Pour l'eau, il peut jouer un rôle dans la solubilisation de la fraction hydrolysable. Il agit également sur les hydrolyses chimiques et enzymatiques (B.K. Tiwari, 2013).

### **III.5.2 Température :**

La température d'extraction influe sur la diffusion des composés phytochimique de la matière végétale, une température plus élevée augmente la vitesse de diffusion et réduit le temps d'extraction, mais cela peut provoquer une augmentation de la concentration de certaines molécules indésirables dans l'extrait. Une température trop élevée peut entraîner la décomposition des constituants cellulaires et ainsi libération des produits phytochimiques, comme elle peut inhiber l'activité enzymatique. En pratique la température généralement utilisée pour l'extraction dépend de la température d'ébullition du solvant choisi. (Philippe Evon, 2012)

### **III.5.3 Le temps d'extraction :**

Le temps d'extraction des composés phytochimiques à partir des plantes médicinales nécessaire pour effectuer une extraction complète varie en fonction de l'espèce végétale la taille des particules de la matière et l'organe de la plante (R. Wongkittipong, 2004).

### **III.5.4 La taille des particules :**

Le matériel végétal peut subir un broyage ou concassage avant l'extraction pour réduire la taille des particules car plus la taille des particules est petite, plus la surface de contact entre le solvant et la matière végétale est grande. Mais ceci n'aura pas une grande influence sur l'extraction par soxhlet. Ceci a été confirmé en comparant plusieurs concentrations finales après extraction à partir de particules de différents diamètres. Pour les autres techniques, l'inconvénient du broyage ou concassage des plantes avant l'extraction est que les fines particules peuvent bloquer les filtres plus rapidement que les particules plus grosses, ce qui pourrait éventuellement entraîner le gaspillage de l'extrait et augmentation du temps d'extraction (B.K. Tiwari, 2013).

### **III.5.5 L'agitation du fluide :**

L'agitation du solvant en contact avec le solide influe sur la performance de l'extraction solide-liquide. Une agitation continue favorise les chocs entre les différentes particules. Ceci va provoquer l'éclatement de certaines cellules qui vont libérer alors leur contenu cellulaire dans le solvant. (CISSE, 2010).

L'agitation mécanique des particules dans le solvant permet le maintien des particules en suspension et permet d'assurer l'homogénéité du milieu, ce qui a un effet toujours favorable sur l'opération (CISSE, 2010).

### **III.5.6 Le taux de l'humidité du solide :**

Lors de l'utilisation des solvants hydrophobes, la présence d'eau dans la matière végétale peut freiner la pénétration du solvant dans la cellule ce qui aura pour conséquence le ralentissement du processus d'extraction (Rachel, 2007).

### **III.6 Limites des techniques d'extraction :**

Les performances des techniques classiques de l'extraction solide-liquide dépendent de la quantité de solvant utilisée et de la température. De nombreux inconvénients sont rencontrés tel que l'augmentation du temps d'extraction et la dégradation des molécules phytochimiques à cause de la chaleur. Ces inconvénients sont détaillés dans les parties qui suivent : (B.K. Tiwari, 2013)

#### **III.6.1 Le solvant**

Le choix du solvant est très important pour les techniques classiques d'extraction. Le nombre réduit de solvants qui peuvent être utilisées signifie que certains composés bioactifs peuvent ne pas être solubles dans le système solvant choisi. Certaines méthodes classiques utilisent de grandes quantités de solvants organiques lors de l'extraction (par exemple la macération), ce qui est ni écologique ni toujours rentable économiquement.

(B.K. Tiwari, 2013)

#### **III.6.2 Température**

Des températures élevées pour des temps d'extraction longs ne sont pas toujours appropriés. Une distillation à la vapeur peut également se traduire par une dégradation des molécules volatiles bioactives lors de l'extraction des huiles essentielles. Avant de choisir les conditions d'extraction d'un bioactif d'intérêt on doit les évaluer afin de s'assurer de la stabilité thermique de ce dernier. Si le bioactif est sensible à la chaleur, il est nécessaire de l'extraire à des températures plus basses pour une plus longue période de temps ou en utilisant un procédé non conventionnel. (B.K. Tiwari, 2013)

## **Conclusion**

Lors de l'utilisation des méthodes d'extraction conventionnelles en variant les facteurs qui influent sur l'extraction, une large gamme de composés phytochimiques peut être extraite. Toutefois, l'optimisation des paramètres d'extraction dépend des produits phytochimiques désirés, ainsi que de l'espèce et l'organe de la plante utilisés.

*Chapitre 4 :*

*Matériels et Méthodes*

## IV Matériels et méthodes :

### IV.1 Introduction :

Afin d'étudier l'effet des différents extraits sur la croissance de trois espèces bactériennes différentes, nous avons suivi la méthodologie suivante :

- Extraction
- Concentration de l'extrait
- Évaluation de l'effet antimicrobien

Dans ce chapitre nous allons détailler le protocole expérimental suivi et décrire le matériel qui a été utilisé lors des expérimentations (équipement de laboratoire et matériel biologique).

### IV.2 Matériel végétal :

#### IV.2.1 *Thymus vulgaris* et *Origanum majorana*:

- Les feuilles de *Thymus vulgaris* et d'*Origanum majorana* séchées et broyées ont été achetées dans le commerce ;
- Les feuilles ont été rincées à l'eau distillée afin d'éliminer toutes les impuretés présentes ;
- Elles ont ensuite été séchées dans une étuve à une température de 50°C pendant 24h.



Figure IV-1 : *Origanum majorana*



Figure IV-2 : *Thymus vulgaris*

#### ***IV.2.2 Maclura pomifera :***

Les feuilles de *Maclura pomifera* ont été cueillies à l'École Nationale Polytechnique d'Alger, elles ont été rincées à l'eau distillée avant d'être séchées à l'étuve à 50°C pendant 24h. Elles ont ensuite été broyées en particules très fines pour faciliter l'extraction.



**Figure IV-3 :*Maclura pomifera***

### **IV.3 Matériels et solvants utilisés pour les extractions :**

#### **IV.3.1 Matériel :**

- Chauffe ballon (Wisd) a été utilisé pour chauffer et réguler la température pendant l'extraction.
- Une étuve (memmert) réglée à 50°C pour le séchage des plantes
- Une étuve (nüve) équipée d'un agitateur réglé à 30°C pour la macération des plantes
- Une balance de précision (OHAUS) pour les différentes pesées.
- Un rotavapeur (Heidolph) pour la concentration des extraits à une pression réduite.

#### **IV.3.2 Verrerie :**

**La verrerie qu'on a utilisée pour l'extraction est :**

- Soxhlet de 150 mL (SHUNIU GG-17).
- Réfrigérant pour condenser le solvant (SHUNIU GG-17)
- un ballon de 250 mL (SHUNIU GG-17)

### IV.3.3 Solvants :

Les solvants utilisés pour réaliser nos extractions sont cités dans le tableau suivant :

**Tableau IV-1 : Caractéristiques des solvants utilisés lors de l'extraction**

Caractéristiques	Hexane	Chloroforme	Éthanol	Eau
Formule brute	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	CHCl <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	H <sub>2</sub> O
Masse moléculaire (g/mol)	86,2	119,38	46,07	18,0153
d <sup>20</sup>	0,66	1,479	0,789	0,997 05
Température de fusion (°C)	-95,3	-63,5	-114	0
Température d'ébullition (°C)	68,7	61,2	78.37	100
Température d'auto inflammation	-26	/	363	/
Indice de réfraction à 20 (°C)	1,37	1,45	1,3594	1,3325
Pureté (%)	99,9	99,9	99,8	

Tous les solvants ont été prélevés sous une hotte pour des raisons de sécurité.

### IV.4 Matériel pour l'analyse antibactérienne :

#### IV.4.1 Les souches utilisées :

Les souches bactériennes utilisées sont des souches de référence obtenues auprès de l'AmericanType Culture Collection (ATCC).

Pour notre étude, les souches utilisées sont : *Escherichia coli* (ATCC25922) : *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853)

Toutes ces souches ainsi que la gélose nutritive ont été aimablement fournies par le Laboratoire des milieux des cultures de l'Institut Pasteur *Mohamed, Belouizdad*, Daira Hussein Dey, Alger.

