

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

Laboratoire de Biotoxicologie, pharmacognosie et valorisation biologique des plantes



MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME  
DE MASTER II EN BILOGIE

OPTION : biotechnologie végétale

PRESENTE PAR : Mr. ADEM HAMID

THEME :

EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE, ANTIFONGIQUE ET  
ANTITOXINOGENIQUE DE L'EXTRAIT BRUT METHANOLIQUE DES  
GRAINES DE *Chamaerops Humilis L*

Soutenu le 20\06\2016 devant la commission d'examen :

Mr Hasnaoui okkacha	Président	PR	Université de Saida
Mr Adli djalal eddine	Encadreur	MCB	Université de Saida
Mr Hachem kada	Examineur	MCA	Université de Saida

ANNEE UNIVERSITAIRE

2015\2016

The background is a highly decorative page with a light blue and white color scheme. It features intricate lace patterns, large white roses, and two white doves perched on a nest of flowers at the bottom. The overall aesthetic is elegant and celebratory.

## *Dédicace*

**Je dédie de modeste travail à**

**Mes chères parents qui m'ont soutenu et**

**accompagné pendant tout le cursus**

**A mes 2 frères Kada et Abdelkrim**

**À ma sœur (F))**

**À mes amis et mes collègues**

**À tous ceux qui aiment la science**

## **REMERCIEMENT**

AVANT TOUTES CHOSES, JE REMERCIE DIEU, LE TOUT PUISSANT, POUR  
M'AVOIR DONNÉ LA FORCE ET LA PATIENCE.

J'EXPRIME D'ABORD MES PROFONDS REMERCIEMENTS ET MA VIVE  
CONNAISSANCE À MR ADLI DJALLAL, MAITRE CONFÉRENCE À  
L'UNIVERSITÉ DE SAÏDA POUR AVOIR ENCADRÉ ET DIRIGÉ CE TRAVAIL  
AVEC UNE GRANDE RIGUEUR SCIENTIFIQUE, SA DISPONIBILITÉ, SES  
CONSEIL ET LA CONFIANCE QU'IL M'ACCORDÉ M'ONT PERMET DE  
RÉALISER CE TRAVAIL.

J'ADRESSE MES SINCÈRES REMERCIEMENTS À MR HASNAOUI OKKACHA,  
PROFESSEUR À L'UNIVERSITÉ DE SAÏDA D'AVOIR ACCEPTÉ DE PRÉSIDER  
LE JURY.

JE TIENS ÉGALEMENT MES VIFS REMERCIEMENTS À MR HACHEM KADA,  
MAITRE CONFÉRENCE À L'UNIVERSITÉ DE SAÏDA POUR L'HONNEUR QU'IL  
NOUS A FAIT EN ACCEPTANT D'EXAMINER CE MÉMOIRE.

À TOUTE PERSONNE QUI A PARTICIPÉ DE PRÈS OU DE LOIN, DIRECTEMENT  
OU INDIRECTEMENT, À LA RÉALISATION DE CE TRAVAIL EN  
PARTICULIER : OUAFI HAFID, TALATIZI MUSTAPHA ET MLOUKA

À TOUS MES AMIS.

À TOUS LES ÉTUDIANTS DE MASTER DE LA PROMOTION  
2016.

## **SOMMAIRE**

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I.1 Généralités sur les plantes médicinales</b> .....	<b>3</b>
<b>I.2 Propriétés pharmacologiques</b> .....	<b>3</b>
<b>I.2.1. Activité antibactérienne</b> .....	<b>3</b>
<b>I.2.2. Activité antioxydante</b> .....	<b>3</b>
<b>I.3 Les éléments actifs</b> .....	<b>4</b>
<b>I.3.1 Métabolites primaires</b> .....	<b>4</b>
<b>I.3.2. Métabolites secondaires</b> .....	<b>4</b>
<b>I.3.2.1. Les composés phénoliques</b> .....	<b>4</b>
<b>I.3.2.1.1 Les principales classes des composés phénoliques</b> .....	<b>6</b>
<b>I.3.2.1.1.a Acide phénolique</b> .....	<b>7</b>
<b>I.3.2.1.1.b. flavonoïdes</b> .....	<b>8</b>
<b>I.3.2.1.1.c. Les anthocyanes</b> .....	<b>10</b>
<b>I.3.2.1.1.d Coumarines</b> .....	<b>10</b>
<b>I.3.2.1.1.e. Tanins</b> .....	<b>11</b>
<b>I.3.2.1.1.e.1. Tanins hydrolysables</b> .....	<b>11</b>
<b>I.3.2.1.1.e.2.Tanins condensés (Proanthocyanidols)</b> .....	<b>11</b>
<b>I.3.2.1.1.f. Lignanes</b> .....	<b>12</b>
<b>I.3.2.1.1.g. Quinones</b> .....	<b>12</b>
<b>I.3.2.1.2 Effets biologiques des polyphénols</b> .....	<b>13</b>
<b>I.3.2.2 Les alcaloïdes</b> .....	<b>14</b>
<b>I.3.2.3 Les terpénoïdes et les stéroïdes</b> .....	<b>14</b>
<b>I.3.2.4. Les huiles essentielles</b> .....	<b>15</b>

I.3.2.4.1. Définition .....	15
I.3.2.4.2. Répartition et sites d'accumulation des HE dans les plantes .....	15
I.3.2.4.3. Composition chimique des huiles essentielles .....	15
I.3.2.4.3. a. Les composés aromatiques .....	15
I.3.2.4.3.b. Les composés terpéniques .....	15
I.3.2.4.3.c. Les composés d'origine diverses .....	16
I.3.2.4.4. Propriétés physico-chimique des huiles essentielles .....	16
I.3.2.4.5. Les techniques d'extraction des huiles essentielles .....	16
I.3.2.4.5.a Infusion .....	16
I.3.2.4.5.b Macération .....	16
I.3.2.4.5.c Décoction .....	17
I.3.2.4.5.d Distillation .....	17
I.3.2.4.5.d.1 Extraction par entraînement à la vapeur d'eau .....	17
I.3.2.4.5.d.2 Hydro-diffusion .....	18
I.3.2.4.5.d.3 Hydro-distillation .....	18
I.3.2.4.5.E.Extraction assistée par micro-onde .....	18
I.3.2.4.5.F Extraction par l'expression à froid .....	19
I.3.2.4.5.G Extraction par Ultrasons ou Sonication .....	19
I.3.2.4.5.H Extraction par solvants chimiques .....	
I.3.2.4.6. Toxicité des huiles essentielles.....	20
I.3.2.4.7. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles .....	20
I.3.2.4.8 La conservation des huiles essentielles .....	21
I.3.2.4.9. Les activités biologiques des huiles essentielles .....	21
I.3.2.4.9.a .Activités antimicrobienne .....	21
I.3.2.4.9.b. Activité antifongique .....	21
I.3.2.4.9.c. Activités anticancéreuse .....	21

I.3.2.4.9.d. activité antiparasitaire .....	21
I.3.2.4.9.e .Activité anti-inflammatoire .....	22
II.1 La plante étudiée ( <i>chamaerops humilis L</i> ) .....	23
II.2 Les noms vernaculaires .....	23
II.3 Habita .....	24
II.4 Description et aspect botanique de la plante .....	24
II.5 Classification botanique de la plante .....	26
II.6 Utilisation en médecine traditionnelle (phytothérapie) .....	26

### ***MATERIEL ET METHODE***

III.1 L'objectif de travail .....	27
III.2 Matériel végétale .....	28
III.3 Matériel microbien.....	29
III.3.1 Les souches bactériennes.....	29
III.3.2 Les souches de moisissures .....	30
III.3.3 Les souches de levure .....	30
III.4 Extraction des graines de ( <i>C.h</i> ) .....	31
III.4.1 Extraction par solvant .....	31
III.5 Tests phytochimiques .....	31
III.5.1 Préparation des extraits.....	31
III.5.1.1 Préparation de l'extrait éthanolique .....	31
III.5.1.2 Préparation de l'infusé aqueux.....	32
III.5.1.3 Préparation des extraits aqueux .....	32
III.5.1.4 Macération en milieu acide .....	32
III.6 Screening phytochimique .....	32
III.6.1 Les tannins .....	33

III.6.2 Les flavonoïdes .....	33
III.6.3 Les anthocyanes.....	33
III.6.4 Les coumarines .....	33
III.6.5 Les alcaloïdes .....	33
III.6.6 Stérols et triterpènes .....	33
III.6.7 Les composés réducteurs .....	34
III.6.8 L'amidon .....	34
III.7 Etude de l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait des graines de ( <i>C.h</i> ) sur les souches testées .....	34
III.7.1 Evaluation de l'activité antibactérienne .....	34
II.71.1 Technique de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par La méthode des micro-dilutions sur milieu liquide .....	34
III.7.1.2 Préparation de l'inoculum .....	34
III.7.1.2 a Préparation de pré culture .....	34
III.7.1.2 b Préparation de la suspension bactérienne .....	35
III.7.1.3Préparation de l'extrait méthanolique brut .....	35
III.71.4 Préparation de la solution mère .....	36
III.7.1.5 Préparation de la micro plaque.....	36
II.7.1.6 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) .....	37
III.7.2 Essais d'activités antifongiques .....	38
III.7.2.1 Sur les espèces de moisissures.....	38
III.7.2.1.1 Méthode de contact direct .....	38
III.7.2.2 Sur les Levures .....	39
III.7.2.2.1 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide .....	39
III.7.2.2.1.2 Préparation de l'inoculum .....	39
III.7.2.2.1.3 Préparation de la solution mère .....	40

III.7.2.2.1.4 Préparation de la microplaque .....	40
III.7.2.2.1.5 Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF) .....	40
III.8 Analyses mycotoxicologiques .....	41
III.8.1 Recherche des souches productrices d'aflatoxines .....	41
III.8.2 Test d'activité antiaflatoxinogénique de l'extrait des graines de <i>Chamaerops humilis</i> .....	41
III.8.3 Analyse chromatographique par C.C.M .....	41
III.8.3.1 Extraction des mycotoxines .....	41
III.8.3.2 Séparation chromatographique.....	43

## **RESULTA ET INTERPRETATION**

IV.1 Détermination du rendement en extrait sec .....	44
IV.2 Screening phytochimiques .....	44
IV.3 Etude de l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait des graines de ( <i>C.h</i> ) sur les souches testées .....	46
IV.3.1 Activité antibactérienne .....	46
IV.3.1.1 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode de micro-dilutions .....	46



IV.3.1.2 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	47
IV.3.2 Détermination de l'Activité antifongique.....	49
IV.3.2.1 Sur les espèces de moisissures.....	49
IV. 3.2.1.1 Méthode de contact direct.....	49
IV.3.2.1 .2 L'activité inhibitrice de l'extrait à 5µg /ml .....	49
IV.3.2.1.3 L'activité inhibitrice de l'extrait à 12, 25 µg /ml .....	49
IV.3.2.1.4 L'activité inhibitrice de l'extrait) à 25µg /ml.....	50
IV.3.2.1.5 L'activité inhibitrice de l'extrait) à 50 et 75 µg /ml.....	50
IV.3.2.2 Sur les Levures .....	51
IV.3.2.2.1 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et la concentration minimale fongicide (CMF) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide .....	51
IV.4 Résultats des analyses mycotoxicologiques.....	52
IV.4.1 Effet de l'extrait brut méthanolique des graines de (C.h) vis-à-vis le poids mycélien.....	52
IV.4.2 Test d'activité anti-aflatoxinogénique de l'extrait.....	52
<b>V. Discussion</b> .....	<b>53</b>
<b>VI. Conclusion</b>	<b>58</b>
<b>X .Référence bibliographique</b>	
<b>XI Annexe</b>	

## Liste de Tableaux

<b>Tableau 01:</b> Les principales classes des composés phénoliques.....	<b>6</b>
<b>Tableau 02:</b> principaux acides hydroxybenzoïques .....	<b>7</b>
<b>Tableau 03:</b> principaux acides hydroxycinnamiques.....	<b>7</b>
<b>Tableau 04 :</b> Principaux types de coumarines.....	<b>10</b>
<b>Tableau 05:</b> Activités biologiques de quelques composés phénoliques.....	<b>13</b>
<b>Tableau 06 :</b> Situation botanique de l'espèce étudiée.....	<b>26</b>
.	
<b>Tableau 07:</b> caractéristique du matériel végétal.....	<b>28</b>
.	
<b>Tableau 08 :</b> les différentes souches utilisées pour déterminer l'activité antimicrobienne de l'extrait des graines de ( <i>C.h</i> ).....	<b>29</b>
<b>Tableau 09 :</b> Liste des souches de moisissures testées.....	<b>30</b>
<b>Tableau 10:</b> Liste des levures testées.....	<b>30</b>

<b>Tableau 11</b> : Le screening phytochimique des graines de ( <i>C.h</i> ).....	<b>44</b>
<b>Tableau 12</b> : Résultat des CMI et CMB de l'extrait des graines de ( <i>C.h</i> ) vis-à-vis des souches bactériennes.....	<b>46</b>
<b>Tableau13</b> : Résultats de l'activité inhibitrice de l'extrait brut méthanolique des graine de ( <i>C.h</i> ). Sur les souches fongiques testées.....	<b>49</b>
<b>Tableau 14</b> : Résultat des CMI et CMB de l'extrait des graines de ( <i>C.h</i> ) vis-à-vis <i>Candida albicans</i> .....	<b>51</b>

## LISTE DE FIGURE

<b>Figure 01</b> : Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate.....	<b>5</b>
<b>Figure 02</b> : Structure générale des flavonoïdes.....	<b>8</b>

<b>Figure 03</b> : Les principales classes de flavonoïdes.....	<b>9</b>
<b>Figure 04</b> : Quelques structures d'anthocyanosides .....	<b>10</b>
<b>Figure 05</b> : Structure de base des tanins hydrolysables.....	<b>11</b>
<b>Figure 06</b> : Structure de base des tanins condensés.....	<b>11</b>
<b>Figure 07</b> : Structure et numération des atomes de carbone du phénylpropane.....	<b>12</b>
<b>Figure 08</b> : Quelques motifs quinoniques.....	<b>12</b>
<b>Figure 09</b> : Exemples de quelques structures alcaloïdiques.....	<b>14</b>
<b>Figure 10</b> : montage d'entraînement à la vapeur d'eau .....	<b>17</b>
<b>Figure 11</b> : montage d'hydro distillation.....	<b>18</b>
<b>Figure 12</b> : montage d'extraction assistée par micro-onde.....	<b>19</b>
<b>Figure 13</b> : le palmier nain ( <i>chamaerops humilis L</i> ) .....	<b>23</b>
<b>Figure 14</b> : Aire de <i>Chamaerops humilis</i> .....	<b>24</b>
<b>Figure 15</b> : (A) feuille, , (b) fleurs, (C) fruit.....	<b>25</b>

<b>Figure 16:</b> (A) : les fruits, (B) : les graines, (C) : leurs broyat .....	<b>28</b>
<b>Figure 17:</b> (A) préparation de l'extrait méthanolique ; (B) filtration d'extrait.....	<b>31</b>
<b>Figure 18 :</b> (A) préparation de l'infusé aqueux ; (B) filtration d'extrait.....	<b>32</b>
<b>Figure 19 :</b> l'extrait méthanolique brut.....	<b>35</b>
<b>Figure 20 :</b> solution mère a testé.....	<b>36</b>
<b>Figure 21 :</b> préparation de la micro plaque (la méthode des micro- dilutions sue milieu liquide.....	<b>37</b>
<b>Figure 22 :</b> L'inoculation des boites.....	<b>38</b>
<b>Figure 23 :</b> solution mère a testé.....	<b>40</b>
<b>Figure 24 :</b> Filtration du milieu YESaprès14 jours d'incubation .....	<b>41</b>
<b>Figure 25 :</b> Méthode d'extraction des mycotoxines.....	<b>42</b>
<b>Figure 26 :</b> Cuve chromatographique CCM.....	<b>43</b>
<b>Figure 27 :</b> Quelques tests du screening phytochimique (A) : Les tanins ; (b) : Les flavonoïdes ;(c) : Les Anthocyanes ; (d) : Alcaloides ; (e) : Les composés réducteurs (f) : Stérois et triterpènes.....	<b>45</b>
<b>Figure 28 :</b> la concentration minimale bactéricide.....	<b>47</b>

<b>Figure 29</b> : l'effet d'antibactérienne del'extrait brute des graine de ( <i>C.h</i> ) sur (A) : <i>Bacillus subtilis</i> ,(B) : <i>Enterococcus faecalis</i> .,(C), <i>Pasteurella multocida</i> ,(D) : <i>Bacillus cereus</i> ,(E) : <i>Listeria monocytogenes</i> ,(F): <i>Enterobacter cloacae</i> .....	<b>48</b>
<b>Figure 30</b> : L'indice antifongique de l'extrait brut méthanolique des graine de ( <i>C.h</i> ).....	<b>50</b>
<b>Figure 31</b> : l'effet d'antifongique de l'extrait brute des graines de ( <i>C.h</i> ) sur (A) : <i>Candida albicans</i> ATCC26790, (B) : <i>Candida albicans</i> ATCC10231.....	<b>51</b>
<b>Figure 32</b> : L'effet de l'extrait brut méthanolique des graines de fruit de <i>Chamaerops humilis</i> sur les poids mycélienne (g).....	<b>52</b>
<b>Figure(33)</b> : L'effet antiaflatoxinogénique de l'extraite des graines de ( <i>C.h</i> ) par CCM sous UV (Détection d'AFB1).....	<b>52</b>

### Liste des abréviations

**A:** *Aspergillus*

**B:** *Bacillus*

**BMH** : Bouillon Muëller-Hinton

**BN** : Bouillant nutritive

**C.h** : *chamaerops humilis*

**C**: *Candida*

**CCM** : Chromatographie sur couche Mince

**CMB** : concentration minimale bactéricide

**CMI**: concentration minimale inhibitrice

**CP** : composé phénolique

**DMSO** : Diméthyl Sulfoxyde

**E**: *Escherichia*

**GN**: Gélose nutritive

**HE**: huiles essentielles

**mg** : milligramme

**ml** : millilitre

**R**: *Rhizopus*

**UV**: Ultra Violet

**YES**: Yeast Extract Sucrose

**%** : Poncentage

**µg** : Microgramme

**µl** : Microlitre

## Résumé

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs dotés d'activité antimicrobienne.

*Chamaerops humilis* L. est une plante médicinale appartient à la famille des Acéracées, originaire des régions bordant la Méditerranée occidentale, occupe une aire de répartition très importante en Algérie, connue sous le nom de palmier nain ou palmier doum.

Dans ce contexte, le but notre travail a été d'évaluer l'extrait des graines de la plante selon plusieurs approches : selon une étude phytochimique, une étude du pouvoir antibactérien, antifongique et antitoxinogénique.

De ce fait, les tests phytochimiques ont permis de détecter les différentes familles de composé chimique tel que les tanins, flavonoïdes, anthocyanes, comarines, stéroïdes et triterpènes et composés réducteurs.

L'extrait brut méthanolique a été obtenu par macération avec un rendement de 2,7% puis testé vis-à-vis dix souches bactériennes de références et certaines moisissures appartenant aux genres : *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Rhizopus* ainsi que sur des levures du genre *Candida*.

L'analyse du pouvoir antimicrobien vis-à-vis les dix espèces bactériennes et les trois espèces de levure (*C. albicans*), a montré une activité remarquable de cet extrait.

De plus, l'extrait a été rendu efficace d'une part vis-à-vis la croissance des souches de moisissures testées avec des proportions variables vis-à-vis les souches de : *Cladosporium spp* 85,45% *Rhizopus stolonifer* 58,63%, *Aspergillus niger* 40,38% et *Aspergillus flavus* 81,25% à une concentration de 75µg/ml

L'effet de l'extrait brut méthanolique sur le poids mycélien a prouvé une inhibition considérable vis-à-vis *A.flavus*.

Par ailleurs, les tests mycotoxigéniques n'ont décelé aucun effet inhibiteur de l'extrait sur la sécrétion des mycotoxines (AFG et AFB) par la plaque CCM.

#### **Mots clés :**

*Chamaerops humilis* L, Extrait brut méthanolique, Activité antifongique, antibactérien, antitoxinogénique. Mycotoxines.

#### **Abstract :**



Medicinal plants represent an inexhaustible source of substances and compounds natural bioactive equipped with antimicrobial activity.

*Chamaerops humilis l.* is a medicinal plant belongs to the family of the Acéracée, native of the regions bordering the Western Mediterranean, occupies a very important range in Algeria, known as saw palmetto or doum Palm.

In this context, the aim of our work was rated the extract from the seeds of the plant according to several approaches: a phytochemical, a study of the antibacterial power study, antifungal and antitoxinogenique.

