

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE Dr. TAHER MOULAY SAIDA  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



**LABORATOIRE DE BIOTOXICOLOGIE, PHARMACOGNOSIE ET LA  
VALORISATION BIOLOGIQUE DES PLANTES.**

**MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME**

**Master EN BIOLOGIE**

---

OPTION : Microbiologie appliquée et Biotechnologie végétale

Présenté Par : - Chikh Abdelkader.

- Bouanani Mohamed Amine.

**THEME**

**Contribution à l'étude phytochimique, antibactérienne et cytotoxique de la  
plante *Salicornia frutiocsa* de la région ouest Algérienne**

Soutenu le : 14/06/ 2016 devant la commission d'examen :

- **Mr. Si Tayeb.T** Maitre de conférences. U de Saida Président.
- **Mr. Benreguig.M** Maitre de conférences .U de Saida Examineur.
- **Mr. Adli. D** Maitre de conférences .U de Saida Encadreur.

**Année Universitaire : 2015-2016.**

*Dieu merci pour d'avoir nous donnons la santé, la volonté et le courage sans lesquels ce travail n'aurait pu être réalisé.*

### **Remerciement**

*Au terme de ce travail, nous tient à exprimer toute nos reconnaissances et notre profond respect a notre encadreur **Mr ADLI.D** le Maitre Assistance de l'Université de Saida, pour sa patience, ses précieux conseils et son aide durant toute la période du travail,*

*Nous tient à exprimer nos grandes considérations et nos sentiments de reconnaissance à **Mr Si Tayeb.T**, qui nos fait l'honneur de présider le jury de notre soutenance.*

*C'est avec un très grand plaisir que nous remercions infiniment **Mr Benreguig .M**, d'avoir bien voulu examiner ce modeste travail, qu'elle trouve ici nos très profondes gratitude.*

*Nous remercions profondément, **Mr Halla. N**, et **Mr GHELLAI**, pour sons disponibilités, sons remarques précieuses, sons aides et pour avoir corrigés cette thèse, qu'ils trouvent ici l'expression de nos profonds respects et tous les enseignants qui on attribués à notre formation durant les années d'études.*

*Nous remercier aussi : **M<sup>elle</sup> Naimi .S**, **M<sup>elle</sup> Itte .H**, **M<sup>r</sup> Mansouri .A** et **M<sup>r</sup> Hmaimade .M**, **M<sup>r</sup> Brahimi .M** qui sons aidées et supportées durant la période du travaille.*

*Nous ne pourrons terminer, sans remercier tous les membres de Laboratoire de biologie, tous ses qui ont participé d'une manière ou d'une autre dans l'élaboration de ce projet de fin d'étude.*



## *Dédicace*

*Je dédie ce travail :*

*Aux être la plus chère à mon cœur, ma grande mère qui ma protéger*

*toujours avec ces prières. Que dieu le garde et le protège.*

*A mes parents, qui ont été toujours présent pour me soutenir et  
m'encourager.*

*A mes frères et ma sœur.*

*A tous ma famille*

*A mon binôme*

*A mes amies et tous mes collègues de promotion.*

*A tous ceux qui me sont chères.*

*Grâce à Dieu, vous tous et toutes, je continuerai...*

**CHIKH**



## *Dédicace*

*Rien n'est aussi beau à offrir que le fruit d'un labeur qu'au dédie du fond du  
mon cœur à ceux que j'aime jusqu'à les frontières de l'imagination ;*

*A Mes chers parents, mes frères, sans eux, je n'aurais pas abouti à ce stade  
d'étude, que Dieu puisse m'aider à les honorer, les servir et les combler*

*A mes frères*

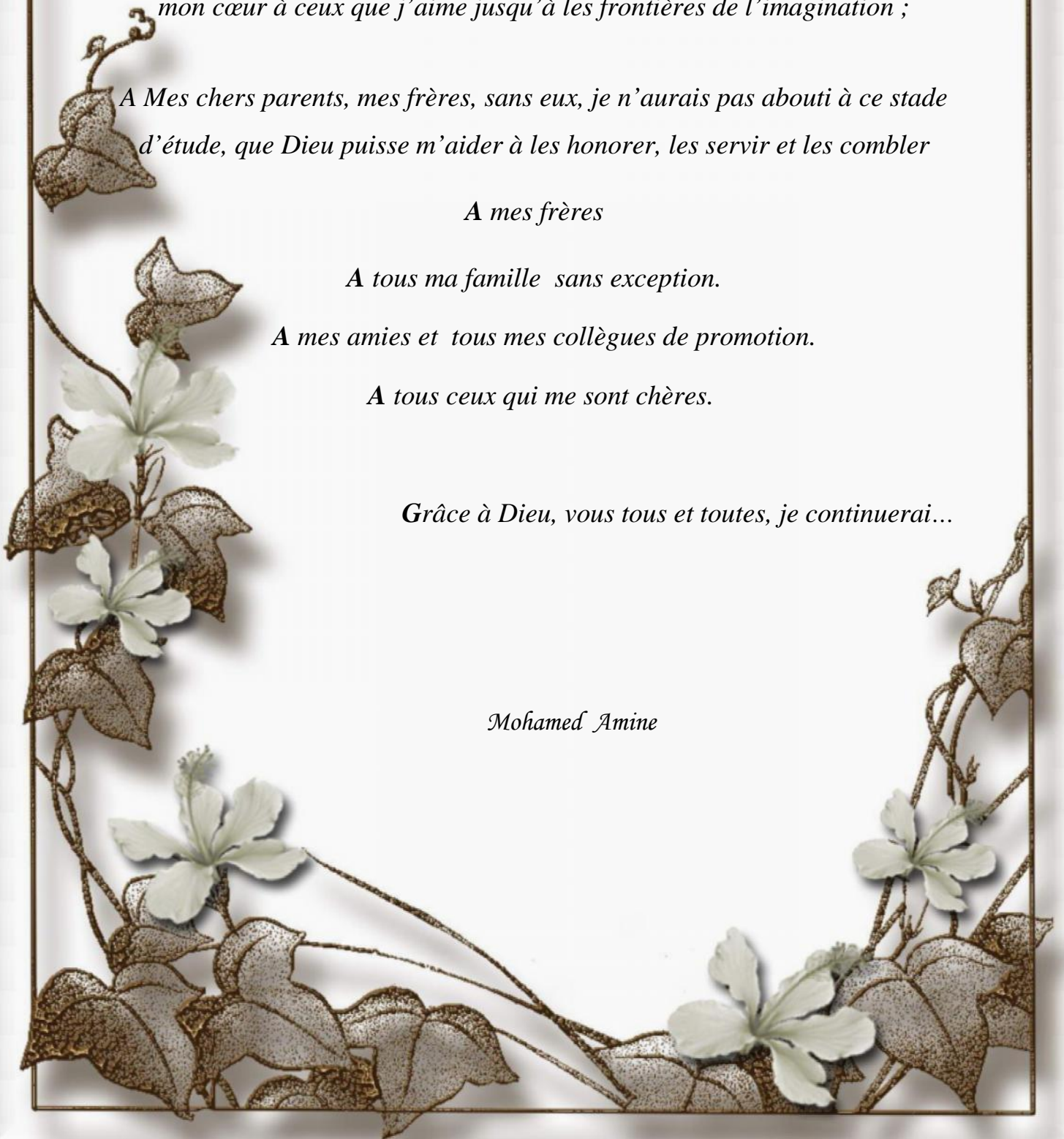
*A tous ma famille sans exception.*

*A mes amies et tous mes collègues de promotion.*

*A tous ceux qui me sont chères.*

*Grâce à Dieu, vous tous et toutes, je continuerai...*

*Mohamed Amine*



---

## Résumé

---

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale. Pour ces raisons, on s'est proposé à contribuer à une étude de screening phytochimique, pouvoir Antibactérien et cytotoxicité des extraits de l'espèce *salicornia fruticosa* populaire au niveau de la wilaya de mascara (Macta) « *salicornia fruticosa* L. »

*Salicornia fruticosa* est une plante halophile appartenant à la famille des *Chénopodiacées* et l'une des plantes les plus tolérantes au salinité .

Les tests phytochimiques ont permis de détecter les différentes familles de composés chimiques existants dans la partie aérienne de cette plante telle que les flavonoïdes, les tanins, les stérols, les triterpènes, les composés réducteurs, les coumarines et les alcaloïdes.

Les extractions des extraits bruts à savoir les flavonoïdes et les tannins à partir de la partie aérienne ont été réalisées par des méthodes d'extractions à l'aide de solvants spécifiques pour chaque extrait. Le rendement a été 17.3% pour extrait brut méthanolique et les flavonoïdes fraction acétate d'éthyle avec 2.8 %, les flavonoïdes fraction butanolique avec 3.4% et les tanins avec un rendement 1.9 %.

Les activités biologiques étudiées consistent : une détermination des (CMI) et (CMB) de l'extrait brut méthanolique vis-à-vis quinze souches bactériennes de références; Les CMI obtenues vis-à-vis les bactéries testées sont comprises entre 0.78 et 50 mg/ml. Les résultats obtenus indiquent que *L.monocytogenes* été la souche la plus sensible. Par contre, *C. fetus*, *C.freundii*, et *P.aerugenusa* sont les plus résistantes. L'étude de l'activité antibactérienne des extraits sélectifs vis-à-vis de la souche de *L.monocytogenes* montre l'effet synergique des trois extraits sélectifs flavonoïde fraction acétate d'éthyle, flavonoïde fraction butanolique et les tannins.

L'essai de la cytotoxicité de notre extrait brut méthanolique vis-à-vis les globules rouges présentent un effet cytotoxique à une concentration de 50 mg/ml.

**Mots clé:** *Salicornia fruticosa*, Screening Phytochimique, Extrait brut méthanolique, Flavonoïdes, Tannins, Activité antibactérienne, Cytotoxicité.

---

---

## Abstract

---

Nowadays, the use of medicinal plants in herbal medicine has been of great interest in biomedical research. For these reasons, it is proposed to contribute to a study of screening phytochemical, antibacterial and cytotoxicity of extracts of the species from the *Salicornia fruticosa* popular at the level of the wilaya of Mascara (Macta) "*Salicornia fruticosa* L."

*Salicornia fruticosa* is a halophyte plant belonging to the family *Chenopodiaceae* and one of the plants the most salt tolerant.

The phytochemical tests allowed detecting the different families of existing chemical compounds in the aerial part of the plant such as flavonoids, tannins, sterols, triterpenes, reducing compounds, coumarins and alkaloids.

The extraction of crude extracts namely flavonoids and tannins from aerial part conducted by extraction methods using specific solvents for each extract. The performance has 17.3% for best methanolic extracts and flavonoids with 2.8 ethyl acetate fraction % flavonoid fraction butanol with 3.4% and tannins with a yield of 1.9.

Studied biological activities: a determination of the (CMI) and (CMB) of the crude extract methanolic or even fifteen bacterial strains in references; The CMI obtained towards the bacteria tested are included between 0.78 and 50 mg/ml. The results obtained indicate that *L.monocytogenes* was the most sensitive strain. On the other hand, *C.fetus*, *C.freundii*, and *P.aeruginosa* are the most resistant. The study of the antibacterial activity of selective extracts towards *L.monocytogenes* strain shows the synergistic effect of the three selective extracts flavonoid fraction of ethyl acetate, flavonoid fraction butanol and tannins.

Test the cytotoxicity of our crude extract methanolic opposite red blood cells have a cytotoxic effect at a concentration of 50 mg/ml.

**Key words:** *Salicornia fruticosa*, Phytochemical Screening, Extracts methanolic crude, Flavonoid, Tannin, Antibacterial activity, Cytotoxicity.

---

---

في الوقت الحاضر يلقي استخدام النباتات الطبية في طب الأعشاب اهتماما كبيرا في مجال البحوث الطبية الحيوية. و لهذه ، اقترحنا المساهمة في دراسة المكونات الكيميائية للنبتة ، النشاط المضاد للجراثيم الخلايا لمستخلص من *Salicornia fruticosa* الموجودة في ولاية Macta *Fruticosa Salicornia* هو نبات من النباتات الملحية من عائلة *Chenopodiaceae*

وقد كشفت اختبارات الكيمياء النباتي من وجود عائلات مختلفة من المركبات الكيميائية الموجودة في الجزء الهوائي للنبات مثل مركبات flavonoïde, les tannins stérols, les triterpènes, les composés réducteurs, les coumarines et les alcaloïdes

الهوائي كان عن طريق tannin flavonoïde . و كان المرودود يتراوح بينا 17.3 أساليب استخراج باستخدام مذيبات خاصة لكل الميثانولي 2.8% flavonoïde fraction acétate d'éthyle , flavonoïde fraction 3.4 % , les tannins 1.8 butanolique

وتشمل الأنشطة البيولوجية بتحديد (CMI) (CMB) للمستخلص الميثانولي الخام ضد خمس سلالات البكتيرية ممرضة حيث CMI المتحصل عليها ضد البكتيريا المختبرة تتراوح ما بين 0.78 50 /مل وتشير هذه *L.monocytogenes* كانت الأكثر حساسية على عكس *C.fetus*, *C.freundii*, *P.aerugenusa*

دراسة النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلصات المختارة ضد *L.monocytogene*. يظهر تأثير متناغم لثلاث مستخلصات مختارة و التي هي flavonoïde fraction acétate d'éthyle, flavonoïde fraction butanolique .les tannins اما فيما يخص اختبار سمية الخلايا لمستخلص الميثانولي الخام ضد كريات الدم الحمراء يظهر تأثيره السام بتركيز 50 /

الكلمات المفتاحية : *Salicornia fruticosa* , المكونات الكيميائية , النشاط المضاد للبكتيريا CMI, CMB, مفعول السام الخلية .

---



## Liste des abréviations

**%** : Pourcentage

**µg** : microgramme

**µl** : microlitre

**AFNOR** : Association Française de normalisation

**ATCC**: American Type Culture Collection

**C** : Concentration.

**cm** : Centimètre

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**CMB**: Concentration Minimale Bactéricide

**DIL** : dilution

**DMSO**: Diméthylsulfoxyde

**h**: Heur

**I %** : Pourcentage d'inhibition

**I**: Indices

**I<sub>2</sub>**: Iode.

**KI** : Iodure de potassium

**M**: Molarité

**mg** : milligramme

mgEAG/g : milligramme équivalente acide gallique

**ml** : millilitre

**mm** : millimètre

**nm** : nanomètre

**° C** : Degré celcius.

**PBS** : Phosphate buffered saline

**Rdt**: Rendement

**T°** : Température

**UFC** : Unité formant colonie

**UV**: Ultra-violet

**V/V** : Volume à Volume.

**V**: volume



## Liste des figures

<b>Figure 1.</b>	La distribution de la famille chénopodiacées dans le monde.....	7
<b>Figure 2.</b>	Les espèces du salicornia (a) le ressort et (b) les saisons d'automne.....	8
<b>Figure 3.</b>	Aspects morphologiques des parties aériennes d'espèces de salicornia.....	10
<b>Figure 4.</b>	Quelques acide phénols de la série benzoïque.....	14
<b>Figure 5.</b>	Quelques acide phénols de la série cinnamique.....	14
<b>Figure 6.</b>	Squelette de base des flavonoïdes.....	15
<b>Figure 7.</b>	Structure des différentes classes des flavonoïdes.....	15
<b>Figure 8.</b>	Structure générale des anthocyanes (le cation flavylum).....	16
<b>Figure 9.</b>	Structure des tanins hydrolysables et les acides associés.....	17
<b>Figure 10.</b>	Structure des tanins condensés et leur monomère.....	18
<b>Figure 11.</b>	Structure de base de coumarine.....	19
<b>Figure 12.</b>	Structure d'une molécule de quinone.....	19
<b>Figure 13.</b>	Structure de quelques alcaloïdes.....	21
<b>Figure 14.</b>	Biosynthèse des métabolites secondaires.....	22
<b>Figure 15.</b>	Schémas des étapes de l'hydrodistillation.....	26
<b>Figure 16.</b>	Meps - système d'échantillonnage et phénomènes d'adsorption.....	28
<b>Figure 17.</b>	Dta - système d'extraction « purge & trap » (p&t) et d'un tube adsorbant de type tenax (ta).....	29
<b>Figure 18.</b>	Schéma d'un extracteur de soxhlet.....	31
<b>Figure 19.</b>	Schéma d'un système d'extraction likens-nickerson.....	32
<b>Figure 20.</b>	Schéma du principe de la technique d'extraction par le co2.....	32
<b>Figure 21.</b>	Carte géographique de la station de récolte.....	36
<b>Figure 22.</b>	Moulin de laboratoire (mf 10 basic).....	38
<b>Figure 23.</b>	Le broyage des feuilles et les tiges de s.fruticosa.....	38
<b>Figure 24.</b>	Montage de l'hydrodistillation.....	39
<b>Figure 25.</b>	Ampoule à décanter.....	39
<b>Figure 26.</b>	Montage de macération.....	40
<b>Figure 27.</b>	Montage de reflu.....	41
<b>Figure 28.</b>	Protocole d'extraction des extraits bruts.....	43
<b>Figure 29.</b>	Schéma d'extraction des flavonoïdes.....	44
<b>Figure 30.</b>	Protocole d'extraction des tanins.....	45
<b>Figure 31.</b>	Préparation des dilutions de l'extrait brute méthanolique.....	49
<b>Figure 32.</b>	Protocole préparatoire pour la culture des souches bactériennes dans des disques de gélose.....	51
<b>Figure 33.</b>	Préparation de la microplaque.....	54
<b>Figure 34.</b>	RENDEMENTS DES EXTRAITS OBTENUS.....	59
<b>Figure 35.</b>	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	60
<b>Figure 36.</b>	Les résultats diamètres zones d'inhibitions de l'activité antibactérienne l'extrait brut S.fruticosa vis-à-vis différentes souches bactériennes (méthode des disques).....	63
<b>Figure 37.</b>	Résultats de test sensibilité de quelques souches vis-à-vis l'extrait par la méthode des disques .a : C. fetus ; b : B.cereus ; c : K.pneumonia ; d : E.cloacae ; e :	

S.typhimurium ; f : S.aureus ; g : E.coli ; h : P.aeruginosa ; i : S.enterica ; j : B.subtilis ; k : E.faecalis .	64
<b>Figure 38.</b> Résultat activité antibactérienne des extrais sélectifs vis-à-vis L.monocytogenes par la méthode de disques	65
<b>Figure 39.</b> Résultat des CMI et des CMB d'extrait brut méthanolique vis-à-vis des souches bactériennes	66
<b>Figure 40.</b> L'effet d'extrait brut méthanolique de S.fruticosa solubilisé dans DMSO sur la fuite de l'hémoglobine intracellulaire chez les globules rouges humains.	67

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Classification botanique de <i>Salicornia fruticosa</i> .1 .....	10
<b>Tableau 2.</b> Principales classes des composés phénoliques .....	13
<b>Tableau 3.</b> Activités biologiques de quelques composés phénoliques .....	20
<b>Tableau 4.</b> Les différentes souches bactériennes testées .....	48
<b>Tableau 5.</b> Les dix concentrations d'extrait brut .....	52
<b>Tableau 6.</b> Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques appartenant à la partie aérienne de la plante étudiée .....	58
<b>Tableau 7.</b> Les rendements en extraits obtenus .....	59
<b>Tableau 8.</b> Diamètres des zones d'inhibition obtenus par la méthode de diffusion sur disque d'extrait <i>Salicornia fruticosa</i> , DMSO et Gentamicine vis-à-vis des souches bactériennes .....	62
<b>Tableau 9.</b> Diamètres des zones d'inhibition obtenus par la méthode de diffusion sur disque des extraits sélectifs vis-à-vis <i>L.monocytogenes</i> .....	64

# SOMMAIRE

Remerciement  
Dédicace  
Résumé  
Abstract

Liste des abréviations  
Liste des figures  
Liste des tableaux

**Introduction ..... 1**

## Première partie : synthèse bibliographique

1	Generalites sur les plantes medicinales .....	5
1.1	Etude de la plante.....	5
1.1.1	Famille des amaranthacees ou chenopodiacees : .....	5
1.1.1.1	Vegetation .....	5
1.1.1.2	Classification .....	6
1.1.1.3	Distribution .....	6
1.1.2	Genre de salicornia .....	7
1.1.2.1	Usage de genre salicornia .....	9
1.1.3	Presentation d'espece etudiee .....	9
1.1.3.1	Salicornia fruticosa .....	9
1.1.3.2	Taxonomies : .....	10
2.	Les elements actifs des plantes medicinales .....	11
2.1	Generalites sur les metabolites secondaires .....	11
2.1.1	Classification des metabolites secondaires .....	11
2.1.1.1	Les composes phenoliques .....	11
2.1.1.2	Les principales classes des composes phenoliques .....	12
a.	Acide phenolique .....	13
b.	Les flavonoïdes .....	14
c.	Les anthocyanes .....	16
d.	Tanins .....	16
e.	Coumarines .....	18
f.	Les quinones .....	19
2.1.1.3	Effets biologiques des polyphenols .....	19
2.1.1.4	Les isoprenoïdes (steroides et terpenoides) .....	21
2.1.1.5	Les composes azotes (derives des acides amines) alcaloïdes .....	21
2.1.2	Biosynthese des metabolites secondaires .....	22
2.2	Les huiles essentielles .....	23
2.2.1	Generalite .....	23
2.2.2	Repartition des huiles essentielles dans la plante .....	23
2.2.3	Caracteres physico-chimiques des huiles essentielles .....	24
2.2.4	Methodes d'extraction des composes volatils et phenoliques .....	24
2.2.5	Extraction des huiles essentielles .....	25
2.2.5.1	Hydrodistillation .....	25

2.2.5.2	Distillation a vapeur saturée et l'hydro-diffusion .....	26
2.2.5.3	Expression ou pressage a froid .....	26
2.2.5.4	Enfleurage .....	26
2.2.5.5	Extraction de la fraction volatile dans l'espace de tete .....	27
2.2.5.5.1	Micro-extraction sur phase solide .....	27
2.2.5.5.2	Desorption thermique automatique .....	28
2.3	Extraction des extraits.....	29
2.3.1	Extraction liquide-liquide et maceration .....	29
2.3.2	Extraction au soxhlet .....	30
2.3.3	Extraction par la methode de likens-nickerson .....	31
2.3.4	Extraction au CO2 supercritique .....	32
2.3.5	Extraction par micro-ondes .....	33
2.3.6	Extraction par ultra-sons .....	33

### Deuxième partie : Matériel et méthodes

1.	Materiel vegetale .....	36
1.1	Description de la zone de prélèvements .....	37
1.2	Broyage et conservation de la poudre des salicornia fruticosa .....	37
2.	Extraction des he par hydrodistillation .....	38
3.	Tests phytochimiques .....	40
3.1	Préparation extrait ethanolique .....	40
3.1.1	Les tannins .....	40
3.1.2	Les flavonoïdes .....	41
3.1.3	Stérols et triterpènes .....	41
3.1.4	Les composés réducteurs .....	41
3.2	Préparation de l'extrait aqueux .....	41
3.2.1	Les saponosides .....	42
3.2.2	L'amidon.....	42
3.3	Macération du matériel végétal avec l'acide sulfurique (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) .....	42
3.3.1	Les alcaloïdes.....	42
3.3.2	Les coumarines .....	42
3.3.3	Les anthocyanes.....	43
4.	Extraction des composés phenoliques .....	43
4.1	Préparation des extraits bruts méthanoliques .....	43
4.2	Extraction des flavonoïdes .....	43
4.3	Extraction des tannins.....	45
5.	Dosage des composés phenoliques .....	46
5.1	Dosage des phénols totaux .....	46
6.	Etudes biologiques.....	47
6.1	Etude de l'activité antibacterienne.....	47
6.1.1	Test de sensibilité par la méthode de diffusion sur agar (méthode des disques) .....	50
6.1.1.1	L'extrait brute méthanolique .....	50
6.1.1.2	Les extraits de trois composés phénoliques .....	51
6.1.2	Détermination de la CMI et de la CMB en microplaque.....	52
6.2	Evolution de l'effet hemolytique .....	54

6.2.1	Préparation du pbs (phosphate buffered saline) à $\text{ph}=7,4\pm 0,02$ .....	54
6.2.2	Prélèvement du sang .....	54
6.2.3	Préparation de la suspension érythrocytaire .....	54
6.2.4	Préparation des extraits .....	55
6.2.5	L'effet hémolytique .....	55

### Troisième partie : Résultats et interprétation

1.	Les résultats de screening phytochimique .....	57
2.	Les rendements en extraits secs .....	58
3.	Extraction des huiles essentielles.....	60
3.1	Résultats d'extraction par hydrodistillation .....	60
4.	Dosage des polyphénols totaux .....	60
5.	Pouvoir antibactérienne .....	61
5.1	Technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton (méthode des disques) .....	61
5.1.1	D'extrait brute méthanolique <i>S.fruticosa</i> .....	61
5.1.2	Activité antibactérienne des extraits sélectifs .....	64
5.2	Détermination (CMI) et (CMB) par la méthode microdilution en milieu liquide (microplaque) .....	65
6.	Pouvoir hémolytique de l'extrait brut méthanolique de <i>Salicornia fruticosa</i> .....	66

### Quatrième partie : Discussion

Discussion.....	69
Conclusion .....	73
Références Bibliographiques .....	75
Annexes.....	90



# *Introduction*

**D**epuis des millénaires, l'homme puise dans son environnement les connaissances nécessaires à sa survie et à son bien être. Avant même de posséder l'usage du langage, il pouvait transmettre l'expérience de la médecine et de tous types de remèdes naturels pour finalement élaborer ce que nous appelons aujourd'hui « la médecine traditionnelle »

« La médecine traditionnelle réunit l'ensemble des connaissances, compétences et pratiques basées sur les théories, croyances et expériences auxquelles différentes cultures ont recours pour entretenir la santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, soulager ou soigner des maladies physiques et mentales » **(Khoukhal, 2015)**.

Aujourd'hui comme jadis, la médecine moderne dépend beaucoup des plantes. Les laboratoires de chimie et de biologie à travers le monde ont emboîté le pas à la médecine traditionnelle pour la recherche des voies et moyens de venir à bout des pathologies diverses, ceci par la recherche de nouveaux principes actifs et la compréhension de leurs modes d'action. **(Beddou., 2015)**

Dépassant actuellement 200000 substances identifiées, les métabolites secondaires peuvent être classés en plusieurs groupes en fonction de leurs classes chimiques et leurs origines de biosynthèse, on distingue trois principales classes : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes **(Bruneton, 2009)**.