#### **IV.4.2 Matériel utilisé :**

Pour effectuer les analyses antimicrobiennes nous avons utilisé :

- Bain marie (memmert) pour faire fondre les milieux de culture.
- Autoclave (nüve) pour la stérilisation du matériel.
- Étuve (SELECTA) réglée à 37°C pour l'incubation des boîtes de pétri
- Bec Bunsen pour assurer la stérilité de la zone de travail.
- Des boîtes de pétries.
- Pipettes pasteurs.
- Pince en inox
- papiers Whatman pour les disques de l'antibiogramme.
- Toutes les manipulations ont été réalisées sous une hotte microbiologique (telSTAR mini-V/PCR) préalablement stérilisée par UV.

#### **IV.5 Préparation des extraits :**

##### **IV.5.1 Extraction par soxhlet :**

La matière végétale pesée a été placée dans une cartouche en cellulose. Cette dernière a ensuite été déposée dans un extracteur de type soxhlet, équipé à sa base d'un ballon de 250 ml dans lequel se trouve le solvant.

Le ballon a été chauffé avec un chauffe-ballon, et un réfrigèrent permettait de condenser les vapeurs de solvant.



**Figure IV-4 : Dispositif d'extraction par soxhlet**

Le tableau ci-dessous résume les quantités de matière végétale et de solvant utilisées, ainsi que les conditions opératoires pour chaque plante.

**Tableau IV-2 : Tableau récapitulatif des procédés d'extraction par soxhlet**

Technique utilisée	La plante	Solvant	V <sub>solvant</sub> (mL)	t <sub>extraction</sub> (h)	m <sub>plante</sub> (g)	T (°C)
Soxhlet	<i>Thymus Vulgaris</i>	Hexane	175	4.00	6.40	80
		Éthanol	175	4.00	6.46	90
		Chloroforme	175	4.00	6.40	70
	<i>OriganumMajorana</i>	Hexane	200	6.00	8.57	90
		Éthanol	200	5.00	6.84	90
		Chloroforme	175	5,50	7.18	65
	<i>MacluraPomiféra</i>	Hexane	150	4,45	10.00	80
		Éthanol	150	5,70	10.00	85
		Chloroforme	150	3,85	10.00	65

#### IV.5.1.1 .Concentration des extraits :

Les extraits obtenus ont été concentrés à l'aide d'un rotavapeur. Ce dernier, possède une pompe d'aspiration qui permet de réduire la pression, ce qui provoque une réduction de la température d'ébullition des solvants.

L'extrait concentré est obtenu par sa séparation du solvant. Les extraits concentrés ont ensuite été conservés à l'obscurité à 4°C.



**Figure IV-5 : Concentration de l'extrait par un rotavapeur**

Le tableau ci-dessous résume les conditions opératoires qu'on a utilisées pour la concentration sous pression.

**Tableau IV-3 : les conditions opératoires de la concentration**

Technique utilisée	La plante	E <sub>solvant</sub>	t <sub>concentration</sub> (min)	P <sub>sous-vide</sub> (mbar)	Nbr de rot/min	T (°C)
Rtavapeur	<i>Thymus Vulgaris</i>	E <sub>Hexane</sub>	30	500	55	53
		E <sub>Ethanol</sub>	120	500	40	70
		E <sub>Chloroforme</sub>	60	500	50	45
	<i>OriganumMajorana</i>	E <sub>Hexane</sub>	15	500	70	55
		E <sub>Ethanol</sub>	45	500	70	70
		E <sub>Chloroforme</sub>	30	500	50	45
	<i>MacluraPomifera</i>	E <sub>Hexane</sub>	60	500	70	55
		E <sub>Ethanol</sub>	45	500	70	69
		E <sub>Chloroforme</sub>	60	500	70	45

## V.2. Extraction par macération :

La macération des plantes est réalisée à 30°C dans une étuve équipée d'un agitateur orbital qui tournait à une vitesse de 114 tours par minute, et ce, pour assurer l'homogénéité de la solution qui contient la matière végétale

La matière végétale est placée dans un Erlen-Meyer de 500 mL contenant 400 ml d'eau distillée.

A la fin de la macération, les extraits étaient filtrés et mis ensuite dans des tubes à essais stériles puis conservés à 4°C.



Figure IV-6 : macération des *MacluraPomiféra*

Les quantités utilisées ainsi que les conditions opératoires fixées lors de la macération sont résumées dans le tableau suivant :

**Tableau IV-4 : Tableau récapitulatif des procédés d'extraction par macération**

<b>Technique utilisée</b>	<b>La plante</b>	<b>Solvant</b>	<b>V<sub>solvant</sub> (mL)</b>	<b>t<sub>extraction</sub> (h)</b>	<b>m<sub>plante</sub> (g)</b>	<b>T (°C)</b>
<b>Macération</b>	<i>Thymus Vulgaris</i>	Eau	400	144	7	30
	<i>Origanum Majorana</i>	Eau	400	144	7	30
	<i>Maclura Pomifera</i>	Eau	400	144	10	30

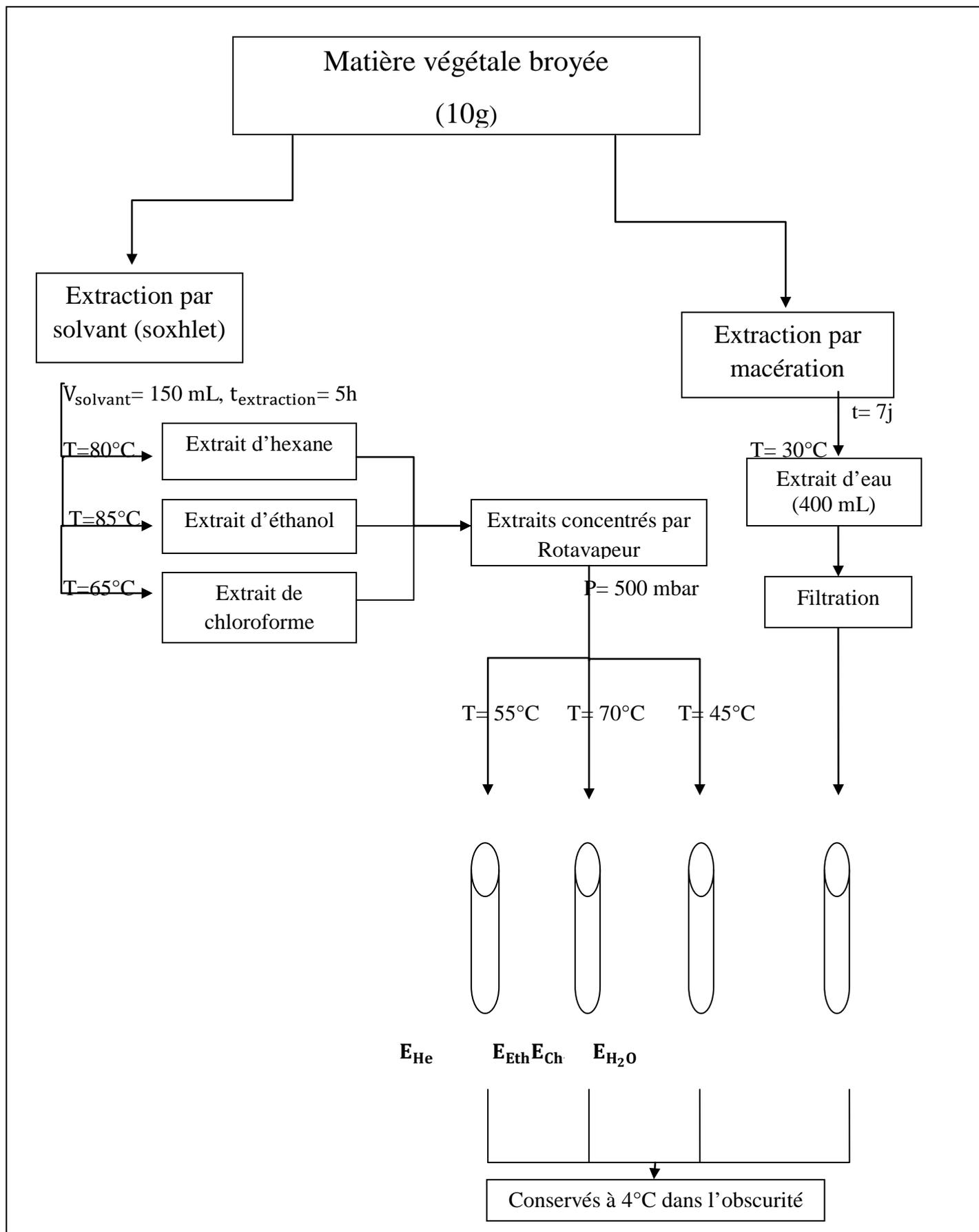


Figure IV-7 : procédé d'extraction des *Maclura pomifera*

#### IV.6 L'étude de l'activité antibactérienne :

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de plantes, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode de Kirby-Bauer), qui est une méthode semi-quantitative qui permet de déterminer la sensibilité des espèces bactériennes et ce à partir d'une plage d'inhibition qui apparaît autour d'un disque de papier whatmann imbibé de l'extrait.