As such, the phytochemical tests allowed to detect the different families of chemical compound such as tannins, flavonoids, anthocyanins, comarines, sterols and triterpnes and reducing compounds.

The methanolic crude extract was obtained by maceration with a yield of 2.7% and then tested against 10 strains of references and some moulds belonging to the genera: *Aspergillus*, *Cladosporium*, and *Rhizopus* and yeast of the genus *Candida*.

The analysis of antimicrobial power vis-a-vis the 10 bacterial species and three yeast species (*c. albicans*), has shown a remarkable activity of this extract.

Moreover, the extract was made effective on the one hand towards the growth of strains of fungi tested with varying proportions with regard strains from: *Cladosporium spp.* 85.45% *Rhizopus stolonifer* 58.63%, *Aspergillus niger* 40.38% and *Aspergillus flavus* 81, 25% at a 75µg/ml concentration

The effect of the methanolic crude extract on the Mycelial weight showed inhibition considerable towards *A.flavus*.

Furthermore, the test mycotoxicogeniques found no inhibitory effect of the extract on the secretion of mycotoxins (AFG and AFB) by the TLC plate.

**Key words:**

*Chamaerops humilis L.*, extract methanolic crude, antifungal, antibacterial activity, antitoxinogenique. Mycotoxins.

ملخص

تمثل النباتات الطبية مصدر دائم للمواد لطبيعية والمركبات النشطة البيولوجية، يعرف نبات (*chamaerops humilis*) بانه نبتة طبيعية تنتمي الى عائلة *Arecaceae* تنتشر هذه النبتة والمعروفة باسم النخيل القزم او الدوم على المناطق المطلة على البحر الابيض المتوسط والتي تشمل نطاق واسع في الجزائر .

وفي هذا السياق يهدف عملنا الى دراسة مستخلص بذور هذه النبتة وفق عدة طرق :

دراسة كيميائية نباتية ،كمضاد للبكتيريا ، الاعفان وافراز السموم العفنية .

قد كشفت تجارب الكيمياء النباتية على تواجد عائلات مختلفة من مركبات كيميائية مثل:

(Les tanins, flavonoïdes, anthocyanes, comarines, stérols et triterpnes et composés réducteurs).

المستخلص الخام الذي تم استخلاصه بتقنية النقع بمرودود 2.7% تم اختبار قدرته على عشر سلالات بكتيرية وبعض الاعفان من اجناس (*Rhizopus* و *Aspergillus*, *Cladosporium*) وخمائر من نوع: *Candida*.

تم اثبات فعالية هذا المستخلص ضد نمو عشر سلالات بكتيرية وثلاث خمائر من نوع (*C. albicans*) بالإضافة الى هذا فان فعالية المستخلص ضد تطور الاعفان قد اثبتت تثبيط معتبر بنسب مختلفة 85.45% بالنسبة *Cladosporium spp* ، 58.53% ، *Rhizopus stolonifer* ، 40,38% ، *Aspergillus niger* و 81,25% بالنسبة الى *Aspergillus flavus* في تركيز 75µg/ml .

اظهر المستخلص الميثانولي الخام فعالية معتبرة ضد تطور حجم الغزل الفطري بالنسبة الى *A.flavus* ، من جانب اخر فان التحاليل الميكوتوكسينوجينية باستعمال تقنية الكروماتوغرافي الورقية لم تبين اي تطبيق على مستوى افراز التوكسينات .

**الكلمات المفتاحية:** *chamaerops humilis* ،مستخلص خام ميثانولي ،دراسة كيمياء نباتية ، مضاد الاعفان ، مضاد البكتيريا ، افراز التوكسينات العفنية .

## Introduction :

Depuis les temps les plus reculés, l'homme a eu recours aux plantes non seulement pour se nourrir, se vêtir, se parfumer, se chauffer,.. mais également pour se soigner (**Madaoui et al, 2014**),

l'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques, est rapportée dans les littératures antiques arabe, chinoise, égyptienne, hindou,... etc Le pouvoir thérapeutique de ces plantes serait dû en totalité et/ou en partie aux essences qu'elles contiennent (**Benmeddour et al., 2015**).

En médecines traditionnelles, le recours à l'utilisation des plantes et/ou de leurs extraits est une approche biologique sans effets négatifs sur l'écologie (**Soković et Van Griensven, 2006**).

Spécialement à base des plantes qui sont la principale source de médicaments et d'aliments où ils jouent un rôle essentiel dans le maintien de la santé humaine. La valeur médicinale de ces plantes se trouve dans certaines substances chimiques bioactives, essentiellement des métabolites secondaires, qui possèdent une action physiologique sur le corps humain: alcaloïdes, polyphénols et terpénoïdes (**Kardong et al., 2013**).

De nombreux travaux ont démontré que les métabolites secondaires, présentent un potentiel important en tant qu'agents antibactériens, antifongiques, antioxydants, etc. (**Guy et al., 2014**).

L'Algérie regorgeant d'une richesse floristique importante. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques (**Ouibrahim., 2015**). Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve l'espèce de *Chamaerops humilis L.*

Le palmier nain de son nom scientifique *Chamaerops humilis L.* est une plante médicinale qui appartient à la famille des Acéracées (**Khoudali et al., 2014**), qui occupe une aire de répartition très importante en Algérie, elle est utilisée dans la médecine traditionnelle. Les enquêtes menées sur le terrain auprès des populations et les tradi-praticiens montrent l'ampleur qu'occupe cette espèce dans le domaine de la phytothérapie dans la société Algérienne. (**Benmehdi et al., 2014**).

Dans ce contexte, le présent travail a pour objectif de :

- L'étude phytochimique de l'extrait des graines de *Chamaerops humilis*.
- Etude de l'effet antibactérien et antifongique de l'extrait brut des graines de (*C.h*) par la méthode de :
  - micro-dilutions sur milieu liquide (microplaque).
  - contact direct en milieu de culture.

- Etudié l'effet anti-aflatoxinogène de l'extrait brut méthanolique de (*C.h*) sur la souche fongique d'*Aspergillus flavus* par la méthode chromatographique sur couche mince.

## **I.1 Généralités sur les plantes médicinales :**

Depuis les temps les plus reculés, l'homme a eu recours aux plantes non seulement pour se nourrir, se vêtir, se parfumer, se chauffer,.. mais également pour se soigner (**Madaoui et al, 2014**), donc toute plante dite "médicinale" présente des substances ou des précurseurs qui peuvent être utilisés à des fins thérapeutiques. Cette drogue peut être soit toute la plante, soit une partie de la plante (feuille, racine, bouton floral.....ect), ou des extraits (**Catier et Roux, 2007**).

En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés: les métabolites secondaires. Ces derniers sont par la suite accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante, Ces substances constituent une source de molécules bioactives, avec des propriétés physico-chimiques diverses et multiples vertus biologiques (antimicrobien, antioxydant, anti-tumorale et anti-inflammatoire...),(**Ouirahim ;2015**).

## **I.2 Propriétés pharmacologiques :**

### **I.2.1. Activité antibactérienne :**

Les plantes possèdent un système de défense naturelle très efficace, basé sur la biodiversité de leurs métabolites secondaires (**chikhi ; 2014**). Cette diversité, des groupes structuraux et fonctionnels, permet de se protéger efficacement contre de nombreux pathogènes tels que les bactéries, les champignons et les virus. Les plantes synthétisent, de manière constitutive ou induite, une multitude de molécules antimicrobiennes (**Jones et Dangl, 2006 ; Gibbons et al., 2008**), Certains extraits et huiles essentielles des plantes se sont montrés efficaces dans l'inhibition de la croissance d'une grande variété de souches bactériennes (**chikhi ; 2014**).

### **I.2.2. Activité antioxydante :**

Les antioxydants sont des composés (naturels ou synthétiques), qui permettent de ralentir le phénomène d'oxydation et protéger le système cellulaire contre les effets des processus potentiellement nocifs qui causent l'oxydation excessive, l'utilisation des antioxydants synthétiques dans les industries agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique est suspectée à long terme d'effets tératogènes, mutagènes et cancérigènes (**Chavéron, 1999**). Plusieurs limites et restrictions ont été mises en place concernant leur utilisation, leur substitution par des antioxydants naturels s'avère primordial. Les plantes sont une source des antioxydants naturels. Ces derniers sont apparus comme alternative aux antioxydants synthétiques, et ils sont aujourd'hui généralement préférés par les consommateurs (**Elkalamouni, 2010**).

### I.3 Les éléments actifs :

Les plantes synthétisent une gamme très vaste de composés organiques qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme. (Hartmann, 2007), La valeur médicinale de ces plantes se trouve dans certaines substances chimiques bioactives, essentiellement des métabolites secondaires, qui possèdent une action physiologique sur le corps humain (Kardong et al., 2013).

#### I.3.1 Métabolites primaires :

Les métabolites primaires sont les composés qui ont des rôles essentiels liés à la photosynthèse, la respiration et la croissance et le développement. Il s'agit notamment des phytostérols, des lipides acylés, des nucléotides, des acides aminés et les acides organiques. (Rocha et al ; 2010).

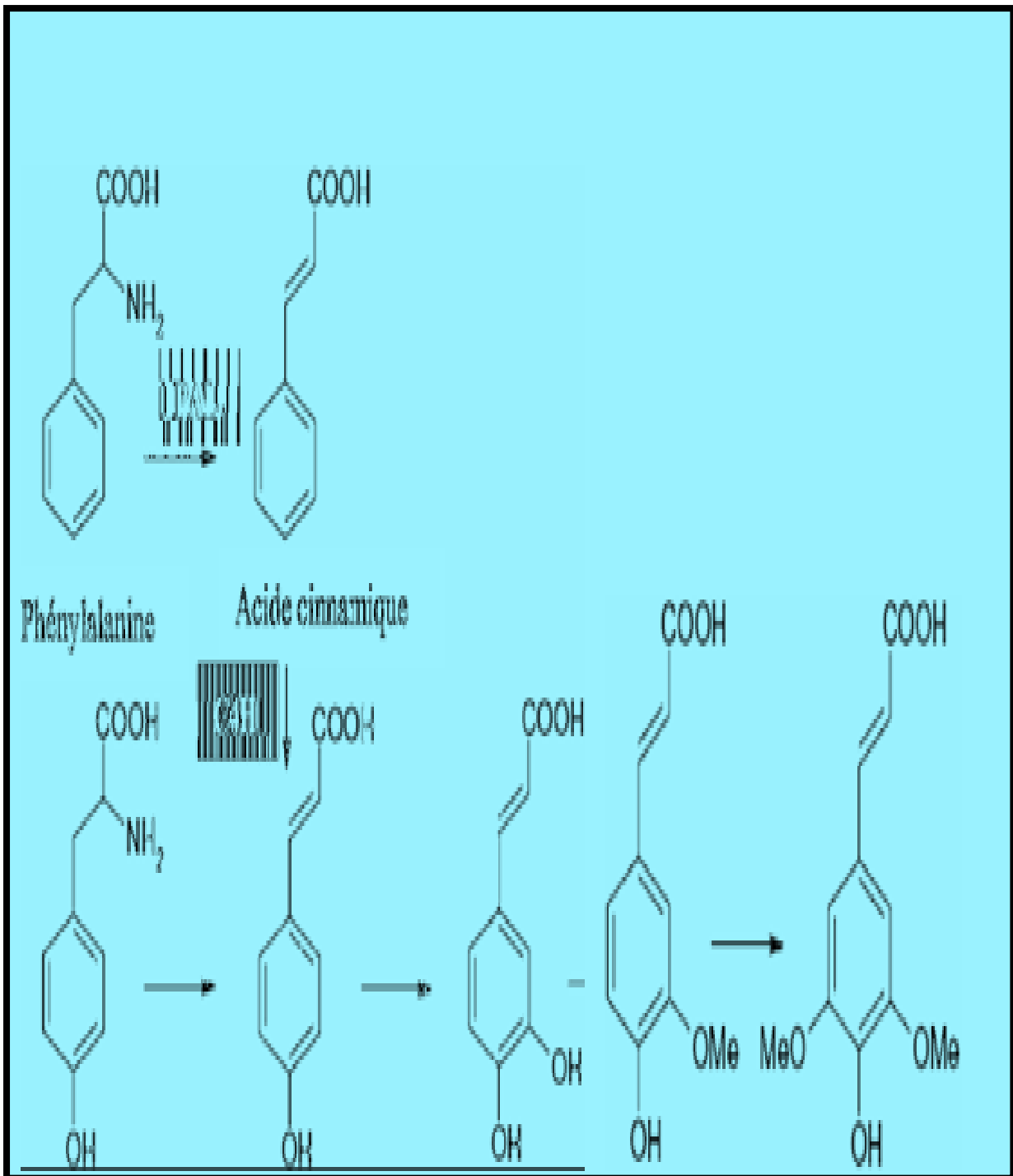
#### I.3.2. Métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles: Les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes (Abderrazak et Joël., 2007).

##### I.3.2.1. Les composés phénoliques :

Les polyphénols ou composés phénoliques (CP) sont des molécules du métabolisme secondaire spécifique du règne végétal (Guy et al., 2014), Ils regroupent un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisé en une dizaine de classes chimiques ont été isolées et identifiées (TAO et LAMBERT, 2014). Ils ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles qui peuvent être libres ou engagées, avec ou non d'autres fonctions (alcoolique (OH), carboxylique (COOH),... (Macheix et al., 2005). Leur répartition tant qualitative que quantitative dans la plante varie selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stades de développement (GRESELE et al., 2011). Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagenèse:

- La voie la plus courante est celle qui, via le shikimate (l'acide shikimique) (figure01), conduit des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acides benzoïques, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines, etc.
- L'autre voie, par de l'acétate et conduit à des poly- $\beta$ -cétosters de longueur variable « les polyacétates » qui engendrent, par cyclisation (réaction de Claisen ou condensation aldolique), des composés souvent polycycliques : chromones, isocoumarines, orcinols, depsides, depsidones, xanthonés, quinones, etc. (Bruneton, 2009).



Tyrosine      Acide p-coumarique      Acide caféique      Acide férulique      Acide sinapique

**Figure (01):** Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate (Crozier et al., 2006). PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase.

### I.3.2.1.1 Les principales classes des composés phénoliques :

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (Tableau 01). Ces molécules sont généralement trouvés conjuguées aux sucres et les acides organiques (Crozier et al., 2006).

**Tableau (01): Les principales classes des composés phénoliques (Harborne., 1989 ; Machelx et al., 2006 ; Crozier et al., 2006).**

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemples)
C6	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques	Acide caféique, Acide férulique	Pomme de terre, pomme
	Coumarines		
C6-C4	Naphtoquinones	Juglone	Citrus Noix
C6-C2-C6	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C6-C3-C6	Flavonoïdes Flavonols Anthocyanes Flavanols Flavanones	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pèlargonidine Catéchine, épicatechine Naringénine	Fruits, légumes, fleurs Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus
	Isoflavonoïdes	Daidzéine	
(C6-C2) <sub>2</sub>	Lignanes	Pinorésinol	Soja, pois Pin



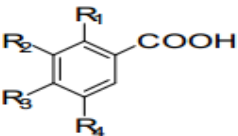
(C6-C3) n	Lignines	Bois, noyau des fruits
(C15)	Tannins	Raisin rouge, kaki

### I.3.2.1.1.a Acide phénolique :

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (**Bruneton, 2009**).

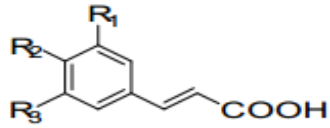
Les acides phénoliques sont divisés en deux classes: les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. Les acides hydroxycinnamiques (tableau 03) sont plus fréquents que les acides hydroxybenzoïques (tableau 02) et comprennent essentiellement l'acide p-coumarique, caféique, férulique et sinapique (**Pandey et Rizvi, 2009**).

**Tableau (02):** principaux acides hydroxybenzoïques (**Sarni et al ., 2006**)

structure	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Acide phénolique
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide phydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

**Tableau (03):** principaux acides hydroxycinnamiques (**Sarni et al ., 2006**)

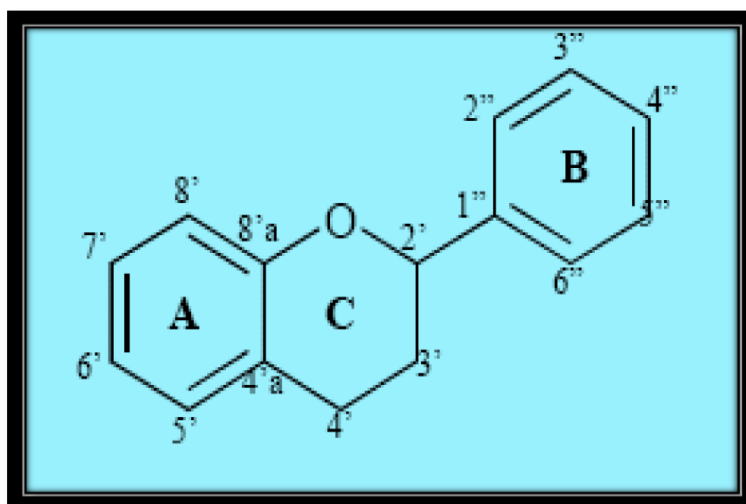


Structure	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Acide phénolique
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide cafféique
	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Acide fêrulique
	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Acide sinapique

### I.3.2.1.1.b. flavonoïdes :

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines et d'autres parties de la plante (**Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006**). Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques (**Ghedira, 2005**). Il comprend à lui seul plus de 6000 molécules regroupées en sous-classes (**Andersen et Markham, 2006 ; Machelx et al., 2006.**)

La structure de base commune à ce groupe de polyphénols, est le diphenylpropane : c'est la présence de deux cycles aromatiques (A et B) liés par une chaîne de 3 carbones, formant un hétérocycle oxygéné (C) (**YAO et al, 2010**) (**fig00**). Il reste des milliers d'autres composés à découvrir puisque le squelette des flavonoïdes peut être substitué par différents groupements comme des groupements hydroxy, méthoxy, méthyl, benzyl et isoprényl (**GRESELE et al., 2011**)



**Figure (02) : Structure générale des flavonoïdes (GRESELE et al., 2011).**

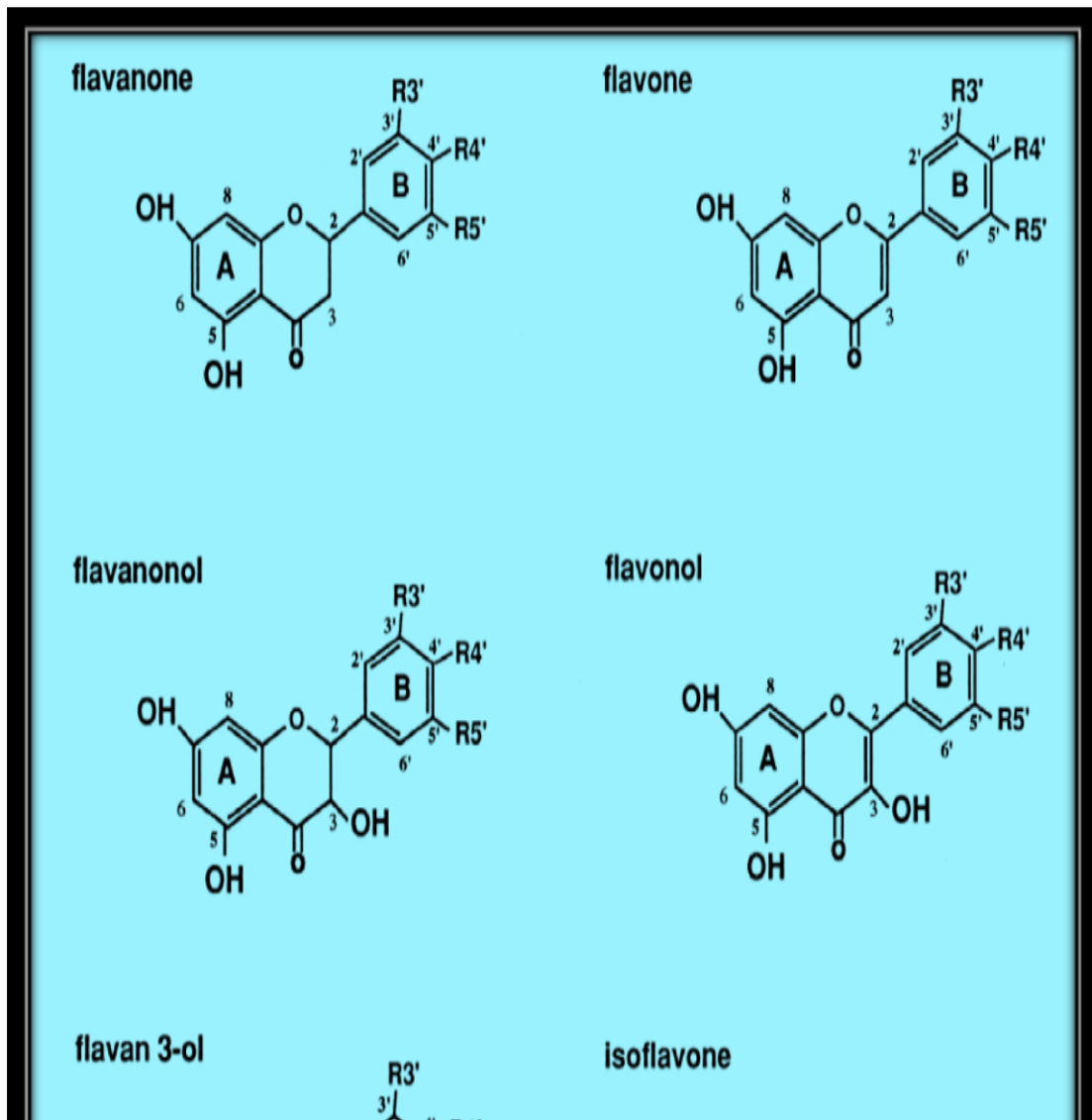
Les flavonoïdes sont subdivisés en sous-classe selon les variations autour du squelette chimique de base en C15 portant principalement sur trois points :

-Le degré d'hydroxylation des différents cycles ;

-le niveau de méthylation (groupements O-CH<sub>3</sub> à la place des seules fonctions phénoliques ;

-le niveau de glycosylation. En dehors, de quelques exceptions comme le groupe des flavanes, les flavonoïdes des végétaux sont liés à des sucres. D'une manière générale, l'ose est lié à la molécule phénolique par l'intermédiaire d'une liaison glycosidique C-O-C dégradable par hydrolyse acide à chaud, ou de type C-C beaucoup plus résistante (Bendini et al, 2007).