Ces métabolites ont depuis leur découverte des actions bactéricides qui sont établies depuis des millénaires, permettant à la phytothérapie de reprendre l'avantage sur les médicaments obtenus par synthèse chimique **(Bellakhdar.,2006)**.

*Salicornia fruticosa L.* (également connu comme glasswort) est l'herbe succulente annuelle de la famille de *Chénopodiacée* et des plantes tolérantes plus salées. Il se développe sur les marais salants et les rivages vaseux **(Kim et al, 2009)**

Dans cette perspective la problématique du thème se focalise sur :

- Extraction des Huile essentielle par hydrodistillation.
- Screening phytochimique.
- Des extractions des extrait brut méthanolique et les extrait sélectifs flavonoïdes, tanins et un dosage des polyphénols
- Etude de l'effet antibactérien des extrait de la plante se fait par :
  - par la méthode de diffusion sur agar (méthode des disques) vis –à-vis quinze souches de références. Pour extrait brut méthanolique.

- par la méthode de diffusion sur agar (méthode des disques) vis –à-vis souche *L.monocytogenes*. Pour extraits brut méthanolique, flavonoïde fraction acétate, flavonoïde fraction n-butanol et tanins
  - Par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide (microplaque) pour l'extrait brut méthanolique.
- Etude de la cytotoxicité d'extrait brut méthanolique.

*Synthèse*

*Bibliographique*

## 1. Généralités sur les plantes médicinales

Les plantes médicinales sont toutes les plantes qui auraient une activité pharmacologique pouvant conduire à des emplois thérapeutiques. Cela grâce à la présence d'un certain nombre de substances actives dont la plupart agissent sur l'organisme humain.

Elles sont utilisées en pharmacie humaine et vétérinaire, en cosmétologie ainsi que dans la confection de boissons, soit nature, soit en préparation galénique ou encore sous forme de principes actifs comme matière pour l'obtention de médicaments (Naghibi *et al.*, 2005 ; Babulka, 2007).

### 1.1 Étude de la plante

#### 1.1.1 Famille des *Amaranthacées* ou *Chénopodiacées* :

La famille des *Chénopodiacées* fournit le contingent majoritaire dans ces types de peuplements beaucoup de ses représentants halophiles ont une apparence de plantes grasses à rameaux articulés, comme les *salicornes* formant le fond de la végétation de la Camargue. Certaines espèces, peu nombreuses d'ailleurs, supportent des teneurs de 1 à 3 pour 100 de sel dans le sol, mais le caractère halophile de la végétation apparaît déjà pour des teneurs inférieures à 1 pour 100 (Ozenda, 1982).

La famille des *Chénopodiacées* comprend un nombre élevé d'halophytes. Plusieurs de ses genres sont des halophytes obligatoires et sont strictement adaptées aux fortes salinités (Grigore et Toma, 2008). Elle possède la plus grande diversité dans l'anatomie des organes photosynthétiques par rapport aux angiospermes. Cette diversité est principalement liée aux origines multiples de la photosynthèse type C4 (Akhani, 2004 ; Podlech, 1997; Kadereit et al, 2003). Les *Chénopodiacées* ont plus de taxons C4 (45 genres et 550 espèces) (Sage, 1999) que toute autre famille de dicotylédones. ils sont la seule famille chez les angiospermes qui comprend des plantes terrestres de type C4 manquant de l'anatomie Kranz (Kapralov *et al.*, 2006).

##### 1.1.1.1 Végétation :

Les *Chénopodiacées* sont en général des plantes buissonnantes, rarement des herbes (*Chenopodium*, *Bassia*) (Ozenda, 1991), à racines et tiges ordinairement pourvues d'anneaux libéroligneux surnuméraires (Maire, 1962).

Quelques genres ont des feuilles à limbe plat et bien développé (*Atriplex*, *Beta*, *Chenopodium*), mais très souvent les feuilles se réduisent à une gaine entourant la tige et terminée par un limbe réduit à une pointe coriace (Ozenda, 1991), elles sont ordinairement

alternes, rarement opposées, non stipulées (Maire, 1962), les rameaux souvent charnus et /ou articulés, sève aqueuse (Florence, 2004).

Les fleurs sont toujours petites, peu visibles, cachées en partie entre des bractées (Ozenda, 1991);

hermaphrodites ou unisexuées par avortement, ou parfois nettement unisexuées (Maire, 1962) généralement actinomorphes.

Inflorescences axillaires, formées de glomérules ou de cymes disposés en épis, grappes, ou panicules, munies de bractées ou non, parfois logées dans des excavations des tiges ou fleurs solitaires (Florence, 2004). La floraison est en général automnale (Ozenda, 1991).

#### 1.1.1.2 Classification :

La classification des Chenopodiaceae repose essentiellement sur la structure de la graine et la forme de l'embryon, caractères d'une observation assez délicate. Les Chenopodiaceae hyperhalophiles (*Halocnemum strobilaceum*, *Arthrocnemum glaucum* ssp. *indicum*, *Salicornia fruticosa*) font défaut au Sahara central et méridional. Elles descendent par contre très au Sud dans le Sahara océanique (Ozenda, 1991).

#### 1.1.1.3 Distribution :

La famille est largement distribuée dans les milieux salins tempérés et subtropicaux du monde entier, particulièrement autour de la Méditerranée, de la mer Caspienne et de la mer Rouge, dans les steppes du centre et de l'est de l'Asie et dans la pampa d'Argentine. Certaines espèces sont également devenues des plantes adventices qui poussent dans les sols alcalins autour des habitations. (Figure 1).

Les *Chenopodiaceae* sont surtout caractéristiques des terrains plus ou moins salés : ce sont des nits profiles ou rudérales abondantes dans les décombres (*Chenopodium*) ou des halophiles formant des peuplements denses sur les côtes ou dans les steppes et les déserts salés (associations à *Atriplex*, *Salicornia*, *Spinifex*, *Salsola*, *Suaeda* des déserts d'Australie, d'Asie, des chotts sahariens ou des salitrales d'Argentine). C'est ainsi qu'elles poussent en abondance sur les rivages maritimes et les espaces laissés à sec par un retrait relativement récent des mers, comme la betterave sauvage (*Beta vulgaris*) (Site de Plantes et botanique, 2013).

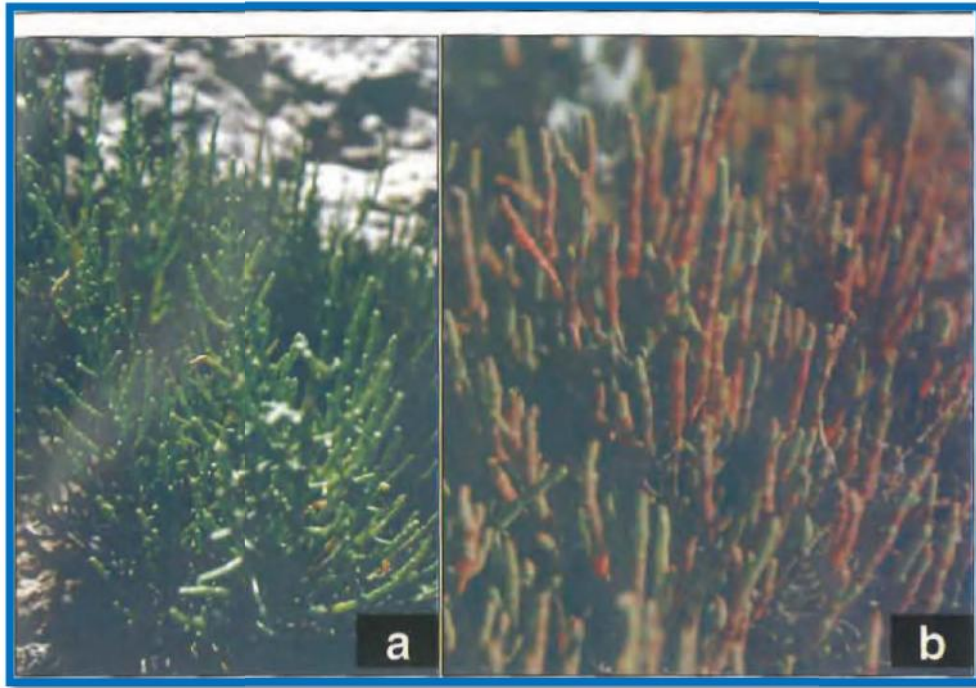


**Figure 1.** La distribution de la famille Chénopodiacées dans le monde (Kadereit *et al.*, 2007).

### 1.1.2 Genre de *Salicornia*

*Salicornia* L. est une herbe hygrohalophytic (des soifs fortement salins) et apparent sans feuilles annuelle répandue qui ont articulé et les tiges succulentes (Davy *et al.*, 2001).

Il appartient à la famille de Chenopodiaceae, un des onze familles plus avancés dans le Caryophyllales d'ordre (Al-Jaber *et al.*, 1992). Les espèces de *Salicornia* (Figure 2) sont petites, habituellement plus moins de 30 cm grands, la tige principale et ses branches opposées se composent d'entre-nœuds courts, cylindriques ou clavés, chacun avec une bêche succulente et photosynthétique, conférant l'aspect articulé (Davy *et al.*, 2001). Beaucoup d'espèces sont de feuillage tours verts, mais rouges en automne. Les fleurs hermaphrodites sont vent pollinisé, et le fruit est petit et succulent et contient une graine simple (Bail, 2004).



**Figure 2.** Les espèces du *Salicornia* (a) le ressort et (b) les saisons d'automne.

Des espèces de *Salicornia* sont ambiant identifiées en tant qu'un des écosystèmes les plus importants dans une zone de marée puisqu'elles jouent des rôles essentiels en écologie de marée, telle que servir d'amortisseurs, protéger les rivages contre l'érosion par la force des vagues, et filtrer des contaminants de la terre (Silva *et al.*, 2007; Kong *et al.*, 2008a, Han *et al.*, 2010).

Par exemple, *Salicornia bigelovii* est efficace pour enlever le sélénium de l'eau polluée et du sol (Lin *et al.*, 2000) et peut inhiber la croissance de *Skeletonema costatum*, une fleur marine formant diatomées, jouant ainsi un rôle actif dans la prévention de l'eutrophisation et la prolifération d'algues nuisibles ) (Jiang *et al.*, 2010).

*Salicornia* a été commencé probablement pendant le miocène quelque part entre Méditerranéenne et l'Asie centrale du pluriannuel *Sarcocornia* et a commencé à diversifier pendant défunt pliocène/tôt le pléistocène (Kadereit *et al.*, 2007). En fait, le genre *Salicornia* comprend environ 117 espèces, étant *Salicornia herbacea*, *Salicornia bigelovii*, *Salicornia europea*, *Salicornia prostrata*, *Salicornia ramosissima* et *Salicornia virginica* ceux avec une plus grande fréquence.



### 1.1.2.1 Usage de genre *Salicornia*

L'utilisation de *salicornia* comme nourriture est désigné par la palynologie criminalistique comme une réalité au moins d'il y a 550 ans. Actuellement est très apprécié comme un produit gastronomique en Europe, mais en particulier dans les pays asiatiques, où est utilisé dans des salades fraîches et des cornichons. Certaines des espèces *Salicornia* afficher des applications sur la médecine populaire (pour le traitement de la bronchite, l'hépatite et diarrhée) et a montré des propriétés biologiques importantes telles que antioxydant, anti-inflammatoire, hypoglycémique et les activités cytotoxiques. Les études phytochimiques sur ce genre ont rapporté la présence d'acides gras, des stérols, saponines, les dérivés de l'acide chlorogénique, des alcaloïdes, des flavonoïdes et autres types de composés phénoliques (Isca ,2014).

Cependant, les espèces *Salicornia* ont une grande diversité d'applications allant de l'utilisation comme plante médicinale à la consommation humaine à leur utilisation comme additif dans la fabrication du verre et du savon (ce dernier en raison de sa haute teneur en cendres) (Davy *et al.*, 2001; Liebezeit, 2008).

### 1.1.3 Présentation d'espèce étudiée

#### 1.1.3.1 *Salicornia fruticosa*

*Salicornia fruticosa* L. (également connu comme glasswort) est l'herbe succulente annuelle de la famille de Chenopodiaceae et du la plupart salent les usines tolérantes. Elle se développe sur des marais de sel et les bords de la mer boueux (Kim *et al.*, 2009) et ce famille est représenté en Egypte par 25 genres et environ 300 espèces. Plusieurs espèces possèdent des propriétés d'antibactérien et d'antihypertensif, également mentionnées dans la médecine traditionnelle pour le soulagement du mal de dents et de rhumatismal chronique (Elsebaie *et al.*, 2014) (figure 3).



**Figure 3.** Aspects morphologiques des parties aériennes d'espèces de *Salicornia*.

### 1.1.3.2 Taxonomies :

**Tableau 1.** Classification botanique de *Salicornia fruticosa* L. (*Quézel.*, 1962)

Règne	Végétal
Embranchement	Spermatophytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicots moyennes
Sous-classe	Pré-astéridées (Apétales)
Ordre	Caryophyllales (Centrospermales)
Famille	Amaranthacées (Chénopodiacées)
Genre	<i>Salicornia</i>
Espèce	<i>Salicornia fruticosa</i> (L)

## 2. Les éléments actifs des plantes médicinales :

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse de principes actifs les plus divers. Ce processus métabolique est lié aux conditions mêmes de vie de la plante : la plante doit faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit : prédateurs, microorganismes pathogènes, etc. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre : les métabolites secondaires (**Kansole, 2009**).

### 2.1 Généralités sur les métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils y jouent différents rôles, dont celui de moyen de défense contre les agressions externes. (**Hartmann, 2007**).

Ils sont divisés principalement en trois grandes familles: Les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes (**Lutge et al., 2002 ; Abderrazak et Joël., 2007**)

#### 2.1.1 Classification des métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes, les composés acétyléniques, les cires, et les composés phénoliques (**Vermeris, 2006**). On distingue trois classes principales :

##### 2.1.1.1 Les composés phénoliques :

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires. (**Lebham, 2005**). Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieures (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) ; et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogénèse, la germination des graines et la maturation des fruits (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Ils regroupent un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisé en une dizaine de classe chimiques, qui présentent tous un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles OH (**Hennebelle et al., 2004**).

Ils résultent bio génétiquement de deux voies synthétiques principales : la voie shikimate et acétate (Lugasi *et al.*, 2003). Les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes simples et pro-anthocyanidines) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes. (Beta *et al.*, 2005).

### 2.1.1.2 Les principales classes des composés phénoliques :

Les composés phénoliques sont classés selon le nombre d'atome de carbone dans le squelette de base, ces structures peuvent être sous forme libres ou liées à l'ester ou hétérosides (Bruneton, 1999) (Tableau 2).

Tableau 2. Principales classes des composés phénoliques (Bruneton, 1999 ; Hennebelle, 2006).

Nombre d'atome de carbone	Squelette de base	Classe	Exemples	Plantes
6	C6	Phénols simples	Cathécol, hydroquinone	Busserole
7	C6-C1	Acides phénols Benzoïques	Ac. gallique, Ac. salysalique, vanilline	Artichaut Saule
8	C6-C2	Acétophénones	3-acétyl6- méthoxybenzaldehyde	Saule
9	C6-C3	Acides phénols Cinnamiques	Ac. coumarique, Ac.caféique	Romarin Marronnier d'inde
10	C6-C4	Naphtoquinones	Shikonine	Drosera spp.
13	C6-C1-C6	Xanthones	Bellidifoline, mangoétine	Racine de gentiane, Centaurée
14	C6-C2-C6	Stiblènes	Hydrangénol,,Pinosylvine	Raisin, pin
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétine, Roténoïde	Ginkgo Thym Camomille
18	(C6-C3)2	Lignanes	Matairésinol	Chardon
30	(C6-C3-C6)2	Bi flavonoïdes	Amentoflavone, Hinokiflavone	Carcinia Hypericum
N	(C6-C3-C6)n	Tanins condensés (proanthocyanid ols	Aesculitanins	Marronnier d'inde, vigne

### a. Acide phénolique :

Les acides phénoliques sont présents en abondance dans les aliments et divisés en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. Les acides hydroxycinnamiques sont plus fréquents que les acides hydroxybenzoïques et comprennent essentiellement l'acide p-coumarique, caféique, férulique et sinapique (Pandey et Rizvi, 2009) (Figure 4 et 5).

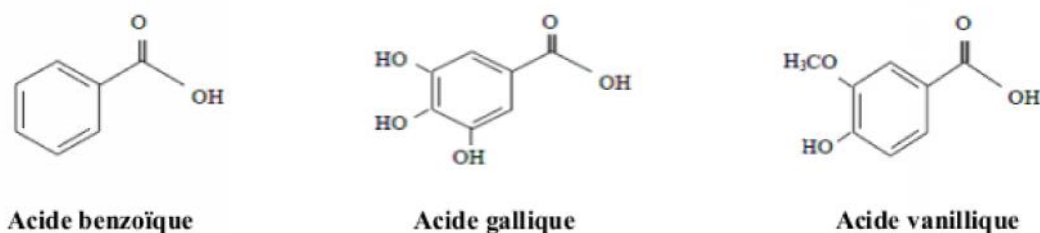


Figure 4. Quelques acide phénols de la série benzoïque ( bruneton, 2009 ).

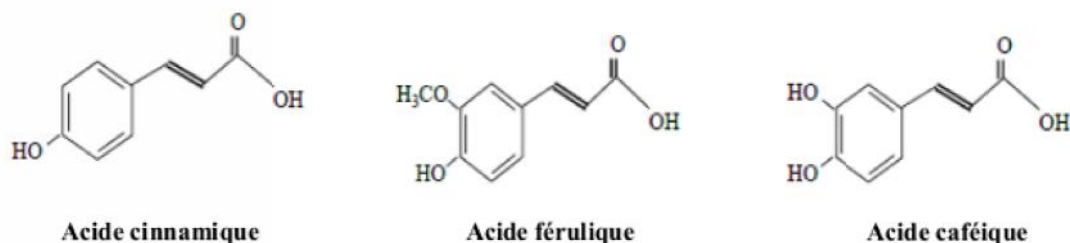


Figure 5. Quelques acide phénols de la série cinnamique ( bruneton, 2009 ; Pawloxska et al.,2006 ).

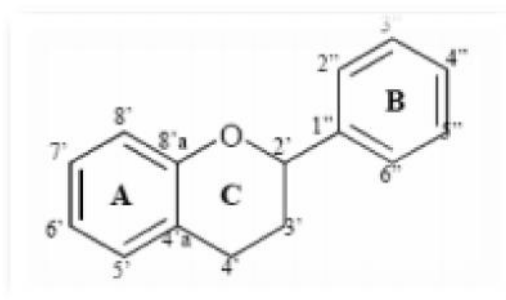
### b. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles, ils constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels du règne végétal (Ghedira, 2005), qui sont caractérisés par la présence d'une structure phénolique dans leur molécule, et même d'une structure flavone ce qui les distingue des autres polyphénols.

Aujourd'hui plus de 9000 flavonoïdes ont été répertoriés et il en reste des milliers d'autres à découvrir puisque le squelette des flavonoïdes peut être substitué par différents groupements comme des groupements hydroxy, méthoxy, méthyl, benzyl et isoprényl (Beecher, 2003 ; Williams et Grayer, 2004 ; Kueny-Stotz, 2008).

➤ **Structure chimique et classification :**

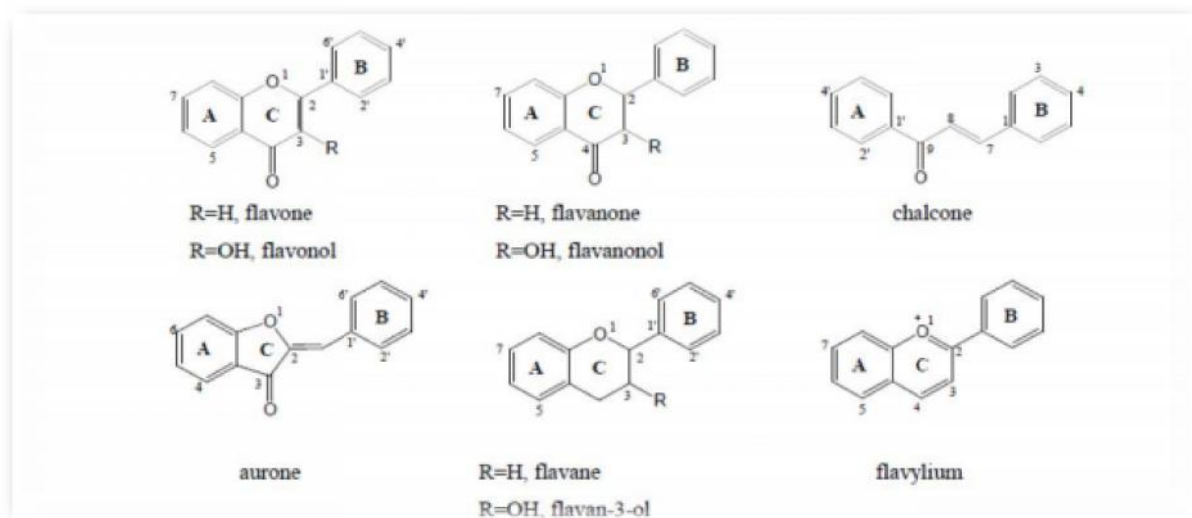
Les flavonoïdes sont des dérivés benzo- -pyran (Skerget *et al.*, 2005). Leur structure de base est celle d'un diphenylpropane à 15 atomes de carbone (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), constitué de deux noyaux aromatiques (ou anneaux) que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygénés, qui désigne la lettre C (Dacosta, 2003) (Figure 6).



**Figure 6.** Squelette de base des flavonoïdes (Girotti-Chanu, 2006).

De façon générale les flavonoïdes se trouvent soit à l'état libre, dans ce cas ils sont dits aglycones, soit sous forme de C- ou O-glycosides, et dans ce cas ils sont liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose, ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères (Dacosta, 2003).

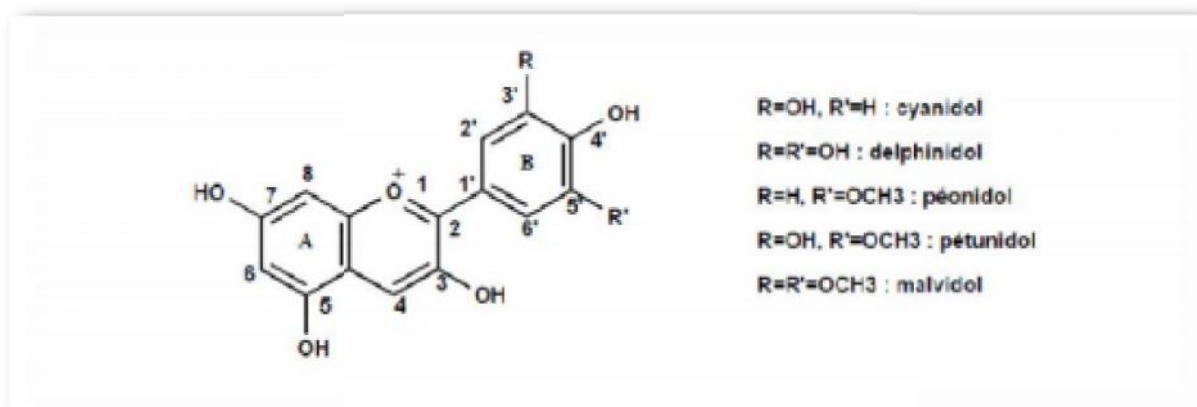
Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont: flavones, isoflavandiols, flavanols, flavondiols, aurones, chalcones, anthocyanins (figure 7).



**Figure 7.** Structure des différentes classes des flavonoïdes (Martinez *et al.*, 2005).

### c. Les anthocyanes :

Les anthocyanes (**du grec anthos, fleur et Kuanos, bleu violet**) terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés. Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, ce sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange. Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu. A l'origine de la couleur des fleurs, des fruits et des baies rouges ou bleues, elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplis d'eau. On trouve également les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines. En automne, les couleurs caractéristiques des feuilles des arbres sont dues aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle (khoukhal, 2015) (Figure 8).



**Figure 8.** Structure générale des anthocyanes (Le cation flavylium).

**d. Tanins :**

Ils sont d'origine végétale et non azotée qu'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbres, les fruits (raisin, datte, café, cacao...) et les feuilles de thé. Se sont des composés polyphénoliques, solubles dans l'eau de masse molaire entre 500-2000D, de structures variées ayant en commun la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les protéines. (**Vermerris et al., 2006**).

Utilisés depuis l'antiquité par l'homme pour le traitement des peaux d'animaux, les tanins ont une importance économique et écologique importante parmi les caractéristiques des tanins le goût astringence qui est une sensation tactile due à la précipitation des protéines salivaires et qui crée une sensation d'assèchement dans la bouche (**Peronny, 2005**).

**➤ Structure et classification :**

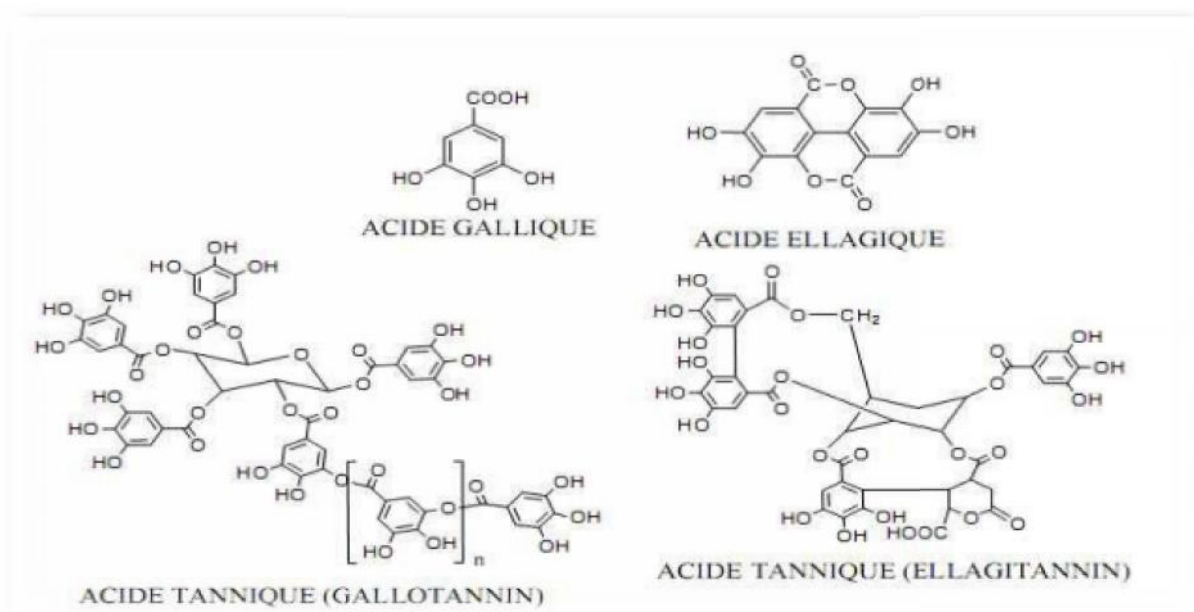
Les tanins sont classés en deux groupes selon leur structure chimique : les tanins hydrolysables et les tanins condensés:

**• Tanins hydrolysables**

Ce sont des esters de glucose, ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique ou enzymatique. Ils libèrent alors une partie non phénolique (le plus souvent du glucose ou de l'acide quinique) et une partie phénolique qui peut être de l'acide gallique (**Macheix et al., 2005**) (**Figure 9**).