##### Principe de la méthode :

- La réalisation d'un antibiogramme consiste en la recherche de la sensibilité d'une bactérie à un certain nombre d'antibiotiques.
- Parmi les différentes méthodes d'évaluation de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques, celle dites de diffusion en milieu gélosé s'avère la plus utilisée pour réalisation d'un antibiogramme. Cela consiste à placer un disque de papier imprégné d'antibiotique sur la gélose inoculée au préalable. L'antibiotique s'humidifie puis diffuse dans le milieu en provoquant un gradient de concentration décroissant autour du disque. Nous pouvons schématiser tout ce processus comme suit :

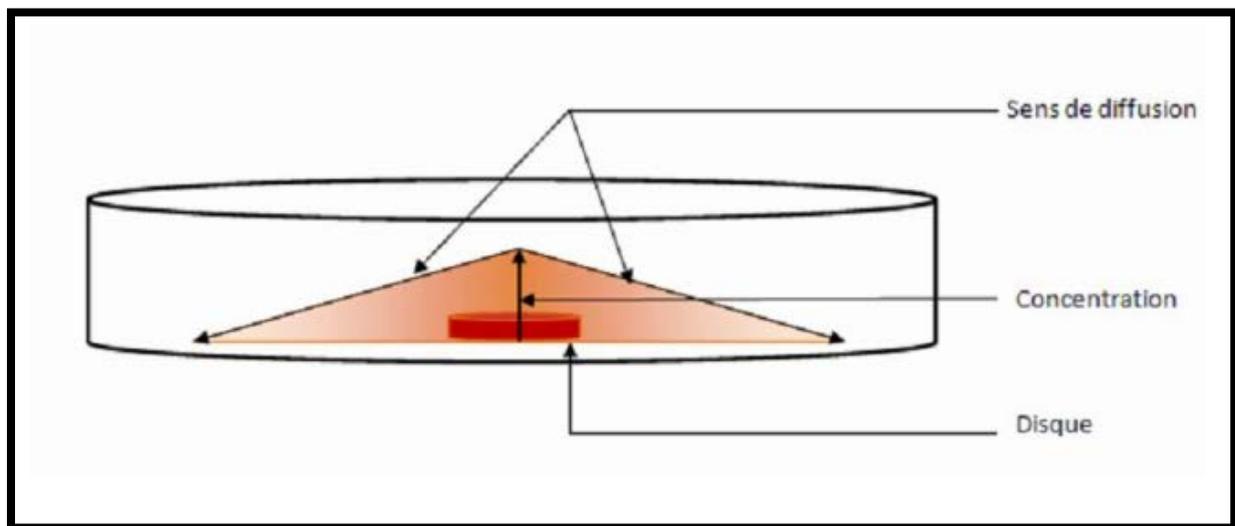


Figure IV-8 : Schématisation de la mise en œuvre d'un antibiogramme

**Le protocole que nous avons adopté est le suivant :**

- Des disques de papier filtres stériles Whatmann de 6 millimètres de diamètre sont imprégnés de différentes solutions des extraits préalablement.
- Des boîtes de pétri contenant une gélose Mueller-Hinton sontensemencées par les différentes souches bactériennes.



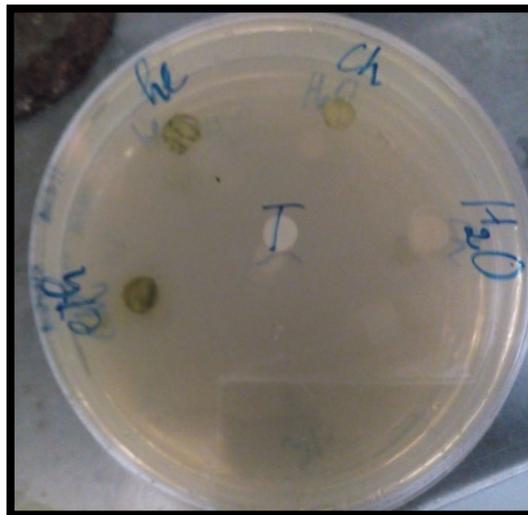
**Figure IV-9 : les disques imprégnés de solutions d'extraits**

- ❖ À l'aide d'une pince stérile les disques sont déposés à la surface du milieuensemencé (étalé).



**Figure IV-10 : dépôts des disques dans les milieux ensemencés par une souche**

- ❖ Les boîtes sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37 °C.



**Figure IV-11 : Boîtes inoculées**

- ❖ Après l'incubation l'effet des extraits se traduit par l'apparition autour des disques d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance (dans le cas où l'extrait possède une activité antibactérienne). Le diamètre de cette zone d'inhibition est mesuré. Plus ce dernier est grand plus la souche est sensible.

- ❖ Les tests ont été répétés trois fois, des disques imprégnés des solvants seuls et d'eau stérile sont aussi utilisés et servent de témoins.

*Chapitre 5 :*

*Résultats et Discussion*

## **V Résultats et discussion**

### **V.1 Étude de l'activité antibactérienne :**

Notre étude a porté sur l'évaluation de l'effet antibactérien de différents extraits de *Thymus vulgaris*, *Origanum majorana* et *Maclura pomifera*. Le test de sensibilité a été effectué par la méthode de diffusion des disques (méthode de Kirby-Bauer) et les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés.

Au terme de ces tests nous classons les plantes suivant leur richesse en biomolécules possédant des agents antibactériens et selon la sensibilité des différentes souches bactériennes.

### **V.2 Méthode de mesure :**

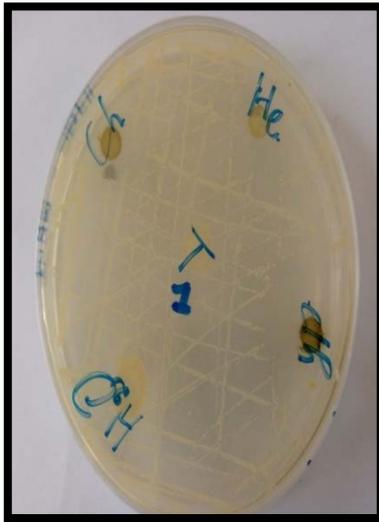
Afin de minimiser les erreurs expérimentales et de se rapprocher beaucoup plus des valeurs significatives, nous avons examiné, trois fois, la sensibilité de chaque souche vis-à-vis des différents extraits issus de plantes utilisées. La moyenne des trois diamètres d'inhibition obtenus lors des 3 essais et l'écart type de chaque série de mesure ont été calculé en vue d'évaluer la dispersion des valeurs expérimentales.

### **V.3 Effets des différents extraits :**

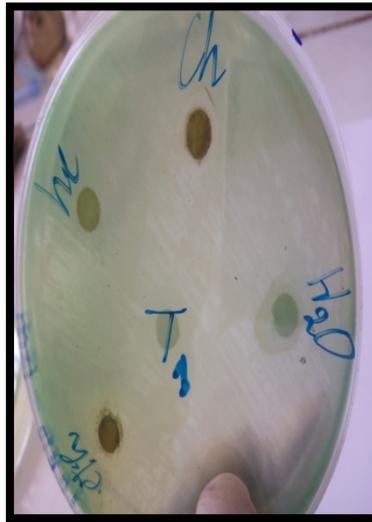
L'antibiogramme consiste à chercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques, les figures ainsi que les tableaux ci-dessous rapportent les valeurs en mm des zones d'inhibition observées après mise en contact des extraits avec les différentes souches étudiées.