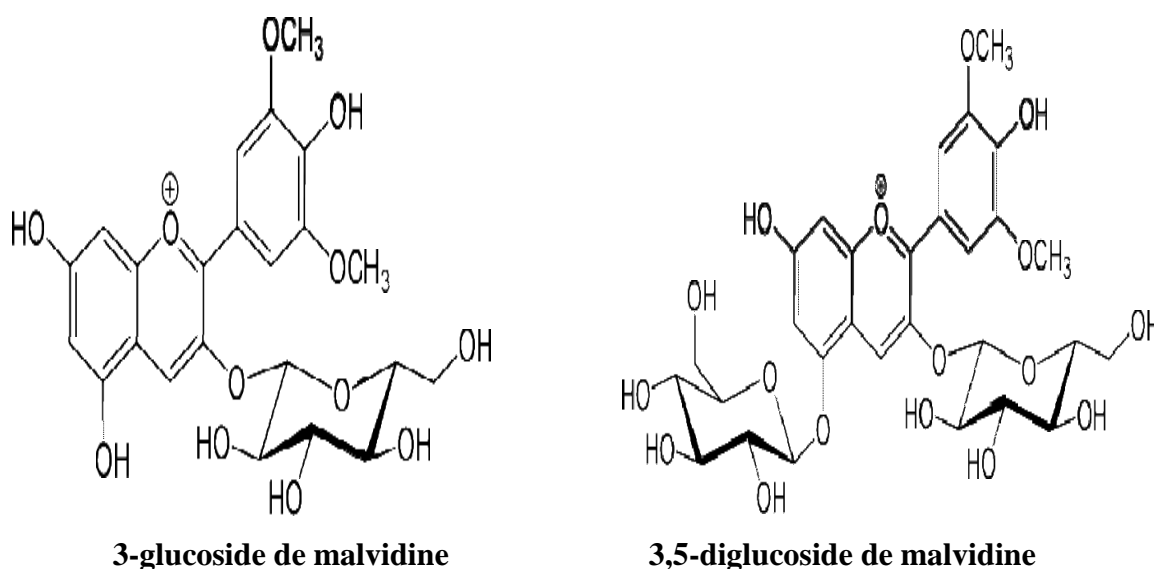
On distingue alors (flavones, isoflavones, flavonols et flavanones), les flavanols, les proanthocyanidines, les anthocyanes ainsi que des composés plus minoritaires, les chalcones et dihydrochalcones (CROZIER et al, 2009) (figure 03).



**Figure (03) :** Les principales classes de flavonoïdes (Crozier et al, 2009).

### I.3.2.1.1.c. Les anthocyanes :

Les anthocyanes ou pigments anthocyaniques sont des composés hydrosolubles, de teinte rouge, violette ou bleue, qui colorent les fleurs, les fruits et parfois les feuilles. Les anthocyanes sont présents dans la nature uniquement sous forme d'hétérosides appelés anthocyanosides. Ces pigments sont très répandus dans le règne végétal et proche des flavonoïdes sur le plan de l'origine, de la structure et des propriétés pharmacologiques (Cazier et Roux, 2007). Leur structure de base (Figure 04) est caractérisée par un noyau « flavon » généralement glucosylé en position C3 (Collin et Crouzet, 2011).

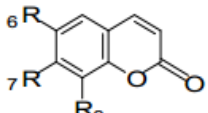


**Figure (04) :** Quelques structures d'anthocyanosides (Collin et Crouzet, 2011)

### I.3.2.1.1.d Coumarines :

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique (Macheix .,2005).

**Tableau (04) :** Principaux types de coumarines (Macheix .,2005)

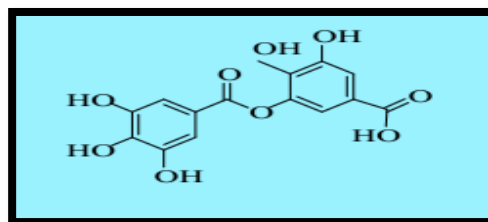
structure	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	Acide phénolique
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Scopolétole
	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	Fraxétole
	H	OH	OH	Daphnétole

### I.3.2.1.1.e. Tanins :

Les tanins sont des substances polyphénoliques polymériques de structures variées, solubles dans l'eau de masse moléculaire comprise entre 500 et 2000D , ayant en commun la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les protéines (Catier et Roux, 2007). Les tanins sont caractérisés par une saveur astringente et sont retrouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (YAO et al., 2004 et 2010).

On distingue habituellement, chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénique :

**I.3.2.1.1.e.1. Tanins hydrolysables :** Ce sont des oligo- ou des polyesters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable de molécules d'acide-phénol. Le sucre est très généralement le glucose. L'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, soit l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP) et ses dérivés d'oxydation (déhydrohexahydroxydiphénique = DHHDP ; acide chébulique) dans le cas des tanins classiquement (mais improprement) dénommés tanins ellagiques (Bruneton, 2009).



**Figure (05) :** Structure de base des tanins hydrolysables (Hartzfeld et al . , 2002).

### I.3.2.1.1.e.2.Tanins condensés (Proanthocyanidols) :

Les tanins condensés ce sont des oligomères ou polymères flavanolique Ils sont constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone , le plus souvent épicatechine et catéchine (**Bruneton, 2009**). Les tanins condensés sont des molécules hydrolysables, leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre (**Wilfred et Ralph, 2006**)

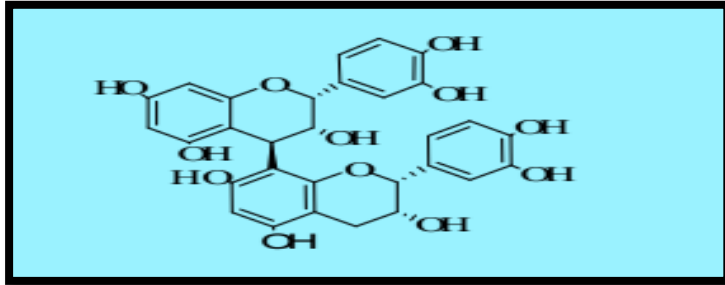


Figure (06) : Structure de base des tanins condensés (**Peronny, 2005**).

**I.3.2.1.1.f. Lignanes :**

Les lignanes résultent de la condensation d'unités phénylpropaniques (Figure 07). Quatre groupes peuvent être considérés : les lignanes (liaison entre deux carbones des chaînes latérales de deux unités dérivées du phénylpropane), les néolignanes (un seul carbone est en jeu), les "oligomères", (condensation de 2 à 5 unités phénylpropaniques) et enfin les norlignanes avec un squelette en C17. (**Krief, 2003**).

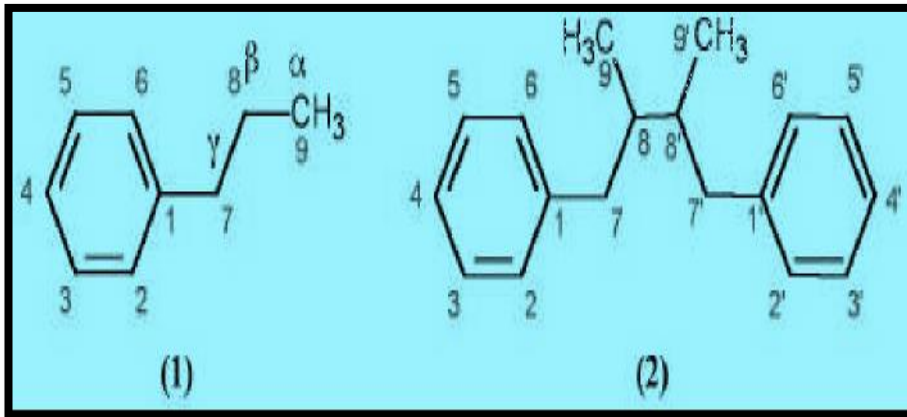
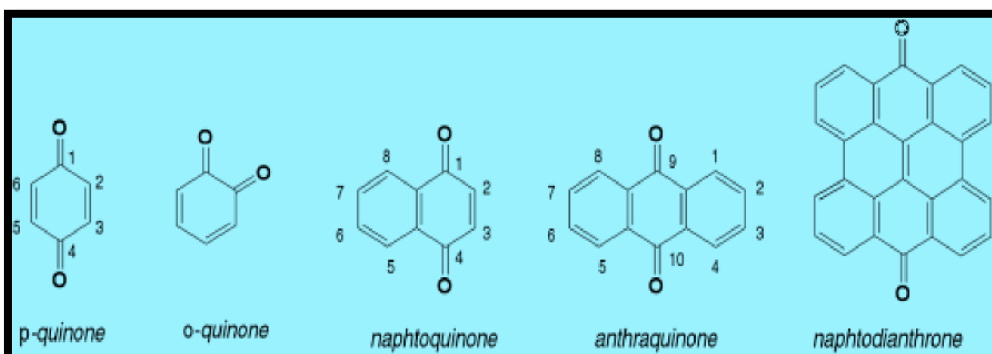


Figure (07) : Structure et numération des atomes de carbone du phénylpropane (1) et deslignanes (2) (liaison -<sup>8</sup> ou 8,8') (**Moss, 2000**)

**I.3.2.1.1.g. Quinones :**

sont des



Ce

composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques. Elles sont caractérisées par un motif 1,4-dicéto cyclohexa-2,5-diéniq (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa-3,5-diéniq (ortho-quinones) (figure09) **(Bruneton, 2009)**. 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)**.

**Figure (08) :** Quelques motifs quinoniques (Bruneton, 2009).

#### **I.3.2.1.2 Effets biologiques des polyphénols :**

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en général et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques **(Ksourl et al, 2007)**. 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 **(Bounatirou et al., 2007)**. Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés oxydo réduction en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes **(Puido et al, 2000 ., Nijveldt et al., 2001)**.

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 **(GomezCaravaca et al., 2006)**.

Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire **(Leong et Shul, 2002)**. Le tableau 05 récapitule les effets biologiques des polyphénols rapportés par la littérature.

**Tableau (05):** Activités biologiques de quelques composés phénoliques **(GRESELE et al, 2011)**.

Composés

Activité biologique

## phénoliques

Acide Phénolique	Antifongique, anti oxydante ,Antibactérienne
Tanins	Effet stabilisant sur le collagène, antioxydant, Anti diarrhéique, effet antiseptique, vasoconstricteur. Antitumorale, anticarcinogène, anti inflammatoire,
Flavonoïdes	antioxydante, antiallergique, antiulcé antivirale, antimicrobienne, hypotenseur, diurétique.
Coumarines	Anticoagulante, antioxydante, prote vasculaire et antioedémateuse.
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux, anti oxydant
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène, antioxydar antitumoraux, antifongiques et inflammatoires.
Tannins galliques et Catéchiqes	Antioxydantes
Lignanes	Anti-inflammatoires, analgésiques

**I.3.2.2 Les alcaloïdes :**

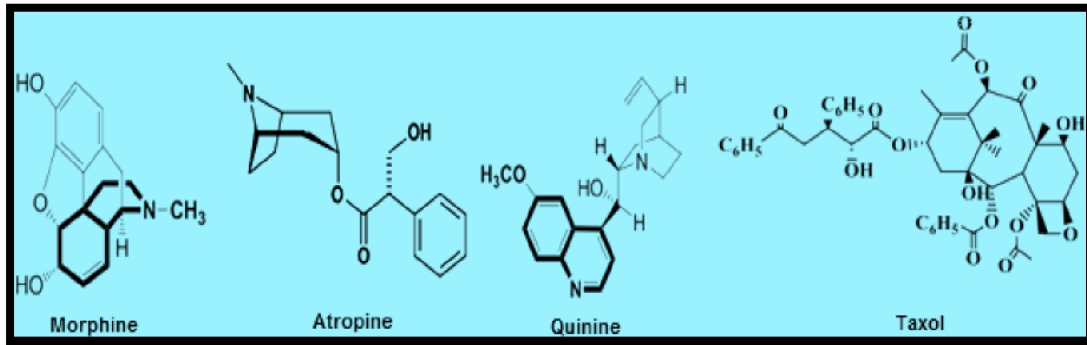
La définition admise des alcaloïdes est celle donnée par Winterstein et Trier en 1910 : « Un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose » (**Zenk et Juenger, 2007**). ils constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 différentes structures (**Stöckigt et al., 2002**).

On distingue généralement :

- Les alcaloïdes vrais, qui sont d'un point de vue de la biosynthèse dérivés d'acides aminés, et qui présentent au moins un hétérocycle ;
- Les proto- alcaloïdes, qui dérivent d'acides aminés, dont l'azote n'est pas inclus dans le système hétérocyclique ;
- Les pseudo- alcaloïdes, qui présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés.



Bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques (comme la strychnine ou l'aconitine), certains sont employés dans la médecine pour leurs propriétés analgésiques (comme la morphine, la codéine (**Badiaga, 2011**))



**Figure (09) :** Exemples de quelques structures alcaloïdiques (**Badiaga, 2011**)

### I.3.2.3 Les terpénoïdes et les stéroïdes :

Elaborés à partir des mêmes précurseurs, les terpénoïdes et les stéroïdes constituent sans doute le plus vaste ensemble connu de métabolites secondaires des végétaux (**Bruneton, 2009**). Les terpénoïdes sont des substances généralement lipophiles, formés par la réunion d'unités pyrophosphate isopenténoïdes à cinq carbones provenant de la voie de l'acide mévalonique (**Judd et al., 2002 ; Hopkins, 2003**). La famille des terpènes comprend des hormones (gibbérellines et acide abscissique), des pigments caroténoïdes (carotène et xanthophylle), des stérols (ex. ergostérol, sitostérol, cholestérol), des dérivés de stérols (ex. des hétérosides digitaliques), le latex (qui est à la base du caoutchouc naturel) ainsi qu'une grande partie des huiles essentielles qui confèrent aux plantes leur parfum ou leur goût (**Hopkins, 2003**).

### I.3.2.4. Les huiles essentielles :

#### I.3.2.4.1. Définition :

L'huile essentielle (HE) est un métabolite secondaire synthétisé par les plantes. Elle est généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première botaniquement définie, et le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition (**Pierron, 2014**), Soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage (**Bardeau, 2009**).

#### I.3.2.4.2. Répartition et sites d'accumulation des HE dans les plantes :

Les huiles essentielles n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Parmi les 1 500 000 espèces végétales, 10% seulement sont dites « aromatiques », c'est-à-dire qu'elles synthétisent et sécrètent des infimes quantités d'essence aromatique (**Degryse et al., 2008**). Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Ensuite, elles sont stockées dans des cellules dites cellules à huiles essentielles, dans des poils sécrétrices, dans des poches sécrétrices ou

dans des canaux sécréteurs (**Boz et al., 2009**). Elles sont extraites du matériel végétal de divers organes : **Racine** (Vétiver) ; **bulbe** (Ail) ; **rhizome**(Gingembre), **Tige** (Petits grains) ; **bois** (Bois de Rose, Cèdre, Santal) ; **écorce** (Cannelle) ; **Feuille** (Citronnelle, Eucalyptus) ; **bourgeon** (Pin) ; **sève** (Encens, Myrrhe) ; **Fleur** (Ylangylang, Rose, Lavande) ; **fruit** (Orange); **graine** (Muscade, Anis) (**Pibiri, 2005**).

#### **I.3.2.4.3. Composition chimique des huiles essentielles :**

La composition chimique des HE est très complexe, elle contient plus de 100 substances chimiques différentes avec 10 à 20 atomes de carbone qui peuvent être sous-divisées en diverses familles chimiques, il existe trois principales classe chimiques des HE : les composés terpéniques, les composés aromatiques dérivés de phénylpropane, et les composés d'origines diverses (**Charpentier, Hamon-Lorléach et al., 2008**).

##### **I.3.2.4.3. a. Les composés aromatiques :**

Les dérivés du phénylpropane sont moins abondants que les terpénoïdes. Cette classe comprend des composés odorants comme la vanilline l'eugénol, l'anéthole, l'estragole, thymol, menthol, carvone, carotol et bien d'autres. Ils sont plus fréquents dans les HES d'Apiaceae (anis, fenouil, cannelle, basilic) (**Hellal., 2011**).

##### **I.3.2.4.3.b. Les composés terpéniques :**

Les terpénoïdes (les terpènes), existent chez toutes les plantes et représentent la plus vaste catégorie de métabolites secondaires, avec plus de 22 000 composés décrits. Sont largement rencontrés dans les H.Es. Bien que les hydrocarbures terpéniques aient des structures très diverses, ils sont formés d'un multiple pair ou impair d'unités de 2-méthylbuta-1,3-diène ou appelé encore isoprène. On distingue ainsi selon le nombre de carbone constituant les molécules de ce groupe: les mono terpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20), les triterpènes,(C30) et les tétraterpènes (C40). (**Ferhat., 2010**). A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales (**Florence, 2012**).

##### **I.3.2.4.3.c. Les composés d'origine diverses :**

Ils existe un nombre non négligeable de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles issue soit de la dégradation des terpènes non volatils qui proviennent de l'auto-oxydation par exemple des carotènes ou des acides gras comme les acides linoléique et  $\alpha$ -linoléique en (3-cis-hexanoldecenal B-inone) (**Piochon, 2008**).

#### **I.3.2.4.4. Propriétés physico-chimique des huiles essentielles :**

les (HE) sont incolores ou jaune pâle à l'état liquide et à température ordinaire, elles sont volatiles et odorantes. Leur densité est le plus souvent inférieure à un (1); à l'exception de quelques cas. Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les huiles végétales dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques. Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation (**Ayaidia, 2011**).

### **I.3.2.4.5. Les techniques d'extraction des huiles essentielles**

L'extraction veut dire la séparation des parties actives de tissus végétaux ou animaux des composants inactifs ou inertes à l'aide de solvants sélectifs. Les produits ainsi obtenus sont relativement impures sous forme de liquides, semi-solides ou poudres exclusivement destinés à un usage oral ou externe. (Handa, 2008). Il existe plusieurs modes d'extraction comme l'hydro-distillation, l'expression à froid, l'enfleurage, l'extraction par solvants organiques, distillation à la vapeur d'eau etc. (Pierron, 2014).

#### **I.3.2.4.5.a Infusion :**

C'est la forme de préparation la plus simple, elle se prépare en versant de l'eau bouillante sur les parties de plantes fraîches ou séchées et les bien tremper afin d'extraire leurs principes médicinales. Elle convient pour l'extraction de parties délicates ou finement hachées des plantes: feuilles, fleurs, graines, écorces et racines, ayant des constituants volatiles ou thermolabiles comme les huiles essentielles (Benzeggouta ; 2015) .

#### **I.3.2.4.5.b Macération:**

Elle consiste à mettre une plante ou partie de plante, dans de l'eau froide (macération aqueuse) ou une huile végétale (macération huileuse), pendant plusieurs heures, voir plusieurs jours, pour permettre aux constituants actifs de bien diffuser. Elle convient pour l'extraction de plantes contenant du mucilage, comme les graines de lin ou les graines du plantain des sables, leur forte concentration en amidon ou pectine peut causer une gélatinisation s'ils se préparent dans de l'eau bouillante. Egalement utilisée pour empêcher l'extraction de constituants indésirables qui se dissolvent dans l'eau chaude (Kraft et Hobbs, 2004). Elle concerne aussi les plantes dont les substances actives risquent de disparaître ou de se dégrader sous l'effet de la chaleur par ébullition (Benzeggouta ; 2015).