Ils sont constitués d'un noyau central -le glucose- et de chaînes latérales (en position 1, 2, 3, 4 ou 6 sur le glucose) comprenant 1 à n monomère(s) d'acide phénol. Des liaisons carbonées à carbone entre noyaux (liaisons biphenyle réalisées par couplage oxydatif), conduisent à des molécules ramassées plus rigides de solubilité diminuée dites les tanins éllagiques ((**khoukhal, 2015**)).



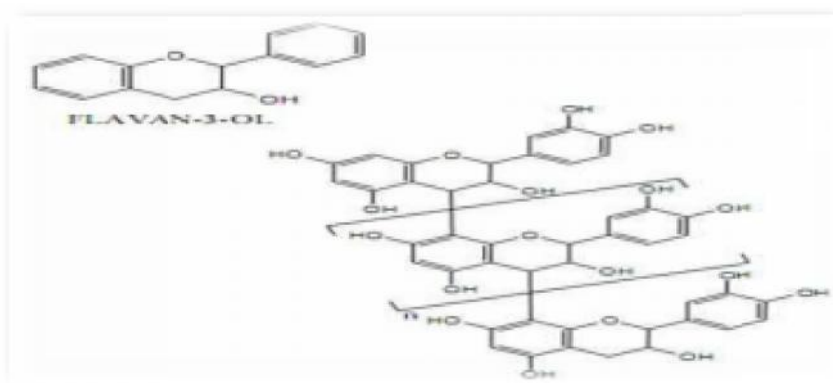


**Figure 9.** Structure des tanins hydrolysables et les acides associés (Peronny, 2005).

- **Les tanins condensés (pro-anthocyanidines) :**

De structure plus complexe, on les appelle également pro-anthocyanidines, largement présents dans le règne végétal, et que l'on rencontre dans de nombreux produits alimentaires (fruit, légumes, boissons....) (Peronny, 2005).

Ils ne renferment pas de sucres dans leur molécule ; ils ne sont hydrolysés ni par les acides, ni par les tannasses mais en présence d'acide forts ou d'agents d'oxydation, ils se transforment en substances rouges : les phlobaphènes (exemple : rouge de cola) (Atefeibu, 2002). Ce sont des polymères de flavan-3-ols, appelés aussi catéchines et de flavan-3,4-diols appelés leuco-anthocyanidines ou un mélange des deux (Atefeibu, 2002 ; Peronny, 2005) (Figure 10).



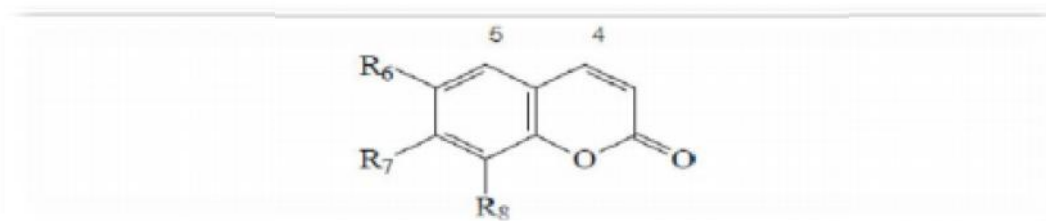
**Figure 10.** Structure des tanins condensés et leur monomère (Peronny, 2005).

**e. Coumarines :**

Les coumarines constituent une classe importante de produits naturels et donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché. A l'exception des algues, ces composés sont les constituants caractéristiques du règne végétal chlorophyllien. Les familles les plus riches en coumarines sont : les Légumineuses, Rutacées, Apiécées et Thymeleacées. Elles se trouvent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines (Guignard ,1998 ; Deina *et al.*, 2003 ; Booth *et al.*, 2004).

Les coumarines sont des substances phénoliques synthétisées à partir de la fusion des noyaux benzènes et - pyrone (O'Kennedy et Thomes, 1997). Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et dans les solvants organiques ou les solvants chlorés alors que les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau (Bruneton, 1999).

Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration et aussi selon l'espèce. Dans la cellule végétale elles sont principalement présentes sous forme glycosylée (Hofmann, 2003), Cette glycosylation est une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques de ces molécules. Elles sont considérées comme des phytoalexines, c'est-à-dire des métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries. Les coumarines peuvent également se trouver dans le règne animal (les glandes à sécrétion odoriférante du castor) et chez certains microorganismes (Hofmann, 2003) (Figure 11).



**Figure 11.** Structure de base de Coumarine ( kholkhal , 2015 ).

**f. Les quinones :**

Les quinones sont des noyaux aromatiques avec deux substitutions cétones. Ce sont des substances colorées et brillantes, en général rouges, jaunes ou oranges et possédant deux fonctions cétones. Elles sont responsables de la réaction de brunissement dans les fruits et végétaux coupés ou lésés. En plus de fournir une source de radicaux libres stables, les

quinones sont connues pour se complexer de manière irréversible avec les nucléophiles des acides aminés dans les protéines. Par conséquent, les quinones inactivent les protéines et altèrent leur fonction (Arif *et al.*, 2009). On trouve les quinones dans les végétaux, les champignons et les bactéries. Les organismes animaux contiennent également des quinones, comme par exemple la vitamine K qui est impliquée dans la coagulation du sang. Les quinones sont utilisées dans les colorants, les médicaments et dans les fongicides (Kansole, 2009) (Figure 12).

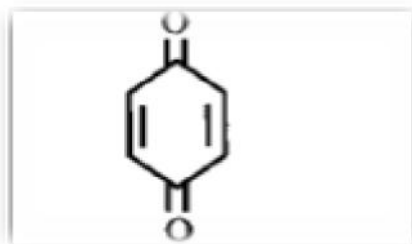


Figure 12. Structure d'une molécule de quinone (Cowan, 1999).

#### 2.1.1.3 Effets biologiques des polyphénols :

Les polyphénols ont une multitude d'activités biologiques dépendant de leur structure chimique.

Ils constituent une importante famille d'antioxydants dans les plantes, les fruits et les légumes puisqu'elles comprennent plus de 6000 molécules. Contrairement aux antioxydants synthétiques comme le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT). Les polyphénols n'ont aucun effet nuisible sur la santé humaine (Bounatirou *et al.*, 2007).

Ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux (Babar Ali *et al.*, 2007), anti-allergènes, vasodilatateurs (Falleh *et al.*, 2008) et antioxydants (Gomez Caravaca *et al.*, 2006)

Les polyphénols ont également un rôle dans le contrôle de la croissance et le développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance. Ils permettent aux végétaux de se défendre contre les rayons ultraviolets. Certains d'entre eux jouent le rôle de phytoalexines comme les isoflavonols permettant de lutter contre les infections causées par les champignons, ou par les bactéries (Makoi et Ndakidemi, 2007). Les pigments non azotés sont impliqués dans le processus de pollinisation : ils attirent l'attention des insectes pollinisateurs, ou servent au contraire à dessiner les formes pour éloigner les prédateurs. D'autre sont des inhibiteurs d'enzymes et interviennent dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies (Bruneton, 1999).

Les polyphénols sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation (**Bruneton, 1999**) (**Tableau 3**) :

**Tableau 3.** Activités biologiques de quelques composés phénoliques (**Bruneton 1999 ;Hennebelle, 2006**).

Composés	phénoliques	Activité biologique
<b>Ac. Phénols</b>	Ac. Cafeique Ac. Salicylique	Antibactérienne Antifongique, antioxydante
<b>Tanins</b>	Tanin gallique Proanthocyanidine	Effet stabilisant sur le collagène, antioxydant, anti-diarrhéique, effet antiseptique, effet vasoconstricteur
<b>Flavonoïdes</b>	Lutéoléine Catéchine Hespéridine Quercétine Naringénine	Antitumorale, anticarcinogène, anti -inflammatoire, antioxydante, antiallergique, antiulcéreuse, antivirale, antimicrobienne, hypotenseur diurétique.
<b>Coumarines</b>	Dicoumarol	Anticoagulant, antioxydant, protectrice vasculaire et antioedémateuse

#### 2.1.1.4 Les isoprénoïdes (Stéroïdes et Terpénoïdes) :

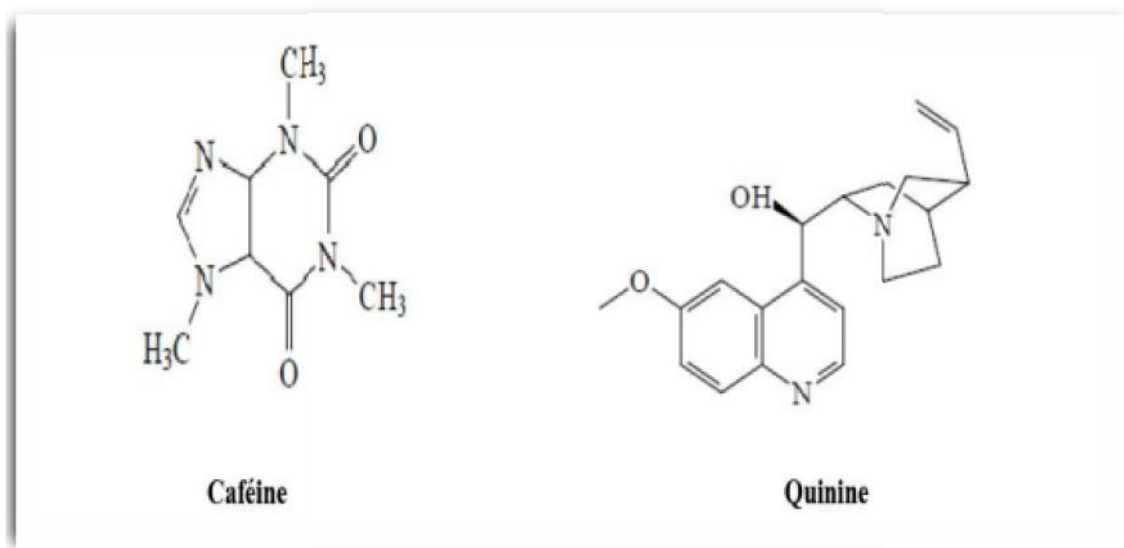
Les terpénoïdes sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux, ils résultent de l'enchaînement de plusieurs unités isoprénique (**Bhat, et al., 2005**).

#### 2.1.1.5 Les composés azotés (dérivés des acides aminés) Alcaloïdes :

Les alcaloïdes sont un groupe de composés azotés et faiblement basiques issus principalement des végétaux (**Figure 13**). Ils présentent des réactions communes de précipitation. Après extraction, ils sont détectés par des réactions générales de précipitation fondées sur leur capacité de se combiner avec des métaux. La caractérisation de la présence d'alcaloïde peut se faire par précipitation à l'aide de : réactif silicotungstique : réactif de Bertrand, réactif tétraiodomercurate de potassium : réactif de Valser-Mayer, iodobismuthate de potassium : réactif de Dragendorff (**Kansole, 2009**).

En raison de leur puissante activité biologique, la plupart des alcaloïdes connus, environ 12.000, ont été exploités en tant que médicaments, stimulants, narcotiques et comme poisons. Contrairement à la plupart des autres types de métabolites secondaires, les

nombreuses classes d'alcaloïdes ont des origines biosynthétiques uniques (Ziegler et Facchini, 2008).



**Figure 13.** Structure de quelques alcaloïdes

➤ **Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des alcaloïdes :**

Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques qui s'exercent dans les domaines les plus variés :

- ✓ Au niveau du système nerveux central comme antidépresseurs (morphine, scopolamine) ou stimulants (strychnine, caféine),
- ✓ Au niveau du système nerveux autonome : sympathomimétiques (éphédrine) ou sympatholytiques, parasymphatomimétiques, anti-cholinergiques et ganglioplégiques.

On notera aussi l'existence de curarisants, d'anesthésiques locaux, d'anti-fibrillants, d'anti-tumoraux, et d'antipaludiques (Bruneton, 1999).

**2.1.2 Biosynthèse des métabolites secondaires :**

Les métabolites secondaires résultent généralement de trois voies de biosynthèse : la voie de shikimate, la voie de mevalonate et du pyruvate (Verpoorte et Alfermann, 2000) (Figure 14).

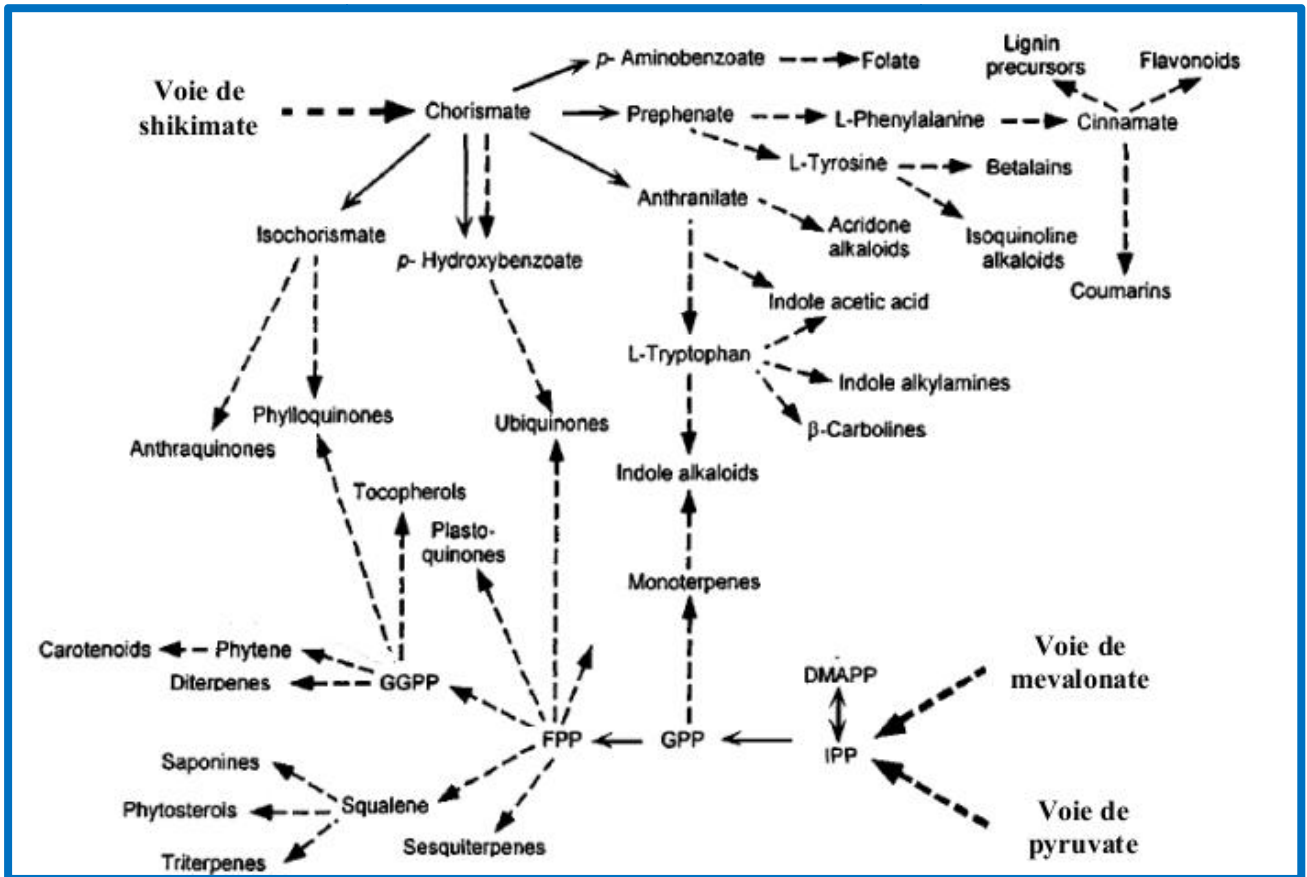


Figure 14. Biosynthèse des métabolites secondaires (VERPOORTE et ALFERMANN, 2000 ; WINK, 2010).

## 2.2 Les huiles essentielles :

### 2.2.1 Généralité :

L'huile essentielle, essence ou également appelé huile volatile, est l'ensemble d'extraits volatils de composition complexe obtenu des plantes aromatiques. D'après l'Association Française de Normalisation (AFNOR, Edition 2000), a défini les huiles essentielles comme étant : des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de Citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques. L'odeur et la volatilité des essences contribuent dans les interactions entre les végétaux également entre végétal et l'animal ou elles constituent un moyen de défense avec sont action répulsive contre les prédateurs (micro-organismes, champignons, bactéries, animaux herbivores). Elles peuvent également participé à l'attraction des insectes pollinisateurs.

Il s'agit d'un extrait pur et naturel provenant de plantes aromatiques (**Roulier. 1190 ; Wegrzyn., Lamendinh. 2005**). Elle concentre l'essence de la plante, autrement dit son parfum. Il s'agit de substances odorantes, volatiles, de consistance huileuse, très concentrées, offrant une forte concentration en principes actifs (**Lardry, Haberkorn, 2007**) Il faut ainsi une très grande quantité de plantes fraîches pour obtenir quelques millilitres d'huiles essentielles (**Nogaret-Ehrhart. 2007**) On ne peut définir une essence sans définir sa méthode d'extraction.

Selon la **pharmacopée européenne 2008** : « Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition »

### 2.2.2 Répartition des huiles essentielles dans la plante :

Les huiles essentielles se rencontrent dans tout le règne végétal. Cependant, elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles (**Mann.1987**) telles que : les Conifères, les Rutacées, les Ombellifères, les Myrtacées, les Lamiacées, les Poacées.

Elles sont présentes dans différents organes végétaux producteurs, variant en fonction de la zone productrice du végétal (**Lamendin,2004 ; Rafi.,et al ,1995**) : les sommités fleuries (**ex:** lavande, menthe...), dans les racines ou rhizomes (**ex:** vétiver, gingembre), dans les écorces (**ex:** cannelles), le bois (**ex:** camphrier), les fruits (**ex:** citron), les graines (**ex:** Muscade) et sont contenues dans des structures spécialisées à savoir : les poils, les canaux sécréteurs et les poches (**Couic-Marinier.,Lobstein, 2013**).

### 2.2.3 Caractères physico-chimiques des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraînaibles à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau (**AFSSAPS, 2008**). Il faut donc impérativement un tensioactif pour permettre leur mise en suspension dans l'eau. Elles présentent une densité en général inférieure à celle de l'eau et un indice de réfraction élevé. Elles sont pour la plupart colorées : **ex :** rougeâtre pour les huiles de cannelle et une variété de thym, jaune pâle pour les huiles de sauge sclarée et de romarin officinal. Elles sont altérables et sensibles à l'oxydation. Par conséquent, leur conservation nécessite de l'obscurité et de l'humidité. De

ce fait, l'utilisation de flacons en verre opaque est conseillée (Couic-Marinier., Lobstein, 2013).

Elles sont constituées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15) (AFSSAPS ,2008).

#### 2.2.4 Méthodes d'extraction des composés volatils et phénoliques :

Dans ce contexte, il apparaît que l'étape de préparation de l'échantillon est au moins aussi fondamentale que celle de l'identification proprement dite des constituants (Muñoz-Olivas, 2004; Marriott *et al.*, 2001; Augusto *et al.*, 2003). Ces méthodes de préparation ont fait l'objet de nombreux articles et revues qui décrivent les potentialités et les limites des procédés mis en œuvre pour l'étude des métabolites secondaires issus de plantes ou de produits agroalimentaires (Mendiola *et al.*, 2007 ; Pourmortazavi et Hajimirsadeghi, 2007 ; Ridgway *et al.*, 2007)

Il apparaît, notamment, que les procédures de préparation des échantillons doivent être adaptées à la nature des constituants étudiés et à celle de la matrice support. Les composés volatils sont généralement extraits des plantes ou des produits agroalimentaires issus de leur transformation (confitures, boissons alcoolisées, compléments nutritifs, etc.) par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger, par distillation-extraction utilisant un appareil de type Lickens-Nickerson. Et composés phénoliques par extraction aux solvants avec un appareil de type Soxhlet (Sides *et al.*,2000 ; Wilkes *et al.*, 2000 ; Buldini *et al.*, 2002 ; Ridgway *et al.*, 2007). De nombreuses techniques d'extraction, plus respectueuses de l'environnement, telles l'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique et l'extraction assistée par micro-ondes ou par ultra-sons ont été développées dans le but de limiter le temps d'extraction, la consommation en solvants et en énergie, d'augmenter le rendement et d'améliorer la qualité des produits en limitant les altérations thermiques et hydrolytiques (Diaz-Maroto *et al.*, 2002 ; Lucchesi *et al.*, 2004a).

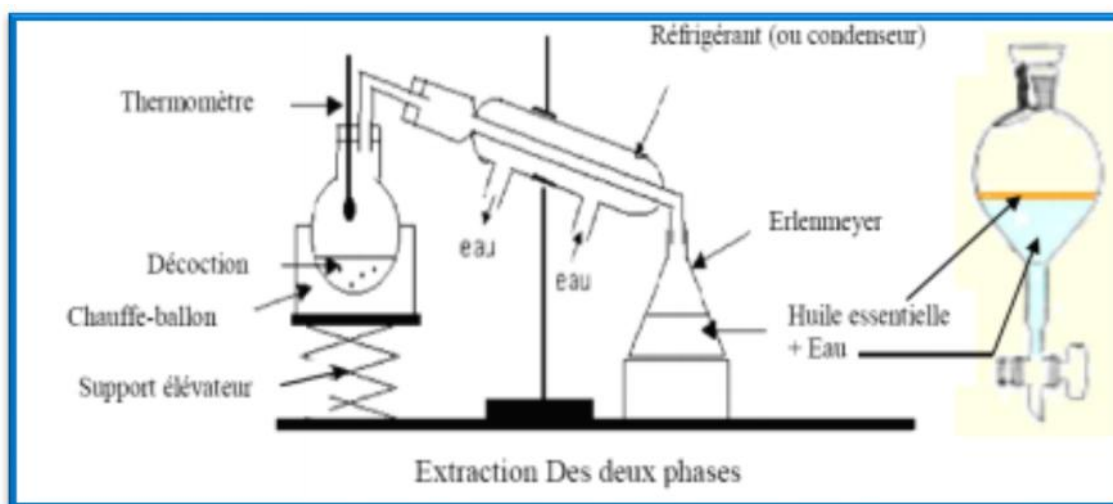
#### 2.2.5 Extraction des huiles essentielles :

##### 2.2.5.1 Hydrodistillation :

L'hydrodistillation (HD) est la méthode la plus couramment employée pour l'extraction d'une huile essentielle (Meyer-Warnod, 1984) ; dans son principe, elle correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau ; l'ensemble est ensuite porté à ébullition, à pression atmosphérique. Sous l'effet de la chaleur, les molécules odorantes contenues dans les glandes sécrétrices des



végétaux sont libérées sous forme d'un mélange azéotropique. Bien que la plupart des constituants aient des températures d'ébullition supérieures à 100°C, ils sont entraînés mécaniquement avec la vapeur d'eau. Le refroidissement par condensation conduit à la séparation du mélange eau-huile essentielle par décantation. Le système « Clevenger », préconisé par la pharmacopée européenne (**Pharmacopée Européenne, 1997**), permet le recyclage de la phase aqueuse du distillat dans le bouilleur par cohobage (**Clevenger, 1928**). Ainsi, l'eau et les molécules volatiles sont séparées, par leurs différences de densité, dans l'essencier en une phase aqueuse (hydrolat) et une phase organique surnageant (huile essentielle). La durée d'hydrodistillation, de trois à six heures en fonction de la matière végétale à traiter, peut avoir une influence sur le rendement en huile essentielle et sur sa composition chimique (**Figure 15**).



**Figure 15.** Schémas des étapes de l'hydrodistillation (**Lagunez Rivera., 2006**).

### 2.2.5.2 Distillation à vapeur saturée et l'hydro-diffusion :

Le principe de la distillation à vapeur saturée est analogue à l'hydrodistillation. Toutefois, le matériel végétal n'est pas en contact direct avec l'eau ; il est placé sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau qui traverse le végétal ; ils sont ensuite séparés par décantation du distillat refroidi. L'hydro-diffusion consiste à faire passer un flux généralement descendant de vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétale. Ces techniques sont usuellement employées par les industriels pour la production d'huiles essentielles et d'hydrolats à grande échelle. Les compositions chimiques des produits peuvent être sensiblement différentes en fonction des méthodes utilisées (**ICS – UNIDO, 2008**).

### 2.2.5.3 Expression ou pressage à froid :

Le procédé est utilisé uniquement pour l'obtention des huiles essentielles contenues dans les zestes d'agrumes (**Dugo et Di Giacomo, 2002**). Il s'agit d'un processus physique dans lequel les glandes à huile essentielle de la peau du fruit sont percées, broyées ou concassées mécaniquement afin de libérer l'essence. Cette méthode est économiquement plus rentable que l'hydrodistillation et permet d'éviter d'éventuelles dégradations thermiques.

### 2.2.5.4 Enfleurage :

Cette méthode est réservée aux huiles essentielles à forte valeur ajoutée ; elle est notamment utilisée avec les fleurs telles le jasmin ou la tubéreuse qui continuent à produire des métabolites secondaires après la cueillette. Le procédé à froid consiste à absorber le parfum de ces fleurs en utilisant un corps gras à haut pouvoir d'absorption. Pendant la période de récolte (qui dure plusieurs semaines), les pétales de fleurs fraîchement cueillis sont étalés sur de la graisse et remplacés toutes les 24 heures par les pétales de fleurs nouvellement cueillies. Le corps gras, non renouvelé au cours du processus, est saturé en essence florale et l'huile essentielle est ensuite extraite de la graisse par de l'éthanol (**Clarke, 2008**).