### V.3.1 Résultats de l'activité antimicrobienne des différents extraits :

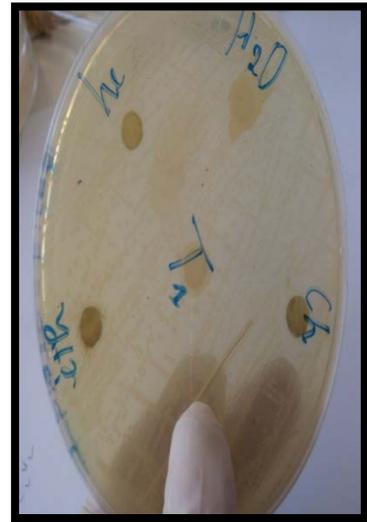
- *Thymus vulgaris* :



*Staphylococcus aureus*



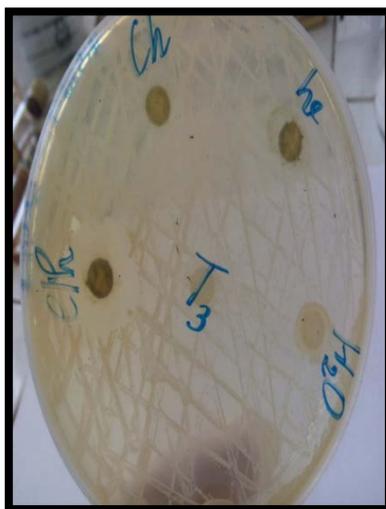
*Pseudomonas aeruginosa*



*Escherichia coli*

**Figure V-1 : Effet antibactérien de *Thymus vulgaris***

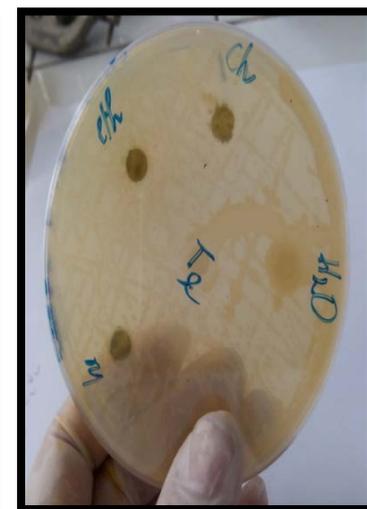
- *Origanum majorana* :



*Staphylococcus aureus*



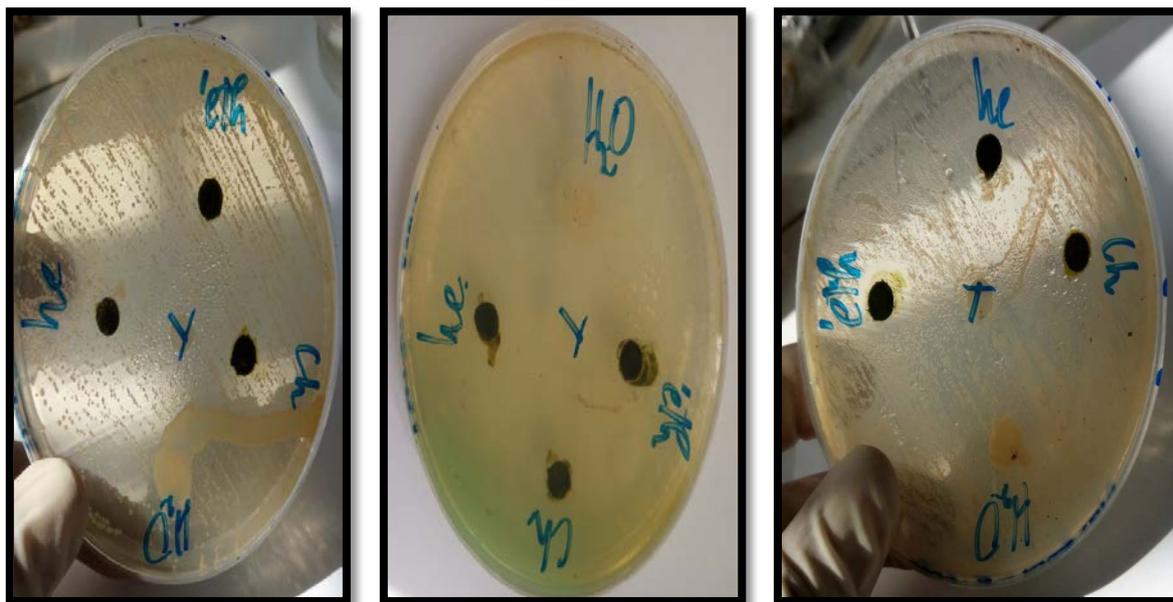
*Pseudomonas aeruginosa*



*Escherichia coli*

**Figure V-2 : Effet antibactérien d'*Origanum majorana***

- *Maclura pomifera* :



*Staphylococcus aureus*

*Pseudomonas aeruginosa*

*Escherichia coli*

**Figure V-3 : Effet antibactérien de *Maclura pomifera***

Ces photographies ont été prises lors de la mesure des diamètres des zones d'inhibition après 48h de croissance bactérienne à 37°C. Les bactéries se développent à la surface milieu de cultures, et leurs sensibilités se caractérisent par l'apparition d'une zone d'inhibition transparente autour des disques porteurs des différents extraits.

Les figures V.1, V.2 et V.3 montrent les zones d'inhibition autour des disques imbibés d'extraits de plantes. On peut en déduire que les plantes utilisées contiennent des agents antibactériens qui inhibent la croissance bactérienne. Cette inhibition diffère d'un extrait à un autre et d'une bactérie à une autre, cela dépend de la nature du solvant utilisé, de la bactérie, ainsi que de la plante.

### V.3.2 Tableaux exprimant les diamètres d'inhibition :

L'antibiogramme consiste à chercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques, les tableaux ci-dessous rapportent les valeurs en mm des zones d'inhibition induites par les antibiotiques sur les différentes souches étudiées de chaque plante.

- **Les témoins :**

Afin de savoir si l'inhibition de la croissance bactérienne n'est pas due au solvant, nous avons étudié séparément l'effet des différents solvants utilisé sur les souches bactériennes.

Les résultats relatifs aux diamètres des zones d'inhibition révélés par les différents extraits sont regroupés ci-dessous

**Tableau V-1 : Effet des solvants sur les souches bactériennes (diamètres donnés en mm)**

Solvant \ Bactérie	Chloroforme	éthanol	Hexane	H <sub>2</sub> O
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	11	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	15	0	0
<i>Escherichia coli</i>	12	9	0	0



*Staphylococcus aureus*



*Pseudomonas aeruginosa*



*Escherichia coli*

**Figure V-4 : Effet antibactérien des solvants**

- **Extraits d'hexane :**

Le tableau ci-dessous regroupe les moyennes des diamètres des zones d'inhibition des différents extraits obtenus en utilisant l'hexane sur les 3 souches de références.

**Tableau V-2 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits hexaniques**

Les plantes	Les souches	Diamètre d'inhibition moyen (mm)
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	30±3
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9± 3
	<i>Escherichia coli</i>	15±3
<i>Origanum majorana</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	15±2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10±2
	<i>Escherichia coli</i>	13 ±2
<i>Maclurapomiféra</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	15± nd
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9± nd
	<i>Escherichia coli</i>	21± nd

Les résultats obtenus par la méthode de Kirby-Bauer, montrent que les extraits des 3 plantes par hexane possèdent une activité antibactérienne.

Les diamètres des zones d'inhibition sont compris entre 30 mm± 3 et 15 ± 3 pour le *Thymus vulgaris*, entre 15± 2mm et 13±2 mm pour l'*Origanum majorana* et de 15mm à 21mm pour les *Maclura pomiféra* ce qui permet de constater que les *S. aureus* et *E.coli* sont très sensibles à cet extrait d'hexane.

Par contre *P. aeruginosa* n'a subi aucune inhibition, les diamètres des zones d'inhibition sont faibles (proches de 9mm) pour les 3 plantes.

- **Extraits de chloroforme :**

Le tableau ci-dessous regroupe les moyennes des diamètres des zones d'inhibition des différents extraits obtenus en utilisant le chloroforme comme solvant pour les trous souches de référence.

**Tableau V-3: Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits chloroformiques**

Les plantes	Les souches	Diamètre d'inhibition moyen (mm)
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	29±2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16±5
	<i>Escherichia coli</i>	18±2
<i>Origanum majorana</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	13 ±1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10±2
	<i>Escherichia coli</i>	15±2
<i>Maclura pomifera</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	18 ± nd
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10± nd
	<i>Escherichia coli</i>	12± nd

Les résultats obtenus montrent que les extraits des 3 plantes par le Chloroforme possèdent aussi une activité antibactérienne sur *S.aureus* et *E.coli*, par contre *P.aeruginosa* n'a pas été inhibée. les diamètres de *Thymus* sont compris entre 29± 2 mm et 18± 2mm. Les extraits d'*Origanum majorana* et de *Maclura pomifera* ont provoqué la formation de zones

d'inhibition de diamètres respectivement compris entre  $15 \pm 2$  mm et  $13 \pm 1$  mm et de 12mm à 18mm. Pour *P. aeruginosa* le diamètre de la zone d'inhibition était de 10 mm, ce qui n'est pas très différent de celui des solvants seuls, ce qui veut dire qu'il n'y a pas eu d'inhibition. Les seuils d'inhibition de Chloroforme sont exprimés dans le Tableau V.1 et montrés dans la Figure V.4 d'où on a constaté la sensibilité des plantes vis-à-vis des souches

- **Les Extraits d'éthanol :**

Le tableau ci-dessous regroupe les moyennes des diamètres des zones d'inhibition des différents extraits obtenus en utilisant l'éthanol comme solvant.