#### **I.3.2.4.5.c Décoction:**

Elle convient pour l'extraction de matières végétales dur ou très dur : bois, écorce, racines, ou des plantes avec des constituants peu solubles (ex : l'acide silicique). Elle consiste à faire bouillir les plantes fraîches ou séchées dans de l'eau pendant 10 à 30 min, pour bien extraire les principes médicinales (Benzeggouta, 2015)

#### **I.3.2.4.5.d Distillation:**

C'est une pratique très ancienne utilisant la vapeur d'eau pour récupérer les principes volatiles (Goetz et Busser, 2007), il existe trois différents procédés utilisant le principe de la distillation : l'hydro-distillation, l'hydro-diffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau (Piochon ,2008) .

##### **I.3.2.4.5.d.1 Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :**

La distillation par entraînement à vapeur d'eau est le procédé le plus utilisé pour obtenir les huiles essentielles. Une source de chaleur chauffe un alambic qui contient de l'eau et les végétaux disposés sur un plateau. La chaleur entraîne la formation de vapeur qui

traverse les végétaux et emporte avec elle les molécules aromatiques. On récupère un liquide composé d'eau et d'huile essentielle. L'huile essentielle plus légère, se sépare de l'eau. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité des huiles essentielles obtenues en diminuant les altérations liées au procédé de distillation (Florence, 2012).

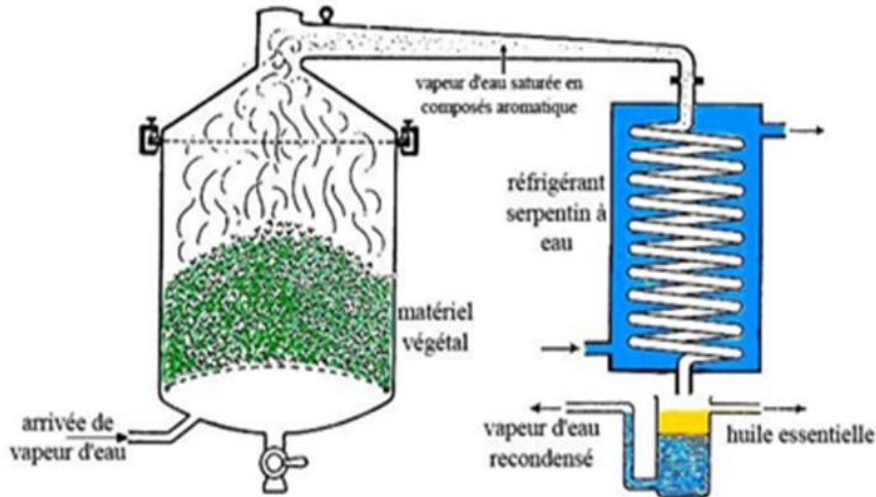


Figure (10) : montage d'entraînement à la vapeur d'eau (El haib, 2011).

#### I.3.2.4.5.d.2 Hydro-diffusion :

Cette technique est relativement récente. Elle consiste à faire passer du haut vers le bas et à pression réduite la vapeur d'eau au travers de la matière végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide et donc moins dommageable pour les composés volatils (KHOLKHAL, 2014).

#### I.3.2.4.5.d.3 Hydro-distillation: (water distillation)

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité (Baser et Buchbauer, 2010).

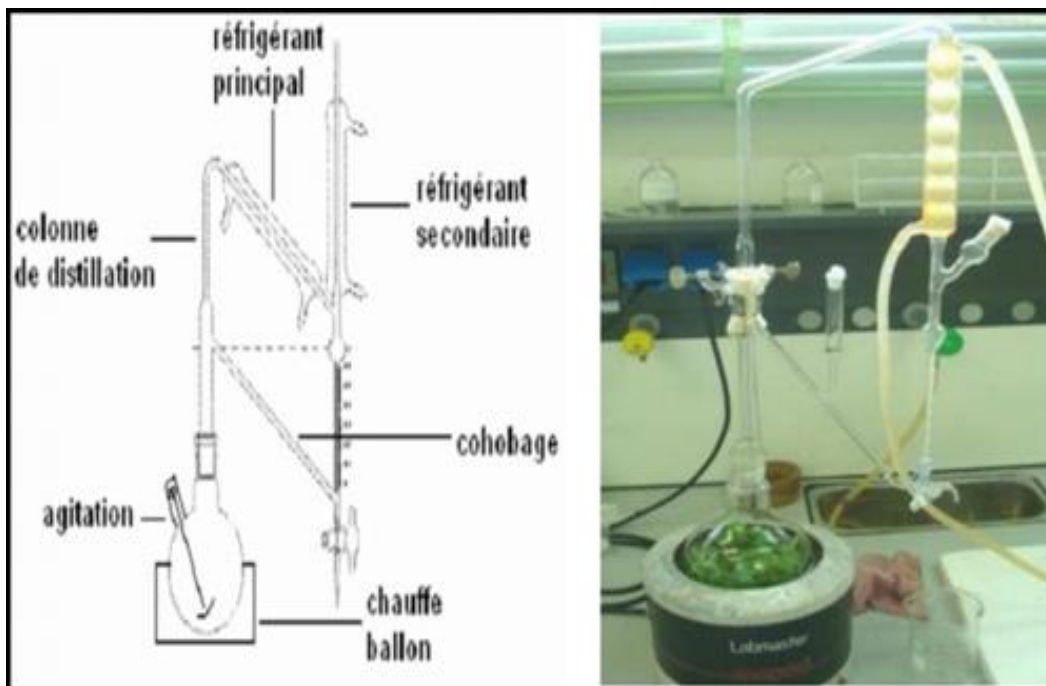
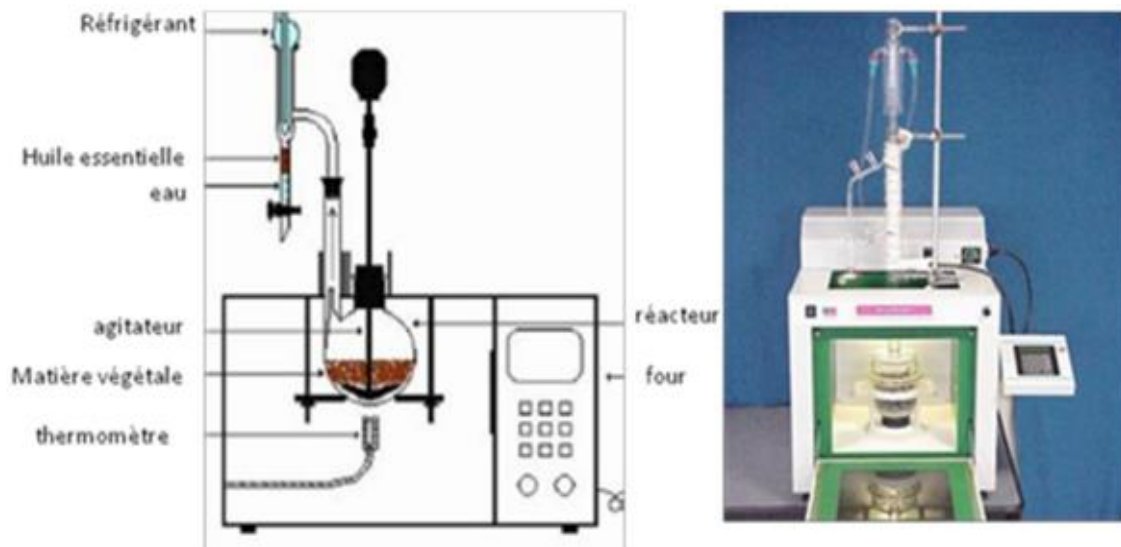


Figure (11): montage d'hydro distillation (El haib, 2011).

#### I.3.2.4.5.E.Extraction assistée par micro-onde :

Les micro-ondes ou hyperfréquences sont des ondes électromagnétiques de longueur d'onde intermédiaire entre l'infrarouge et les ondes de radiodiffusion entre 300 GHz à 300 MHz. Cependant, quelques fréquences seulement sont utilisées pour des usages industriels (Leonelli et al., 2013).

L'extraction par micro-onde est une technique qui a été développée au cours des dernières décennies à des fins analytiques. Le procédé d'extraction par microondes appelée Vacuum Microwave Hydrodistillation (VMHD) consiste à extraire l'huile essentielle à l'aide d'un rayonnement micro-ondes d'énergie constante et d'une séquence de mise sous vide. Seule l'eau de constitution de la matière végétale traitée entre dans le processus d'extraction des essences. Sous l'effet conjugué du chauffage sélectif des micro-ondes et de la pression réduite de façon séquentielle dans l'enceinte de l'extraction, l'eau de constitution de la matière végétale fraîche entre brutalement en ébullition (Ayaidia ,2011). Le contenu des cellules est donc plus aisément transféré vers l'extérieur du tissu biologique, et l'essence est alors mise en oeuvre par la condensation, le refroidissement des vapeurs et puis la décantation des condensats. Cette technique présente les avantages suivants: rapidité, économie du temps d'énergie et d'eau extrait dépourvu de solvant résiduel (Ayaidia ,2011).



**Figure (12):** montage d'extraction assistée par micro-onde (El haib, 2011).

#### **I.3.2.4.5.F Extraction par l'expression à froid :**

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (Solene, 2012).

#### **I.3.2.4.5.G Extraction par Ultrasons ou Sonication :**

La technique d'extraction par ultrasons est la plus utilisée à l'échelle industrielle pour améliorer les phénomènes de transfert de masse. Elle a été reconnue pour son application potentielle dans l'extraction des plantes et leurs huiles (carvone, gingerols, huile d'amande...), les protéines (soja), polyphénols, anthocyanines, saponines de ginseng, polysaccharides, la pasteurisation et la production de produits laitiers... (Adamet al., 2012; Goula, 2013; Both et al., 2014). Plusieurs facteurs gouvernent l'action des ultrasons comme la fréquence, la pression, la température et le temps de sonication. Il faut prendre en considération les caractéristiques de la plante comme l'humidité, les dimensions des particules et les solvants utilisés pour avoir un bon rendement (Wang et Weller, 2006).

Les avantages de la technique incluent (Goula, 2013):

- Amélioration du rendement de l'extraction.
- Augmente la perméabilité des parois cellulaires et produit des cavitations.
- Augmentation de l'extraction de composés thermosensibles avec des conditions qui donnent ailleurs de faibles rendements....

Cependant, l'effet de l'extraction par ultrasons sur le rendement et la cinétique d'extraction est lié à la nature de la matrice végétale. La présence d'une phase dispersée mène à l'atténuation des ondes ultrasonores et les zones actives dans l'extracteur restent à proximité

de l'émetteur d'ultrasons. Cette méthode ne permet pas de renouveler le solvant pendant le processus (Penchev, 2010). Un autre inconvénient de la méthode qui est occasionnel mais connu, est l'effet délétère de l'énergie ultrason sur les constituants actifs des plantes médicinales par la formation des radicaux libres et par conséquent des changements indésirables dans les molécules médicamenteuses (Handa, 2008).

#### **I.3.2.4.5.H Extraction par solvants chimiques :**

la mise en œuvre de cette technique est indispensable lorsque les composés ne sont pas extractibles par entraînement à la vapeur en raison de leur faible volatilité ou que le rendement de celui-ci est trop faible (Sutour, 2010), elle consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil qui lave la matière première à traiter, ou il subira après décantation et concentration; une distillation partielle. Ce solvant est séparé de la concrète par filtration puis subira un glaçage de - 12 à -15 °C, ainsi que cette précieuse substance est à nouveau filtrée et concentrée a faible pression (Mohammedi, 2006). Les solvants les plus utilisés sont : l'éther de pétrole, l'hexane, le dichlorométhane, le benzène, le chloroforme, l'éthanol et le méthanol (Lau, Gan et al., 2010).

#### **I.3.2.4.6. Toxicité des huiles essentielles :**

L'avenir à court terme apportera un éclairage important sur la cytotoxicité et la génotoxicité des huiles essentielles. Il est cependant capital d'intégrer la notion de la dualité "Efficacité - Toxicité". En effet, toute substance thérapeutiquement active est potentiellement toxique. Tout dépendra de la dose unitaire, journalière, de la voie d'administration, de l'état du patient... (Pierron, 2014). l'isolement de molécules toxiques qui dans certaines pathologies, apporteront des solutions appréciables. C'est le cas du taxol isolé de l'if (*Taxusbaccata*) dont l'activité antitumorale traite les cancers mammaires et utérins avec de bons résultats (Pierron, 2014).

#### **I.3.2.4.7. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles :**

Une plante étant formée de plusieurs milliers de constituants différents, l'obtention d'une substance active pure est une opération difficile et de longue durée. Afin de déterminer leur composition chimique, les huiles essentielles extraites ont été analysées par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).L'identification des composés chimiques a été réalisée par CPG couplée à la spectrométrie de masse (SM) (Kpodekon et al., 2013).

#### **I.3.2.4.8 La conservation des huiles essentielles :**

Les HE se conservent parfaitement quelques années à condition qu'elles soient dans un endroit frais, à l'abri de la lumière et conditionnées dans des flacons en verre colorés ou opaques ; on évitant les variations de température. Grâce a leurs qualités antiseptiques les problèmes de conservation sont moins fréquent (Grosjean, 2008).

#### **I.3.2.4.9. Les activités biologiques des huiles essentielles :**

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels de ses composés majoritaires et à leurs effets synergiques (Zhiri, 2006).

De nombreux auteurs ont rapporté que les extraits d'herbes ont des composés chimiques capables d'avoir une activité antimicrobienne (Dorantes et al, 2000 ; Djenane et al., 2006).

##### **I.3.2.4.9.a .Activités antimicrobienne :**

Les HEs les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes sont d'autant de plantes aromatiques à HEs riches en composé phénolique comme l'eugénol, le thymol, ces derniers ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries *E-coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clotridium spp* (Benyahia, 2015).

##### **I.3.2.4.9.b. Activité antifongique :**

Les huiles essentielles agissent sur un large spectre de moisissure et de levure en inhibant la croissance des levures et la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures (OUIBRAHIM ;2015).

##### **I.3.2.4.9.c. Activités anticancéreuse :**

Ces dernières années, l'attention des chercheurs quant à leur possible activité contre le cancer. De ce fait, les huiles essentielles et leurs constituants volatils font dorénavant l'objet d'études dans la recherche de nouveaux produits naturels anticancéreux (Edris, 2007). Les huiles essentielles agissent au niveau de la prévention du cancer ainsi qu'au niveau de sa suppression. Il est bien connu que certains aliments, comme l'ail ou le curcuma, sont de bonnes sources d'agents anticancéreux utiles pour prévenir l'apparition de cancer (Béliveau et al., 2006).

##### **I.3.2.4.9.d. activité antiparasitaire :**

Les HEs s'opposent au développement et détruisent certains parasites. Le groupe des phénols possède une action puissante contre les parasites, et cétones et lactones possèdent aussi une certaine toxicité (Bardeau., 2009).

##### **I.3.2.4.9.e .Activité anti-inflammatoire :**

Certains composés des huiles essentielles ont montré une activité anti-inflammatoire et antalgique sur des modèles animaux. Ainsi, la cineole a montré un effet anti-inflammatoire perceptible chez la souris et un effet antalgique dont le mécanisme semblerait être non-opioïde ce qui ouvre une porte de recherche de



nouveaux antalgiques qui épargnent l'effet dépressif du système nerveux central induit lors de l'utilisation de s opioïdes (Afif ;2015).

### **II.1 La plante étudiée (*chamaerops humilis*) :**

*Chamaerops humilis* L. (*C.h*) est un palmier nain ou palmier doum, appartient à la famille des Acéracée, originaire des régions bordant la Méditerranée occidentale (Khey et al. , 2013), pousse à l'état spontané et croit à l'état sauvage dans de nombreux pays du circum méditerranéen dont l'Algérie fait parti (TELA BOTANICA ,2013) .

Cette espèce utilisée à des fins économiques occupe de nombreux écosystèmes en Algérie par ailleurs Les nombreuses enquêtes ethnobotaniques menées sur le terrain montrent que ce taxon est utilisé comme plante médicinale (Hasnaoui et al. , 2014).



Figure (13) : le palmier nain (*chamaerops humilis* L) (Khoudali et al. , 2014)

## II.2 Les noms vernaculaires :

- ✓ **Palmier nain** : terme pris de la définition scientifique de l'espèce.
- ✓ **Palmier éventail** : la feuille du palmier a une forme en éventail d'où le nom, en Afrique du nord et particulièrement en Algérie, l'appellation usuelle est doum.
- ✓ **Palmier de méditerranée** : pousse à l'état spontané dans certains pays du bassin méditerranéen.

## II.3 Habita :

(*C.h*) L est une espèce thermophile qui supporte des températures moyennes annuelles élevées supérieures à 30°C, répandue dans la région méditerranéenne occidentale (Khey et al .; 2013). Son aire couvre l'Europe du Sud (Italie, Espagne, Malte, Sud de la France) et l'Afrique du Nord (Algérie, Tunisie et Maroc) (Medjati. , 2014).

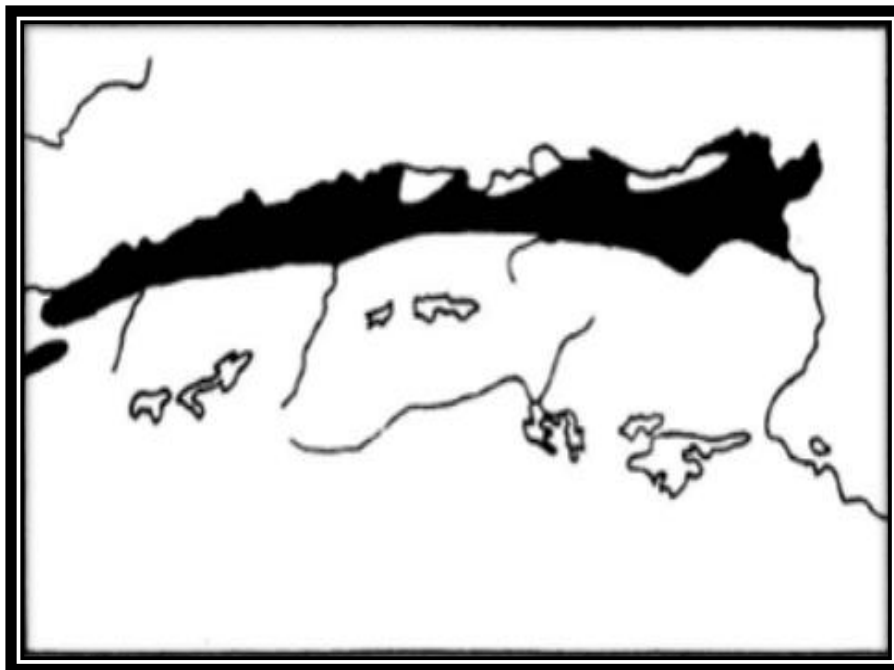


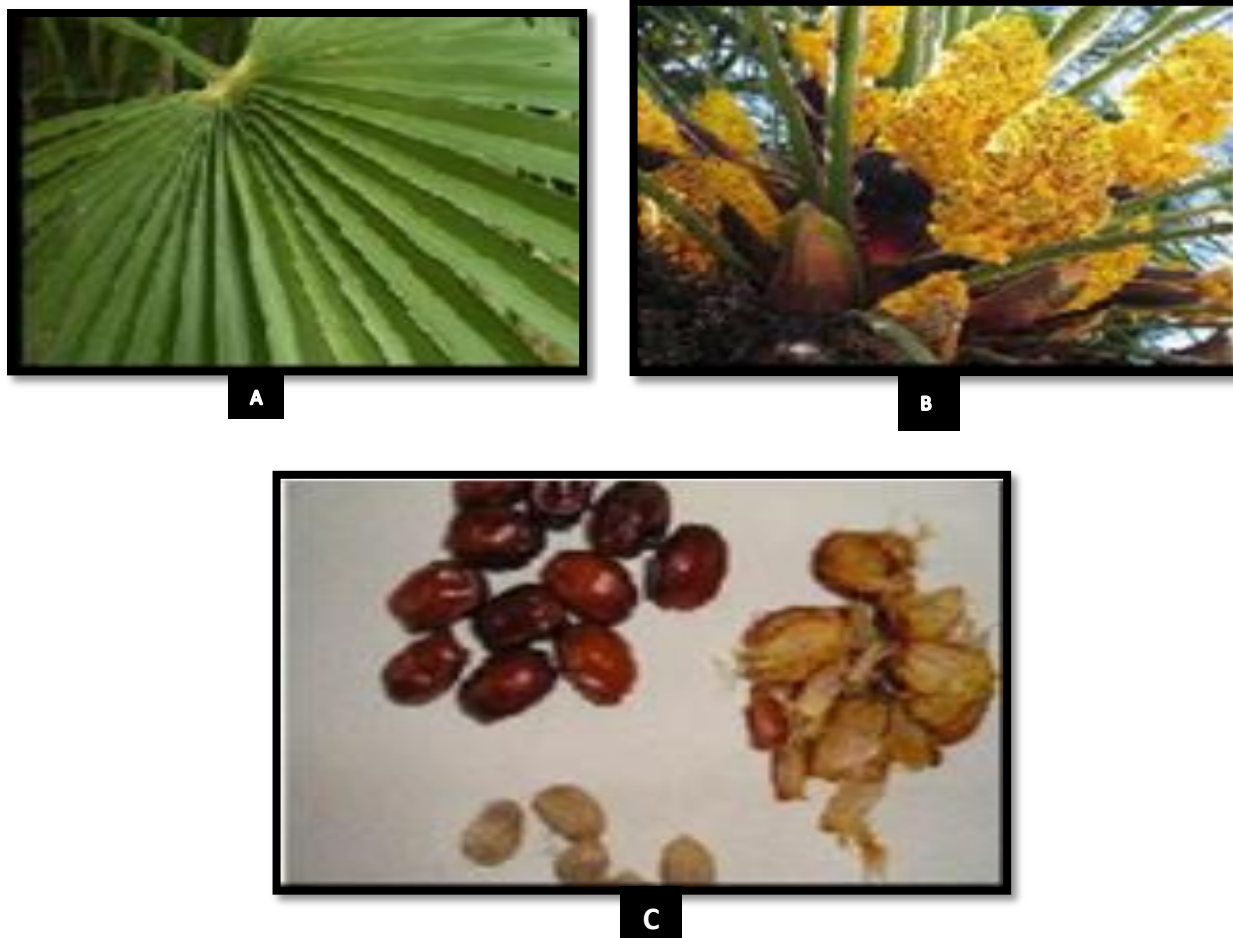
Figure (14) : Aire de *Chamaerops humilis* (Quézel et Santa ,1962)

#### II.4 Description et aspect botanique de la plante:

La (*C.h*) est une espèce généralement dioïque (fleurs mâles et femelles souvent sur des pieds différents) de plus c'est un palmier nain presque acaule à l'état sauvage, et une multi-tige arbuste avec un tronc court (Medjati. , 2014), ces feuilles se situent au sommet du stipe, appelées palmes et sont organisées en bouquet, leurs pétioles ont une longueur importante de 40 cm et même plus.