### 2.2.5.5 Extraction de la fraction volatile dans l'espace de tête :

#### 2.2.5.5.1 Micro-extraction sur phase solide :

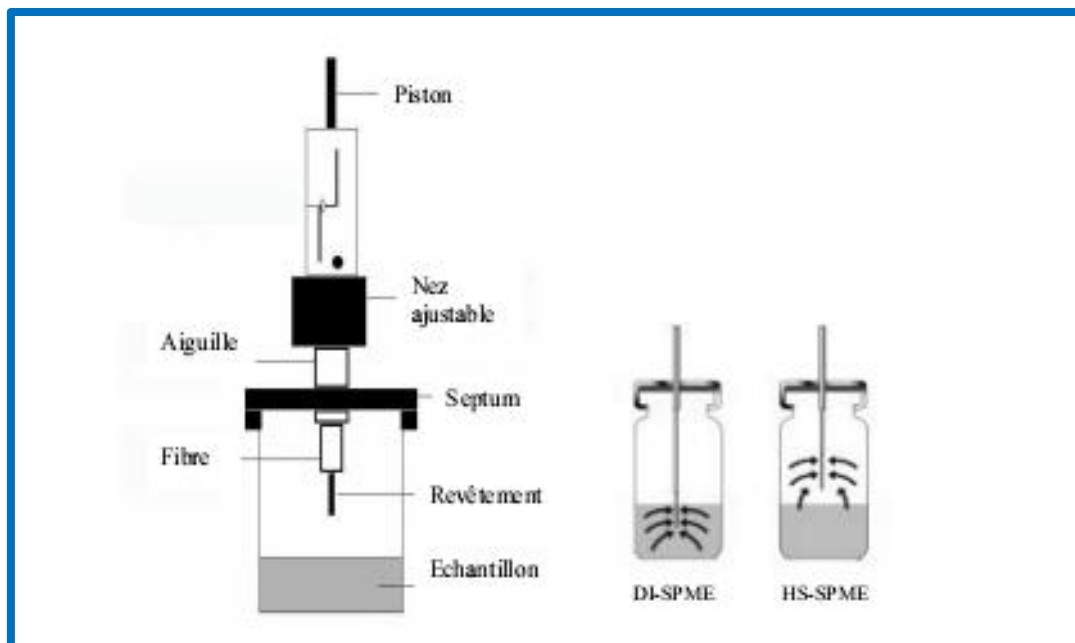
La micro-extraction sur phase solide (MEPS) est une méthode d'extraction sans solvant développée par (**Arthur et Pawliszyn, 1990**) par pré-concentration des composés de matrices solides ou liquides (**Burgot et Pellerin, 2003**).

L'instrument de la MEPS se présente sous la forme d'un ensemble seringue-aiguille ; les composés sont extraits par adsorption sur une fibre de silice fondue (1 à 2 cm de longueur) revêtue d'un polymère (7 à 100 µm d'épaisseur) qui fait office de phase stationnaire. (**Matich et al., 1996**) (**Figure 16**).

La fibre est soit introduite directement dans l'échantillon, on parle de MEPS par immersion directe (DI-MEPS), soit exposée dans l'espace de tête (HS-MEPS).

Certains travaux (**Kataoka et al., 2000**) montrent que la méthode DI-MEPS est plus sensible que la HS-MEPS. Cependant, les chromatogrammes obtenus à partir de la seconde méthode présentent une meilleure résolution que ceux résultant de la première (**Pellati et al., 2005**). En outre, l'efficacité de chacune des deux techniques dépend de la nature de la matrice et de sa composition (**Kataoka et al., 2000**).

L'extraction par immersion directe est, en général, plus adaptée pour les matrices liquides alors que l'espace de tête convient mieux aux matrices solides ou semi-liquides tels les miels (Yang *et al.*, 2012).



**Figure 16.** MEPS - Système d'échantillonnage et phénomènes d'adsorption.

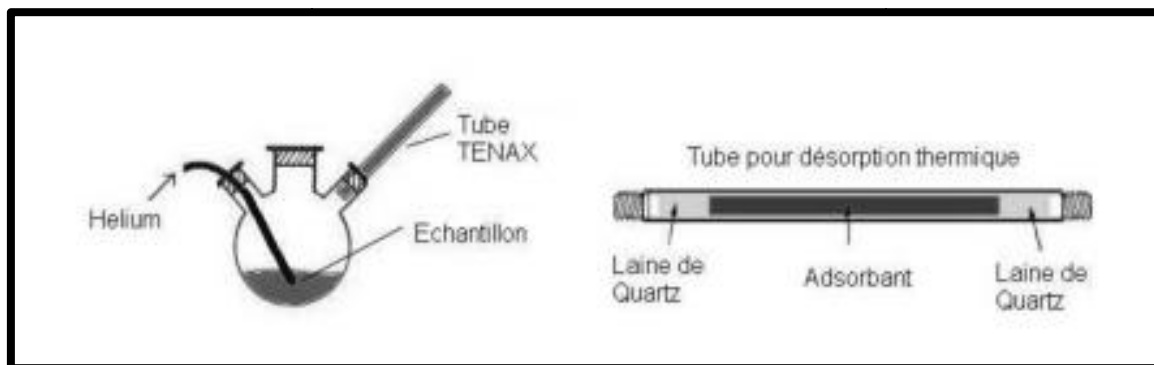
Ces dix dernières années, la MEPS a été mise en œuvre avec succès en combinaison avec des méthodes d'analyses conventionnelles telle la chromatographie en phase gazeuse (CPG) associée à un détecteur à ionisation de flamme (DIF) ou couplée en ligne à la spectrométrie de masse (CPG/SM) (Barboni, 2009).

#### 2.2.5.5.2 Désorption thermique automatique :

La technique de désorption thermique automatique (DTA) est une méthode très utilisée en industrie agroalimentaire pour l'analyse des arômes de viandes (Cannac-Arteaga, 2001) et de fruits (Mamede et Pastore, 2006), ainsi que dans le domaine de l'environnement pour l'étude des polluants de l'air (Burger *et al.*, 1991) et des composés organiques volatils (COV) (Noij *et al.*, 1987).

Le procédé « *purge and trap* » (P&T) est le plus couramment employé pour l'extraction des composés de la matrice et le prélèvement dans l'espace de tête (Figure 17).

L'extraction dynamique par P&T-DTA permet souvent l'identification de constituants qui ne sont pas rapportés par extraction liquide-liquide ou en mode statique (MEPS) (Paolini *et al.*, 2008a).



**Figure 17.** DTA - Système d'extraction « purge & trap » (P&T) et d'un tube adsorbant de type Tenax (TA).

Le choix de la technique d'échantillonnage est principalement régi par l'objectif de l'analyse. Le système DTA permet l'analyse des molécules prélevées sur des tubes adsorbants constitués le plus souvent de polymères organiques (Núñez *et al.*, 1987).

Parmi eux, les tenax (polymères d'oxyde de 2,6-diphényle) sont les adsorbants les plus utilisés pour l'analyse de l'air car ils sont thermiquement stables jusqu'à 350°C.

Le principe de la DTA est une désorption à deux étages :

- ✓ Le premier consiste à désorber les molécules préalablement piégées dans les tubes adsorbants. Ces derniers sont chauffés au moyen d'un four thermique afin de permettre la libération des molécules. Le tube est en permanence balayé par un gaz vecteur inerte (He) qui transporte les substances vers le cryopiège « cold trap » refroidi par effet Peltier et rempli de phase adsorbante.
- ✓ Le second étage consiste à désorber les molécules cryofocalisées dans le piège par chauffage rapide. Le gaz vecteur transporte les molécules ainsi libérées en tête de colonne chromatographique

Ce système à deux étages confère une bonne résolution aux chromatogrammes et limite les phénomènes de coélutions pouvant être rencontrés lors d'une désorption classique (Kolb, 1999).

## 2.3 Extraction des extraits

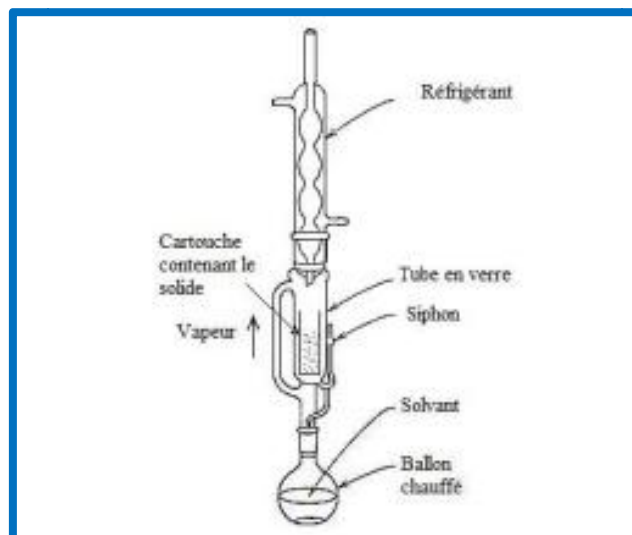
### 2.3.1 Extraction liquide-liquide et Macération :

Il s'agit des méthodes les plus simples à mettre en œuvre pour l'extraction des métabolites secondaires contenus dans une matrice liquide ou solide. Elles sont basées sur l'utilisation de solvants seuls ou en combinaison choisis en fonction de la famille de composés à extraire. Les solvants les plus couramment utilisés sont le pentane, l'hexane, l'oxyde de diéthyle, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane, le méthanol, l'éthanol et l'eau. En

outre, une matrice peut subir plusieurs extractions successives en utilisant des solvants de plus en plus polaires afin d'obtenir des mélanges enrichis en molécules d'intérêt. Toutefois, ces méthodes présentent de nombreux inconvénients telle la perte de certains analytes pendant la concentration de l'échantillon ou encore les problèmes écologiques liés à l'élimination et au traitement des solvants (Ibañez *et al.*, 1998). Ces techniques ont été optimisées, notamment, pour l'analyse des composés non volatils (polyphénols, sucres, cires) dans les fruits et légumes (Kok *et al.*, 1987) qu'ils soient comestibles (banane, orange, papaye, brocoli, carotte, pomme de terre,...) (Faller et Fialho, 2010) ou non (baies de genévrier, glands) (Hayouni *et al.*, 2007). Les travaux publiés par Careri *et al.*, (2001) préconisent l'utilisation du méthanol comme solvant d'extraction des composés phénoliques des végétaux. Ces méthodes d'extraction ont également été appliquées au laboratoire pour la caractérisation chimique d'eaux florales (Paolini *et al.*, 2008a). Enfin, ces procédés interviennent dans la fabrication et le contrôle de la qualité des spiritueux (Tuberoso *et al.*, 2006).

### 2.3.2 Extraction au Soxhlet :

L'appareillage Soxhlet permet l'extraction aux solvants « en continu » d'espèces chimiques contenues dans une matrice solide. L'échantillon, placé dans une cartouche poreuse à l'intérieur de l'extracteur, est traversé par les vapeurs de solvant. Celles-ci passent du ballon chauffé au tube adducteur puis se condensent dans le réfrigérant. Le condensat s'accumule dans le corps de l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du siphon, entraînant alors le retour du liquide dans le ballon. Au fil des cycles, le solvant s'enrichit en substances extraites jusqu'à épuisement de l'échantillon en substances d'intérêt. Par comparaison avec les macérations classiques, cette technique permet d'une part de réduire le temps d'extraction, et d'autre part requiert nettement moins de solvant et d'échantillon pour une efficacité d'extraction supérieure, (Bimakr *et al.*, 2011) (Figure 18).



**Figure 18.** Schéma d'un extracteur de Soxhlet

De par la diversité des familles chimiques pouvant être extraites, ce procédé offre de nombreuses applications dans le domaine de l'agroalimentaire (**Jadhav et al., 2009**) et comme le montre, aussi, les travaux de **Bimakr et al., (2011)** portant sur l'étude des flavonoïdes dans les feuilles de menthe verte (*Mentha spicata* L.). Cette méthode est également utilisée pour l'extraction de certains polluants tels les pesticides ou les polychlorobiphényles (PCB) présents dans les aliments (haricot, porc, agneau, poisson, etc.) (**Beyer et Biziuk, 2008**). Des systèmes d'extraction aux solvants sous pression ont été développés et automatisés (ASE : Automated Solvent Extraction) (**Luque de Castro et Priego-Capote, 2010**) afin d'offrir aux utilisateurs des méthodes plus efficaces, plus rapides et moins consommatrices en solvants.

### 2.3.3 Extraction par la Méthode de Likens-Nickerson :

Le mode d'extraction Likens-Nickerson (**1964**) est basé sur une utilisation combinée de l'hydrodistillation et de l'extraction aux solvants (**Figure 19**). Cette technique est généralement utilisée en agroalimentaire pour l'extraction des parfums et arômes contenus dans des échantillons solides (fruits, légumes, graines, etc.) (**Sinyinda et Gramshaw, 1998**) ou liquides (miels, vins, liqueurs, etc.) (**Bosch-Fusté et al., 2007**). Sur de telles matrices, elle permet d'obtenir des rendements d'extraction en volatils bien supérieurs à ceux de l'hydrodistillation (**Bosch-Fusté et al., 2007**).

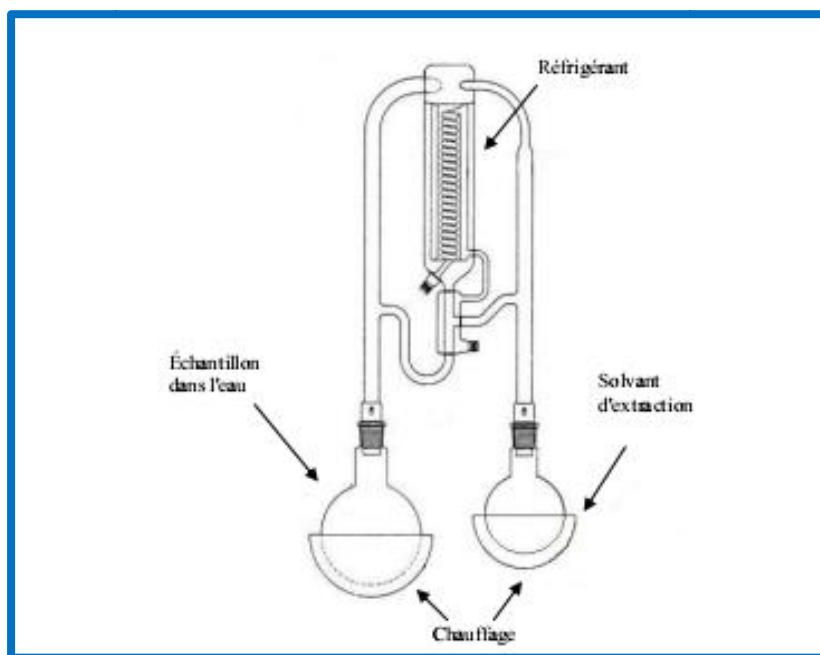


Figure 19. Schéma d'un système d'extraction Likens-Nickerson

### 2.3.4 Extraction au CO<sub>2</sub> supercritique :

L'extraction par fluides supercritiques a pris ces dernières années beaucoup d'essor concernant l'extraction des extraits végétaux. Le principal avantage de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pendant le processus d'extraction (Figure 20). En outre tous les processus de dégradation possibles tels que l'oxydation ou l'isomérisation sont réduits au minimum du fait que le temps d'extraction y est réduit. Au-delà du point critique ( $P= 73,8$  bars,  $T^{\circ} = 31,1$  ° C), le CO<sub>2</sub> possède les propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction (Piochon, 2008)

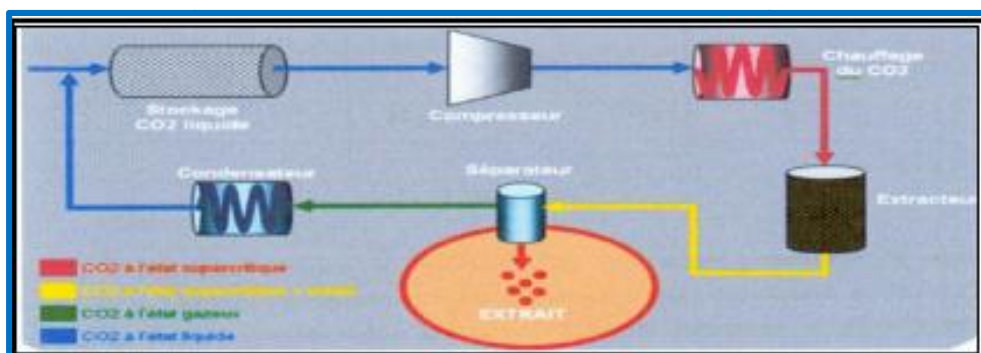


Figure 20. Schéma du principe de la technique d'extraction par le CO<sub>2</sub>

### 2.3.5 Extraction par micro-ondes :

L'utilisation des fours à micro-ondes, avec ou sans solvant, a été appliquée à l'extraction des métabolites secondaires dans le milieu des années quatre-vingts (**Ganzler et al., 1986**). Les micro-ondes interagissent simultanément et sélectivement par rotation dipolaire et conduction ionique avec les molécules présentes dans les tissus végétaux entraînant un échauffement localisé suivi d'une expansion puis d'une rupture des membranes cellulaires (**Bousbia et al., 2009**). D'une manière générale, par rapport aux modes d'extraction classiques, les avantages de cette méthode sont la rapidité et l'atténuation des risques d'altération thermique. Elle a été mise en œuvre par **Viroth et al., (2008)** pour l'extraction de graisses contenues dans divers aliments telles des viandes, des viennoiseries et des graines. Aujourd'hui, différentes techniques sont disponibles (**Lucchesi, 2005**) notamment :

- ✓ l'extraction assistée par micro-ondes (MAE : Microwave Assisted Extraction) (**Letellier et al., 1999**) présentant un intérêt particulier pour l'extraction des composés non volatils et thermosensibles par des solvants de faible constante diélectrique ; l'hydrodistillation assistée par micro-ondes sous vide pulsé (VMHD : Vacuum Microwave HydroDistillation) (**Mengal et Mompon, 1996**) plus rapide que l'hydrodistillation pour un rendement similaire en composés volatils ;
- ✓ l'extraction par micro-ondes sans ajout de solvants organiques (SFME : Solvent Free Microwave Extraction) (**Chemat et al., 2004a**) qui s'avère être une combinaison entre un chauffage par micro-ondes et une distillation à sec sous pression atmosphérique. Les principaux avantages résident dans la faible durée d'extraction (15-30 minutes) et dans le caractère respectueux de l'environnement (pas de solvant, faible consommation d'eau) (**Lucchesi et al., 2004b**)

### 2.3.6 Extraction par ultra-sons :

Le principe de l'extraction assistée par ultra-sons est analogue à celui d'une extraction aux solvants ; toutefois, les vibrations provoquées par les ultrasons permettent d'extraire plus rapidement les constituants. Les applications de cette méthode sont nombreuses ; nous pouvons citer les travaux de **Cuoco et al., (2009)** qui ont extrait les anthraquinones dans les racines de Garance (*Rubia tinctorum*) ou ceux de **Lee et Lin (2007)** qui ont comparé les rendements de l'extraction aux ultrasons et aux solvants des isoflavones des racines de *Radix puerariae*. Avec un temps d'extraction plus court et une consommation



en énergie plus faible, cette méthode permet d'obtenir de meilleurs rendements que les extractions classiques aux solvants (avec et sans pression). Cette technique a également été appliquée par **Chemat *et al.*,(2004)** pour isoler les composés volatils des graines de Carvi (*Carum carvi* ; selon eux, ce procédé est plus sélectif (taux de matière grasse réduit) et plus rapide que l'extraction par Soxhlet.

*Matériels*

*et*

*Méthodes*

La partie expérimentale a été réalisée au laboratoire de l'université Dr. TAHAR MOULAY SAIDA.

### 1. Matériel végétale :

Selon la monographie, la matière première végétale peut être fraîche, flétrie, sèche, entière, contusée ou pulvérisée (**La Pharmacopée Européenne citée par Duval Laurent, 2012**).

La plante utilisée dans notre étude est *Salicornia fruticosa*, a été récoltée de la région Macta wilaya Mascara (**Figure 21**).

La plante a été identifiée par le Dr si Tayeb maître de conférences (A) de l'université de Saida. Cette plante a été récoltée en octobre 2015 après le lavage, le séchage se fait dans un endroit aéré et propre, à l'abri de la lumière.



**Figure 21.** Carte géographique de la station de récolte.

### 1.1 Description de la zone de prélèvements :

La zone humide de la Macta, est un site d'une superficie de 44.500 Ha inscrit par le gouvernement de la République Algérienne Démocratique et Populaire sur la liste des zones humides d'importance internationale établie dans le cadre de la convention **Ramsar (Iran ) en 1971** ; dans le but de promouvoir la conservation et l'utilisation rationnelle des zones humides dans le monde entier.

La zone humide de la Macta représente un type de zone humide rare en Afrique du Nord en raison de la diversité des milieux qu'ils renferment et notamment les sansouires qui rappellent les milieux de la Camargue de France. Ce site est unique grâce à la présence d'une diversité des groupements des salsolacées annuelles qu'ils renferment et qui forment rarement de telles associations dans d'autres régions (**DGF, 2001**).

La zone humide chevauche sur trois wilayas, à savoir la wilaya de Mascara, la wilaya de Mostaganem et la wilaya d'Oran, dont les deux tiers de la superficie se trouvent dans la wilaya de Mascara

La zone humide de la Macta se trouve à environ 15 Kms au Nord ouest de Mohammedia Wilaya de Mascara et environ 50 Kms à l'Est d'Oran, la zone représente une dépression triangulaire délimitée au Nord par le cordon dunaire par rapport au golf d'Arzew, au Nord ouest par le massif de la Sebkhia d'Arzew, au Nord-est par la retombée Sud du plateau de Mostaganem, les plaines de Sig et de l'Habra la prolongent dans sa largeur Est ouest. L'altitude varie entre 01 et 40 m. Les coordonnées géographiques sont les suivantes :

Les longitudes : 00°07'Ouest et 00°07'Est du méridien de Greenwich, et entre 35°33' et 35°42' de la latitude Nord.

La zone atteint au Sud les contreforts de l'Atlas Tellien, les monts de Béni Chougrane. Notre site comporte à la fois des plans d'eau, des marais.

### 1.2 Broyage et Conservation de la poudre des *Salicornia fruticosa* :

Les feuilles et les tiges ont été broyées à l'aide d'un moulin de laboratoire (MF 10 BASIC) à une vitesse de 4000 à 6500 rpm (**Figure 22**). Jusqu'à obtention d'une poudre fine et homogène qui a été conservée dans des sachets en papiers propres et bien fermés (**Figure 23**).



Figure 22. Moulin de laboratoire (MF 10 BASIC).



Figure 23 . Le broyage des feuilles et les tiges de *S. fruticosa*

**Remarque :** dans ce travail on a fait plusieurs techniques d'extraction : en fait extraction H.E par hydrodistillation, huile végétale (acide gras) par soxhlet et extraction d'extrait brut par macération on a utilisé des solvants à différentes polarités (méthanol, hexane), et le résultat de soxhlet le résultat de l'huile végétale obtenue par soxhlet a un rendement très faible et pour l'extrait le solvant qui donne un rendement important par macération est le méthanol.

## 2. Extraction des HE par hydrodistillation:

L'obtention des huiles essentielles a été faite par la technique d'hydrodistillation qui repose sur l'utilisation d'une quantité de 50g de la partie aérienne de la plante *Salicornia Fruticosa* avec 250 ml d'eau distillée dans un ballon de 1L relié à un réfrigérant. Le mélange a été porté à ébullition pendant trois heures (Li *et al.*, 2013) (Figure 24).

Le distillat volatil recueilli par la suite contient deux phases ; l'une est organique et l'autre est aqueuse (eau aromatique ou hydrolat aromatique). Ces dernières vont être séparées par décantation pour obtenir une HE (Figure 25).



Figure 24. Montage de l'hydrodistillation



Figure 25. Ampoule à décanter

### 3. Tests phytochimiques :

L'examen phytochimique est un premier pas dans la recherche des molécules à activité thérapeutique dans les plantes. Il permet la détection des classes des composés chimiques essentiellement : les composés phénoliques, les saponosides, les alcaloïdes, les stérols et triterpènes, l'amidon, les composés réducteurs. (Hadri, 2015).

Ces tests phytochimiques sont représentés par :

- ✓ Des réactions de coloration et de précipitation ;
- ✓ Des essais de solubilité des constituants présents dans la plante ;
- ✓ Des examens sous la lumière ultraviolette.

#### 3.1 Préparation extrait éthanolique :

Ajouter 100 ml de d'éthanol 70 % à 5 g de la poudre végétale dans un erlenmeyer de 250 ml. Laisser agiter et macérer pendant 24 h à la température ambiante du laboratoire (Figure 26). Après la filtration sur un papier filtre l'extrait éthanolique est soumis aux tests cités ci-dessous :



Figure 26. Montage de Macération

##### 3.1.1 Les tannins

La présence des tannins est mise en évidence en ajoutant à 1ml de l'extrait éthanolique, 2ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de  $\text{FeCl}_3$  diluée (1 %). L'apparition d'une coloration bleu-noire caractérise la présence des tannins galliques, verte ou bleu-verte celle des tannins catéchiques (Trease et Evans, 1987).

### 3.1.2 Les flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5ml de l'extrait éthanolique avec 1ml de HCl concentré et 0,5g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes (Cavé, 1993).

### 3.1.3 Stérols et triterpènes

Il consiste à évaporer à sec l'extrait éthanolique correspondant à 10 ml. Ensuite, on dissout le résidu obtenu dans un mélange d'anhydride acétique/ chloroforme (5/5 : V/V); puis on filtre et on traite le filtrat par quelques gouttes d'acide sulfurique concentré (réaction de Liebermann-Burchardt). Si cette réaction donne des colorations verte-bleue et verte-violette, elle indique alors la présence respective des hétérosides stéroïdiques et triterpéniques (Trease et Evans, 1987).

### 3.1.4 Les composés réducteurs

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

### 3.2 Préparation de l'extrait aqueux :

Dans un ballon monocol surmonter d'un réfrigérant, Nous avons procédé à une décoction de 2 grammes de poudre végétale avec 100 ml d'eau distillée qu'on porte à ébullition pendant 30 minutes ( Figure 27 ). Après refroidissement et la filtration, on réajuste le volume à 100ml. L'extrait aqueux est soumis aux tests suivants :



Figure 27. Montage de reflux



### 3.2.1 Les saponosides

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse. A partir de l'extrait aqueux, on prépare 10 tubes (1,3cm de diamètre interne) avec 1,2, ... 10ml, le volume final étant réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Chacun de ces tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes.