**Tableau V-4 : Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits éthanoïques**

Les plantes	Les souches	Diamètre d'inhibition moyen (mm)
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	$28 \pm 3$
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$15 \pm 1$
	<i>Escherichia coli</i>	$17 \pm 3$
<i>Origanum majorana</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	$19 \pm 2$
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$14 \pm 1$
	<i>Escherichia coli</i>	$15 \pm 1$
<i>Maclura pomifera</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	$18 \pm$ nd
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$13 \pm$ nd
	<i>Escherichia coli</i>	$16 \pm$ nd

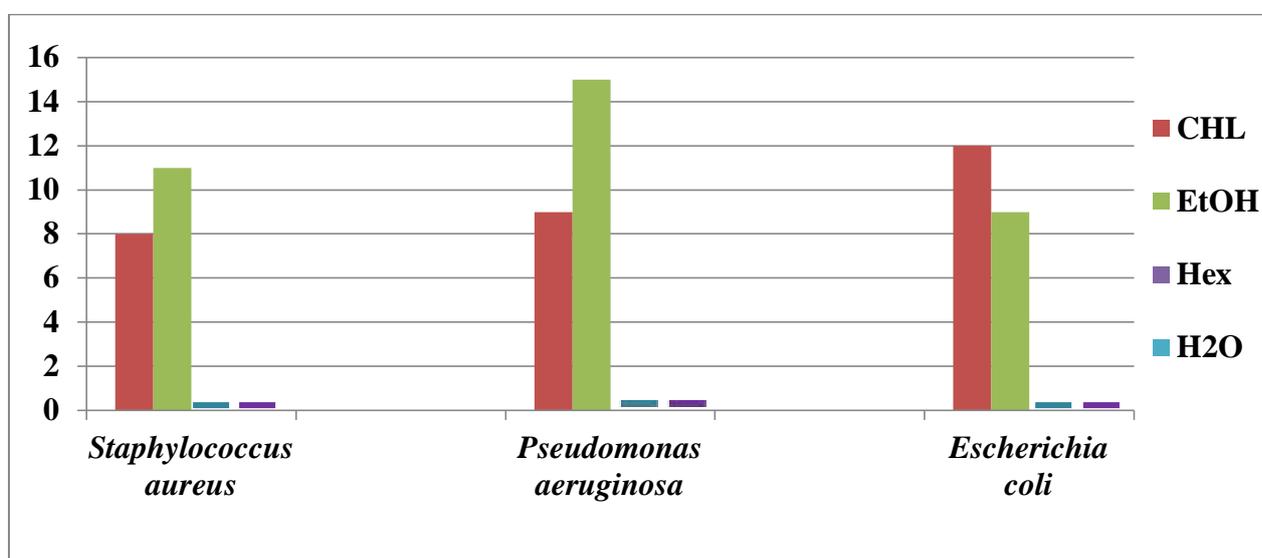
Au regard de ces résultats, nous observons que les extraits éthanolé ont fortement inhibé la croissance des trois souches.

En comparant ces résultats avec les résultats obtenus avec l'éthanol seul, nous constatons qu'il n'y a pas une différence significative, on peut donc en déduire que cette inhibition peut être attribuée en grande partie au solvant utilisé

- **Extraits d'eau :**

La macération des plantes dans l'eau n'a donné aucun résultat d'inhibition sur toutes les souches. (Voir figures : V.1, V.2 et V.3)

#### V.4 Comparaison des effets antibactériens des différents extraits :



**Figure V-5 : Pouvoir inhibiteur des solvants**

Nous avons remarqué que l'éthanol et le chloroforme possèdent une activité antibactérienne marquée. Le chloroforme exerce une inhibition plus importante sur l'*E.coli* que *S.aureus* et *P.aeruginosa*. Par contre l'éthanol exerce une plus forte inhibition sur *P.aeruginosa* et les *S.aureus* que sur *E.coli*.

À partir de ces résultats nous allons fixer les seuils d'inhibition pour chaque souche ce qui nous aidera par la suite à comparer les sensibilités bactériennes.

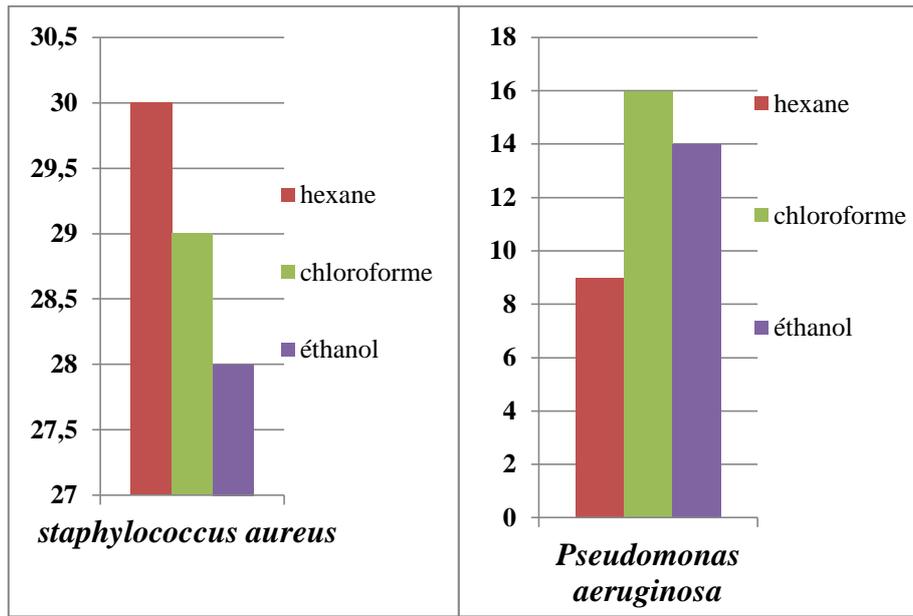


Figure V-6 : sensibilité de *S. aureus*

Figure V-7 : sensibilité de *P.aeruginosa*

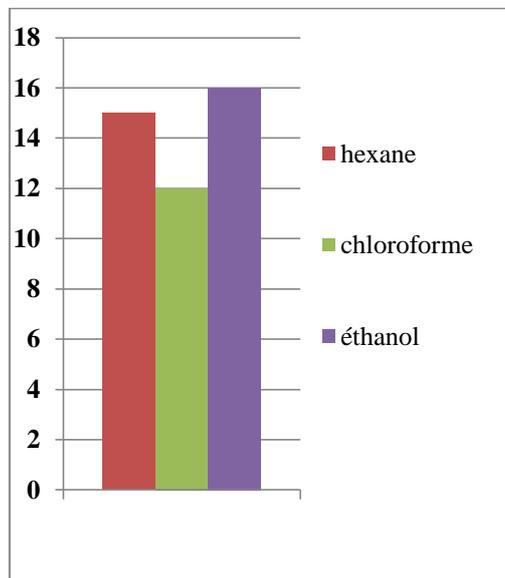


Figure V-8 : sensibilité d'*E.coli*

- La *Staphylococcus aureus* était la souche la plus sensible aux différents extraits d'hexane, et ce pour toutes les plantes qu'on a utilisé, particulièrement *Thymus vulgaris* (figure V.8). On remarque que les valeurs obtenues sont supérieures aux seuils établis par les témoins, les extraits sont donc efficaces. Nos résultats sont en accord avec (Marraiki, 2010 ) qui expliqua la sensibilité de *S. aureus* en présence d'extraits obtenus par chloroforme et (Aqil F, 2006) montre la performance de

l'éthanol lors de l'extraction à partir de plantes médicinales et la sensibilité de *S.aureus* en présence de ces extraits.

- *Pseudomonas aeruginosa* était résistante à tous les extraits. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Chetan Sharma, 2012 ) qui a démontré la sensibilité des souches que nous avons utilisée aux différents extraits par les solvants choisis.
- Pour *Escherichia coli*, l'inhibition était importante pour les trois plantes mais elle était plus notable pour les extraits de *Maclura pomifér* alors de l'utilisation de l'hexane, et moyenne pour l'éthanol et le chloroforme. Ce qui a été déjà prouvé par (Ahmad I, 2007).