Les sujets femelles produisent une grande quantité de fruits ovoïdes de couleur orange foncé à rouge, Le fruit est globulaire de forme oblongue, ellipsoïde, à épicarpe brun à fines rainures claires (HASNAOUI , 2008).

la hauteur moyenne de cette plante est estimée entre 1 et 1,5 mètre mais elle peut atteindre des hauteurs de 9 à 10 m dans les zones protégées (Khoudali et al. ; 2014), elle est très rustique au froid et à la sécheresse. Elle peut survivre à des températures de -12°C. (HASNAOUI , 2008).



**Figure (15) : (A) feuille, , (b) fleurs, (C) fruit (Medjati. ; 2014).**

### **II.5 Classification botanique de la plante :**

La famille des Arecaceae comprend 200 genres et 3000 espèces. Le *Chamaerops humilis L.* est une plante médicinale qui appartient à cette famille (Khoudali et al., 2014).

**Tableau (06) : Situation botanique de l'espèce étudiée (Benmehdi et al. ;2012).**

Embranchement :	Spermaphytes
Sous embranchement :	Angiospermes
Classe :	Monocot
Ordre :	Spadiciflores
Famille :	Areaceae
Trybu :	Coryphée
Genres :	<i>Chamaerops</i>
Espèce :	<i>Humilis</i>
Sous espèce :	argentéa

## II.6 Utilisation en médecine traditionnelle (phytothérapie) :

Presque toutes les cultures et les civilisations de l'Antiquité à nos jours ont dépendu entièrement ou partiellement de la phytothérapie en raison de leur efficacité, l'accessibilité, la disponibilité, la faible toxicité et d'acceptabilité (Akharaiyi et Boboye. ; 2010).

Sur le plan phytogéographique le (*C.h*) une espèce ouest-méditerranéenne, En Algérie ce taxon est largement répandu dans la partie occidentale algérienne. (Hasnaoui et al. , 2008) Le rôle socio-économique, ethno-pharmaceutique et ethnobotanique du *C.h* a été signalé par plusieurs auteurs (Hasnaoui et al. ,2013). De nombreuses études descriptives ont été effectuées sur le rôle déterminant du *C.h* en médecine traditionnelle (Hasnaoui et al . ,2014), Elle est utilisé pour le traitement des maladies du tube digestif (Bnouham et al . ; 2002 . Benmehdi et al. , 2012), aussi pour le traitement du diabète, spasme, tonifiant et les troubles gastro-intestinaux (Hasnaoui et al. , 2011), De plus l'extrait aqueux des feuilles diminué également le taux de cholestérol total et de triglycérides (Gaamoussi et al . , 2010).

Les feuilles et les fruits ont des vertus médicinales (hypoglycémiant, anti-inflammatoire, anabolisant, antiseptique, antilithique, et diurétique (Hasnaoui et al .,2014), Un autre intérêt est porté aussi à l'utilisation de ces plantes comme source d'inhibiteur de la corrosion. Ces inhibiteurs sont utilisés pour empêcher ou retarder la corrosion des métaux (Hazwan et al. ,2011)

### III.1 L'objectif de travail :

L'objectif de ce travail consiste à une étude qualitative du contenu en polyphénols des différents extraits aqueux et organiques des graines de la plante de *Chamaerops humilis* L, et préparation un extrait brut méthanoliques à partir de ces graines pour but d'évaluer l'activité antibactérienne par la méthode des microdilutions sur microplaque de 96 puits vis-à-vis les souches de références suivantes : *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Pasteurilla multocida* ATCC 43137, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Escherichia coli* ATCC 25933, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Campylobacter fetus* ATCC 27374 .

d'évaluer l'activité antifongique par la méthode de contacte directe vis-à-vis des espèces de moisissures : *A.flavus*, *A.niger*, *Rhizopus.stolonifer* et *Caldosporium.sp*, d'une levure du genre *Candida* de références suivantes : *Candida albicans* ATCC26790, *Candida albicans* IP 444, *Candida albicans* ATCC10231 et l'étude de l'effet anti-aflatoxinogène par la méthode de CCM

### III.2 Matériel végétale :

Notre travail a été réalisé sur des fruits de la plante de *Chamaerops humilis*. Ces fruits ont été recueillis à partir des montagnes situées à la commune de Sidi Ahmed wilaya de Saida en septembre 2015 et identifier botaniquement par Pr Hasnaoui.

Les graines constituent la partie utilisée de cette plante. Elles ont été isolées et broyées, à l'aide d'un broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre qui est par la suite conservée jusqu'au moment d'utilisation.



**Figure (16): (A) : les fruits, (B) : les graines, (C) : leurs broyat**

**Tableau (07): caractéristique du matériel végétal**

Quantité de la plante	100g
Lieu de récolte	Saida
La date de récolte	22 septembre 2015
Partie utilisée	Grains
Etat	Sèche

### III.3 Matériel microbien :

#### III.3.1 Les souches bactériennes :

Dix souches de bactéries de références ont été utilisées pour déterminer l'activité antimicrobienne de l'extrait des graines de (*C.h*), elles sont représentées dans le tableau suivant :

**Tableau(08) :** les différentes souches utilisées pour déterminer l'activité antimicrobienne de l'extrait des graines de (*C.h*)

Nom de la souche	N°de référence	Gram	Source et identification
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 49452	Positif	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.
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	positif	
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	positif	
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	positif	
<i>Pasteurilla multocida</i>	ATCC 43137	Négatif	
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	Négatif	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25933	Négatif	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 70603	Négatif	
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	Négatif	
<i>Campylobacter fetus</i>	ATCC 27374	Négatif	



### III.3.2 Les souches de moisissures :

Les moisissures faisant partie de notre étude (**tableau 09**) ont été isolées, identifiées et ramenées par Mr.Adli, maître de conférence au niveau de l'université de Saida.

**Tableau (09) :** Liste des souches de moisissures testées

Nom de la souche	Famille	Source et identification
<i>Aspergillus.flavus</i>	Trichocomaceae	Laboratoires de recherche des ressources végétales et la sécurité alimentaires des zones semi-arides du sud-ouest algérien, université de Béchar.
<i>Aspergillus.niger</i>	Trichocomaceae	
<i>Rhizopus.stolonifer</i>	Mucoraceae	
<i>Caldosporium.sp</i>		

### III.3.3 Les souches de levure :

Trois souches de levure du genre *candida* de références ont été utilisées pour déterminer l'activité antifongique de l'extrait des graines de (*C.h*)

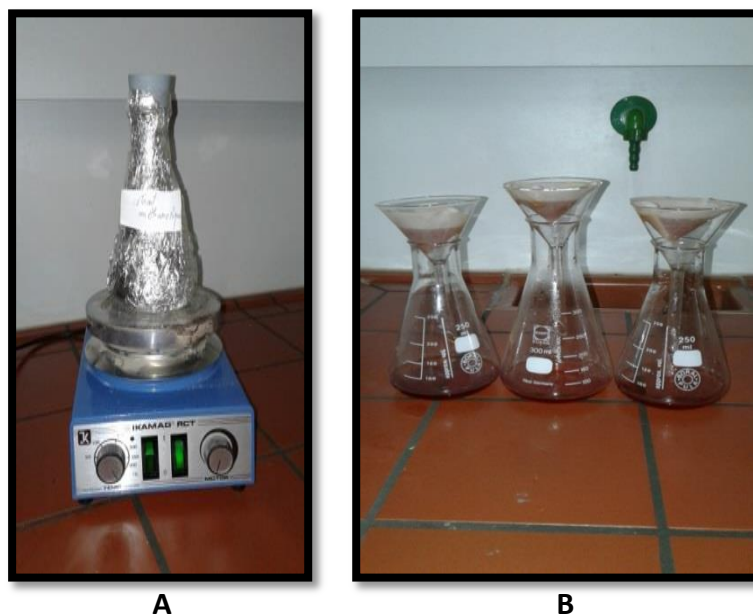
**Tableau (10):** Liste des levures testées.

Nom de la souche	Référence	FAMILLE	SOURCE ET IDENTIFICATION
<i>Candida albicans</i>	ATCC26790	<i>Saccharomycetaceae</i>	Laboratoire antibiotiques, antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique Université de Tlemcen
<i>Candida albicans</i>	IP 444	<i>Saccharomycetaceae</i>	
<i>Candida albicans</i>	ATCC10231	<i>Saccharomycetaceae</i>	

### III.4 Extraction des graines de (*C.h*) :

### III.4.1 Extraction par solvant :

La méthode d'extraction que nous avons adoptée est la macération. Une quantité de 5g des graines de (*C.h*) préalablement nettoyées et broyées sont mises à macérer dans un mélange méthanol/eau (80 :20 mL/V), sous agitation pendant 24h L'extrait hydro - alcoolique est récupéré après filtration du mélange à l'aide d'un papier filtre. L'extrait méthanolique ainsi préparé est utilisé au cours de l'examen phytochimique et de l'étude biologique (Talbi et al. , 2015).



**Figure (17): (A) préparation de l'extrait méthanolique ; (B) filtration d'extrait**

### III.5 Tests phytochimiques :

L'espèce sélectionnée fait l'objet d'une étude phytochimique qui consiste à détecter les différents composés chimiques existant dans la plante. L'extrait obtenu est soumis aux différents tests phytochimiques, qui sont basés sur des essais de solubilité, des réactions de coloration et de précipitation ainsi que des examens en lumière ultraviolette.

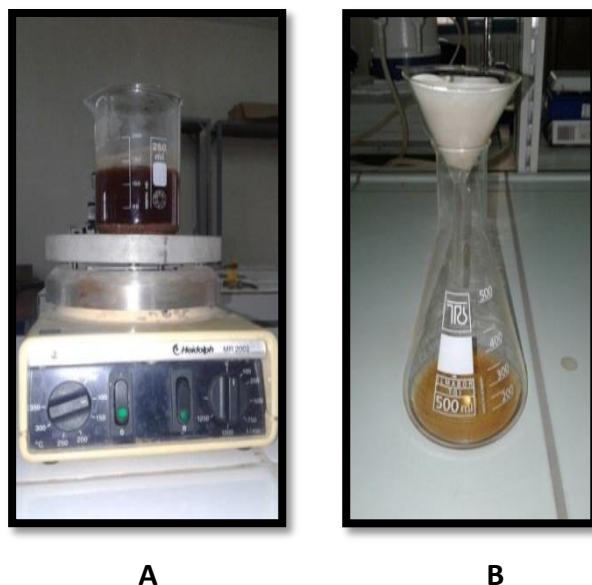
#### III.5.1 Préparation des extraits :

##### III.5.1.1 Préparation de l'extrait éthanolique :

Une quantité de 10 g de la poudre des graines de *C.h* est mise à macérer dans un mélange éthanol/eau (70 :30 V/V) sous agitation magnétique pendant 24h l'extrait hydro - alcoolique est récupéré après filtration du mélange à l'aide d'un papier filtre.

##### III.5.1.2 Préparation de l'infusé aqueux :

Une masse de 5g de poudre végétale est mise dans 100ml d'eau distillée bouillante pendant 30 minutes. Après refroidissement nous avons filtré l'extrait sur du papier filtre, on récupère le filtrat dans un flacon opaque afin de réaliser des tests phytochimiques.



**Figure (18) :**(A) préparation de l'infusé aqueux ; (B) filtration d'extrait

#### **III.5.1.3 Préparation des extraits aqueux :**

5g de poudre des graines de (*C.h*) dissous dans 100ml d'eau distillée ont été chauffés à reflux pendant 2h, Après refroidissement. Nous avons filtré l'extrait sur du papier filtre (**Bougandoura et al. ;2012**)

#### **III.5.1.4 Macération en milieu acide :**

On mélange 2g de poudre des graines de *C.h* avec 25ml de l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) et 75ml d'eau distillée ; on laisse macérer sous agitation pendant 24h à l'abri de la lumière. Après filtration, on récupère le filtrat acide dans un flacon opaque afin de réaliser des tests phytochimiques.

#### **III.6 Screening phytochimique :**

Le screening phytochimique met en évidence la présence des familles de molécules actives, c'est une étude qualitative utilisée pour connaître la composition chimique globale des extraits (**Senhaji et al., 2005; Kumar et al., 2010**).

##### **III.6.1 Les tannins :**

La présence des tannins est mise en évidence en ajoutant à 1ml de l'extrait éthanolique, 2ml d'eau distillée et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl<sub>3</sub> diluée (1 %). L'apparition d'une coloration bleu-noire caractérise la présence des tannins galliques, verte ou bleu-verte celle des tannins cathéchiques (**Trease et Evans, 1987**).

### **III.6.2 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**).

### **III.6.3 Les anthocyanes :**

Un volume de 2ml d'infusé aqueux est additionné à quelques gouttes 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**).

### **III.6.4 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**).

### **III.6.5 Les alcaloïdes :**

Nous avons pris deux tubes à essai dans lesquels nous avons 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**).

### **III.6.6 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**).

### **III.6.7 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).

### **III.6.8 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).

### **III.7 Etude de l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait des graines de (*C.h*) sur les souches testées :**

#### **III.7.1 Evaluation de l'activité antibactérienne :**

Les tests sont effectués sur plusieurs souches bactériennes de référence. Le choix de ces bactéries est basé sur leur pouvoir de pathogénicité.

L'activité antibactérienne de l'extrait des graines de *C.h* a été évaluée par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).

#### **II.71.1 Technique de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par La méthode des micro-dilutions sur milieu liquide:**

La technique utilisée est décrite par CLSI en 2006. Elle est basée sur la capacité des microorganismes à produire une croissance visible à l'œil nu au sein d'une série de dilutions de la substance antimicrobienne (CLSI-M7-A7, 2006).

Le Bouillon Muëller-Hinton (MH) (pH de 7,2 à 7,4) est largement utilisé comme milieu standard pour la micro-dilution en plaque. Il permet une meilleure croissance de la plupart des bactéries pathogènes non exigeantes, en plus de son faible effet antagoniste vis-à-vis des antibiotiques. Ce bouillon est considéré comme milieu de référence.

Après la préparation de l'inoculum de travail, on a inoculé la microplaque (96 puits), et on a utilisé 12 puits pour chaque souche antimicrobienne (CLSI-M27-A2, 2002; CLSI-M7-A7, 2006 ; Schwalbe, 2007).

#### **III.7.1.2 Préparation de l'inoculum :**

##### **III.7.1.2 a Préparation de pré culture :**

Les tests antibactériens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de (18 à 24 heures) en phase de croissance exponentielle. La réactivation des souches s'effectue par ensemencement de l'espèce bactérienne dans un milieu de culture liquide (bouillon nutritif). Après incubation de 24 heures à 37°C, un deuxième repiquage est réalisé dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive (GN) puis, incubées à 37°C pendant 24 heures (hellal, 2011).

### III.7.1.2 b Préparation de la suspension bactérienne :

A partir des cultures jeunes sur (GN), nous avons prélevé 5 colonies bien isolées et identiques dans 5 ml d'un milieu de culture liquide (BN), agitées à l'aide d'un vortex pendant quelques secondes. L'ajustement de la charge bactérienne à  $10^6$  UFC/ml, est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625 nm. Selon la standardisation de Mc Farland, on admet une DO comprise entre 0.08 et 0.1 correspond à une concentration de  $10^8$  UFC/ml ; la suspension d'inoculum est diluée à  $1/100^{\text{ème}}$  dans le milieu de culture pour avoir une concentration de  $10^6$  UFC/ml (hellal, 2011).

### III.7.1.3 Préparation de l'extrait méthanolique brut :

L'extrait méthanolique brut des graines de (*c.h*) est préparé par macération de 5g de poudre dans un mélange méthanol/eau (80 :20 mL/V) pendant 24h. Le filtrat obtenu est séché à  $37^{\circ}\text{C}$  au four pasteur pendant 48 heures. Un résidu sec est obtenu. Il est conservé dans un tube en verre sec et propre (chikhi ,2014).



Figure(19) : l'extrait méthanolique brut

### III.7.1.4 Préparation de la solution mère :

La solution mère contient en total un volume de 3ml avec une concentration de 200mg/ml : Une prise de 600 mg d'extrait sec est mise dans un tube à hémolyse en présence de 200µl de DMSE, le mélange est ajusté à 3ml avec de Bouillon Mueller-Hinton (MHB).



**Figure(20) :** solution mère a testé

### **III.7.1.5 Préparation de la micro plaque :**

Pour chaque ligne de la micro plaque, nous avons déposé 50µl de Bouillon Mueller-Hinton (MH) dans les 12 puits à l'exception de puits N°1 et N°12.

Le puits N°1 suivra de puits de départ qui contient 100 µl de la solution mère (extrait brute + Bouillon Mueller-Hinton) avec une concentration maximale, et le puits N° 12 servira de puits de contrôle de contamination qui contient seulement une quantité de 100 µl de MH.

Nous avons ajouté 50 µl de la solution mère dans le puits N°2 à partir du puits N°1.

Après avoir bien mélangé le contenu de deuxième puits nous avons prélevé 50 µl, que nous avons mis dans le troisième puits, puits du troisième au quatrième et ainsi de suite jusqu'au onzième puits de façon à obtenir des dilutions successives. Les 50 µl du onzième puits qui restent doivent être éliminés.

Enfin, nous avons introduit 50 µl de l'inoculum dans chaque puits sauf le puits N°12. Le puits N°12 servira de témoin positif (croissance sans extrait).

Les plaques sont scellées avec un aluminium stérile et placées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. La lecture du résultat s'effectue à l'œil nu à l'aide d'une source de lumière sous la microplaque pour visualisé si il y'a une inhibition ou non (la croissance sous forme une trouble).

La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance sera considéré comme la concentration minimale inhibitrice (CMI), elle est confirmée par la un ensemencement sur milieu solide (CLSI-M7-A7 2006).