Après un repos de 15 minutes en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en centimètre. Si elle est proche de 1 cm dans le 10<sup>ème</sup> tube, alors l'indice de mousse est calculé par la formule suivante : La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100 (Dohou *et al.*, 2003).

$$I = \text{Hauteur de mousse (en cm) dans le 10ème tube} \times 5 / 0,0 X$$

### 3.2.2 L'amidon

On chauffe 5 ml de l'extrait aqueux avec 10 ml d'une solution de NaOH saturée dans un bain marie jusqu'à l'ébullition. Ajouter ensuite le réactif d'amidon. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-violacé (Bruneton, 1999).

### 3.3 Macération du matériel végétal avec l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) :

Ajouter 2 grammes de poudre végétale mélangés à 50ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dilué au demi et à de l'eau distillée dans un erlenmeyer de 250 ml. Laisser agiter et macérer pendant 24 h à la température ambiante du laboratoire. Après Nous filtrés le mélange et rincé à l'eau de manière à obtenir 50ml de filtrat est soumis aux tests suivants :

#### 3.3.1 Les alcaloïdes

Ont prendre deux tubes à essai dans lesquels ont introduit 1ml du macéra. Nous avons ajouté dans le tube n° 1, 5 gouttes de réactif de Mayer et dans le tube n° 2, 5 gouttes de réactif de Wagner. La présence d'une turbidité ou d'un précipité, après 15 minutes indique la présence d'alcaloïdes (Paris *et al.*, 1969).

#### 3.3.2 Les coumarines

Une masse de 1gramme de poudre végétale est placée dans un tube en présence de quelques gouttes d'eau distillée. Les tubes sont recouverts avec du papier imbibé de NaOH dilué et sont portés à ébullition. Toute fluorescence jaune témoigne de la présence de coumarines après examen sous ultra-violet (Rizk, 1982).

### 3.3.3 Les anthocyanes

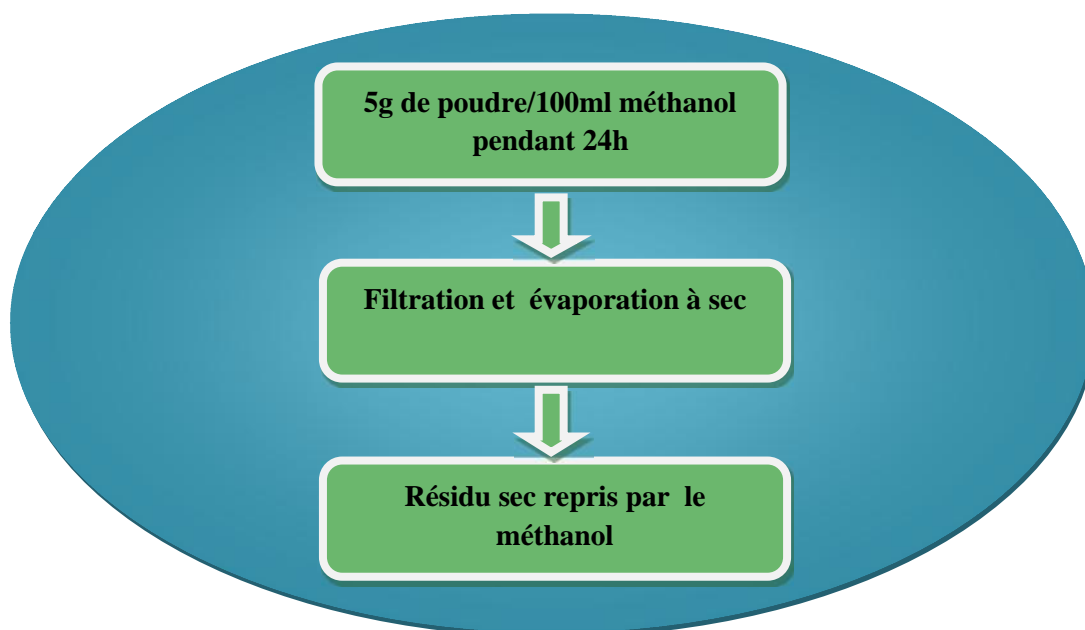
Un volume de 2ml d'infusé aqueux est additionné à 2ml de HCl 2N. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu-violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes (Debray *et al.*, 1971 ; Paris *et al.*, 1969).

## 4. Extraction des composés phénoliques

Les extractions sélectives des principales familles des composés phénoliques ont été effectuées sur la plante étudiées. Selon les méthodes suivantes

### 4.1 Préparation des extraits bruts méthanoliques :

La poudre 5 gramme de partie aérienne de plantes est placée dans un erlenemeyer contenant 100 ml de méthanol pendant 24 heures. Après la filtration, les solutions méthanoliques sont évaporées à sec sous pression réduite dans un rotavapeur rotatif de type Heidolph, 4000 à 60 °C. Les résidus secs pesés sont repris par 3 ml de méthanol.(Benhammou *et al.*, 2009 ; kholkhal ,2015)(Figure 28 ).



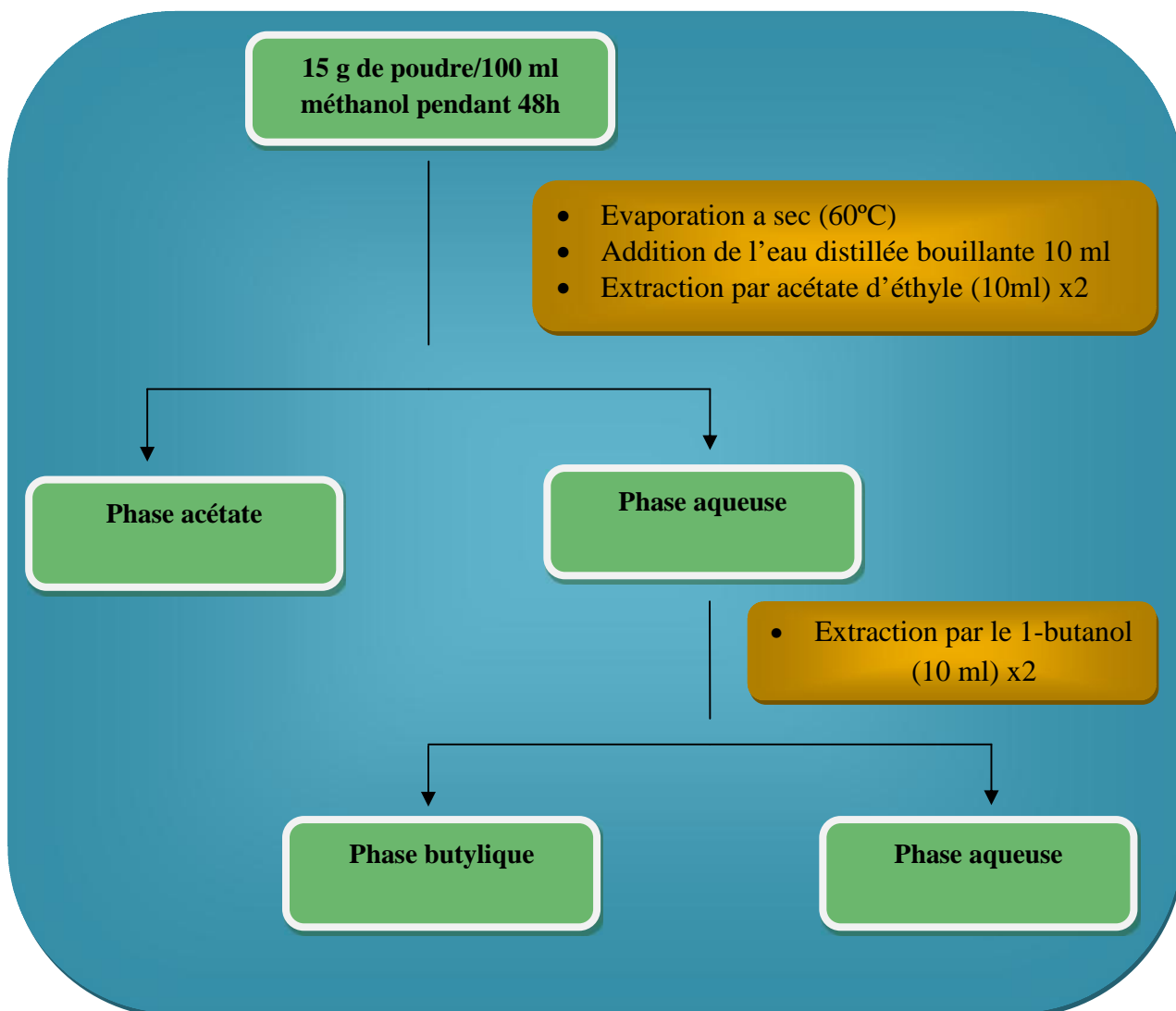
**Figure 28.** Protocole d'extraction des extraits bruts. (Benhammou *et al.*, 2009).

### 4.2 Extraction des flavonoïdes :

Les extractions des flavonoïdes de *Salicornia Fruticosa* sont réalisées par la méthode décrite par Bekkara *et al.*, ( 1998) « fractions d'acétate d'éthyle et butanolique ».

Une masse de 15 gramme de poudre est mise en contact avec 100 millilitres de méthanol pendant 24 heures. L'extrait méthanolique récupéré est ensuite évaporé à sec (T=60

° C) à l'aide d'un rotavapeur type Heidolph, 4000. Le résidu sec obtenu est partagé entre 10 millilitres d'acétate d'éthyle et 10 millilitres d'eau distillée chaude dans une ampoule à décanter. Après agitation et décantation des deux phases, la phase d'acétate d'éthyle est récupérée puis séchée par un rota-vapeur. Le résidu sec est repris par 3 ml de méthanol. La phase aqueuse issue de l'extraction avec l'acétate d'éthyle est partagée avec 10 millilitres du 1-butanol. La phase butanolique est séchée au rota-vapeur à 60 °C. Le résidu sec pesé, est repris par 3 millilitres de méthanol (**Figure 29**).

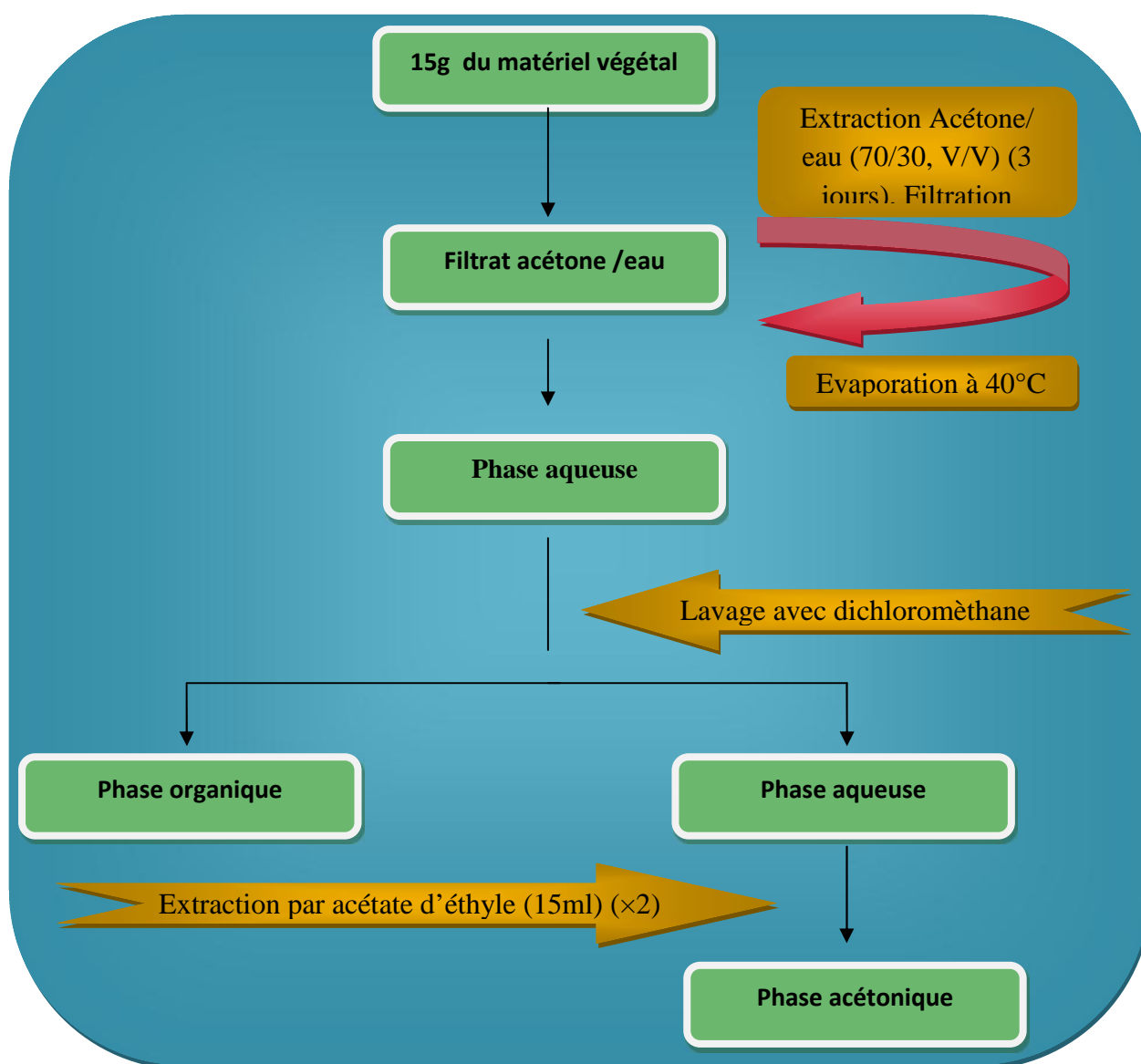


**Figure 29.** Schéma d'extraction des flavonoïdes (Bekkara *et al.*, 1998).

### 4.3 Extraction des tannins

L'extraction des tannins est obtenue en suivant la méthode de **Zhang et al., (2008)**. Le broyat correspondant à 15 grammes est extrait par 100 millilitres du mélange acétone/eau distillée (70/30 ; V/V) durant trois jours à la température ambiante. La solution est filtrée et évaporée à 40 °C à l'aide d'un rota-vapeur type Heidolph, 4000 pour éliminer l'acétone. Puis, la phase aqueuse est lavée par 15ml de dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides.

Après la séparation de la phase organique, la phase aqueuse est extraite deux fois avec 15 millilitres d'acétate d'éthyle. La phase organique ainsi obtenue est évaporée à sec à 40 °C puis pesée et reprise par 3 millilitres de méthanol (**Figure 30**).



**Figure 30.** Protocole d'extraction des tanins (**Zhang et al., 2008**).

**Calcul des rendements en extraits secs :**

Nous pouvons déterminer le rendement de différentes parties pour la plante en extrait sec en calculant le rapport suivant : ( **Hadri ,2015 ; Khoukhal , 2015**)

$$\text{Rdt \%} = \left[ \frac{\text{P1}-\text{P2}}{\text{P3}} \right] \times 100$$

**P1** : poids du ballon après évaporation.

**P2** : poids du ballon avant évaporation.

**P3** : poids de la matière végétale de départ.

**5. Dosage des composés phénoliques :****5.1 Dosage des phénols totaux :**

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits des parties aériennes de *salicornia fruticosa* a été effectué spectrophotométriquement selon la méthode au réactif de Folin Ciocalteu (**Wong et al., 2006**).

**➤ Principe**

Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le réactif de Folin-Ciocalteu consiste en une solution jaune acide contenant un complexe polymérique d'ions (hétéro-polyacides). En milieu alcalin, le réactif de Folin-Ciocalteu, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéro-polyacides, d'où la formation d'un complexe bleu (**Daels-rakotoarison, 1999**).

**➤ Mise en œuvre pratique**

La teneur totale en phénols totaux des extraits bruts de la plante étudiée est déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu (**Wong et al.,2006;Biglari et al.,2008 ; Wang et al.,2008**).

Une quantité de 100 µl de l'extrait est mélangée avec 2,5 millilitres de réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué) et laissée réagir pendant 5 minutes. 2,5mL d'une solution saturée de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sont ensuite ajoutés, après une heure à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 725nm (**Wong et al., 2006**).

Les résultats sont exprimés en milligrammes-équivalent d'acide gallique/gramme de matière végétale sèche. Une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide de l'acide gallique à différentes concentrations est réalisée dans les mêmes conditions que les échantillons.

## **6. Etudes biologiques**

Les études biologiques sont nécessaires pour guider le processus de fractionnement et d'isolement des substances actives. Toutes les fractions sont évaluées, et celles qui possèdent une activité biologique sont soumises à de nouvelles étapes de purification. Dans notre travail, nous avons utilisé des tests antibactériens contre 15 bactéries en culture *in vitro*, afin de visualiser les substances responsables de l'activité antibactérienne, et nous avons modulé la cytotoxicité d'extrait sur les globules rouges humains.

### **6.1 Etude de l'activité antibactérienne**

Dans un premier temps, nous avons testé l'extrait ( Brute et ces dérivés issus ) vis-à-vis des souches bactériennes par la méthode de diffusion sur disque, et dans l'affirmation, nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI), la concentration minimale bactéricide (CMB) par la méthode de micro-dilution en milieu liquide.

#### **➤ Provenance des germes utilisés :**

Nous avons utilisé dans cette étude des souches de références (**Tableau 4**).Elles sont entretenues par repiquages successifs sur Gélose Nutritive (Bactéries) et conservées à 4°C. Ces souches nous ont été fournies par le Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique; Département de Biologie ; Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers; Université de Tlemcen.

Tableau 4. Les différentes souches bactériennes testées.

Nom de la souche	Référence	Gram
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 49452	Positif
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Positif
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	Positif
<i>Methicillin-resistant-Staphylococcus-aureus</i>	ATCC 43300	Positif
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Positif
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	Positif
<i>Pasteurella multocida</i>	ATCC 43137	Négatif
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311	Négatif
<i>Campylobacter fetus</i>	ATCC 27374	Négatif
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25933	Négatif
<i>Klebsiella pneumonia</i>	ATCC 70603	Négatif
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	Négatif
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	Négatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Négatif
<i>Salmonella enterica</i>	ATCC 13312	Négatif

➤ **Mise en culture des souches**

Une pré-culture des souches bactériennes est préparée afin d'obtenir une phase exponentielle de la croissance. La turbidité est ensuite ajustée au standard McFarland 0.5 avec un spectrophotomètre, ce qui correspond à  $1-2 \times 10^8$  UFC/ml ( $DO = 0.08$  à  $0.1$  /  $\lambda = 625$  nm) (NCCLS, 2001).

➤ **Préparations des dilutions :**

1) **Extrait brut méthanolique :**

Nous avons préparé 10 tubes à essai stériles. L'extrait étudié est dissout dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 600 mg/100  $\mu$ l puis dilués jusqu'à arriver à 3 ml par le bouillon Mueller-Hinton (solution mère). La concentration finale en DMSO dans le milieu est de 2% (200mg/ml) montre la préparation des dilutions (**Figure 31**).

### 2) Extrait Flavonoïdes (Fraction acétate d'éthyle) :

Nous avons préparé 10 tubes à essai stériles .L'extrait étudié est dissout dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 400mg/80 µl puis dilués jusque en arrive 2 ml par le bouillon Mueller-Hinton (solution mère). La concentration finale en DMSO dans le milieu est de 2% (200mg/ml) et en a réalisé les dilution par même méthode de dilution d'extrait brute méthanolique par facteur de dilution ½ .

### 3) Extrait Flavonoïdes (Fraction Butanolique) :

Nous avons préparé 10 tubes à essai stériles .L'extrait étudié est dissout dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 500mg/80 µl puis dilués jusque en arrive 2.5 ml par le bouillon Mueller-Hinton (solution mère). La concentration finale en DMSO dans le milieu est de 2% (200mg/ml) et en a réalisé les dilution par même méthode de dilution d'extrait brute méthanolique par facteur de dilution ½ .

### 4) Extrait de Tanins:

Nous avons préparé 10 tubes à essai stériles .L'extrait étudié est dissout dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 200mg/60 µl puis dilués jusque en arrive 1 ml par le bouillon Mueller-Hinton (solution mère). La concentration finale en DMSO dans le milieu est de 2% (200mg/ml) et en a réalisé les dilutions par même méthode de dilution d'extrait brute méthanolique par facteur de dilution ½ .

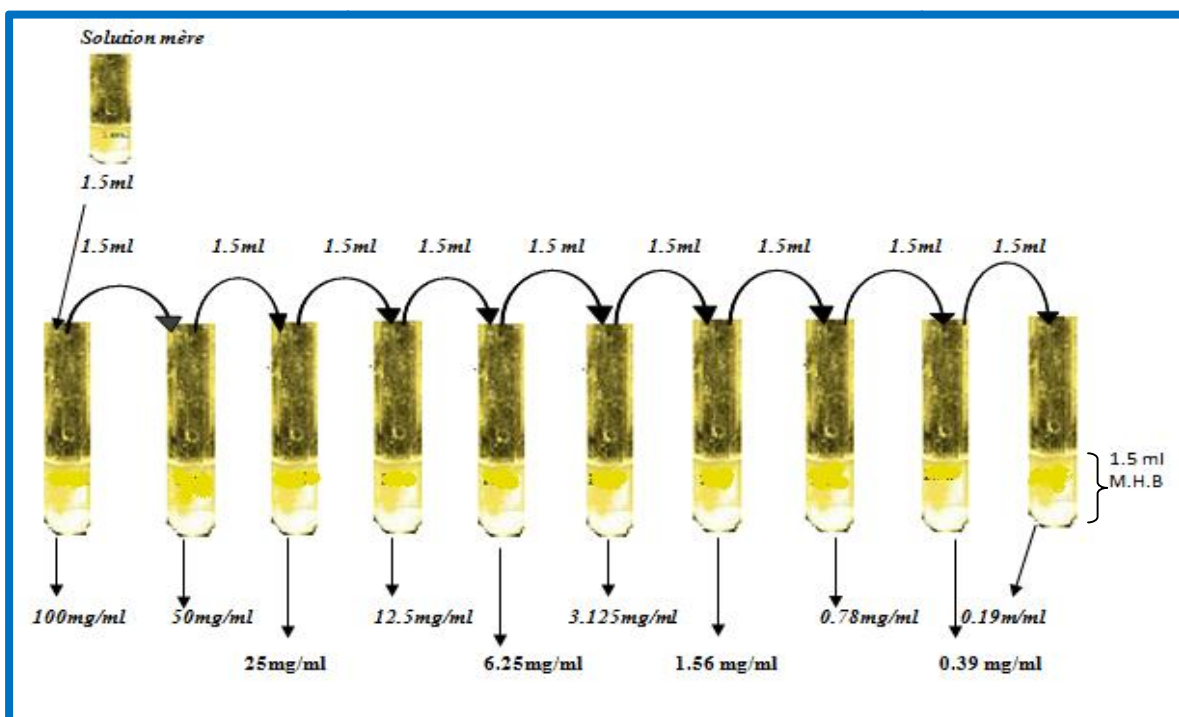


Figure 31. préparation des dilutions de l'extrait brute méthanolique.



### 6.1.1 Test de sensibilité par la méthode de diffusion sur agar (méthode des disques)

Le test de sensibilité des bactéries soumises à notre extrait végétale et les trois composés phénoliques (flavonoïde (fraction acétate d'éthyle), flavonoïde (Fraction Butanolique) et les tanins) est réalisé par la méthode de diffusion en milieu solide en utilisant le milieu Mueller Hinton selon la directive du Comité national pour des normes cliniques de laboratoire (CLSI, 2014).

#### 6.1.1.1 L'extrait brute méthanolique

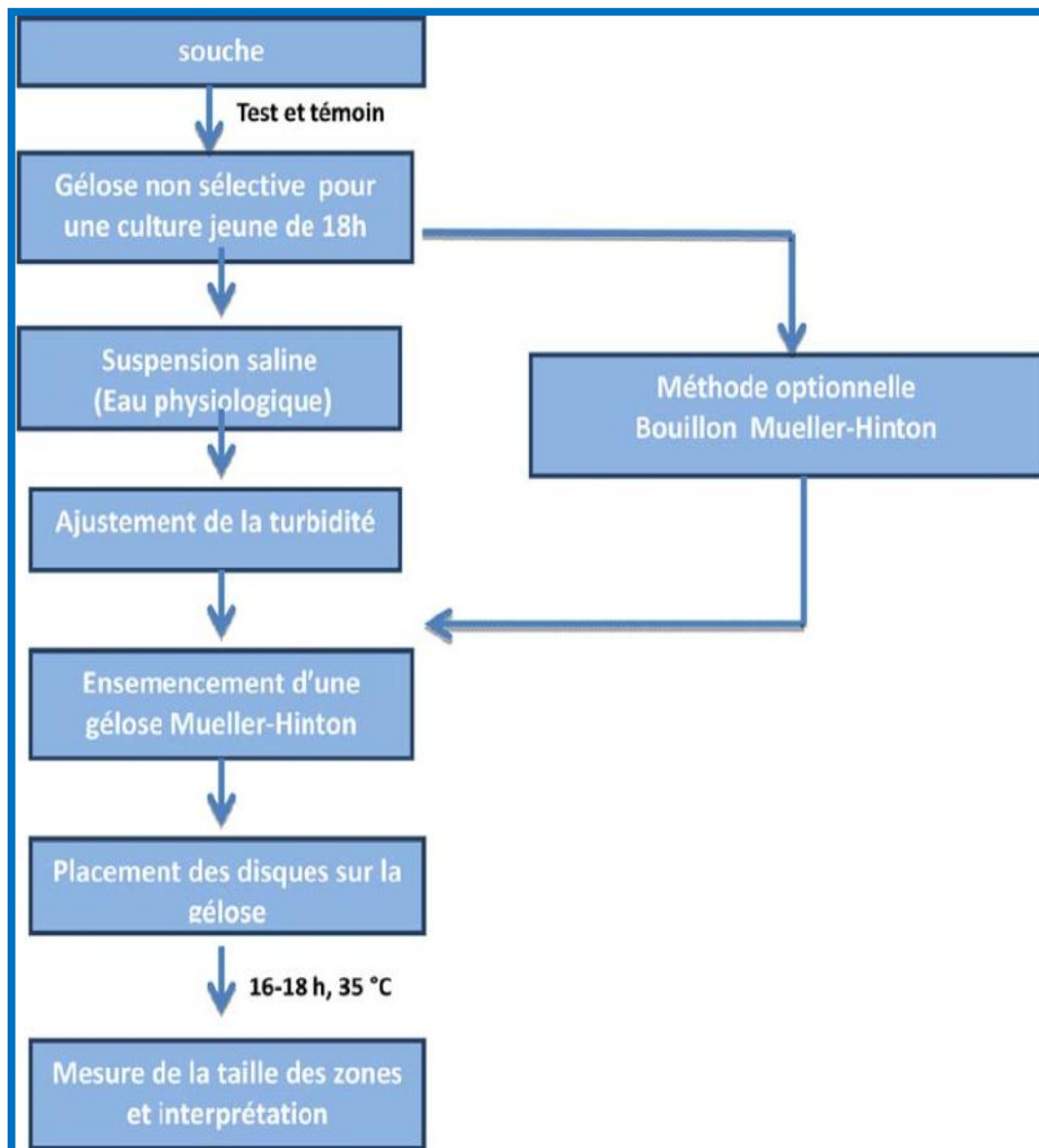
La technique utilisée est La méthode décrite par **Moussaoui et Alauui (2016)**, avec une légère modification, a été employée.