### V.5 Comparaison de l'activité des plantes sur les différentes espèces bactériennes :

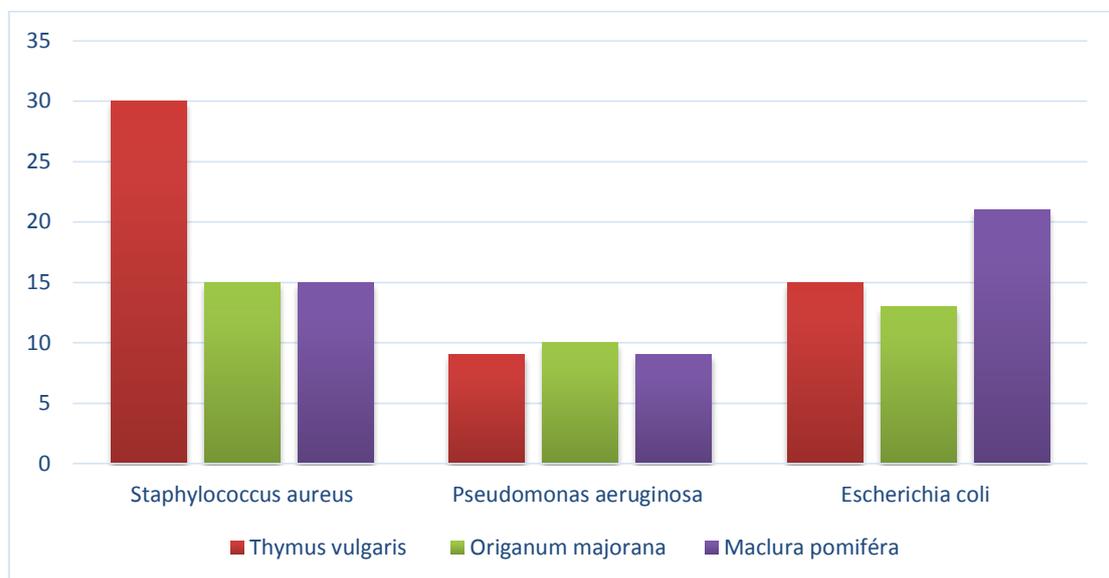
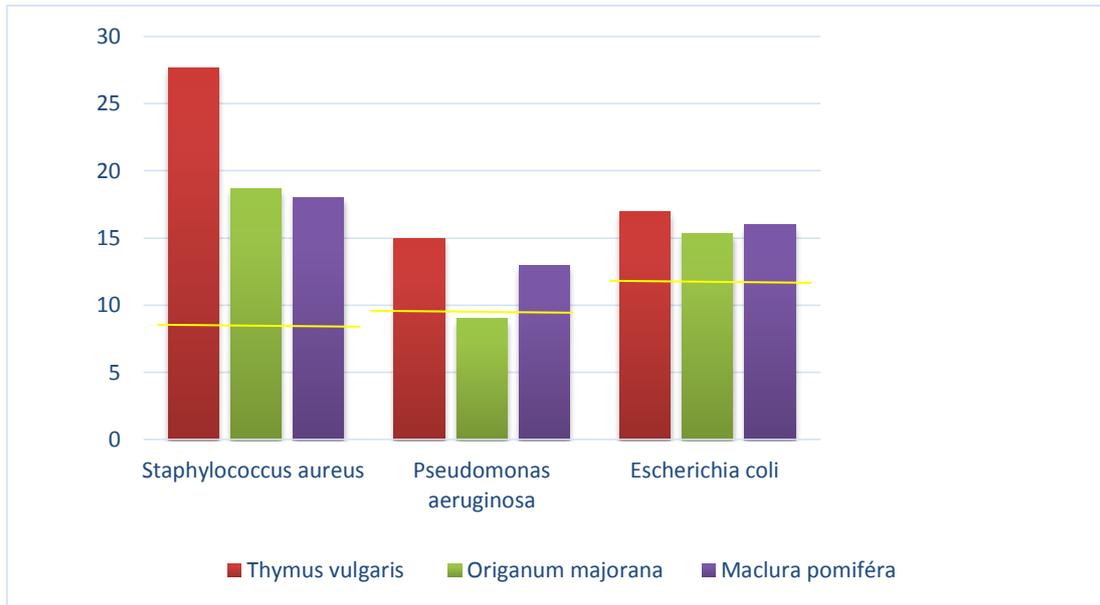
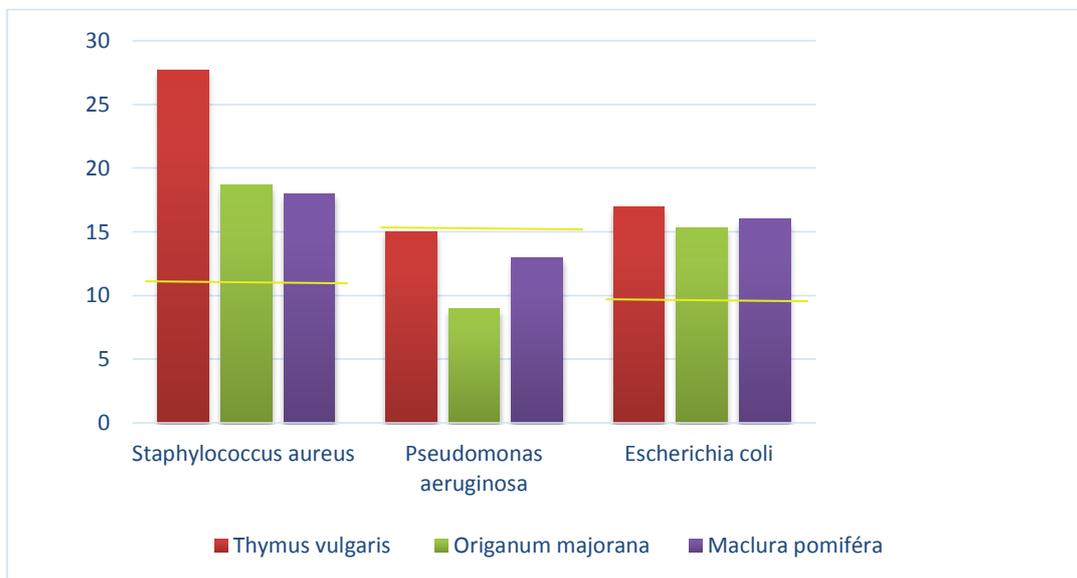


Figure V-9 : Comparaison de l'effet antibactérien des extraits d'hexane



**Figure V-10 : Comparaison de l'effet antibactérien des extraits de chloroforme**



**Figure V-11 : Comparaison de l'effet antibactérien des extraits d'éthanol**

Les histogrammes nous permettent de comparer l'efficacité antimicrobienne des différentes plantes.

Au terme de cette comparaison il apparait que toutes les plantes possèdent un effet antibactérien :

Il est connu que *Thymus vulgaris* possède une très forte activité antibactérienne (Maria C. Rota, 2008), en effet, les zones d'inhibition ont été observées pour toutes les souches testées dans tous les solvants utilisés à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*, qui n'a présenté aucune zone d'inhibition, sa résistance est due à sa capacité de former un biofilm. Ce dernier est d'une organisation complexe, composée de différentes strates dans lesquelles les bactéries se trouvent dans des états physiologiques spécifiques à leur situation. Il est établi que le traitement de telles bactéries nécessite des concentrations considérables d'agents antibactériens (J C Nickel, 2015 )par ailleurs les biomolécules d'*Origanum majorana* et de *Maclura pomifera*, possèdent une activité de moindre importance que celle de *T. vulgaris* qui peut être qualifiée d'activité moyenne inhibitrice de croissance bactérienne (Shayista Chishti, 2013), par contre les feuilles de *Maclura pomifera*, inhibent la croissance de *E.coli* dans l'hexane plus que les 2 autres plantes.

L'activité antibactérienne des différents extraits de feuilles de *Maclura pomifera*, *Thymus vulgaris* et *Origanum majorana* (en utilisant comme solvants le chloroforme, hexane et éthanol) sur *E.coli*, *P.aeruginosa* et *S.aureus* sont encore une fois en accord avec les résultats obtenus par d'autres chercheurs. Il était clair que les solvants organiques (l'hexane et l'éthanol) sont plus efficaces pour l'extraction des biomolécules possédant une activité antibactérienne que le chloroforme. (Indranil Bhattacharjee, 2011).

Les plantes étudiées possèdent des activités antibactériennes contre plusieurs bactéries pathogènes.