50  $\mu$ l solution mère  
(extrait +BMH)

(50  $\mu$ l Sh +50  $\mu$ l inoculum

100  $\mu$ l BMH



A **Figure(21)** : préparation de la micro plaque (la méthode des micro- dilutions sue milieu liquide

B

C

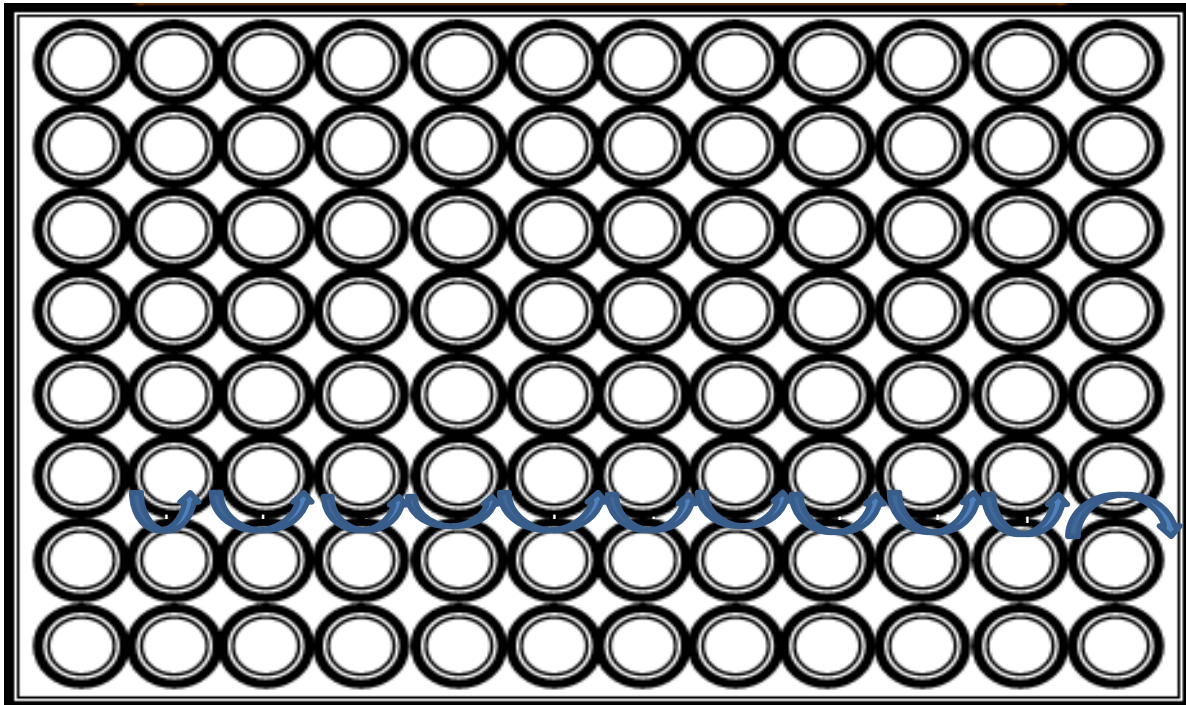
D

E

F

G

H



#### II.7.1.6 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) :

La CMB est définie comme la plus faible concentration de l'antibactérien qui détruit 99,9% de la concentration cellulaire finale. Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 37°C), les deux puits contenant les concentrations en extrait strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMB. Pour ce faire, un échantillon de 10  $\mu$ l de chaque puits (ne présentant pas de croissance) va être transféré dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Gélose nutritive. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 h.

Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte de celle de la CMB renferme un nombre de colonies inférieur à 3 (**Prescott et al. 1995**).

### III.7.2 Essais d'activités antifongiques :

#### III.7.2.1 Sur les espèces de moisissures :



Dans notre étude nous avons décelé le pouvoir antifongique de l'extrait par la méthode de contact direct sur les espèces suivantes :

- ✓ *A.flavus*,
- ✓ *A.niger*,
- ✓ *Rhizopus stolonifer*,
- ✓ *Caldosporium.sp*

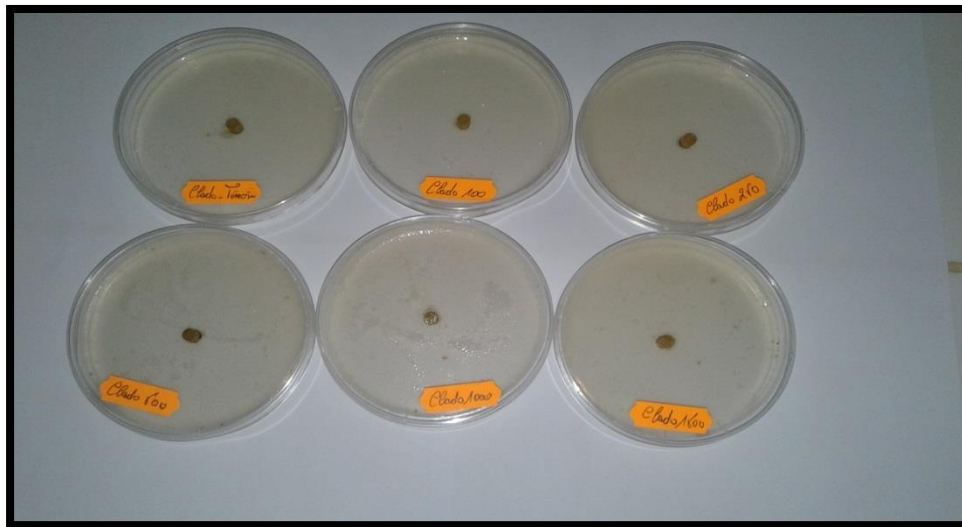
### III.7.2.1.1 Méthode de contact direct :

La méthode de contact direct est utilisée en vue de déterminer les extraits actifs par l'évaluation du taux d'inhibition selon la méthode de **Fandohan,2004** ou l'extrait des graines du *Chamaerops humilis* L est testé avec les concentrations suivantes :

**5 ; 12,5 ; 25 ; 50 et 75** µg/ml de milieu PDA.

Ces concentrations sont obtenues par l'addition de 100 ; 250 ; 500 ; 1000 et 1500 µg de l'extrait brute méthanolique dans 20 ml du milieu PDA tiède dans un tube à essai. Après agitation des tubes le milieu est coulé dans des boites de pétrie.

L'inoculation se fait par le dépôt au centre de la boite un disque mycélium d'environ 0,6 cm de diamètre d'une pré-culture de 3 à 7 jours **figure (22)**, Une boite de pétrie contenant 20ml de PDA sans extrait est inoculer pour servir de témoin.



**Figure (22) :** L'inoculation des boites

Après incubation de 7 jours à une température de  $28\pm 4^{\circ}\text{C}$ , en tenant compte de la croissance de mycélium du témoin; on calcule l'indice antifongique (pourcentage d'inhibition) (**Wang et al., 2005**) qui est déterminé par la formule suivante:

$$\text{Indice antifongique} = (1 - \text{Da}/\text{Db}) \times 100$$

- ✓ **Da:** le diamètre de la zone de croissance de l'essai.
- ✓ **Db:** le diamètre de la zone de croissance du témoin.

### III.7.2.2 Sur les Levures :

Trois souches de levure du genre *Candida* de références ont été utilisées pour déterminer l'activité antifongique de l'extrait, il s'agit :

*Candida albicans* (ATCC26790); *Candida albicans*; (IP44); *Candida albicans* (ATCC10231). Elles sont entretenues par repiquages successifs sur Gélose Sabouraud et conservées à 4°C.

L'activité antifongique de l'extrait des graines de (*C.h*) a été réalisée par des techniques différentes et complémentaires :

- Technique de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur microplaque;
- Technique de détermination de la concentration minimale fongicide (CMF) sur microplaque.

#### III.7.2.2.1 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide :

Nous avons utilisé la méthode décrite en 2002 par Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 (CLSI). C'est la méthode de référence qui permet de tester l'efficacité des antifongiques et de déterminer les CMI et les CMF correspondantes (**CLSI-M27-A2 2002**).

Le principe de cette méthode est d'évaluer la capacité des levures à produire une croissance visible dans les puits d'une microplaque à fond rond (à 96 puits) contenant le milieu de culture liquide, en présence de concentrations croissantes de l'extrait. Le milieu de culture préconisé pour cette technique est Bouillon Sabouraud (BS) à pH 5.

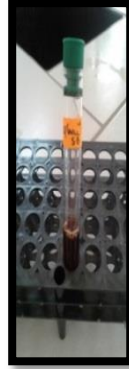
##### III.7.2.2.1.2 Préparation de l'inoculum :

À partir d'une culture jeune de *Candida albicans* en boîte sur gélose, nous avons prélevé 5 colonies d'un mm de diamètre que nous avons placé dans un tube à essai contenant 5 ml d'eau physiologique stérile.

La concentration cellulaire de cette solution est ensuite ajustée de  $10^6$  à  $5 \times 10^6$  cellules/ml. La concentration cellulaire finale qui est fixée entre  $5 \times 10^2$  à  $2.5 \times 10^3$  cellules/ml, est obtenue par deux dilutions successives dans le milieu de test, une dilution de 1:100, suivie d'une autre dilution de 1:20.

### III.7.2.2.1.3 Préparation de la solution mère :

La solution mère contient eu total un volume de 1ml avec une concentration de 200mg /ml : Une prise de 200 mg d'extrait sec est mise dans un tube a hémolyse on ajusté à 1ml avec sabouraud.



**Figure (23) :** solution mère a testé

### III.7.2.2.1.4 Préparation de la microplaque :

Il s'agit de la même méthode que pour les bactéries, mais le milieu de culture utilisé est le BS Après une incubation de 48 h à 28°C.

La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance sera considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI).

### III.7.2.2.1.5 Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF) :

La CMF est définie comme la plus faible concentration de l'antifongique qui tue 99,9% de la concentration cellulaire. Pour la détermination de la concentration minimale fongicide, nous avons utilisé la méthode décrite par **Canton et al. 2003**. Cette méthode est en accord avec les exigences de la CLSI « Clinical and Laboratory Standards Institute » (**Espinelgroff et Canton 2007**).

Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 35°C), les deux puits contenant les concentrations de substances antifongiques strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMF.

Pour ce faire, 10 µl de chaque puits vont être transférés dans des boites de Pétri contenant du milieu sabouraud gélose. Les boites sont incubées dans une étuve à 35 °C pendant 48h.

Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte correspondant à la CMF renferme un nombre de colonies inférieures à 3 (**Majoros et al., 2005**).

### III.8 Analyses mycotoxicologiques :

Sachant que les mycotoxines sont élaborées par des moisissures. Il serait intéressant d'étudier les moisissures productrices des mycotoxines.

#### III.8.1 Recherche des souches productrices d'aflatoxines :

La souche d'*Aspergillus flavus* est repiquée sur milieu PDAac pendant 5 jours à  $25 \pm 2$  °C et soumise aux analyses mycotoxicologiques.

#### III.8.2 Test d'activité antiaflatoxinogénique de l'extrait des graines de *Chamaerops humilis* :

Pour savoir l'effet de l'extrait des graines de (*C.h*) vis-à-vis la production des mycotoxines par *A.flavus* on a utilisé des flacons contenant 50 ml de milieu YES (Yeast Extract Sucrose) en vue de sa richesse en vitamines B, et son pouvoir de favoriser la métabolisation secondaire et induire les réactions anaboliques. Nous avons ajouté dans ces flacons des quantités différents de l'extrait des graines de (*C.h*) **100, 250 ,500 ,1000 et 1500 µg**. Après une agitation, on a introduit un disque mycéliens d'*A.flavus* séparément prélevés d'une pré culture de 05 jours (**Haddouchi et al., 2009**).

#### III.8.3 Analyse chromatographique par C.C.M:

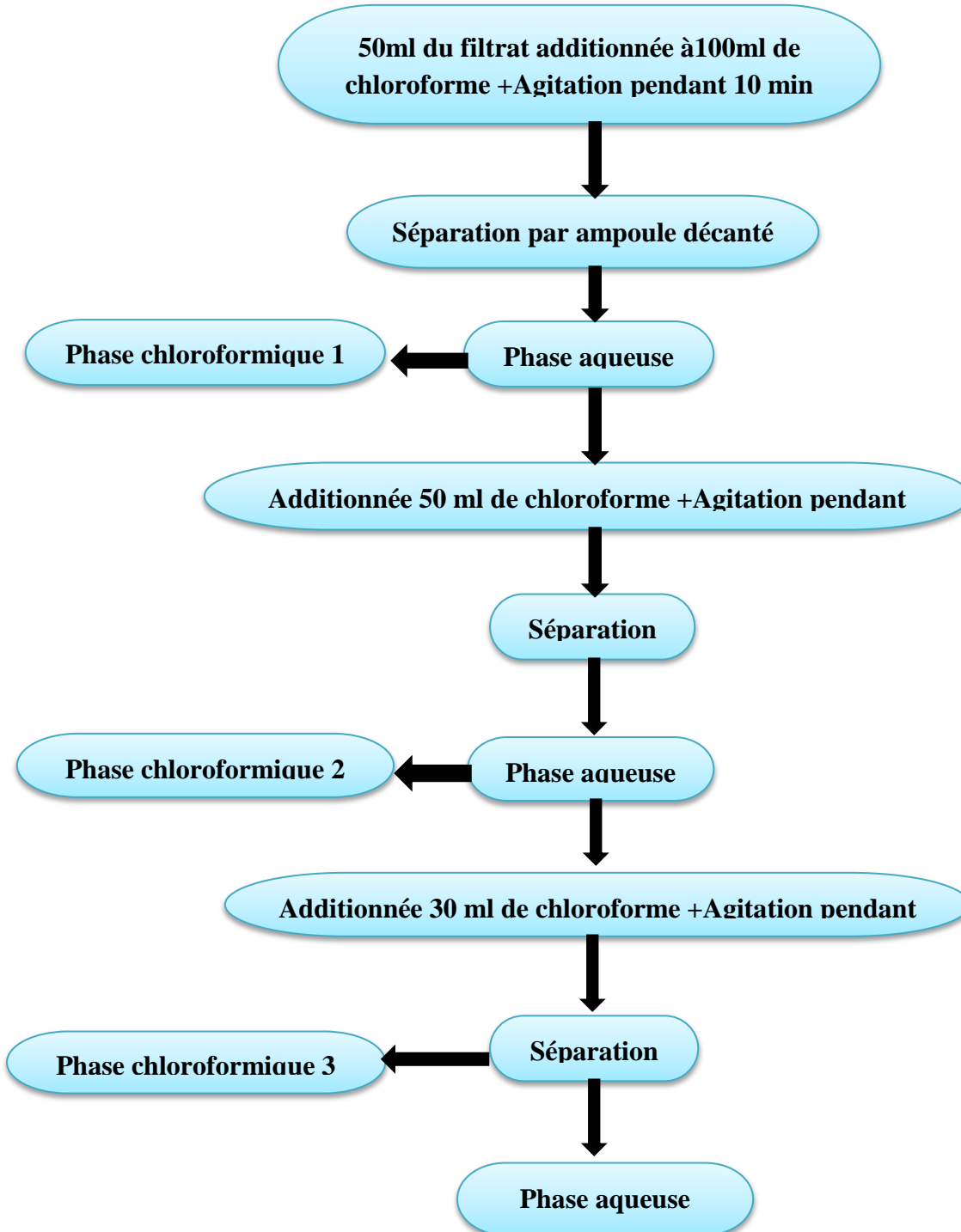
##### III.8.3.1 Extraction des mycotoxines :

Après 14 jours d'incubation, on a éliminé la biomasse mycélienne formée en filtrant le milieu YES par un papier filtre (Figure 24), puis l'extraction a été réalisée selon la procédure qui a été décrite par **Frayssinet et Cahagnier, 1982** (Figure 25)



**Figure (24) :** Filtration du milieu YES après 14 jours d'incubation

Les trois phases chloroformiques ainsi obtenues sont mélangées et filtrées sur du papier filtre puis concentrées par évaporation sous vide à l'aide d'un rotavapor jusqu'à un volume de 2 à 3 ml. Ce filtrat est conservé dans des tubes en verre hermétiquement fermés.



Figure(25) : Méthode d'extraction des mycotoxines (Frayssinet et Cahagnier, 1982)

### III.8.3.2 Séparation chromatographique :

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. Elle se fait sur une plaque de silicagel (F254) sur laquelle sont déposés deux spots de 20  $\mu$ l de chaque extrait à analyser. La plaque est ensuite placée dans une cuve chromatographique et trempée dans un solvant d'éluion constitué de Toluène, Acétate d'Ethyle et acide formique de volume (5, 4, 1ml) respectivement (figure 26). Après migration et évaporation du produit d'éluion à sec, la plaque est examinée sous UV à 365 nm. La présence d'aflatoxines se traduit par des fluorescences caractéristiques aux spots standards et d'un même rapport frontale que l'étalon (**Frayssinet et Cahagnier, 1982**).

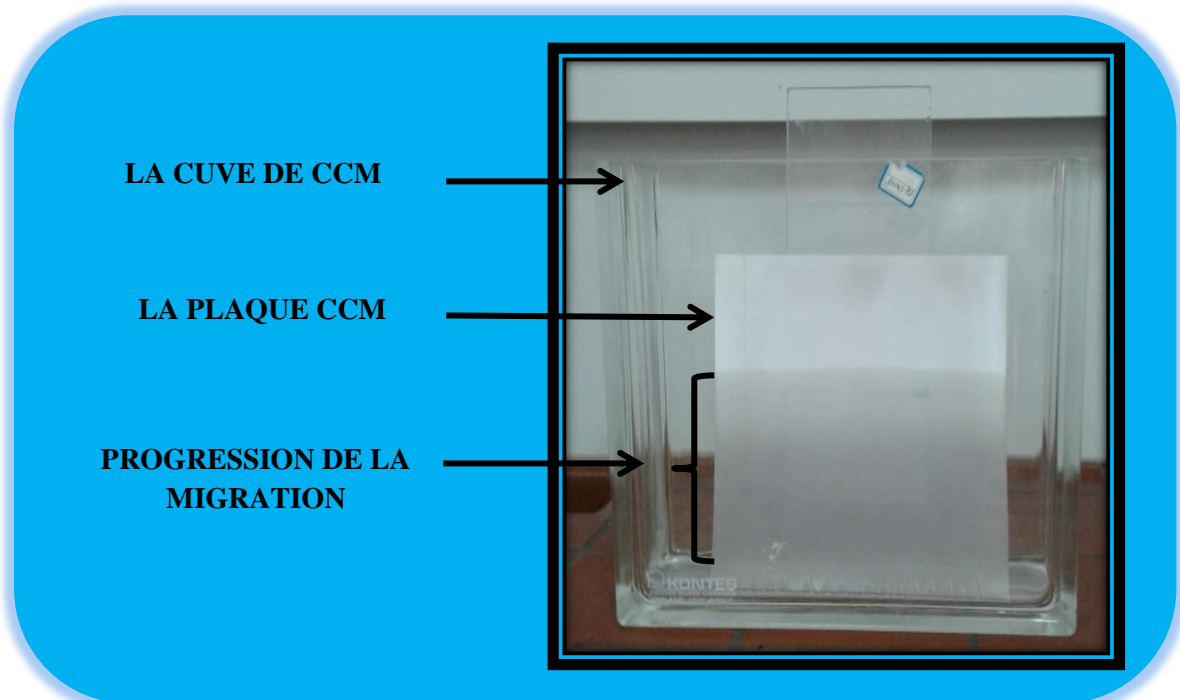


Figure (26) : Cuve chromatographique CCM

#### IV.1 Détermination du rendement en extrait sec :

La préparation de l'extrait à partir des graines de (*C.h*) a été effectuée par le solvant qui est le méthanol. Cette extraction a permis d'obtenir un extrait brut, avec un rendement de 2,7%.

#### IV.2 Screening phytochimiques :

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur différents extraits préparés à partir des graines de (*C.h*), en utilisant des solvants de polarités différentes et des réactifs spécifiques de révélation.