Pour effectuer le test, des disques de papier Whatman stérile de 6 mm de diamètre imbibés par 10 µl d'extrait solubilisé dans le DMSO (**1, 0,5, 0,25**) mg/ disque sont déposés à la surface d'un milieu gélosé en boîte de pétri, préalablementensemencées en surface en nappe avec 1 ml de suspension bactérienne ( $10^8$  UFC/ml). L'excédant de l'inoculum est éliminé par aspiration. Le test a été effectué avec 3 types de concentrations (**100, 50 et 25**) mg/ml.

Les boîtes sont laissées 1 h à température ambiante puis retournées et incubées à 37°C pendant 18-24h. Après incubation, le diamètre des zones d'inhibition est mesuré (mm), disque inclus. (**Figure 32**).

La présence autour des disques d'une zone d'inhibition circulaire claire dans laquelle il n'y a pas de croissance de micro-organismes dénote la sensibilité de ceux-ci à cet extrait. Plus la zone d'inhibition est grande, plus le germe est sensible (**Cheurfa, 2015**).

En parallèle, nous avons utilisé un disque témoin négatif imbibé par le DMSO (10 µl). Dans les mêmes conditions que précédemment, un antibiotique de référence, la gentamicine (100 mg), choisie à cause de son spectre d'action assez large, a été utilisé en antibiogramme standard dont l'interprétation a été faite selon les recommandations du centre d'antibiogramme de la Société française de microbiologie (**Soussy CJ et al., 2010**).



**Figure 32.** Protocole préparatoire pour la culture des souches bactériennes dans des disques de gélose (Aouni *et al.* , 2013).

### 6.1.1.2 Les extraits de trois composés phénoliques :

Avec la même méthode de diffusion d'extrait brut méthanolique nous avons testées les trois extraits de composés phénoliques, l'extrait flavonoïdes avec deux fractions (acétate d'éthyle et Butanolique), et l'extrait de tanins sur la souche bactérienne la plus sensibles a l'extrait brut méthanolique par les étapes suivants :

- **La 1<sup>ère</sup> boîte pétrie contienne 3 disques :**
  - 10  $\mu$ l d'extrait flavonoïde (fraction acétate d'éthyle)
  - 10  $\mu$ l d'extrait flavonoïde (fraction Butanolique)
  - 10  $\mu$ l l'extrait de tanins.

➤ **La 2<sup>ème</sup> boîte pétrie contient 5 disques :**

- 5 µl d'extrait flavonoïde (fraction acétate d'éthyle) + 5 µl d'extrait flavonoïde (fraction Butanolique) ;
- 5 µl d'extrait flavonoïde (fraction acétate d'éthyle) + 5 µl d'extrait de tanins ;
- 5 µl d'extrait flavonoïde (fraction Butanolique) + 5 µl d'extrait de tanins ;
- Mélange les trois extrais avec même volume 3,4 µl ;
- 10 µl d'extrait brut méthanolique.

### 6.1.2 Détermination de la CMI et de la CMB en microplaque

La méthode de micro-dilution en milieu liquide permet de déterminer les paramètres (CMI, CMB) selon la directive du Comité National des Normes du Laboratoire Clinique (CLSI ,2014b). Tous les tests ont été effectués dans le milieu Mueller Hinton en bouillon.

Inhibition de la croissance bactérienne par l'extrait brut méthanolique. La concentration minimale bactéricide (CMB) est définie comme étant la concentration minimale d'extrait (ou de composé) ne laissant pas de bactéries survivantes de l'inoculum après incubation à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Des microplaques à fond en U sont utilisables pour la détermination des CMI (**Figure 33**).

La concentration pour chaque L'extrait est préparé à 10 concentrations de 100 mg/ml à 0,19 mg/ml) (**Tableau 5**).

**Tableau 5.** Les dix concentrations d'extrait brut.

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
mg/ml	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78	0,39	0,19	TC	TS

**TC** : Témoin de culture, **TS** : Témoin de stérilité.

Tout d'abord, nous mettons 50 µl de milieu MH dans le puits 11 qui représente le témoin de culture des bactéries et 100 µl dans le puits 12 qui représente le témoin de stérilité du milieu de culture MH.

Ensuite, nous déposons 50 µl de chaque concentration préparée dans les puits 1 à 9.

A partir d'une culture bactérienne de 24 h d'incubation, une pré-culture pour atteindre la phase exponentielle de croissance microbienne est préparée. Une fois sa densité optique obtenue, cette pré-culture est utilisée pour préparer un inoculum de 10<sup>6</sup> UFC/ml dans une solution de chlorure de sodium (0.9%).

De plus, on met 50 µl de la suspension bactérienne dans les puits 1 à 9 et le puits 11 pour obtenir un volume final de 100 µl. Il faut impérativement désinfecter la micropipette à l'alcool pour éviter les problèmes de contaminations et il est important d'homogénéiser le tube contenant la souche et le tube contenant l'extrait en le passant au vortex avant de l'ajouter dans les puits. Enfin, les microplaques seront mises à l'étuve pendant 24 heures à 37 °C.

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration de l'extrait capable d'inhiber toute croissance visible du germe. Elle mesure donc, un effet bactériostatique et ne renseigne pas sur l'état de la population bactérienne, ne permettant notamment pas de préciser si elle a été tuée en partie ou totalement ou si elle a seulement cessé de se multiplier (**Bergogne-Bérézin et Brogard, 1999 ; Beddou, 2015**). La croissance des microorganismes a été indiquée par la turbidité.

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en extrait capable de tuer plus de 99.9% de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0.01% de survivants). Pour déterminer la CMB, on prélève 10 µl des puits contenant la CMI et deux fois la CMI, qu'on ensemence sur des milieux de culture solide (MHA). Si les bactéries se développent, alors ce n'est pas la CMB, il faudra vérifier le puits contenant quatre fois la CMI. Si les bactéries ne se développent pas, alors il s'agit de la CMB (**Abedini, 2014**)

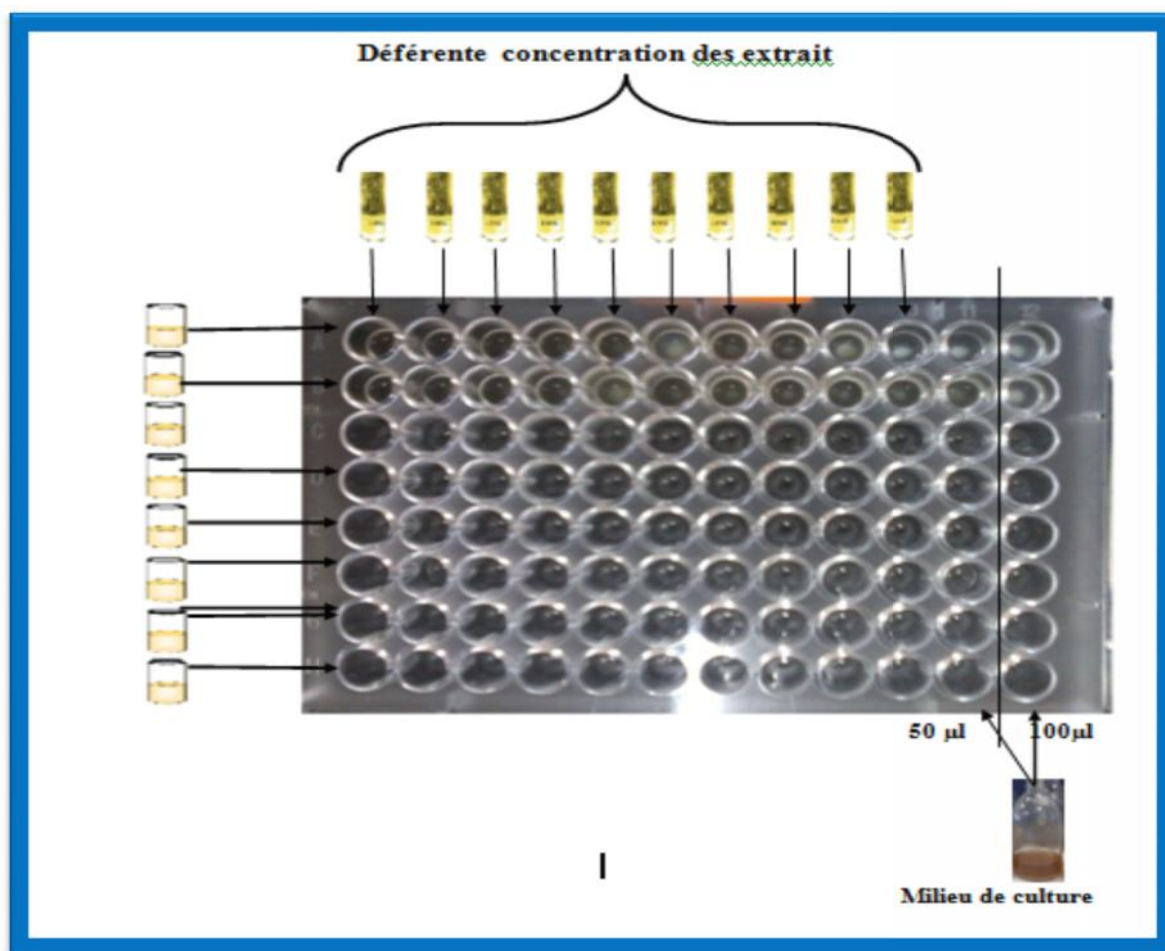


Figure 33. Préparation de la microplaque.

### 6.2 Évolution de l'effet hémolytique

Le test d'activité hémolytique d'extrait brut méthanolique de la plante *Salicornia fruticosa* a été réalisé *in vitro* sur une suspension d'érythrocytes du sang humain dans le tampon phosphate buffered saline.

#### 6.2.1 Préparation du PBS (phosphate buffered saline) à pH=7,4±0,02

Nous avons préparé 1 litre d'une solution tampon phosphate salé (PBS) par l'utilisation des composés suivants avec les concentrations qui correspondent : NaCl (137mM), KCl (2,7mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (8mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2mM) (Mohan, 2006).

#### 6.2.2 Prélèvement du sang

Le sang est prélevé sur des tubes héparine à partir d'un donneur unique et sain.

#### 6.2.3 Préparation de la suspension érythrocytaire

Du sang fraîchement prélevé sur des tube héparine est centrifugé à 4000 tour /minutes pendant 5 minutes, après élimination du surnageant le culot est lavé 2 fois avec une solution de lavage glacée: chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>, 2mM) et chlorure de sodium (NaCl,

150mM), puis repris à nouveau dans le tampon phosphate de sodium salé (PBS) à 10 mM, pH7.4.

#### **6.2.4 Préparation des extraits**

Différentes concentration d'extraits ont été (**0,78 ; 1,56 ; 3,125 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 et 50 mg/ml**), à partir d'une solution mère de 600 mg de poudre dilués avec 3 ml de PBS.

#### **6.2.5 L'effet hémolytique**

Les globules rouges sont suspendus dans du tampon PBS pH 7,4 (100mM), à raison de 4000 cellules/ml. La suspension érythrocytaire est incubée à 37°C sous agitation continue pendant des temps déferents, dès l'addition de la solution d'extrait brut méthanolique à des concentrations finales différentes. Des prélèvements de 50µl à par tir de la solution réactionnelle sont effectués à intervalles réguliers auxquels nous avons ajouté 2ml d'une solution de lavage glacée (NaCl 150mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM).

Les tubes sont centrifugés à 4000 tours/ minutes pendant 5 min. Le surnageant est utilisé pour suivre la fuite de l'hémoglobine intracellulaire par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 548 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV Vis (**Type Analytik Jena**).

Pour le contrôle positif, l'hémolyse totale est obtenue par la mise en suspension des globules rouges avec l'eau distillée. Le tampon avec DMSO sont utilisé comme contrôle négatif.

*Résultats*  
*et*  
*Interprétations*

### 1. Les résultats de screening phytochimique :

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de notre plante. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette.

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques réalisés sur le matériel végétal broyé de la partie aérienne *salicornia fruticosa* mentionnés dans le **tableau 6**, montrent la présence moyenne des anthocyanes et une faible présence de chacun des tanins, des flavonoïdes, des coumarines, des alcaloïdes, des stérols et triterpènes, et des composés réducteurs, avec une absence totale des saponosides et de l'amidon dans la partie aérienne.

La présence des tanins dans l'extrait éthanolique, est confirmée par une réaction positive avec la solution de chlorure ferrique en donnant une coloration bleue verdâtre ; il s'agit donc des tanins catéchiques.

La mise en évidence des flavonoïdes dans l'extrait éthanolique de notre plante est confirmée par l'apparition d'une couleur rose intense en contact avec la tournure de magnésium.

La présence des anthocyanes dans l'extrait éthanolique de notre plante. Sa présence est confirmée par une réaction positive par addition d'ammoniac en donnant une coloration vire au bleu-violacé.

Le test positif des hétérosides stéroïdiques est confirmé par l'apparition des colorations verte-violette.

La présence des alcaloïdes est confirmée par la précipitation et turbidité après addition des réactif Wagner et Mayer.

Le test positif des composés réducteurs confirmé par la formation d'un précipité rouge brique.



**Tableau 6.** Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques appartenant à la partie aérienne de la plante étudiée.

Composants actifs	Révélation	
Les tannins	+	Bleu vert ( cathechique )
Les flavonoïdes	+	Vire au le rose
Les anthocyanes	++	bleu-violacé
Les coumarines	+	Fluorescence
Les alcaloïdes	+	Mayer : turbidité wagner : précipité
Stérols et triterpènes	+	verte-violette (hétérosides stéroïdiques et triterpéniques )
Les saponosides	- IM= 0.5 cm	
Les composés réducteurs	+	précipité rouge brique
L'amidon	-	

(+) : Présence faible

(+++): Présence forte

(++) : Présence moyenne

(-) : Absence.

( IM ) : indice de mousse

## 2. Les rendements en extraits secs

Les extractions des différents composés phénoliques les plus abondants dans notre plante nous ont permis de calculer le rendement de chaque extrait notamment les extraits bruts méthanoliques, les flavonoïdes (fraction acétate d'éthyle et n-butanol), les tanins. Le rendement déterminé par rapport à 10 grammes de matériel végétal sec et broyé pour le extrait bruts méthanoliques et 15 grammes pour les flavonoïdes et tanins est exprimé en pourcentage. Les résultats obtenus sont illustrés dans le **tableau 7**:

Tableau 7. Les rendements en extraits obtenus

Les Extraits	Les solvan utilisés	Rendements %
Extrait brut	Méthanol	17.3
Flavonoïdes : fraction acétate d'éthyle	Acétate d'éthyle	2.8
Flavonoïdes : Fraction Butanolique	n-butanol	3.4
Tanins	Acétone/Eau	1.9

Les résultats obtenus montrent que le plus grand rendement déterminé est raisonnablement celui de l'extrait brut. Ces rendements viennent confirmer les intensités des résultats des tests phytochimiques (**Figure 34**).



Figure 34. Rendements des extraits obtenus.

**E.Fa** : fraction acétate d'éthyle

**E.T** : Tanin

**E.Fb** : fraction butanolique

**E.brut** : extrait brut

### 3. Extraction des huiles essentielles

#### 3.1 Résultats d'extraction par hydrodistillation :

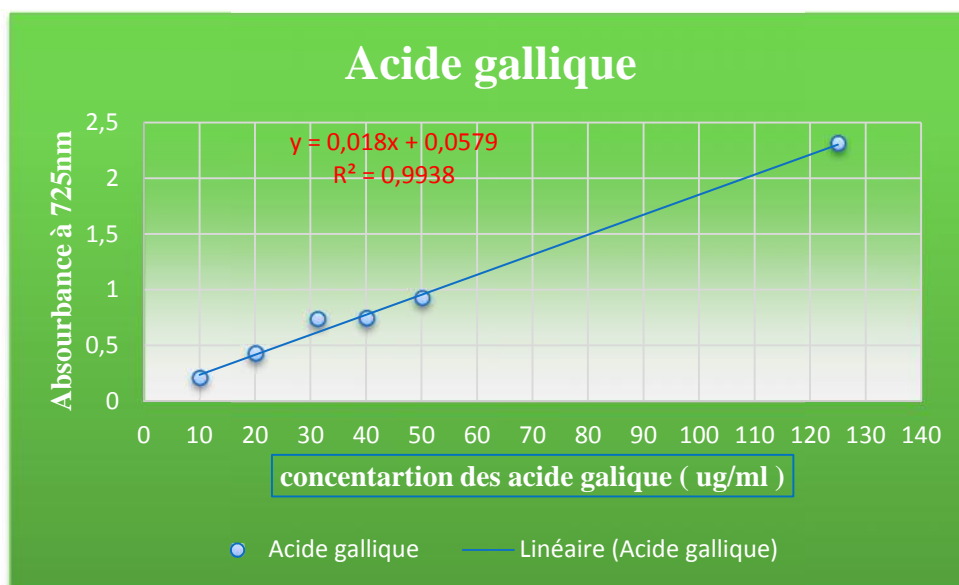
Matériaux végétaux sec après le séchage a utilisé pour extraire l'huile essentielle mais on n'a pas obtenu un rendement par cette méthode.

#### 4. Dosage des polyphénols totaux :

Les polyphénols sont des molécules bioactives très recherchées parce qu'elles sont réputées pour leurs excellentes propriétés antioxydantes et antimicrobiennes.

Pour ces raisons, un dosage de ces composés a été effectué pour la partie aérienne de la plante *salicornia fruticosa*, par la méthode spectrophotométrique au réactif de Folin-Ciocalteu. Les teneurs obtenues sont exprimées en mg, équivalent acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg GAE/g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (**Figure 35**).

Cette courbe est établie en utilisant l'acide gallique comme référence. La formule de la régression linéaire de cette courbe est de  $y = 0.0018x + 0.057$  avec un coefficient de détermination ( $R^2 = 0.993$ )



**Figure 35.** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Le extrait brut méthanolique ont été analysées quantitativement par spectrophotomètre UV-visible, pour leur teneur en polyphénols est  $(15.83 \pm 0.343)$  15.83 mg équivalent acide gallique.

## 5. Pouvoir antibactérienne

### 5.1 Technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton (méthode des disques)

#### 5.1.1 D'extrait brute méthanolique *S.fruticosa* :

L'activité antibactérienne d'extrait de plantes a été évaluée sur des souches bactériennes Gram positives, Gram négatives à l'aide de la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller Hinton agar.

Cette technique nous a permis de déterminer la sensibilité des bactéries soumises à l'extrait brute méthanolique de la plante *S.fruticosa*, DMSO (Contrôle négatif) et gentamicine (Contrôle positif). Les résultats présentés dans (**le Tableau 8**) montrent que l'extrait a des activités antibactériennes de degrés variables contre les différentes souches bactériennes testées (**Figure 36**) et (**Figure 37**).

**Tableau 8.** Diamètres des zones d'inhibition obtenus par la méthode de diffusion sur disque d'extrait *Salicornia fruticosa*, DMSO et Gentamicine vis-à-vis des souches bactériennes.

		Zones d'inhibition en (mm)				
	Souches Bactériennes	Les concentrations d'extrait MeE <i>S.fruticosa</i>			Gentamicine +	DMSO <sup>-</sup>
		25 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml		
		Bactéries Gram positifs	<i>E.faecalis</i>	18		
<i>S.aureus</i>	6		7	20	25	6
<i>L.monocytogenes</i>	15		20	<b>30</b>	38	6
<i>Methicillin-r.S.aureus</i>	6		6	6	25	6
<i>B .subtilis</i>	13		19	<b>25</b>	35	6
<i>B.cereus</i>	7		13	18	20	6
Bactéries Gram négatifs	<i>P.multocida</i>	17	22	<b>30</b>	40	6
	<i>S.typhimurium</i>	6	6	20	25	6
	<i>C. fetus</i>	6	6	10	18	6
	<i>E.coli</i>	6	16	<b>24</b>	28	6
	<i>K.pneumonia</i>	9	11	15	30	6
	<i>E.cloacae</i>	6	6	18	25	6
	<i>C.freundii</i>	6	6	11	18	6
	<i>P.aeruginosa</i>	6	6	12	25	6
<i>S.enterica</i>	10	13	18	23	6	

(+) Contrôle positif ;(-) contrôle négatif.

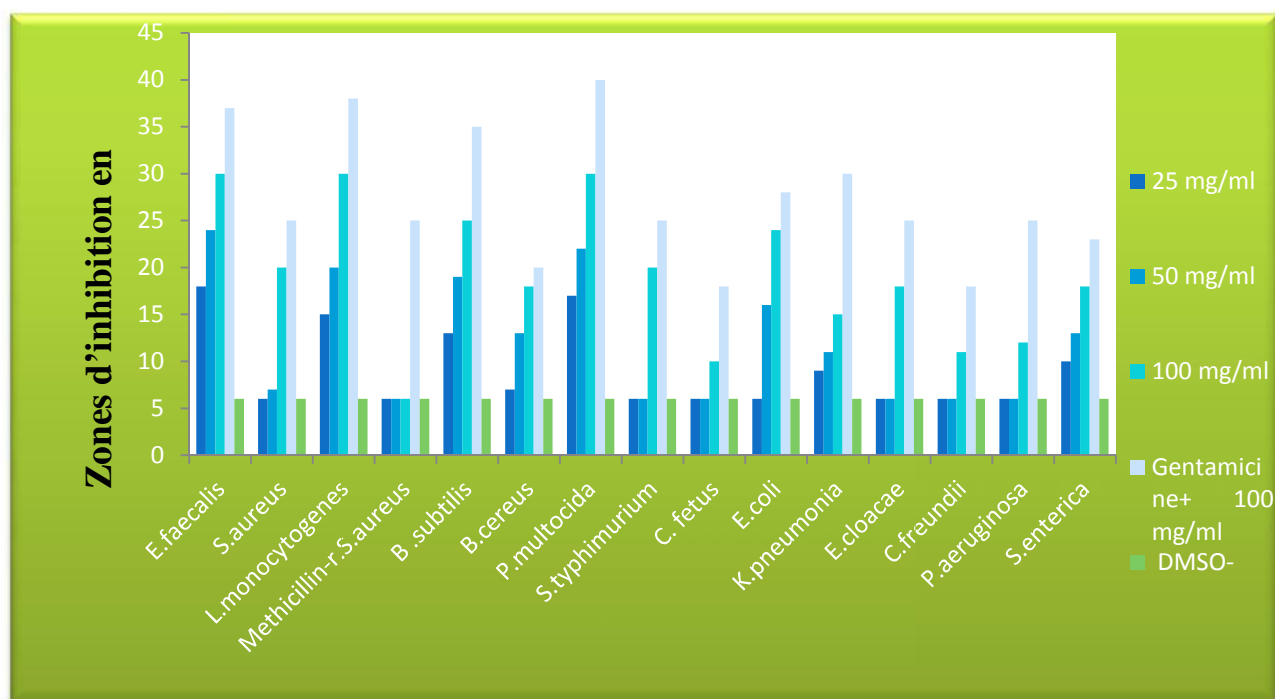
A partir des résultats obtenus, nous avons constaté que l'extrait brute méthanolique de la plante *S.fruticosa* n'a exercé aucun effet sur la croissance de *Methicillin-r.aureus*, alors que son activité vis-à-vis de *C. fetus* et *C.freundii* et *P.aeruginosa* et *K.pneumonia* était modérée à une concentration 100 mg/ml (diamètre des zones d'inhibition de l'ordre de 10 et 11 et 12 et 15 mm, respectivement) (**Tableau 08**).

En revanche, la croissance d'*E.cloacae* , *S.enterica* ,*B.cereus* (18.0 mm), *S. aureus* et *S.typhimurium* (20.0 mm), d' *E.coli* (24.0 mm) et de *B .subtilis* (25.0 mm) était ainsi inhibées par l'effet d'extrait brute méthanolique.