# *Conclusion générale*

## Conclusion générale

L'homme a toujours su tirer profit des plantes médicinales (*la phytothérapie*). Abandonnée durant l'apogée de la médecine moderne *la phytothérapie* prouve son efficacité. Ce travail a été mené dans le but d'évaluer les propriétés antibactériennes des différents extraits végétaux issus de trois plantes médicinales, *Thymus vulgaris*, *Origanum majorana* et *Maclura pomifera*.

Nous avons constaté que les extraits de *Thymus vulgaris* se caractérisent par une forte activité antibactérienne vis-à-vis des souches microbiennes testées. Cependant *Origanum majorana* et *Maclura pomifera* possèdent des activités moyennes en les comparant avec ceux obtenus pour les feuilles de *Thymus vulgaris*.

Nous avons aussi constaté que *Pseudomonas aeruginosa* était résistante à pratiquement tous les extraits testés. Par contre les *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* étaient très sensibles.

D'autres molécules pouvant inhiber *P.aeruginosa* doivent être recherchées.

Nous pouvons conclure de ce travail que les trois plantes étudiées peuvent être une source intéressante de biomolécules possédant une activité antibactérienne. Il serait cependant intéressant de caractériser ces extraits afin d'identifier ces molécules, et également d'étudier leurs effets sur l'homme.

## "دراسة التأثير المضاد للبكتيريا من مستخلصات نباتية "

### ملخص :

يتناول هذا العمل تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصات تم الحصول عليها باستخدام مذيبات مختلفة من ثلاثة نباتات الطبية جزائرية من أجل إقامة دراسة مقارنة للنشاط الحيوي بها. تم اختبار مستخلصات الهكسان، الكلوروفورم، الايثانول والماء على ثلاثة أنواع من البكتيريا المسببة للأمراض. سمح لنا تقييم النشاط المضاد للبكتيريا بتحديد السلالات الأكثر حساسية والأكثر مقاومة لتقييم تأثير النباتات في علاج الأمراض البكتيرية وكذلك التمييز بين مذيب جيد يستخدم لاستخراج الجزيئات الحيوية التي تتميز بهذا التأثير. تبين من خلال هذه الدراسة أن *Tymus vulgaris* هي النبتة ذات التأثير المضاد الأكبر، بينما إضحاً أن الهكسان هو المذيب الأفضل لاستخراج المكوّنات التي تتميز بهذا التأثير.

**الكلمات المفتاحية:** الجزيئات الحيوية، *Thymus vulgaris*, *Origanum majorana*, *Maclura pomifera*, النباتات الطبية، النشاط المضاد للبكتيريا.

### « Etude de l'effet antibactérien des extraits végétaux »

#### Résumé :

Ce travail porte sur l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits par différents solvants de trois plantes médicinales Algériennes, dans le but d'établir une étude comparative de leur bioactivité.

Les extraits d'hexane, chloroforme, d'éthanol et d'eau ont été testés sur trois souches bactériennes pathogènes. L'évaluation de l'activité antibactérienne a permis la sélection des souches les plus sensibles des plus résistantes en vue d'apprécier l'effet de la plante dans le traitement des maladies bactériennes, ainsi que de distinguer le bon solvant qui sert à extraire les biomolécules possédants cet effet.

Le *Thymus vulgaris* s'est révélé être la plante possédant l'effet antibactérien le plus important, tandis que l'hexane s'est avéré être le meilleur solvant d'extraction de constituants possédant cet effet à partir des plantes étudiées.

**Mots clés :** biomolécules, plantes médicinales, activité antibactérienne, *Thymus vulgaris*, *Origanum majorana*, *Maclura pomifera*.

**“Study of antibacterial effect of vegetal extracts”**

**Abstract:**

This work deals with the evaluation of the antibacterial activity of extracts obtained using different solvents from three Algerian medicinal plants in order to establish a comparative study of their bioactivity.

The hexane, chloroform, ethanol and water extracts were tested on three pathogenic bacterial strains. The evaluation of antibacterial activity allowed us to select of the most sensitive and the most resistant strains in order to assess the effect of the plant in the treatment of bacterial diseases as well as to distinguish the good solvent used to extract the biomolécules owning this effect.

*Thymus vulgaris* was found to be the plant with the greatest antibacterial effect, while hexane proved to be the best solvent to extract components having this effect from the tested plants.

**Keywords:** biomolécules, medicinal plants, antibacterial effect, *Thymus vulgaris*, *Origanum majorana*, *Maclura pomifera*.

### *Référence :*

- [1]<http://bioquell.asia/technology/microbiology/staphylococcus-aureus>
- [2]<http://resistance-s-aureus.e-monsite.com>
- [3]<http://www.pseudomonas.com>
- [4][http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas\\_3.html](http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas_3.html)
- [5]<http://www.abc.es/20110531/sociedad/abci-escherichia-coli-pepinos-201105301450.html>
- [6]<http://inhabitat.com/tag/e-coli/>
- [7] :[http://www.ethnopharmacologia.org/recherche-dans-prelude/?plant\\_id=12450#lightbox\[12450\]/3/](http://www.ethnopharmacologia.org/recherche-dans-prelude/?plant_id=12450#lightbox[12450]/3/)
- [8] :<file:///D:/5%C3%A8me%20ann%C3%A9e/pfe/recherche/thymus/Recherche%20dans%20la%20base%20de%20donn%C3%A9es%20pr%C3%A9lude.html>
- [9] :[http://www.ethnopharmacologia.org/recherche-dans-prelude/?plant\\_id=12450#lightbox\[12450\]/2/](http://www.ethnopharmacologia.org/recherche-dans-prelude/?plant_id=12450#lightbox[12450]/2/)
- [10] :<http://davesgarden.com/guides/pf/showimage/130486/>
- [11] :<http://www.aromabio.fr/marjolaine-a-coquilles-ct-thujanol.html>
- [12] :<http://fr.123rf.com/images-libres-de-droits/cerfeuil.html>
- [13] :<https://www.etsy.com/fr/listing/73097575/marjolaine-origanum-majorana-300-graines>
- [14] :<http://www.toadshade.com/MaclurPo.html>
- [15] :[http://www.discoverlife.org/mp/20p?see=I\\_SB22361](http://www.discoverlife.org/mp/20p?see=I_SB22361)
- [16] :<http://www.imagejuicy.com/images/plants/m/maclura>
- [17]:<http://www.alsagarden.com/fr/249-maclura-pomifera-oranger-des-osages-graines.html#sthash.YjCvEZA7.dpbs>
- A. ABDELGUERFI, M. S. (2003). *EVALUATION DES BESOINS EN MATIERE DE RENFORCEMENT DES CAPACITES*. Algérie: FEM/PNUD.
- A. B. Golovanchikov t, M. V. (1998). MEDICINAL PLANTS, EXTRACTION OF ACTIVE COMPONENTS FROM MEDICINAL PLANTS IN ELECTRIC FIELD . *Pharmaceutical Chemistry Journal* , 429-432.
- *Agence de la santé publique du Canada*. (2010). Consulté le mai le 6, 2015, sur STAPHYLOCOCCUS AUREUS : [www.santepublique.gc.ca](http://www.santepublique.gc.ca)
- Agrawal, S. ( 2009 ). *advance in medicinal plants* . Jaipur India : Oxford Book Company.