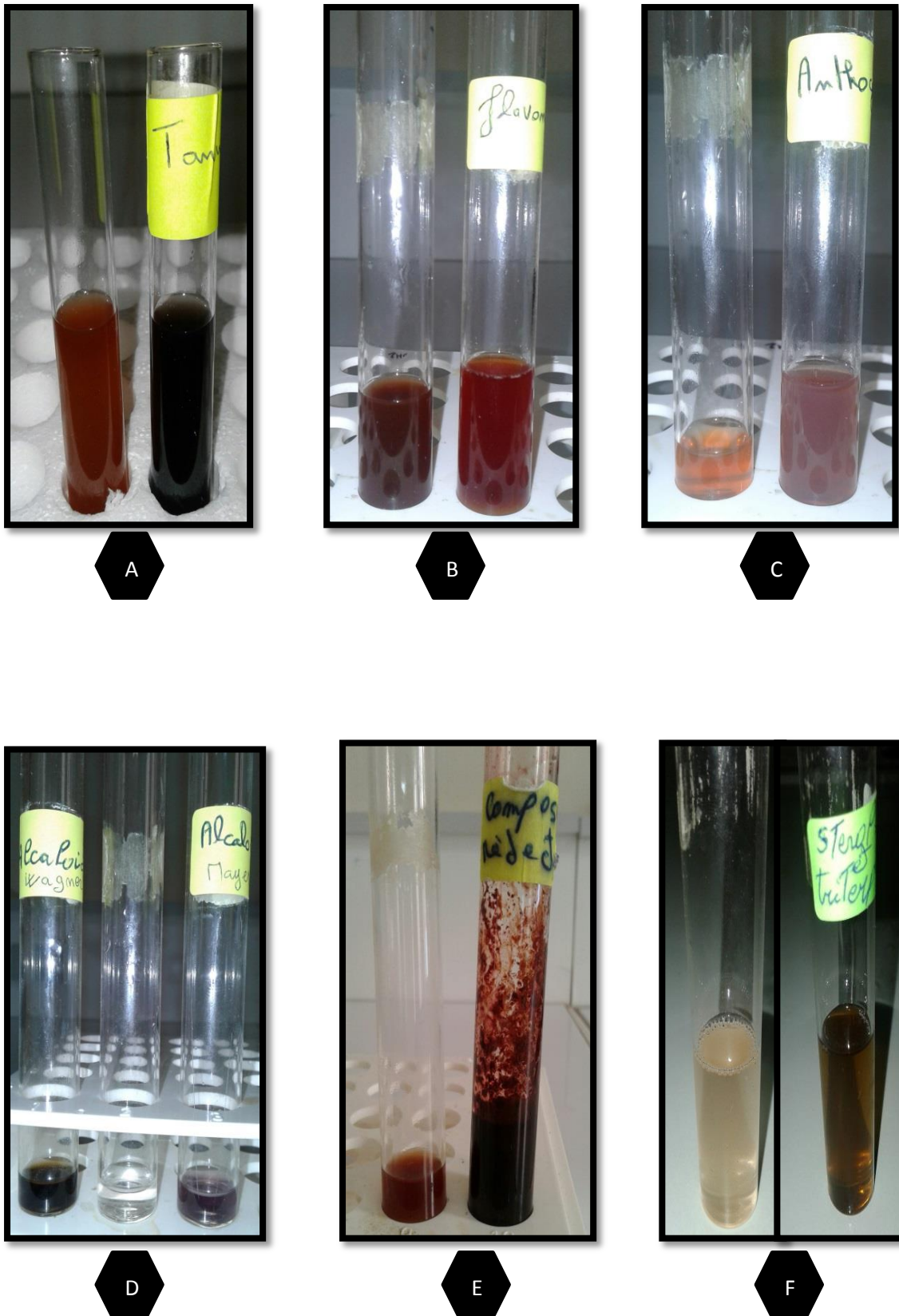
Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des graines de notre plante. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de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

Les Résultats des études phytochimiques effectuées sur les graines de *Chamaerops humilis*, sont présentés dans le tableau ci dessous :

**Tableau (11) :** Le screening phytochimique des graines de (*C.h*).

Métabolites	Résultats obtenus
<b>Les tanins</b>	++ apparition d'une coloration bleu-noire confirmant la présence de tanins galliques
<b>Les flavonoides</b>	++ Une coloration rose ou rouge indique la présence de flavonoides
<b>Les Anthocyanes</b>	+ apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu-violacé
<b>Les coumarines</b>	+
<b>Les alcaloides</b>	-
<b>Stérols et triterpènes</b>	+ Apparition d'une coloration verte-bleue et verte-violette
<b>Les composés réducteurs</b>	+ formation d'un précipité rouge brique

(+) : présence    (-) : Absence



**Figure (27) :** Quelques tests du screening phytochimique (A) : Les tanins ; (b) : Les flavonoïdes ;(c) : Les Anthocyanes ; (d) : Alcaloïdes ; (e) : Les composés réducteurs (f) : Stérols et triterpènes



**IV.3 Etude de l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait des graines de (*C.h*) sur les souches testées:**

**IV.3.1 Activité antibactérienne :**

**IV.3.1.1 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode de micro-dilutions :**

La méthode des micro-dilutions sur milieu liquide est une technique quantitative permettant de déterminer la sensibilité des microorganismes vis-à-vis une substance antimicrobienne. Cette méthode base sur le pouvoir inhibitrice de l'extrait des graine de (*C.h*) à l'intérieur d'un puits, dans un milieu nutritif ensemencée par l'inoculum des souches à testées.

Les résultats de la méthode de micro-dilution tableau (12), montrent que l'extrait des graines de (*C.h*) a un effet inhibiteur à une concentration de **12,5** mg/ml vis-à-vis des souches *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* ; à **6,25** mg/ml vis-à-vis *Listeria monocytogenes*, *Pasteurella multocida*, *Campylobacter fetus*, *Klebsiella pneumonia* ; à **3,12** mg/ml vis-à-vis *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii* et **1,56** mg/ml vis-à-vis *Enterococcus faecalis*.

**Tableau (12) :** Résultat des CMI et CMB de l'extrait des graines de (*C.h*) vis-à-vis des souches bactériennes.

**Concentration**

Souches Testées	Volume BMH + l'extrait (50 µl) à différentes concentration plus l'inoculum (50 µl)										Inoculum + BMH	BMH (100 µl)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	CMB	-	-	CMI	+	+	+	+	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	CMB	-	-	CMI	+	+	+	+	+	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	CMB	-	CMI	+	+	+	+	+	+	-
<i>Bacillus subtilis</i>	CMB	-	-	CMI	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Pasteurella</i>	-	-	CMB	-	CMI	+	+	+	+	+	+	-

<i>multocida</i>			-		-								
<i>Campylobacter fetus</i>		CMB											
	-		-	-									-
<i>Enterobacter cloacae</i>		CMB											
	-		-	-									-
<i>Citrobacter freundii</i>		CMB											
	-		-	-									-
<i>Klebsiella pneumonia</i>		CMB											
	-		-	-									-
<i>Escherichia coli</i>		CMB											
	-		-	-									-
[ ] de l'extrait (mg/ml)	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19	//	//	

#### IV.3.1.2 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) :

La CMB est définie comme la plus faible concentration de l'antibactérien qui détruit 99,9% de la concentration cellulaire finale.

Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 37°C), les deux puits contenant les concentrations en extrait strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMB, La concentration minimale bactéricide (CMB), elle est confirmée par la transformation de 10µl de chaque puits dans des boites de Pétri contenant du milieu Gélose nutritive figure (29), les résultats de ce dernier représentent dans la figure (0).

La figure (28) montre que l'extrait brut méthanolique possède un effet bactéricide vis-à-vis tous les souches à testées.

à une concentration 100 mg/ml vis-à-vis *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli* ; à 50 mg/ml vis-à-vis *Campylobacter fetus*, *Citrobacter freundii* ; à 25 mg/ml vis-à-vis *Bacillus cereus* ; *Listeria monocytogenes*, *Pasteurella multocida* et 12,5mg/ml vis-à-vis *Enterococcus faecalis*

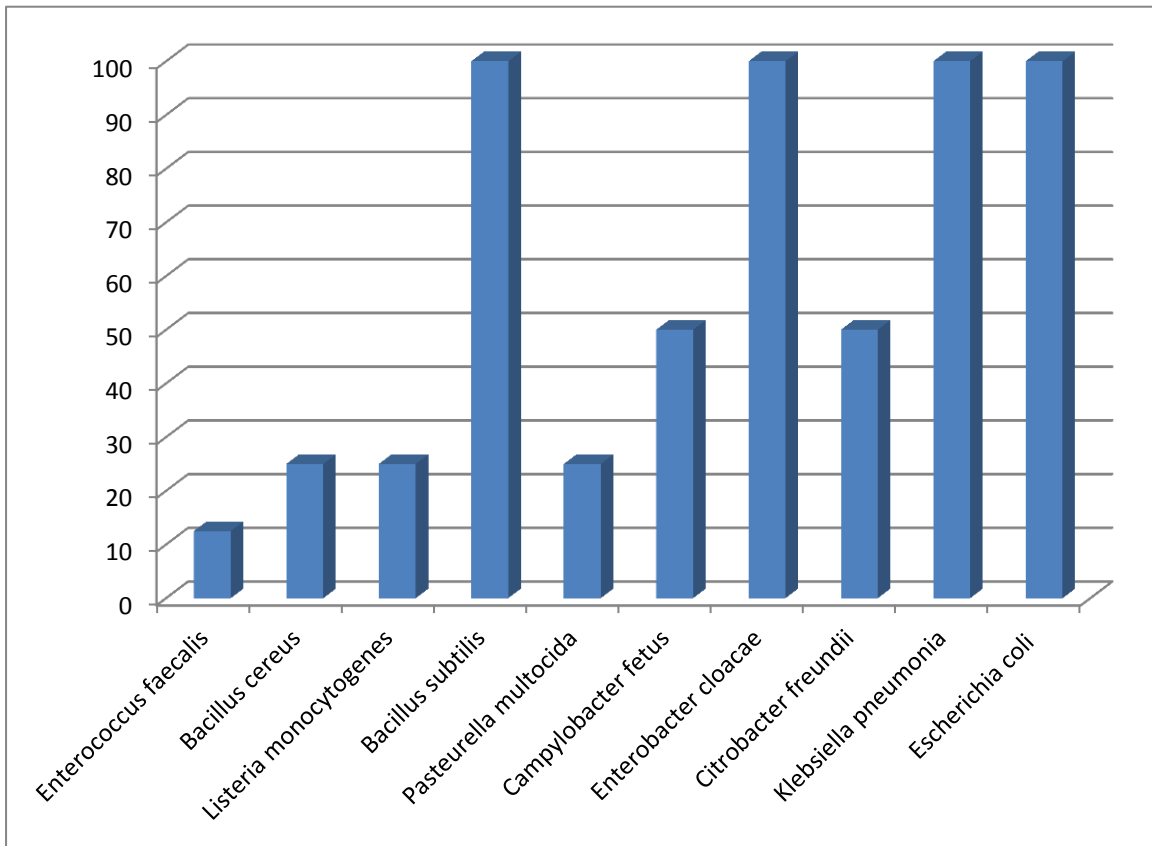
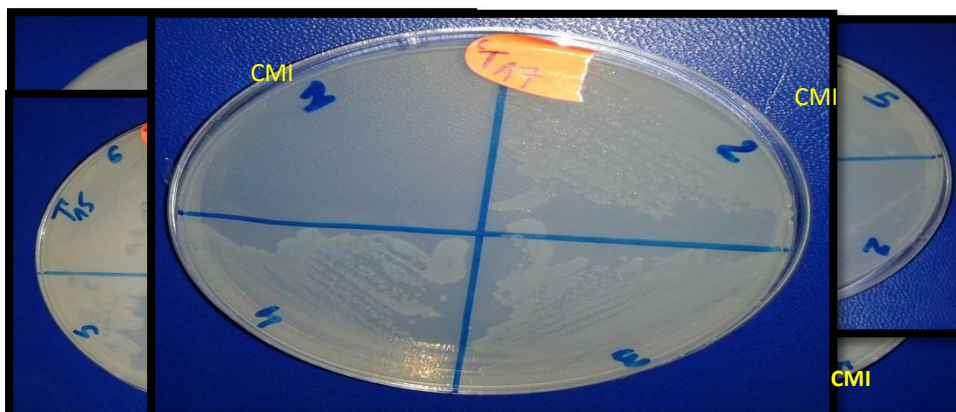
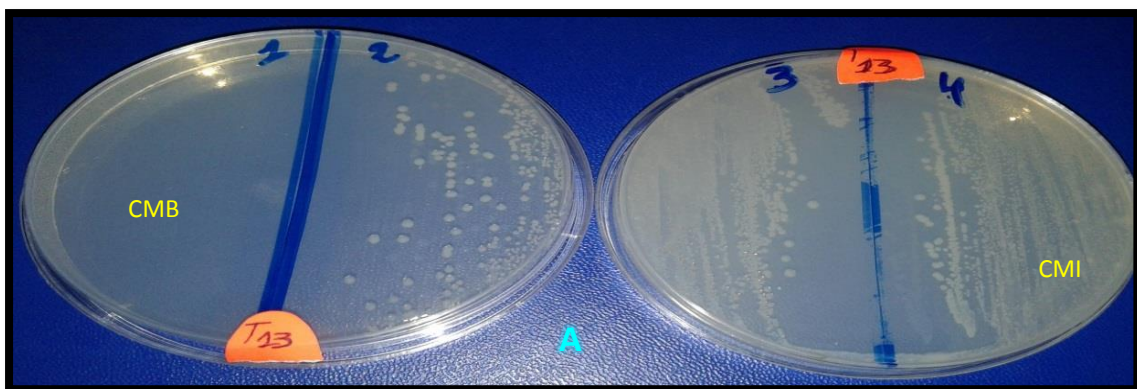
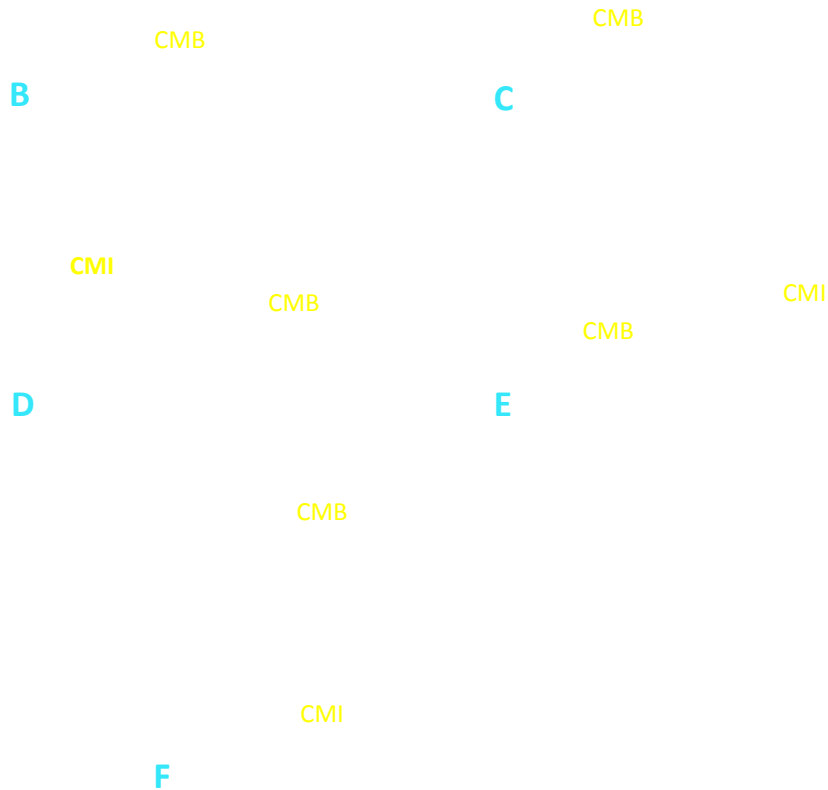


Figure (28) : la concentration minimale bactéricide





**Figure (29) :** l'effet d'antibactérienne del'extrait brute des graine de (*C.h*) sur (A) : *Bacillus subtilis*,(B) : *Enterococcus faecalis* :,(C), *Pasteurella multocida*,(D) : *Bacillus cereus*,(E) : *Listeria monocytogenes*,(F): *Enterobacter cloacae*

#### IV.3.2 Détermination de l'Activité antifongique :

##### IV.3.2.1 Sur les espèces de moisissures :

##### IV. 3.2.1.1 Méthode de contact direct :

L'activité antifongique de l'extrait des graines de *Chamaerops humilis* a été évaluée par la méthode de contact direct qui nécessite une incubation de 07 jours, Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau(13).et figure(30)

**Tableau(13):** Résultats de l'activité inhibitrice de l'extrait brut méthanolique des graine de (*C.h*). Sur les souches fongiques testées.

Concentration (µg/ml)	5	12,5	25	50	75
Espèce					

<i>Aspergillus flavus ss</i>	6,25%	12,50%	43,75%	78,75%	81,25%
<i>Aspergillus niger</i>	13,46%	19,23%	23,08%	39,38%	40,38%
<i>Cladosporium.sp</i>	<b>41,8%</b>	<b>50,91%</b>	<b>69,09%</b>	<b>80%</b>	<b>85,45%</b>
<i>Rhizopus stolonifer</i>	10%	16,25%	30,63%	51,63%	58,63%

L'analyse des résultats relatifs à la croissance fongique soumise à l'action de différentes concentrations de l'extrait brut méthanolique des graines de (*C.h*) testée (figure 30) nous a permis de constater que l'extrait de cet plante exercé une action antifongique variée sur les espèces fongiques testées à des concentrations allant de 5 µg/ml jusqu'à une concentration égale à 75µg/ml. L'extrait des graines de (*C.h*) a pu inhibée la croissance de *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus.flavus* et *Cladosporium.sp*. On a aussi remarqué que le taux d'inhibition de la croissance fongique est proportionnel à la concentration d'extrait

#### IV.3.2.1 .2 L'activité inhibitrice de l'extrait à 5µg /ml :

A la concentration de 5µg /ml de l'extrait, L'analyse antifongique révèle une inhibition de l'extrait vis-à-vis les souches testées, la souche *Cladosporium.sp* représente la souche la plus sensible par rapport aux autres souches testées avec un indice antifongique **41,8%** Par ailleurs, la souche *A.flavus* a été marqué par une résistance à **6,25%**.

#### IV.3.2.1.3 L'activité inhibitrice de l'extrait à 12, 25 µg /ml :

Pour la concentration de 12,5µg /ml vis-à-vis les souches testées, on a remarqué en terme de sensibilité que la souche *Cladosporium.sp* a présenté une sensibilité visiblement remarquable à **50,91%**, tandis que *L'A niger*, *Rhizopus stolonifer* et *A flavus* ont présenté une sensibilité médiocre à **19,23%**, **16,25%** et **12,5%** respectivement.

#### IV.3.2.1.4 L'activité inhibitrice de l'extrait à 25µg /ml :

À partir d'une concentration en extrait de 25µg /ml on n'a observé, des variations ont été produites en termes de sensibilité pour les différentes espèces testées, dont *Cladosporium.sp* a présenté une sensibilité à **69,09%**, *A. flavus* **43,75%**, *Rhizopus stolonifer* **30,63%** et *Aspergillus niger* **23,08%**

#### IV.3.2.1.5 L'activité inhibitrice de l'extrait à 50 et 75 µg /ml :

En ce qui concerne les deux concentrations 50 et 75µg/ml, montrent que l'indice antifongique de *Cladosporium.sp* et *A. flavus* est très élevé par rapport aux concentrations précédentes. **85,45%** et **81,25%** respectivement. Tandis que l'effet inhibiteur reste

proportionnel avec la concentration en extrait pour les autres souches testées à des pourcentages variables

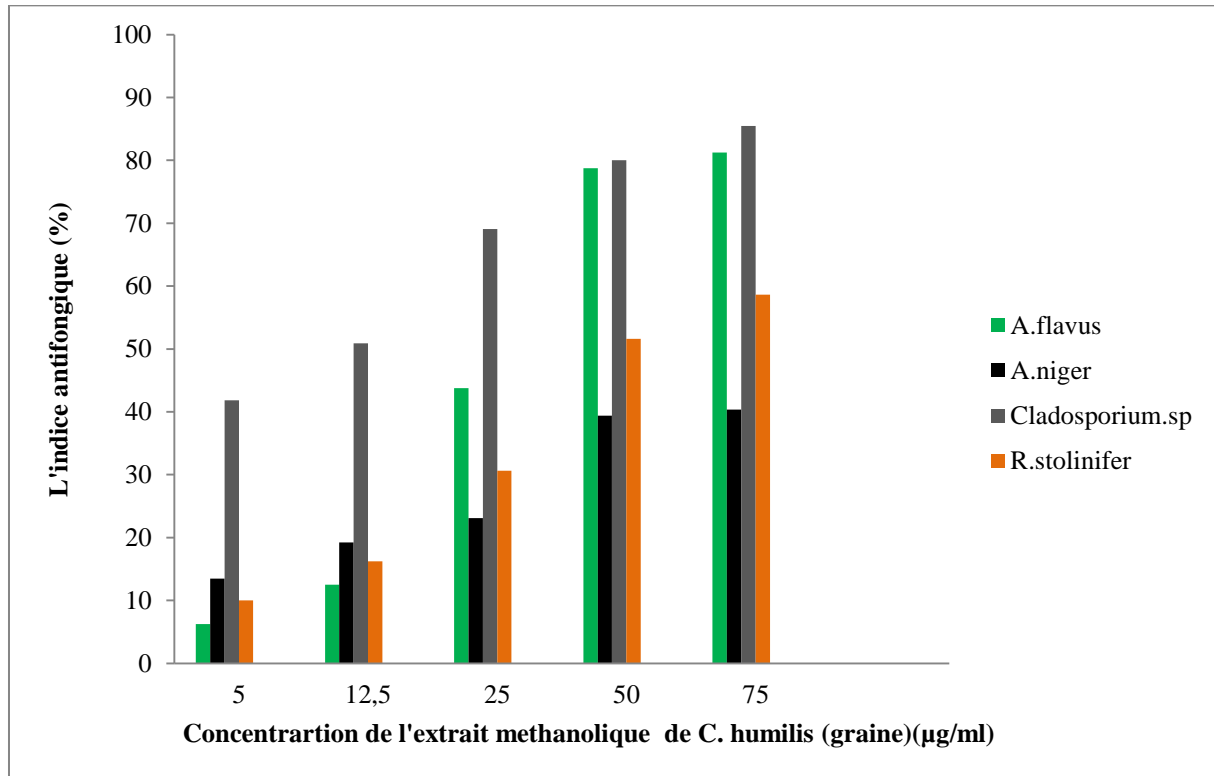


Figure (30) : L'indice antifongique de l'extrait brut méthanolique des graine de (*C.h*).