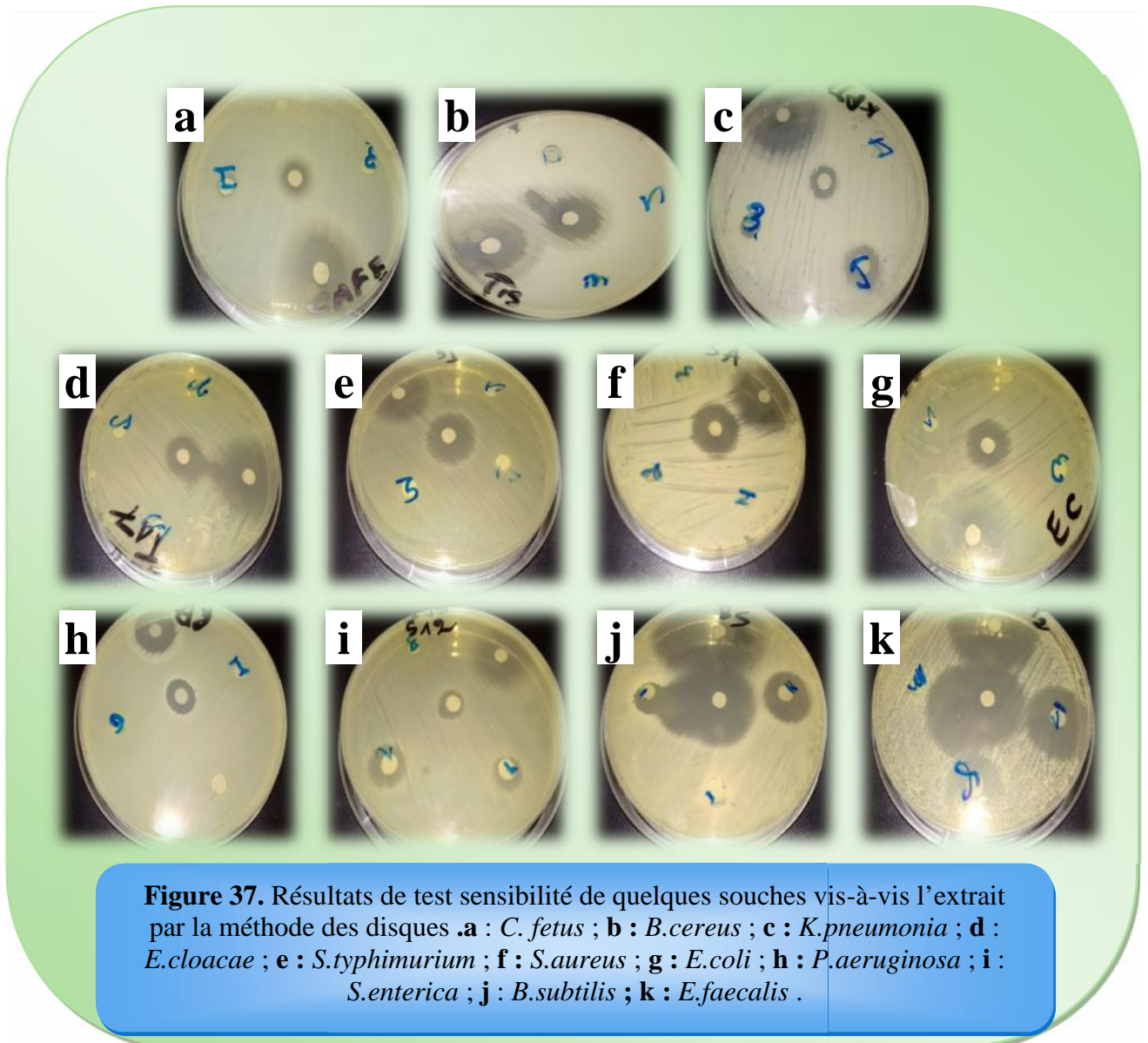
Une activité remarquable d'extrait a été observée vis-à-vis de *E.faecalis*, *L.monocytogenes*, *P.multocida* sont les bactéries les plus sensibles à la concentration 100 mg/ml avec une zone d'inhibition de 30.0 mm, qui est plus élevée par rapport aux autres souches bactériennes testés. Autrement dit, les bactéries Gram-positif sont plus sensibles que les Gram-négatif (**Tableau.8**).

Ces effets antibactériennes d'extraits brut methanolique de *Salicornia fruticosa* à concentration 100 mg/ml sont peu près proportionnelles avec ceux obtenus par l'antibiotique standard utilisé, à savoir la gentamicine (**Tableau.8**) et (**Figure 37**).

Nous constatons que le DMSO (2%) ne présente aucun effet d'inhibitrice significatif vis-à-vis les déférentes souches bactériennes testées (**Tableau.1**) (**figure.36**).



**Figure 36.** Les résultats diamètres zones d'hibitions de l'activité antibactérienne l'extrait brut *S.fruticosa* vis-à-vis différentes souches bactériennes (méthode des disques).



### 5.1.2 Activité antibactérienne des extraits sélectifs :

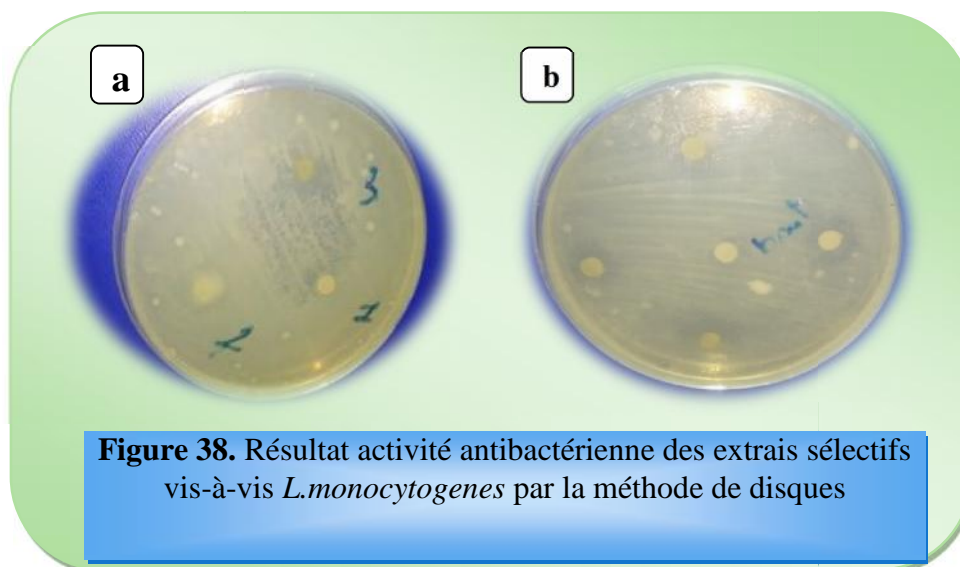
L'activité antibactérienne des extraits sélectifs a été testée par la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller Hinton agar. La sensibilité de souche bactérienne se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des disques (**Tableau 9**).

**Tableau 9.** Diamètres des zones d'inhibition obtenus par la méthode de diffusion sur disque des extraits sélectifs vis-à-vis *L. monocytogenes*

Souche testé	Zones d'inhibition en (mm)							EXT brut
	FA	FB	T	FA.FB	FA.T	FB.T	FA.FB.T	
<i>L. monocytogenes</i>	11	12	10	15	14	15	23	20

**FA** : Flavonoïde fraction acétate d'éthyle ; **FB** : Flavonoïde fraction Butanolique ; **T** : Tanins ;  
**FA.FB** : Flavonoïde fraction acétate d'éthyle + Flavonoïde fraction Butanolique ; **FA.T** : Flavonoïde fraction acétate d'éthyle + Tanins. ; **FB.T** : Flavonoïde fraction Butanolique . + Tanins. ; **FA.FB.T** : Flavonoïde fraction acétate d'éthyle. + Flavonoïde fraction Butanolique . + Tanins. ; **EXT brut** : Extrait brute méthanolique .

A partir des résultats obtenus, nous avons constaté l'activité des les trois extraits sélectifs (flavonoïde fraction acétate d'éthyle ; flavonoïde fraction butanolique ; tanins) était convergente vis-à-vis de *L.monocytogenes* avec des diamètres compris entre 10 et 15 mm, même remarque pour les disques qui contient un mélange entre deux entrails déférentes (FA.FB ; FA.T ; FB.T) avec diamètre des zones d'inhibition de l'ordre de 15 et 14 et 15 mm, respectivement).Par contre le mélange de trois extrais sélectifs a donnée une activité très remarquable a été observée vis-à-vis de *L.monocytogenes* avec une zone d'inhibition de 23,0 mm, qui est plus élevée par à rapport l'extrait brute methanolique avec une zone d'inhibition de 20,0 mm .( **Figure 38**).



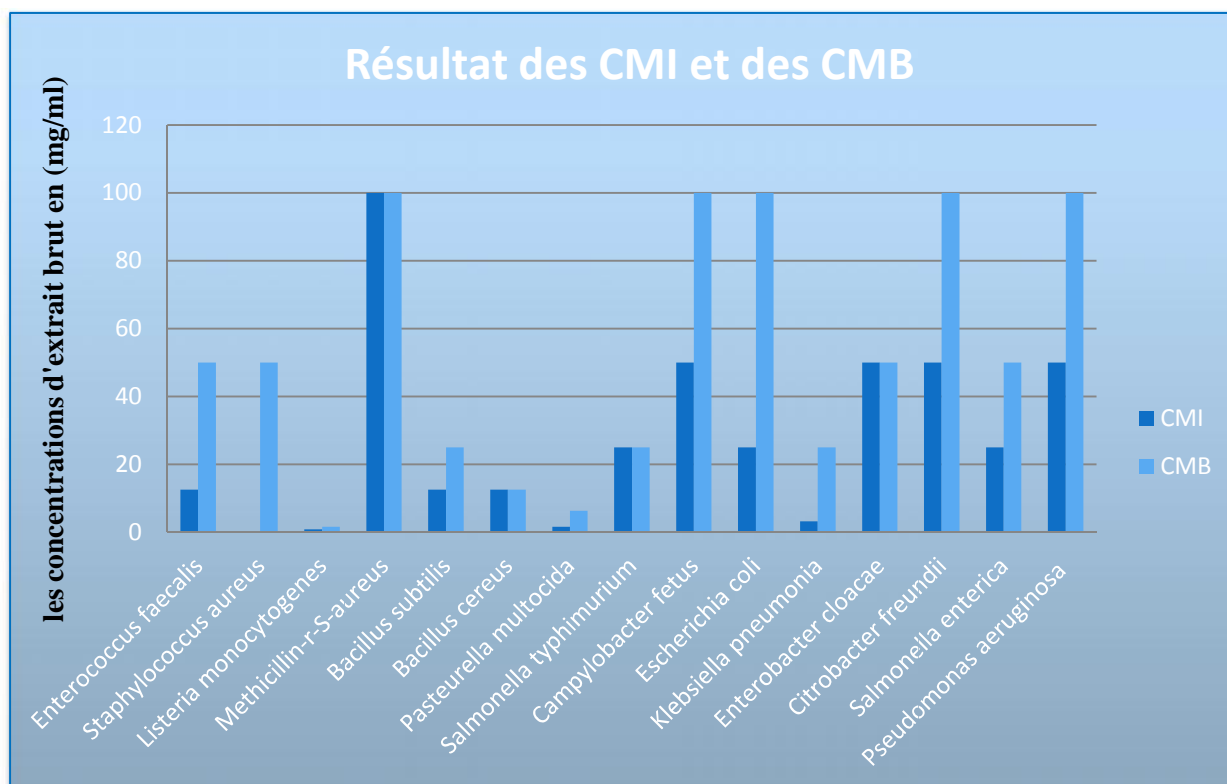
### 5.2 Détermination (CMI) et (CMB) par la méthode microdilution en milieu liquide (microplaque)

La détermination des paramètres de CMI et de CMB d'extrait brut méthanolique, a été effectuée grâce à la méthode de dilution en série en milieu liquide de Mueller Hinton (MH) contre six bactéries à Gram positive, neuf bactéries à Gram négative.



D'après les résultats consignés dans la **figure 39**, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) étaient comprises entre 0,78 et 50 mg/ml. Ainsi, on a pu constater que la souche *L.monocytogenes* a une valeur de CMI optimale (0,78 mg/ml).

Les concentrations minimales bactéricides d'extrait ont été en général nettement plus élevées que les valeurs de CMI correspondantes. Les valeurs de CMB ont varié de 1,56 à 100 mg/ml.



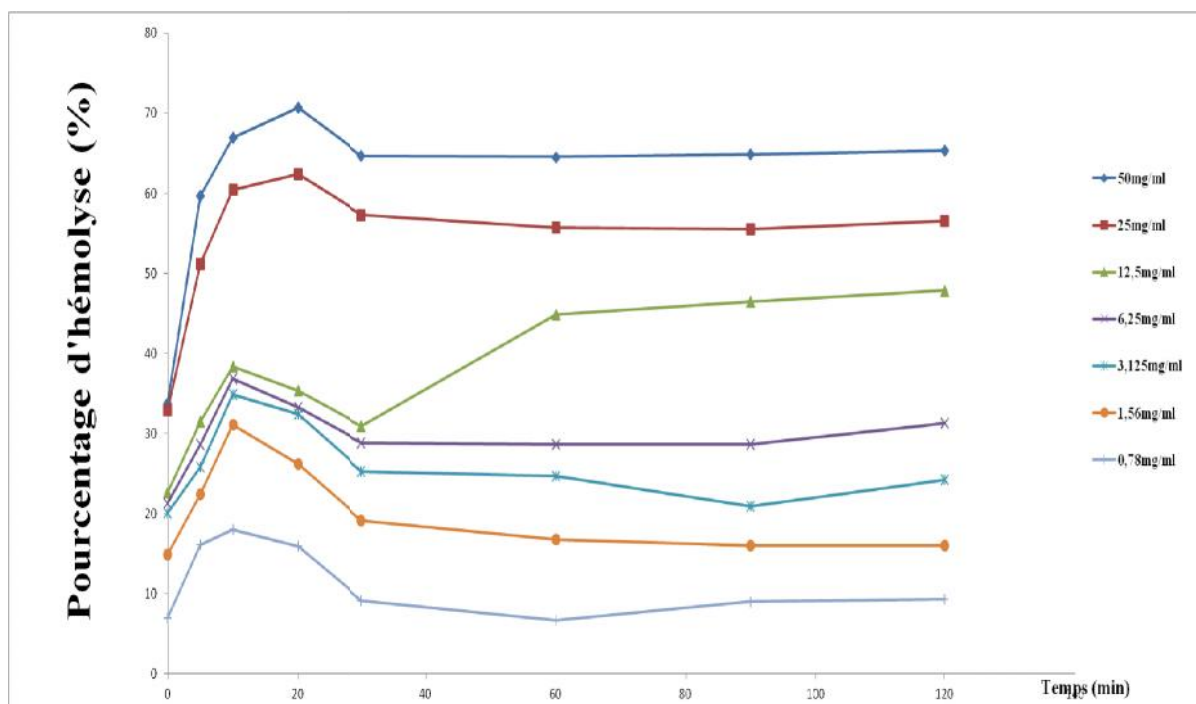
**Figure 39.** Résultat des CMI et des CMB d'extrait brut méthanolique vis-à-vis des souches bactériennes

## 6. Pouvoir hémolytique de l'extrait brut méthanolique de *Salicornia fruticosa*

. Le pouvoir hémolytique a été évalué en utilisant les globules rouges humains comme modèle universel et Le résultats obtenus sont exprimés en terme de pourcentages d'hémolyse ; fuite d'hémoglobine intracellulaire, en fonction de temps, et les résultats rapporté dans la **figure 40**.

Les résultats obtenus, montrent que les pourcentages d'effet hémolytique d'extrait brut méthanolique de la plante *Salicornia fruticosa* sont directement proportionnels à l'augmentation de concentration d'extraits en fonction du temps (**Figure.40**).

L'hémolyse maximale (70,7%) est obtenue à la concentration (50 ml/ml) après 20 min, cette concentration est considérée comme étant la plus toxique vis-à-vis des globules rouges. En revanche, l'hémolyse minimale (6,65%) est obtenue à la concentration (0,78 ml/ml) après 60 min.



**Figure 40.** L'effet d'extrait brut méthanolique de *S.fruticosa* solubilisé dans DMSO sur la fuite de l'hémoglobine intracellulaire chez les globules rouges humains.

Les plantes médicinales ont la capacité de produire des métabolites secondaires qui sont responsables de diverses vertus thérapeutiques, la présence de ces molécules est potentiellement influencée par des facteurs environnementaux tels que la situation géographique, la fertilité du sol, les parties utilisées et la saison de récolte (Ullah *et al.*, 2012).

De ce fait, notre travail a ciblé une plante *Salicornie fruticosa* cultivée au niveau de la wilaya de Mascara (la Mactaa).

Très peu de travaux ont été réalisés sur l'étude phytochimique et l'évaluation des propriétés biologiques de *Salicornia fruticosa*. Pour cela, il est nécessaire de comparer nos résultats avec des espèces du même genre. Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques réalisés sur la partie aérienne montrent la présence des tanins, flavonoïdes, anthocyanes, coumarines, les alcaloïdes, stérols et triterpènes et composés réducteurs. Ces résultats concordent avec les travaux de Seema., (2016) ; Essaidi *et al.*,(2013) qui ont illustrés la présence des mêmes composants au sein des espèces *Salicornia herbacea*. Par ailleurs, Deepa *et al.* ,( 2014) ont démontré uniquement la présence des tanin et flavonoïde au sein de la plante *Salicornia brachiata*.

Les extractions des différents métabolites secondaires de notre plante nous ont permis de calculer les rendements des extraits bruts méthanoliques, des fractions flavoniques (acétate d'éthyle et butanolique) et des tanins.

Le rendement a été élevé dans l'extrait brut méthanolique, ceci a été prouvé par plusieurs études qui ont suggéré que le méthanol est le solvant le plus utilisé pour extraire les composés phénoliques d'une plante avec une bonne quantité (Sun *et al.* 2007; Falleh *et al.*, 2008).

Toutefois, l'extrait de *Salicornie fruticosa* a été obtenu par macération avec un rendement de 17.3 %, ceci est relativement en accord avec les travaux de El sebaie *et al.* ,(2014) sur plant *salicornia fruticosa* qui ont rapporté une valeur de (18.46%) et avec celles de Esaidi *et al.* ,(2013), (17 %) pour *salicornia herbacea* et Ben Sassi *et al.* ,2008 ( 11.8 %) pour *salicornia fruticosa* .

La phytochimie quantitative des composés phénoliques totaux dans l'extrait brut méthanolique a révélé une teneur en phénols totaux de l'ordre de (15.83 ± 0.343) mg EAG/g MS. Cela est en accord avec les travaux menés par ben ssasi ,(2008) dont les teneurs en phénols totaux de (8.7 ± 0.5) ) pour l'extrait brut *Salicornia fruticosa* , par contre une étude faite par Milan *et al.* ,(2015) sur la plante *Salicornia europaea* a montré que la teneur en

phénols totaux est de l'ordre de ( $58.20 \pm 0.44$ ). Cette variation des teneurs peut être expliquée par l'origine de la plante et la méthode d'extraction (la polarité du solvant d'extraction) et les parties utilisés des plantes (**Badou., 2015 ; Djeridane et al., 2013 ; Gao et Liu, 2005**). Elle dépend aussi d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (le climat, la période de récolte et les conditions du stockage) (**Podsdek, 2007 ; Falleh et al., 2008**).

Les composés phénoliques sont formés dans la voie des phénylpropanoïdes, qui est stimulée principalement par l'enzyme phénylalanine ammoniac -lyase (PAL). Le métabolisme des phénylpropanoïdes transforme phénylalanine, le point substrat de branche entre le métabolisme primaire et secondaire, alors que le stress environnemental, tels que la sécheresse peut influencer la voie de biosynthèse de polyphénol (**Andr e et al., 2009**). En réponse à des stress environnementaux, l'activité de PAL augmente et que l'enzyme active de nombreux gènes engagés dans la synthèse des phénylpropanoïdes (**Oh et al., 2009**). Il a été montré que l'induction de l'accumulation des composés phénoliques, tels que l'acide salicylique, peut jouer un rôle dans le mécanisme de protection pendant un stress hydrique (**Miura et Tada , 2014**).

L'activité antibactérienne par la méthode de dilutions a montré une inhibition vis-à-vis 15 souches bactériennes (Gram positives et négatives) par l'extrait brute méthanolique de notre plante *Salicornia fruticosa*. Cette activité a montré que la plus petite valeur de CMI et CMB était celle pour *L.monocytogenes* avec une valeur égale à 0.78 mg/ml, 1.56 respectivement. D'autre part, les grandes valeurs de CMI/CMB étaient contre *C.fetus*, *C.freundii*, et *P.aerugenusa* avec des valeurs de (50/100) mg/ml, (50/100) mg/ml et (50/100) mg/ml respectivement.

En ce qui concerne la méthode de diffusion sur milieu solide, une large variété de diamètres d'inhibition a été observée avec : *L.monocytogenes* (30 mm), *E.faecalis* (30mm), *P.multocida* (30 mm) *K.pneumonia* (15mm), *P.aeruginosa*(12mm), *C.freundii*(11mm) et *C.fetus* (10mm).

Dans le même contexte, de nombreux travaux menés sur le même genre de plante *Salicornia* ou de différente partie de plante ont révélé une activité antibactérienne (**Lellau et Liebezeit., 2003**)

Cependant les diamètres mesurés par **Javad et al., (2014)** de l'extrait de *Salicornia herbacea* sur les souches *S. aureus.*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *E. coli* étaient comme suit : 9 mm, 6.2 mm, 4 mm et 3.5 mm respectivement. De plus celles mesurés par **Essaidi et al., (2013)** étaient: 10mm pour *S.aureus*, 8 mm pour *Streptococcus A*, 4 mm pour *P.aeruginosa*, 6 mm pour *K. pneumoniae* et 3 mm pour *E.coli*.

Toutefois, les extraits sélectifs des fractions de flavonoïdes (acétate d'éthyle et butanolique) et les tannins de *Salicorne fruticosa* ont montré une sensibilité variée vis-à-vis la souche *L.monocytogene* avec une variété de diamètres d'inhibition observée : FA (11mm), FB (12mm), T (10mm), FA.FB (15 mm), FA.T (14mm), FB.T (15mm) et FA.FB.T (23mm).

En effet, plusieurs auteurs ont indiqué que l'activité antimicrobienne des les extraits de certaines plantes halophiles telles que *Salicornia brachiata* ont révélé une très bonne efficacité contre les bactéries gram-positives (**Kumar et al., 2009 ;Manikandan, et al ., 2009**).

L'activité antibactérienne est liée à la présence de phénols (flavones et des flavonoïdes et des composés apparentés), des polysaccharides présents dans les extraits de *Salicornia*. Ces substances phénoliques ont tendance à être soluble dans l'eau, car ils sont le plus souvent combinés avec le sucre comme glycosides et ils sont généralement situés dans la vacuole des cellules. L'encrassement des bactéries sont particulièrement sensibles à l'action des extraits méthanoliques bruts des halophytes (**Kumar et al., 2009**).

En parallèle, les résultats de screening phytochimique d'extrait de *S.fruticosa* ont indiqué la présence de plusieurs composés phénoliques qui peuvent avoir une activité antimicrobienne. Cette activité est non seulement liée à des phénols, mais aussi à d'autres composants tels que des acides gras et le composé osmotique (bétaine) (**Chandrasekaran et al., 2008**) ; **Kim et al., 2010**).

Quelques auteurs ont souligner que les propriétés attribuées aux plantes sont généralement les résultats des effets de synergie entre leurs composés (**Isca et al., 2014**).

Par conséquent, on peut penser que l'activité antimicrobienne des l'extraits (Flavonoïde fraction acétate d'éthyle, Flavonoïde fraction Butanolique et Tanins.)De *S. fruticosa* est le résultat d'un effet additif ou synergique de plusieurs composés présents dans la plante (**Essaidi, 2013**).

Cependant, le mode et le mécanisme d'action des extraits et leurs composés ne sont pas totalement compris et les recherches se poursuivent. Mais quelques auteurs ont donné plusieurs suppositions selon leurs observations: une action sur le métabolisme énergétique (Gill *et al.*, 2004), interruption de la force proton motrice de la membrane cellulaire, dénaturation non spécifique du cytoplasme de la paroi et de la membrane cellulaire (Manou *et al.*, 1998), dénaturation des protéines par les composés phénoliques (Madigan *et al.*, 1997). D'autres auteurs mentionnent une relation entre la structure et l'activité antibactérienne des molécules qui constituent les extraits par la présence de certains groupes fonctionnels: les composés aldéhydiques et phénoliques sont très actifs dans certains essais bien déterminés (Friedman *et al.*, 2002), les structures phénoliques sont les plus actives sur d'autres microorganismes, par la présence du groupe hydroxyle et sa position, les aldéhydes ont aussi une activité antimicrobienne puissante, la présence de l'oxygène dans les cétones augmente les propriétés antimicrobienne des terpènes (Dorman *et al.*, 2000).

En considérant l'utilisation de ces plantes en médecine traditionnelle, l'étude des propriétés d'hémolyse de leurs extraits doit être réalisée, compte tenu de la sensibilité de l'être humain à l'hémolyse induite par certaines substances (Devecioglu *et al.*, 2001)

La cytotoxicité d'extrait brut méthanolique de *salicornia fruticosa* vis-à-vis des globules rouges est élevée au bout de 120 minutes par rapport les premières 60 minutes d'incubation. Sachant que les compositions phénoliques, aldéhydes et alcools favorisant la lyse des globules rouges, de ce fait nous pouvons dire que l'activité cytotoxique des extraits est liée le plus souvent à la présence de ces composés (Sacchetti *et al.*, 2005).

# *Conclusion*

La phytothérapie peut constituer une médecine alternative ou au moins un complément à la pharmacie classique. La nécessité de trouver de nouvelles molécules reste une priorité de santé publique.

A l'heure actuelle, l'Algérie est un pays riche en termes de biodiversité, et l'usage des pharmacopées traditionnelles est encore une pratique bien vivante. Ces pharmacopées traditionnelles comportent des traitements pour soigner plusieurs pathologies et il est donc toujours d'actualité de penser que de nouvelles molécules puissent continuer à être isolées des plantes locales spontanées.

Les résultats obtenus au cours de nos travaux de screening phytochimique de plante *Salicornia fruticosa*, ont révélé la richesse de notre plante en métabolites secondaires, où nous avons constaté la présence des flavonoïdes, des tanins, des stérols, des triterpènes, des composés réducteurs, des coumarines et des alcaloïdes.

Toutefois, les rendements des extraits qui ont été réalisés par la méthode macération sont relativement importants. Pour l'extrait brut méthanolique (la partie arienne) été de l'ordre de 17.3 %, et les flavonoïdes fraction acétate d'éthyle avec 2.8 %, les flavonoïdes fraction butanolique avec 3.4% et les tanins avec un rendement 1.9 %.

Par ailleurs, l'étude qualitative et quantitative de l'activité antimicrobienne de notre extrait brut méthanolique de *Salicornia fruticosa* est avérée très intéressante, du fait que nous avons obtenu un effet inhibiteur vis-à-vis les quinze souches testées. De ce fait, le pouvoir antibactérien est relativement élevé, avec des CMI obtenues sont comprises entre 0.78 et 50 mg/ml. Les résultats obtenus indiquent que *L.monocytogenes* est la souche la plus sensible. Par contre *Methicillin-r.S.aureus* est la plus résistante.

L'essai de la cytotoxicité de notre extrait vis-à-vis les globules rouges révèle que ces extraits présentent un effet cytotoxique à une concentration de 50 mg/ml.

En fin, ces résultats préliminaires peuvent être complétés par d'autres études plus approfondies (tests toxicologiques, mode d'action et d'application, etc.) et la caractérisation de ces extraits qui nécessite, peut-être, d'autres techniques de détection comme CPG-SM, HPLC-SM et RMN.