- Ahmad I, A. F. ( 2007). In vitro efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ESbetaL-producing multidrug-resistant enteric bacteria. *Microbiol Res.* , 162(3):264-75.
- Aqil F, A. I. (2006). Evaluation of anti-methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) activity and synergy of some bioactive plant extracts. *Biotechnol J.* , 1(10):1093-102.
- B.K. Tiwari, N. P. (2013). Handbook of Plant Food Phytochemicals, Sources, Stability and Extraction . USA: Wiley BLACKWELL.
- Badiaâ ER-ROUISSI, A. K. (2014). ETUDES DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET ANTIBACTERIENNE DES EXTRAITS DU GERANIUM ROSAT DU GHARB .*Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué* , 40.
- BELOUED, A. (2005). *PLANTES MEDICINALES D'ALGERIE* . Alger : Office des Publications Universitaires .
- C. Bouchiat, N. E.-Z. (2015). Epidemiology of Staphylococcus aureus in Bangalore, India: emergence of the ST217 clone and high rate of resistance to erythromycin and ciprofloxacin in the community. *New Microbes and New Infections* , Pages 15–20.
- C. PERROTI, N. S. (1999). *Se soigner par les plantes* . BERTI.
- C.Nauciel et J.-L. Vildé . (2005). *Bactériologie médicale 2ed édition* . Paris : MASSON .
- Caumes, É. (2008). Infections bactériennes systémiques . *Manifestations dermatologiques des maladies infectieuses, métaboliques et toxiques* , 1-8 .
- Chetan Sharma, K. R. (2012 ). Antimicrobial potential of Terminalia chebula Retz. fruit extracts against ear pathogens. *World J Otorhinolaryngol* , 28; 2(2): 8-13. .
- Chew, K. K. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of Centellaasiatica. *International Food Research Journal* , 571- 578 .
- CISSE, M. (2010). COUPLAGE DE PROCÉDÉS MEMBRANAIRES POUR LA PRODUCTION D'EXTRAITS ANTHOCYANIQUES : APPLICATION À L'HIBISCUS SABDARIFFA .
- Debuigne, G. (1984). *Larousse des plantes qui guérissent*. Paris 6 : Librairie Larousse .
- Douglas M.Griffith, R. H. (2003). *Forest statistics for West Verginia: 1989 and 2000*.USDA forestservice .
- Elisabeth Stahl-Biskup, F. S. (2002 ). *Thyme, The genus Thymas*. London and New York: Taylor &Francis .
- F. Barbut, B. G. (2014 ). Comment traiter une infection digestive à Clostridium difficile en 2014. *Réanimation* , 284-297.
- FatnassiSaloua, N. I. (2009). Chemical composition and profile characteristics of Osage orange Maclurapomifera (Rafin.) Schneider seed and seed oil. *industrial crops and products* , 29. 1-8.
- G.LEQUEUX, M. (2013). Aromatogramme: mise en place d'une méthodologie. Résultats préliminaires sur des souches de mammites bovines. *journées nationales GTV* (pp. 953-960). Ille: NANTES.

- Hensel, W. (2008). *Les Indispensables Nature De Delachaux*, 350 plantes médicinales. Parix:Delachaux et niestlé SA.
- Hota, D. (2007). *Bioactive Medicinal Plants*. New Delhi: Gene-Tech Books.
- IndranilBhattacharjee, S. K. ( 2011). Antibacterial activities of some plant extracts used in Indian traditional folk medicine *.Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* , S165-S169 .
- Iqbal Ahmad, F. A. (2006). *Modern Phytomedicine, Turning Medicinal Plants into Drugs* .Germany : WILEY VCH.
- J C Nickel, I. R. (2015 ). Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob. Agents Chemother.* , 4. 619-624 .
- Jean LEYBROS, P. F. (1990). Extraction solide-liquide, Aspects théoriques. *TECHNIQUES DE L'INGÉNIEUR* , J 2780.
- Jean-Philippe Lavigne, J. J. (2008). Autres infections bactériennes *.Manifestations dermatologiques des maladies infectieuses, métaboliques et toxiques* , pp 78-87.
- Karan Vasisht, V. K. ( 2004 ). Compendium of Medicinal and Aromatic Plants AFRICA .Italie : ICS-UNIDO.
- KELLER-DIDIER, C. (2004). *LES PLANTES MÉDICINALES*.Paris: ALS.
- Kirtland Chardon Road, K. (2005). Oregano & Marjoram Oregano & Marjoram. *The Herb Society of America* , (440) 256-258.
- L. Hambaba, K. B. (2012). Étude in vitro des activités antimicrobienne et antioxydante des extraits du fruit d'*Elaeagnusangustifolia* L. *Phytothérapie* , 6. 350-356.
- Lawton, S. (2012). Marjoram (*OriganumMajorana*). *Herb of Happiness (dōTerra)* (pp. 1-4). Oilsmentor .
- Leclerc, H. G.-L. (1995). *Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien* . Paris : Doin .
- Lijun Wang, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants *.Trends in Food Science &Technology* , 300–312.
- Linder, D. K. (2010). *DES BACTERIES ET DES HOMMES, de la santé au développement durable*.GENEVE:BiOutils, HUG , Université de GENEVE.
- M. Oba Samoussa, A. K. ( 2011). Étude de la sensibilité aux antibiotiques et aux extraits de quelques plantes médicinales de certains germes issus de la restauration collective *.Nutrition clinique et métabolisme* , 28. S67–S240.
- Maria C. Rota, A. H. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oil. *Food Control* , 19 . 681–687.
- Maria C. Rota, A. H. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control* 19 (2008) 681–687 , 19. 681–687.

- Marraiki, H. M. ( 2010 ). Antimicrobial activity and phytochemical analyses of *Polygonum aviculare* L. (Polygonaceae), naturally growing in Egypt. *Saudi J BiolSci* , 17(1): 57–63.
- Mohamed Z.M. Salem, N. H. (2013). Physico-Chemical Characterization of Wood from *Maclura Pomifera* (Raf.) C.K. Schneid. Adapted to the Egyptian Environmental Conditions. *JOURNAL OF FOREST PRODUCTS & INDUSTRIES* , 2(2),53-57.
- MohdShahid, A. S. (2013). Recent Trends in Biotechnology and Therapeutics Applications of Medicinal Plants .London : Springer .
- Oliver Kayser, W. J. (2007 ). *Medicinal Plant Biotechnology* .British : WILEY-VCH.
- PENGELLY, A. (2006). The Constituents of Medicinal Plants, An introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine. 2nd edition .Australia : ALLEN & ENUIN .
- PHARMACEUTIQUES, L. (2007). PRECIS de Phytothérapie, la santé par les plantes .Monaco:Alpen .
- PHARMACEUTIQUES, L. (2007). PRECIS de Phytothérapie, la santé par les plantes .Monaco:Alpen .
- PHARMACEUTIQUES, L. (2007). PRECIS de Phytothérapie, la santé par les plantes .Monaco:Alpen .
- Philippe Evon, V. V. (2012). Manufacturing of renewable and biodegradable fiberboards from cake generated during biorefinery of sunflower whole plant in twin-screw extruder: Influence of thermo-pressing conditions. *3rd International Conference on Biodegradable and Biobased Polymers* , 1940–1947.
- R. Wongkittipong, L. P. (2004). Solid–liquid extraction of andrographolide from plants—experimental study, kinetic reaction and model. *Separation and Purification Technology* , 147–154.
- Rachel, P. (2007). METHODOLOGIE POUR LE PASSAGE EN CONTINU D’EXTRACTION DE SOLUTE A PARTIR DE MATIERE VEGETALE.
- Ross, I. A. (2005 ). Medicinal Plants of the World of the World Volume 3 Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses . United States of America: Humana Press Inc.
- S Sasidharan, Y. C. (2011). Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines( AJTCAM)* , 1-10.
- SCHMID, R. D. (2005). ATLAS DE POCHE DE BIOTECHNOLOGIE ET DE GENIE GENITIQUE .Paris: Flammarion.
- Shayista Chishti, Z. A. (2013). Medicinal importance of genus *Origanum*: A review .*Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 170-177.
- Singleton, P. (1999). *Bactériologie, 4<sup>o</sup> edition*.DUNOD .
- Sofowora, A. (2010). *Plantes Médicinaes et Médecine Traditionnelle d'Afrique* . Suisse : KARTHALA .

- SOUZA, C. K. (1995). EVALUATION DES PROPRIETES ANTIMICROBIENNES DES EXTRAITS AQUEUX TOTAUX DE QUELQUES PLANTES MEDICINALES .*pharm. Méd. tra. afr* , 103-112.
- Stephanie Rolsma, D. W. (2015). 5 – Pseudomonas aeruginosa toxins. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins (Fourth Edition)* , 133–160.
- Sukhdev Swami Handa, S. P. (2008). Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants.
- Szapiro-Manoukian, N. (2011). E. Coli, un microbe rare transmis par les ruminants .*LE FIGARO* .
- Temilola Oluseyi, K. O. (2011). Comparison of extraction and clean-up techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil samples. *African Journal of Environmental Science and Technology* , 482-493.
- Timothy J. Foster, J. A. (2015). Chapter 37 – Staphylococcus aureus .*Molecular Medical Microbiology (Second Edition)* , 655–674.
- Trambouz P, W. J. (1975). Le développement des procédés de raffinage et pétrochimie. Paris, France: Ed TECHNIP.
- Wynia, R. L. (2011). OSAGE ORANGE, Maclurapomifera (Rafin.) C.K. Schneider Plant Symbol =MAPO .*Manhattan Plant Materials Center* , 1-3.
- Xavier Bertrand, C. S. (2011). Épidémiologie des infections à Pseudomonas aeruginosa. *RFL - Revue francophone des laboratoires* , 35-40.
- Zhang, X. (2000). Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle. *OMS* , 1-87.