# **Références**

# **Bibliographiques**

## A

- **Abderrazak M. , Joël R. (2007).** La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. pp 177.
- **AMIN ABEDINI.(2014).** Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Thèse De Doctorat. Faculté Des Sciences Pharmaceutiques Et Biologiques, Université Lille Nord De France, École Doctorale Biologie Sante.
- **Arif T., Bhosale J D., Kumar N., Mandal T K., Bendre R S., Lavekar S., Dabur R.(2009).** Natural products-antifungal agents derived from plants. *J Asian Nat Prod Res.*; 11, 7: 626 – 638.
- **Arthur C.L., Pawliszyn J.( 1990).** Solid phase micro-extraction with thermal desorption using fused-silica optical fibers, *Analytical Chemistry*, 62, 2145-2148.
- **Atefeibu E.S.I. (2002).** Contribution à l'étude des tanins et de l'activité antibactérienne d'*Acacia Nilotica* Var *Andesonii* .Thèse de Doctorat, université cheikh Anta Diop de Dakar. pp 33.
- **Augusto F., Leite et Lopes A., Zini C.A. (2003).** Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances, *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 160-169.

## B

- **Babar Ali, M., Hahn, E.J., Paek, K.Y. (2007).** Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules*, Vol. 12; pp 607-621.
- **Babulka P. (2007).** Plantes médicinales du traitement des pathologies rhumatismales; de la médecine traditionnelle à la phytothérapie modern; *Phytothérapie*, Vol.5, pp 137-145.
- **Ballakhdar .(2006),** plante médicinale au Maghreb et soins de base Ed le fennec Casablanca,13-34.
- **Barboni T., Luro F., Chiaramonti N., Desjobert J.M., Muselli A., Costa J. (2009).** Volatile composition of hybrids *Citrus* juices by headspace solid-phase micro extraction/gas chromatography/mass spectrometry, *Food Chemistry*, 116, 382-390.
- **Beddou ,F (2015) ,** Etude phytochimique et activités biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius L et Anvillea radiata Coss & dur* , Thèse de Doctorat, université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.

- **Beecher G. R. (2003).** Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J. Nutri.*, 133 (10), 3248S-3254S.
- **Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M.R.(1998).** Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seedtannin content, and study of their seed and root phenolic exudation, *Journal Plant and Soil*, 203: pp 27-36.
- **Ben Sassi A, Harzallah-Skhiri F, Bourgougnon N et Aouni M (2008),** Antiviral activity of some Tunisian medicinal plants against Herpes simplex virus type 1, *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 22:1, 53-65
- **Benhammou, N., Atik Bekkara, F., Kadifkova Panovska, T. (2009).** Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *CR Chim*,12 :1259–1266.
- **Bergogne-Bérézin E., Brogard J. M.(1999),** Bases biologiques de l'antibiothérapie. ed., Masson, p. 27.
- **Beta, T; Nam, S; Dexter, J.E; Sapirstein, H.D. ( 2005).** Phenolic content and antioxidant activity of pearled ulreat and roller – milled fractions, *Creal Chem.* pp 390 -393.
- **Beyer A., Biziuk M.( 2008).** Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. *Food Chemistry*, 108, 669-680
- **Bhat S.V., Nagasampigi B.A. ET Sivakumar M. (2005).** Chemistry of Natural Products; Ed 1: NAROSA, SPRINGER. pp: 115-252.
- **Biglari F., Alkarkhi A.F.M., Easa A.M.(2008).** Antioxydant activity and phenolic content of various data palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chemistry*; Vol. 107; pp 1636-1641.
- **Bimakr M., Rahman R.A., Taip F.S., Ganjloo A., Salleh L.M., Selamat J., Hamid A., Zaidul I.S.M. (2011).** Comparison of different extraction method of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves, *Food and Bioproducts Processing*, 89, 67-72.
- **Boizot, N ; Charpentier, J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Méthodes et outils pour d'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques*, INRA, pp 79-82.
- **Booth N.L., Dejan N., Richard B., Stoci E. (2004).** New lanthanide complexes of 4 methyl 7 hydroxy coumarin and their pharmacological activity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 50; pp 120-123
- **Bosch-Fusté J., Riu-Aumatell M., Guadayol J.M., Caixach J., López-Tamames E., Buxaderas S. (2007).** Volatile profiles of sparkling wines obtained by three

extraction methods and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis, Food Chemistry 105, 428-435.

➤ **Bounatirou S., Smiti S., Miguel M.G., Flleiro L., Rejeb M.N., Neffati M., Costa M.M., Figueiredo A.C., Barosso J.G., Pedro L.G. ( 2007).** Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian Thymus capitatus Hoff.et Link. Food Chemistry; Vol. 105; pp 146-155.

➤ **Bousbia N., Vian M.A., Ferhat M.A., Petitcolas E., Meklati B.Y., Chemat F.( 2009).** Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity, Food Chemistry, 114, 355-362.

➤ **Bruneton, J. (1999).** Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2<sup>ème</sup> édition, Paris : Editions médicales internationales, Tec et Doc Lavoisier, pp 1120.

➤ **Burger B.V., Le Roux M., Munro Z.M., Wilken M.E. (1991).** Production and use of capillary traps for headspace gas chromatography of airborne volatile organic compounds, Journal of Chromatography A, 552, 137-151.

➤ **Burgot G., Pellerin F. (2003).** Micro-extraction en phase solide (SPME), Les techniques de l'ingénieur, P1430, p. 1-20.

➤ **Burgot G., Pellerin F.(,2003)** Microextraction en phase solide (SPME), Les techniques de l'ingénieur, P1430, p. 1-20.

## C

➤ **Cannac-Arteaga D. (2001).** Contribution à l'amélioration de l'analyse de la fraction volatile de produits riches en eau par espace de tête dynamique couplé à la chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse. Thèse de troisième cycle, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand. P137.

➤ **Careri M., Elveri L., Mangia A., Musci M. ( 2001).** Spectrophotometric and coulometric detection in the high-performance liquid chromatography of flavonoids and optimization of sample treatment for the determination of quercetin in orange juice, Journal of Chromatography A, 881, 449-460.

➤ **Cavé A.1993,** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2<sup>ème</sup> Ed. Tec. Et Doc. Ed. Lavoisier, Paris ; pp 274-285.

➤ **Chemat F., Lucchesi M.E., Smadja J. (2004).** Solvent-free microwave extraction of volatile natural substances, Brevet Américain, 0187340 A1.

➤ **Clarke S. (2008).** Processing, extraction and purity. Essential chemistry for aromatherapy. 2<sup>ème</sup> édition. Londres : Elsevier, p. 79-93.

- **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2014)**, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA, 11th edition.
- **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2014)b** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA, 9th edition,
- **Couic-Marineier F.,Lobstein A.(2013)** les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. Actualités pharmaceutiques, 52(525) :18-21
- **Cowan MM. (1999)**. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev; 12 (4); pp 564 – 582.
- **Cuoco G., Mathe C., Archier P., Chemat F., Vieillescazes C., A. (2009)**. multivariate study of the performance of an ultrasound-assisted madder dyes extraction and characterization by liquid chromatography-photodiode array detection, Ultrasonics Sonochemistry, 16, 75-82.

## **D**

- **Dacosta Y. (2003)**. Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed). Paris. pp 317.
- **Daels-rakotoarison D.(1999)**. Extraits polyphénoliques d'aubépine, de cola et d'églaïtier. Thèse de doctorat. Université de Lille II. France.172 (64)
- **Debray M, Jacquemin H, Razafindrambo R.(1971)**. Travaux et documents de l'Orstom. (Paris, N°8).
- **Davy, A.J., Bishop, G.F., and Costa, C.S.B. (2001)**. Salicornia L. (Salicornin pusilln J. Woods, S. ramosissima J. Woods, S. europaea L., S. obscurum P.W. Ball and Tutin, S. nitens P. W. Ball and Tutin, S. fmgilis P. W. Ball and Tutin and S. dolichostachya Moss). Journal of Ecology, 89: 681-707
- **Deepa Santhanakrishnan , Sripriya N. Shankar And Bangaru Chandrasekaran(2014)** studies on the phytochemistry, spectroscopic characterization and antibacterial efficacy of salicornia brachiata , International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Vol 6, Issue 6.
- **Deina M., Rosa A., Casu V., Cottiglia F., Bonsignore L. (2003)**. Natural product: their chemistry and biological significance. Journal of the American Oil Chemistry Society, Vol. 80; pp 65-70.

➤ **Djeridane A., Yousfi M., Nedjmi D., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. (2006)** Antioxydant activity of some medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*; Vol. 97; pp 654-660.

➤ **Dohou N., Yamni K., Tahrouch S. IDRISSE Hassani L.M., Badoc A., Gmira N. (2003).** Screening phytochimique d'une endémique Ibéro-Marocaine, *Thymelea lythroïdes*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, Vol. 142; pp 61-78.

➤ **DORMAN H.J.D. et DEANS S.G., (2000)** Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, vol 88, pp308-316.

➤ **Dugo G., Di Giacomo A. ( 2002).** The genus *Citrus*. Londres, Taylor & Francis Publishing, 2002, 642 pages.

➤ **Duval. L. (2012).** Les Huiles Essentielles à l'officine ; thèse de doctorat en pharmacie ; UFR de médecine et de pharmacie de Rouen.

## E

➤ **Elsebaie E M, Elsanat S, Gouda S, Elnemr K (2014)** Utilization of *Salicornia frutescens* herb for producing antioxidants, food technology department, faculty of agric. Kafrelsheikh university, Egypt, *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.*49(1), 53-58.

➤ **Epifano, F., Genovese, S., Menghini, L., Curini, M., (2007).** Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites, *Review. Phyto*, 68 : 939– 953.

➤ **Essaidia.I, Brahmib.z, Snoussia.A, Koubaiera H, Casabiancaci H , El Omrid A, Chaabounia M , Bouzouita N .(2013)** Phytochemical investigation of Tunisian *Salicornia herbacea* L., antioxidant, antimicrobial and cytochrome P450 (CYPs) inhibitory activities of its methanol extract, *Food Control* 32 125e133

## F

➤ **Fadila Moussaoui , Tajelmolk Alauui (2016)** Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants, *Asian Pac J Trop Biomed*; 6(1): 32-37.

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

➤ **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5): 372–379.

➤ **Faller A.L. K., Fialho E. (2010).** Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods, *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 561-568.

➤ **FRIEDMAN, M., HENIKA P.R. et MANDRELL R.E., (2002)-** Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.*, vol 65, pp1545-1560.

## G

➤ **Ganzler K., Salgó A., Valkó K. (1986).** Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography, *Journal of Chromatography*, 371, 299-306.

➤ **Gao M, Liu CZ. (2005).** Comparison of techniques for the extraction of flavonoids from cultured cells of *Saussurea medusa* Maxim. *World J Microb Biot*, 21: 1461–1463.

➤ **Ghedira K. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, Vol 3(4) ; pp 162-169.

➤ **Gil R, Latorre A, Moya A (2004).** **Bacterial** endosymbionts of insects: insights from

➤ **Girotti –Chanu C. (2006).** Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine , flavone extraite de *Mirotea de bilis* .thèse de Doctorat. Institut national des sciences appliquées de Lyon. pp 136.

➤ **Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2006).** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 41; pp 1220-1234.

➤ **Guignard J-L. (1998).** *Abrégé botanique*. 2ème Edition Masson. Paris, 199.

## H

➤ **Hadri .N (2015) ,** Etude phytochimique et activité antioxydant d'extraits de plantes *Sedum Villosum* L. (orpin) et *Anabasis articularata* Moq.(Forsk), Thèse de Doctorat, université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.

➤ **Hartmann, T. (2007).** From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism, *.Review. Phyto*, 68: 2831–2846.

➤ **Hayouni E.A., AbedrabbaM., Bouix M., Hamdi M. ( 2007).** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts, *Food Chemistry*, 105, 1126-1134.

➤ **Hennebelle T, Sahpaz S, Bailleul F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothér.* Vol. 1 ; pp 3 – 6.

➤ **Hennebelle T. (2006).** Investigation chimique, chimio-taxonomique de Lamiacées productrices d'antioxydants : *Marrubium peregrinum*, *Ballota larenda*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées). Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Doctorat en Chimie Organique et Macromoléculaire. Université des Sciences et Technologie de Lille-Lille 1, Ecole Doctorale Sciences de la Matière du Rayonnement et de l'Environnement. France.

## I

➤ **Ibáñez E., López-Sebastia S., Ramos E., Tabera J., Reglero G. (1998).** Analysis of volatile fruit components by headspace solid-phase micro-extraction, *Food Chemistry*, 63, 281-285.

➤ **Isca V, Seca A, Pinto .D, Silva A (2014 )** .An overview of *Salicornia* genus: The phytochemical and Pharmacological Profile, *Natural products :research reviews* Vol.2.

➤ **Jadhav D., Rekha B.N., Gogate P.R., Rathod V.K. (2009).** Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction, *Journal of Food Engineering*, 93, 421-426.

➤ **Javad Sharifi Rad, Seyedeh Mahsan Hoseini Alfatemi, Majid Sharifi Rad (2014)** In vitro assessment of antibacterial activity of *Salicornia herbacea* L. Seed extracts against multidrug resistant gram-positive and gram-negative bacteria, *International Journal of Biosciences* Vol. 4, No. 6, p. 217-222.

## K

➤ **Kansole, M.M.R. (2009).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiacées du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* vahl et *Orthosiphon pallidus* royle ex benth. Mémoire pour obtenir un diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.



- **Kataoka H., Lord H.L., Pawliszyn J. (2000).** Applications of solid-phase micro-extraction and gas chromatography in food analysis, *Journal of Chromatography A*, 880, 35-62.
- **KHOLKHAL F (2015),** Etude Phytochimique et Activité Antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus ssp coloratus et ssp euciliatus*, Thèse de Doctorat, université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.
- **Kok M.F., Yong F.M., Lim G. (1987).** Rapid extraction method for reproducible analysis of aroma volatiles, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35, 779-781.
- **Kolb B. (1999).** Headspace sampling with capillary columns, *Journal of Chromatography A*, 842, 163-205.
- **Kueny-Stotz M. (2008).** Contribution à la chimie des flavonoïdes : élaboration de squelettes flavylum sophistiqués, nouvelle voie d'accès aux flavan-3-ols et aux proanthocyanidines. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat en Chimie organique, Université Louis Pasteur Strasbourg, France.
- **Kumar R., M. B. Patil, Sachin R. Patil, Mahesh S. Paschapur (2009)** Isolation and Evaluation of Disintegrating Properties of *Salicornia fruticosa* (L.) Mucilage, *International Journal of PharmTech Research CODEN( USA)*, Vol.1, No.3, pp 537- 543

## L

- **Lagunez Rivera I. (2006).** Etude de l'extraction des métabolites secondaires des différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe ; Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de TOULOUSE ; p: 31-42.
- **Lebham. (2005).** Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer. (IVEM). Université de Bretagne Occidentale (UBO).
- **Lebham.(2005),** Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer. (IVEM). Université de Bretagne Occidentale (UBO).
- **Lee M.H., Lin C.C. (2007).** Comparison of techniques for extraction of isoflavones from the root of *Radix Puerariae*: ultrasonic and pressurized solvent extractions, *Food Chemistry*, 105, 223-228.

- **Liebezeit, G. (2008).** Ethnobotany and phytochemistry of plants dominant in salt marshes of the Lower Saxonian Wadden Sea, southern North Sea. *Senckenbergiana Marítima*, 38: 1-30.
- **Letellier M., Budzinski H., Bellocq J., Connan J. (1990).** Focused microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes from sediments and source rocks, *Organic Geochemistry*, 30, 1353-1365.
- **Li, S., Wang, C., Peng, X., et Wu, X. (2013).** Effects of Aqueous Extracts and Essential Oil from *Cinnamomum cassia* on Rat Colonic Mucosal Morphology and Bacteroidales, *Journal of Food and Nutrition Research*, 1(2), 7–12.
- **Lucchesi M.E. (2005).** Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de troisième cycle, Chimie, Université de la Réunion, Saint Denis. P.146 .
- **Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J. (2004).** An original solvent free microwave extraction of essential oil from spices, *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 134-138. (b)
- **Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J. (2004).** Solvent-free microwave extraction of volatile natural substances, *Brevet Américain*, (a)
- **Lugasi, A ; Hovari, J ; Sagi, K.V ; et Biro, L. (2003).** The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. *Acta. Biologica Szegedensis* 1-4: 119-125.
- **Luque de Castro M.D., Priego-Capote F. (2010).** Soxhlet extraction: Past and present panacea, *Journal of Chromatography A*, 1217, 2383-2389.
- **Lutge U., Kluge M., Bauer G. (2002).** Botanique 3ème Ed : Technique et documentation. Lavoisier .Paris, pp 211.

## M

- **M. Aouni, F. Pelen, R. Soulimani (2013),** Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application, *Phytothérapie* .11:225-236.
- **Macheix J-J, Fleuriet A, Jay-Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux.Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Suisse : Lausanne ; Presses polytechniques et universitaires Romandes.
- **MADIGAN, MICHAEL T. et BARRY L. MARRS.( 1997)-** Extremophiles. *Scientific American*. pp.82-87

- **Makoi J.H.J.R., Ndakidemi P.A. (2007).** Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 6(12); pp 1358-1368.
- **Mamede M.E.O., Pastore G.M. (2006).** Study of methods for the extraction of volatile compounds from fermented grape must, *Food Chemistry*, 96, 586-590.
- **MANOU, I., BOUILLARD, L., DEVLEESCHOUWER, M.J., BAREL, A.O. (1998)** Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test . *Journal of Applied Microbiology*, vol 84, 368-376.
- **Matich A.J., Rowan D.D., Banks N.H. (1996).** Solid phase micro-extraction for quantitative headspace sampling of apple, *Analytical Chemistry*, 68, 4114-4118.
- **Mendiola J.A., Herrero M., Cifuentes A., Ibañez E. (2007).** Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications, *Journal of Chromatography A*, 1152, 234-246.
- **Mengal P., Mompon B. (1996).** Procédé et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes, *Brevet Européen*, EP 698 076 B1.
- **Meyer-Warnod B. (1984).** Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils, *Perfumer & Flavorist*, 9, 93-103.
- **Milan S. Stankovi, Milica Petrovi, Dejan Godjevac, Zora Daji, Stevanovi (2015)** Screening inland halophytes from the central Balkan for their antioxidant activity in relation to total phenolic compounds and flavonoids: Are there any prospective medicinal plants?, *Journal of Arid Environments* 120 26e32.
- **Mohammed CHEURFA, (2015)** .thèse de doctorat LMD, Intérêt des biomolécules d'origine végétale sur la santé, Université Hassiba BEN BOUALI - Chlef-.
- **Mohan H., Tripathi. R & Kamat J.P. (2006).** Modulation of oxidative damage by natural products. *Food Chem.*, 100: 81-90.
- **Muñoz-Olivas R. (2004).** Screening analysis: an overview of methods applied to environmental, clinical and food analyses, *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 203-216.

## N

- **Naghibi F, (2005).** Mosaddegh M, Mohammadi M.S et Ghorbani A-Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology-Iranian journal of pharmaceutical research ; vol. 2; pp 63-79.

➤ **National Committee for Clinical Laboratory Standards (2001)** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement. NCCLS document M100- S11. USA: Villanova, vol. 21, n° 1.

➤ **Noij T., Van Es A., Cramers C., Kijjks J. (1987)**. Selective removal of water in purge and cold-trap capillary gas chromatographic analysis of volatile organic traces in aqueous samples, *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications*, 10, 60-66.

➤ **Núñez A.J., Gonzalez L.F., Janak J. (1987)**. Pre-concentration of headspace volatiles for trace organic analysis by gas chromatography, *Journal of Chromatography*, 300, 127-162.

## O

➤ **O’Kennedy R, Thomes R D. (1997)**. éditeurs. *Coumarins : biology, applications and mode of action*. New York, NY : John Wiley & Sons, Inc .

## P

➤ **Pandey KB et Rizvi SI. (2009)**. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2 (5) ; pp 270 – 278.

➤ **Paolini J., Leandri C., Desjobert J.M., Barboni T., Costa J. (2008)**. Comparison of liquid-liquid extraction with headspace methods for the characterization of volatile fractions of commercial hydrolats from typically Mediterranean species, *Journal of Chromatography A*, 1193, 37-49.

➤ **Paris R, Moyse H.(1969)**. *Précis de matière médicale*. Paris: Masson.

➤ **Peronny S. (2005)**. *La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta)*.Thèse de Doctorat du Muséum national d’histoire naturelle. Discipline Eco-Ethologie. pp 151.

➤ **Pharmacopée Européenne (1997)**. 3<sup>ème</sup> édition, Conseil de l’Europe. Sainte Ruffine : éd. Maisonneuve S.A, , 1918 pages.

➤ **Pharmacopée européenne.(2008)**, Recommandation relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Agence Française de Sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS).

➤ **Piochon M. (2008)**. *Etude des huiles essentielles d’espèces végétales de la flore Laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse*. Université du Québec à Chicoutimi, Canada.

➤ **Podsedek, A. (2007).** Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables. A review. *LWT-Food sci Tech*, 40:1–11.

## **R**

➤ **Rafi A., Tasneem U S., Ashfaq A. (1995),** the essential oils . *Hamdard Medicus*, XXXV(1) :108.

➤ **Ridgway K., Lalljie S.P.D., Smith R.M. (2007).** Sample preparation for the determination of trace residues and contaminants in foods, *Journal of Chromatography A*, 1153, 36-53.

➤ **Rizk A.M.(1982).** Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterapia*, Vol. 52 (2); pp 35-42

➤ **Roulier G. (2008),** les huiles essentielles pour votre santé : traité pratique d'aromathérapie. Propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes .Édition Dangles.

## **S**

➤ **Seema Patel(2016)** *Salicornia*: evaluating the halophytic extremophile as a food and a pharmaceutical candidate, *3 Biotech* 6:104

➤ **Sinyinda S., Gramshaw J.W. (1998).** Volatiles of avocado fruit, *Food Chemistry*, 62, 483-487.

➤ **Soussy CJ, Cavallo JD, Chardon H, et al. (2010)** Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie. Édition de janvier, 50 p

➤ **Sun B, Richardo-da-Silvia JM, Spranger I, (2007).** Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46.

## **T**

➤ **Trease E., Evans W.C.(1987)** *Pharmacognosie*. Billiere Tindall. London 13<sup>th</sup> Edition. P, 61-62. In Karumi Y., Onyeyili P.A. et Ogugbuaja V.O. Identification des principes actifs de l'extrait de feuilles de *M. balsamifera* (Baume du pommier). *Journal of Medicine and Scientific*, Vol.4 (3); pp 179-182. Nigeria. ISSN 1682-4474.

➤ **Tuberoso C.I.G., Barra A., Angioni A., Sarritzu E., Pirisi F.M. (2006).** Chemical composition of volatiles in Sardinian myrtle (*Myrtus communis* L.) alcoholic extracts and essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1420-1426.

## U

➤ **Ullah n., Muhammad k., Muhammad u.a., Ali khan t., Tahibzada u.k., Ali khan f., Umberin n et Ullah s. (2012).** Impact of geographical locationson *Mentha spicata* antibacterial activities. *Journal of Medicinal Plants Research* .Vol. 6(7), pp. 1201-1206.

## V

➤ **Vermerris, W. (2006).** Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht. ISBN-10 1- 4020-5163-8 (HB).

➤ **Vermerris, W.(2006),** Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht. ISBN-10 1- 4020-5163-8 (HB).

➤ **Verpoorte R. et Alfermann A.W. (2000).** Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism; Ed: KLUWER ACADEMIC; pp: 1- 23.

➤ **Virost M.A., Fernandez X., Visinoni F., Chemat F. (2008).** Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils, *Journal of Chromatography A*, 1190, 14-17.

## W

➤ **Wang H., Zhao M., Yang B., Jiang Y., Rao G.(2008).** Identification of polyphenols I tobacco leaf and their antioxidant and antimicrobial activities. *Food Chimistry*; Vol.107; pp1399-1406.

➤ **Williams C.A., Grayer R.J. (2004).** Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.*, Vol. 21(4); pp 539-573.

➤ **Wink M. (2010).** Biochemistry of Plant Secondary Metabolism; *Annual Plant Reviews* 40; Ed: WILEY-BLACKWELL, pp 1-23.

➤ **Wong S.P.,Leong L.P., Koh J.H.W.(2006).** Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*;Vol. 99; pp 775-783.

## Y

➤ **Yang Y., Battesti M.J., Djabou N., Muselli A., Paolini J., Tomi P., Costa J. (2012).** Melissopalynological origin determination and volatile composition analysis of Corsican “chestnut grove” honeys, *Food Chemistry*, 132, 2144-2154.

## Z

➤ **Zhang, S.Y., Zheng, C.G., Yan, X.Y., Tian, W.X.(2008).** Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells. *Biochemical and Biophysical Communications*, Vol. 371; pp 654-658.

➤ **Ziegler J, Facchini PJ. (2008).** Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. *Rev Plant Biol*. Vol. 59; pp 735 – 769.

# *Annexes*



## Annexe I: Composition des milieux de culture.

### Eau physiologique

Na Cl.....	9 g
Eau distillée.....	1000 ml

### Bouillon Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf.....	02,0g
Hydrolysate acide de caséine.....	17.5g
Amidon.....	01.5g
Eau distillée.....	1000ml

pH : 7.4

Suspendre 23 g de la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

### Gélose Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf.....	4,0g
Hydrolysate acide de caséine.....	17.5g
Amidon.....	01.5g
Agar .....	15g
Eau distillée.....	1000ml

pH = 6,8 (±0,2) à 37°C

Suspendre 38g de la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min

### Gélose nutritive

Extrait de levure.....	2 g
Extrait de viande.....	10g
Peptone.....	5 g
Glucose.....	20 g
Nacl.....	5g
Eau distillée.....	1000 ml
Agar agar.....	20g

### Bouillon nutritif

Extrait de levure.....	2 g
Extrait de viande.....	10g
Peptone.....	5 g
Glucose.....	20 g
Nacl.....	5g
Eau distillée.....	1000 ml

### Annexe II : Réactifs et réaction de caractérisation

Les réactifs utilisés lors des tests sont les suivants :

- **Réactif de Wagner** : Dissoudre 2g de KI et 1,27g d'I<sub>2</sub> dans 75 ml d'eau. Ajuster le volume total à 100ml d'eau.
- **Réactif de Mayer** : Dissoudre 1,358 g de HgCl<sub>2</sub> dans 60ml d'eau et également 5 g de KI dans 10 ml d'eau. Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100ml d'eau.
- **Réactif d'amidon** : Dissoudre 1,2 g d'iode dans 50 ml d'eau distillée contenant 2,5g d'iodure de potassium. Chauffer dans un bain marie 5 ml de la solution à tester avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée jusqu'à ébullition.
- **Réactif de Liebermann-Burchardt** : Mélanger 5 ml de la solution à tester avec 5 ml d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter le tout et laisser la solution reposer pendant 30 minutes à 21°C.