#### IV.3.2.2 Sur les Levures :

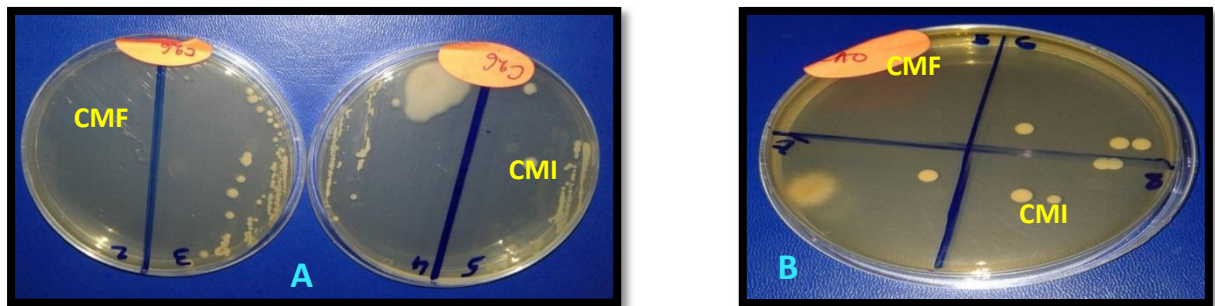
##### IV.3.2.2.1 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et la concentration minimale fongicide (CMF) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide:

Les observations effectuées sur l'effet de l'extrait des graines de (*C.h*) vis-à-vis *Candida albicans* testées sont représentées dans le tableau(14) et figure (31).

Les résultats de la méthode de micro-dilution montrent que l'extrait des graines de (*C.h*) a un effet inhibiteur à une concentration de **6,25 mg/ml** vis-à-vis *Candida albicans* ATCC26790 ; à **3,12 mg/ml** vis-à-vis *Candida albicans* IP 444 et à **0,78mg/ml** vis-à-vis *Candida albicans* ATCC10231. et un effet fongicide à une concentration de **50mg/ml** vis-à-vis *Candida albicans* ATCC2679 *Candida albicans* IP 444 ; et à une concentration de **6,25mg/ml** vis-à-vis *Candida albicans* ATCC10231

**Tableau (14) :** Résultat des CMI et CMB de l'extrait des graines de (*C.h*) vis-à-vis *Candida albicans*

Concentration Souches Testées	Volume BS + l'extrait (50 µl) à différentes concentration plus l'inoculum (50 µl)										Inoculum + BS	BS (100 µl)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Candida albicans</i> ATCC26790	-	CMF	-	-	CMF	+	+	+	+	+	+	-
<i>Candida albicans</i> IP 444	-	CMF	-	-	-	CMF	+	+	+	+	+	-
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	-	-	-	-	CMF	-	-	CMF	+	+	+	-
// de l'extrait	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19	//	//



**Figure (31) :** l'effet d'antifongique de l'extrait brute des graines de (*C.h*) sur (A) : *Candida albicans* ATCC26790, (B) : *Candida albicans* ATCC10231

#### IV.4 Résultats des analyses mycotoxicologiques :

##### IV.4.1 Effet de l'extrait brut méthanolique des graines de (*C.h*) vis-à-vis le poids mycélien:

D'après la figure (32) on a remarqué que la masse mycélienne était inversement proportionnelle à la concentration en extrait. Ceci peut être expliqué par l'existence d'un effet

inhibiteur de cet extrait sur le plan de la croissance mycélienne pour la souche fongique testée (*A. flavus*).

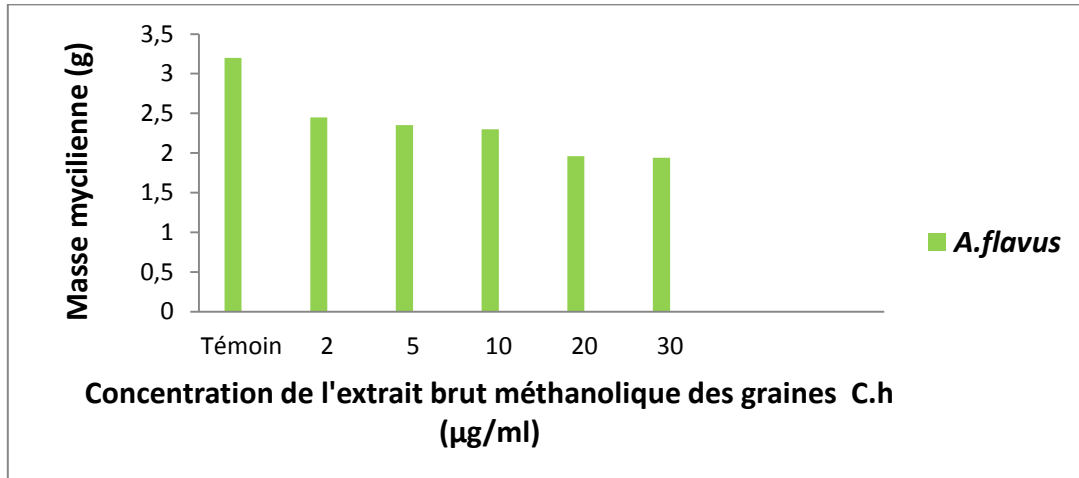
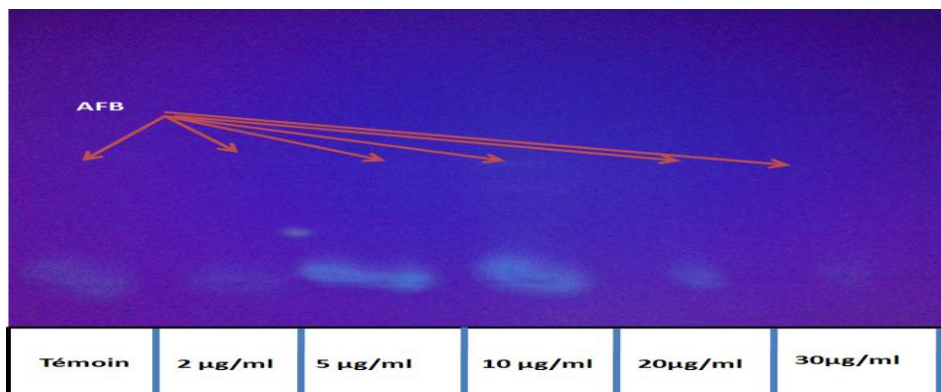


Figure (32) : L'effet de l'extrait brut méthanolique des graines de fruit de *Chamaerops humilis* sur les poids mycélienne (g)

#### IV.4.2 Test d'activité anti-aflatoxinogénique de l'extrait :

D'après les résultats du test de l'activité antiaflatoxinogénique de l'extrait brut méthanolique des graine de (*C.h*) par CCM., aucune inhibition de la sécrétion des mycotoxines n'a été remarquée figure(33)



Figure(33) : L'effet antiaflatoxinogénique de l'extraite des graines de (*C.h*) par CCM sous UV (Détection d'AFB1).



## V. Discussion :

Les plantes sont constituées, dans leur extrême richesse et diversité, de molécules aux structures complexes, dont les fonctionnalités répondent, lorsqu'elles sont valorisées, aux différents besoins des êtres vivants du règne animal. Les ressources végétales présentent l'avantage d'être renouvelables et d'être très largement présentes dans leur diversité sur l'ensemble des terres (**Blanc et Goma, 2006**).

Par ses contrastes géographiques, la région des hauts plateaux -ouest Algérien offre dans les conditions favorables un bioclimat permettant l'installation d'une flore à endémisme marqué, formée par diverses espèces de différentes souches poussant à l'état sauvage, ce qui fait de la région un véritable réservoir de matières premières et une remarquable usine naturelle. (**Benzahi, 2001**).

Ces dernières décennies, plusieurs études se sont penchées sur la valorisation des plantes, notamment les plantes médicinales qui sont utilisées traditionnellement par la population de la région depuis longtemps tant pour conserver et aromatiser ses aliments que pour traiter ses maladies. Cette catégorie de plantes demeure très distincte des autres, mérite d'être valorisée et présentée sous les feux de l'actualité, pour une meilleure exploitation.

Pour une meilleure et plus précise application, il est plus qu'impératif d'étudier la composition biochimique des métabolites issus de ces plantes en vue de déceler leurs molécules à activités biologiques qui est le plus souvent corrélée aux caractéristiques physico-chimiques pouvant avoir des conséquences négatives ou positives sur la qualité de leurs activités biologiques (**Ziane, 2007**).

Plusieurs études ont mis en évidence l'utilisation des huiles essentielles et les différents extraits des plantes comme agents antimicrobiens naturels, ces extraits inhibent efficacement la croissance d'un large éventail de micro-organismes avec moins d'effets secondaires que les agents antimicrobiens synthétiques pour la santé de l'homme (**Bougandoura et Bendimerad., 2012**).

Cela nous à amener à une étude phytochimique et l'évaluation de l'effet antimicrobien de l'extrait brut méthanolique des graines des fruits de la plantes de *Chamaerops humilis* sur quelques souches de bactéries, levures et moisissures sécrétrices des mycotoxines.

Toutefois, l'extrait brut méthanolique des graines des fruits de la plantes de *Chamaerops humilis* a été obtenu par macération à partir de la matière sèche broyée avec un rendement de 2,7%, ceci est relativement en désaccord avec les travaux de **Hasnaoui et al ., (2014)** ayant trouvé un rendement d'extrait chloroformique de 1,5 % à partir des feuilles collectées de la wilaya de Tlemcen (Algérie).

Les rendements trouvés ont été élevé dans des extraits bruts méthanolique, ceci a été prouvé par plusieurs études qui ont suggéré que le méthanol est le solvant le plus utilisé et sur tous pour extraire les composés phénolique d'une plante (**Sun et al ., 2007; Falleh et al.,2008**).

En effet, il est difficile de comparer les résultats du rendement avec ceux de la bibliographie, car ils ne sont que relatifs et dépendent de la méthode et les conditions dans les quels l'extraction a été effectuée, ainsi a l'origine géographique de la plante, conditions pédoclimatiques, et du fait de la différence de composition et des structures chimiques contenues dans le produit naturel. (**Sefidkon , 2001**).

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques réalisés sur les graines des fruits de la plantes de *Chamaerops humilis* montrent la présence des tanins, flavonoïdes, anthocyanes, comarines, stérols et triterpnes et composés réducteurs. Ces résultats concordent avec les travaux de **khoudali., (2014) ; Hasnaoui et al ., (2013a)** qui ont illustré la présence des mêmes composants.

L'activité antibactérienne par la méthode de micro-dilution a montré un effet inhibiteur important vis-à-vis dix souches bactériennes (Gram positives et négatives) par l'extrait des graines de (*C.h*). Cette activité à montré que la plus petite valeur de CMI était celle pour *E faecalis* avec une valeur égale à 1.56 mg/ml. D'autre part, les grandes valeurs de CMI étaient contre toutes les souches testées avec des valeurs de 12.5 mg/ml. De plus, notre extrait possède un effet bactéricide vis-à-vis tous les souches à testées à une concentration (CMB) de 100 mg /ml.

Dans le même contexte, les travaux menés par **Hasnaoui et al ., (2013)** sur les huiles essentielles des feuilles de (*C.h*) ont révélé un l'effet inhibiteur à une concentration d'environ 250 mg / ml pour les bactéries: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. La concentration inhibitrice été d'environ 500 mg / ml de *Listeria monocytogenes* et *Bacillus subtilis*. La forte sensibilité peut être expliquée par la forte présence

des phénols (flavones et des flavonoïdes et des composés apparentés) qui sont doués d'un pouvoir antibactérien (**Kumar et al., 2009**). De plus, plusieurs auteurs mentionnent que les propriétés antimicrobiennes des extraits de plusieurs plantes médicinales ont été attribuées à leur profil chimique (**Baydat et al., 2004 ; Pibiri, 2005 ; Satrani et al., 2006**).

Plusieurs études ont mis en évidence l'utilisation potentielle des extraits comme un facteur de lutte contre des champignons microscopiques susceptibles de produire des mycotoxines d'une part, D'autre part comme inhibiteurs de la croissance des champignons (**Bankole et Joda, 2004**).

Toutefois, l'extrait méthanolique des graines de (*C.h*) a montré une activité antifongique variée vis-à-vis les souches fongiques testées : *A.niger* (40,38%), *R.stolonifer* (58,63%), *A.flavus* (81,25%) et *Cladosporium.sp* (85,45%) à une concentration de 75 µg/ml. En outre, nos résultats sont en accord avec ceux de **Hasnaoui et al ., (2014a ; 2014b)** dont ils ont marqué aussi l'effet inhibiteur des huiles essentielles des feuilles de (*C.h*) sur la croissance mycélienne des même souches.

Après les testes sur la croissance mycélienne, on a mis en évidence un test d'efficacité d'extrait vis-à-vis le poids mycélien dans un milieu liquide « YES » de la souche : *A.flavus*. Nos résultats illustrent une diminution du poids mycélien corroborent avec de ceux de **Haddouchi et al., (2009)** qui ont noté que la diminution du poids mycélien est sous l'action conjuguée entre l'effet nutritif du milieu de culture et l'action antifongique.

De ce fait, l'effet antifongique est proportionnel à la concentration d'extraits de la plante dans le milieu. Selon **Degryse et al (2008)**, le degré d'activité antimicrobienne est proportionnel à la concentration en extrait de plante.

Du point de vue mycotoxicologiques, la détection visuelle de la souche *A. flavus* testée et cultivé sur milieu CEA a révélé une fluorescence bleu des colonies pour l'espèce testée alors nos résultats sont similaires avec ceux de **Lemke, Davis et al., (1989)** qui ont confirmé que l'*A. flavus* est une espèce sécrétrices de mycotoxine est cela par la fluorescence visible sous la lumière UV (365nm).

Par la suite, l'extrait méthanolique des graines de (*C.h*) a été rendue non efficace vis-à-vis la sécrétion des aflatoxines à partir de l'*A.flavus* suite à une série d'analyse par la CCM.

Concernant l'activité antifongique de l'HE vis-à-vis les trois souches de *Candida albicans* a été rendue efficace avec des CMI égaux aux CMF qui sont de l'ordre de 0.78µg/ml pour *Candida albicans* ATCC10231 , 3.12 µg/ml pour *Candida albicans* IP444 et 6.25 µg/ml pour *Candida albicans* ATCC26790 . Autrement. Nos résultats sont en concordance avec ceux de **Hasnaoui et al ., (2014b)** qui ont décelé cette activité à des CMI=<250µl/ml au sein des mêmes souches par huile essentielle des feuilles de (*C.h*).

Dans le même contexte, la détermination des paramètres d'inhibition (CMI, CMF) nous a permis non seulement de confirmer, quantifier, et comparer les activités mais aussi de caractériser la nature de l'effet révélé par un extrais sur un microorganisme donné (**Biyiti et al., 2004**)

L'activité de l'extrait d'une plante dépend de sa composition chimique (la nature des groupes fonctionnels porté par des composés majoritaires) et aussi des proportions de ces différents composants (**Degryse et al.,2008**).

D'une manière générale, la diminution de la croissance en présence de l'extrait comparé au témoin pourrait s'expliquer par la présence dans ces extraits des composés terpéniques à activité antifongique ( **Tatsadjieu, 2003**).

Contre les champignons, les phénols des extraits des plantes provoquent plusieurs dégâts tels que des perturbations morphologiques des hyphes mycéliens, la rupture de la membrane plasmique et l'altération de la structure des mitochondries (**Arras et al., 2001 ; De Billerbeck et al., 2001**). De ce fait, le mécanisme de la toxicité des phénols envers les champignons est basé sur l'inactivation des enzymes fongiques qui contiennent le groupement SH dans leur site actif (**Celimene et al., 1999 ; Cowan, 1999**). Les composants phénoliques agissent aussi en se fixant sur les groupes amine et hydroxylamine des protéines membranaires microbiennes provoquant l'altération de la perméabilité et la fuite des constituants intracellulaires (**Juven et al., 1994; Lopez-Malo et al., 2005**).

Les plantes aromatiques et médicinales possèdent un système de défense naturelle très efficace, se trouve dans certaines substances chimiques bioactives, l'activité antimicrobienne des extraits dépend non seulement des composés phénoliques mais, aussi de la présence de différents métabolites secondaires comme les flavonoïdes, les tanins, les stérols et stéroïdes...etc.

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail dont le but principal est d'essayer d'évaluer les activités antimicrobiennes, antifongiques et antitoxinogénique de l'extrait brut méthanolique des graines de *chamaerops humilis L.*

La préparation de l'extrait à partir des graines de (*C.h*) a été effectuée par le solvant qui est le méthanol. Cette extraction a permis d'obtenir un extrait brut, avec un rendement de 2,7%.

Les résultats obtenus de ce présent travail démontrent que l'extrait brut méthanolique des graines de *Chamaerops humilis* a pu inhibée la croissance de *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus.flavus* et *Cladosporium.sp.*

Cependant, L'extrait brut méthanolique a exercé un effet antifongique vis-à-vis : *Candida albicans ATCC26790*, *Candida albicans IP 444*, *Candida albicans ATCC10231*

Par ailleurs, les résultats mycotoxicologiques; ont révélé la présence de l'AFB1 produites par l'*A.flavu*; d'où l'extrait brut méthanolique n'a prouvée aucune inhibition de la sécrétion de ces mycotoxines.

Concernant les résultats de Screening phytochimiques ont été réalisés sur différents extraits préparés à partir des graines de (*C.h*), montrent la présence des: Tanins, Flavonoïdes, les anthocyanides, les composés réducteurs, terpénoïdes stérols

## VI. Conclusion :

Le but de cette étude était de valoriser la flore locale d'intérêt thérapeutique. A cet effet nous nous sommes intéressés à l'extrait des graines de *Chamaerops humilis* plante médicinale très sollicitées en médecine traditionnelle, en vue d'inhiber *in vitro* une flore fongique toxigène productrice de mycotoxines ; Il a aussi été question d'évaluer *in vitro* l'impact thérapeutique voir régulateur de l'extrait méthylique sur la toxicité de ces molécules fongiques (Aflatoxine B et G).

La première partie de ce travail a été consacrée à la caractérisation des l'extrait des graines de (*C.h*) aux moyens de détermination phytochimique. L'expertise par ces moyens a démontré la présence de cet extrait en tanins, flavonoïdes, anthocyanes, coumarines, stéroïls et triterpènes et composés réducteurs.

Dans un second temps, l'étude *in vitro* du pouvoir antibactérien de l'extrait de (*C.h*) a montré un effet inhibiteur important vis-à-vis dix souches bactériennes testées (Gram positives et négatives).

Dans un troisième temps, nous avons évalué *in vitro* l'activité antifongique de l'extrait sur une flore fongique toxigène *A.flavus* , par deux méthodes – évaluation de la croissance radiale sur milieu solide et la quantification de la biomasse sur milieu liquide ; A ce propos, et à la lumière des résultats parvenus par cette étude, on peut conclure que l'extrait répond approximativement à la problématique posée. En effet, l'extrait a exercé un retard de croissance sur les champignons étudiés(*A.niger*, *R.stolonifer*, *A.flavus* et *Cladosporium.sp*. Ce retard a été plus marqué sur *Cladosporium.sp* qu'*A.niger*.

Par ailleurs, nous devons signaler que l'évaluation de l'effet antixinogénique n'a pas fourni des résultats anti-aflatoxinogénique.

Notons aussi que l'extrait de cette plante a illustré une très grande efficacité vis-à-vis des trois souches de *Candida albicans*.

En conclusion, la valorisation de cet extrait méthanolique permet tout à fait d'envisager une application dans les domaines de lutte antimicrobienne et thérapeutique pour moduler l'impact néfaste des molécules microbiennes toxiques.

En fin, les résultats obtenus ne constituent qu'une première étape de recherche de l'activité anti bactérienne et antifongique de cet extrait testé, des études ultérieures

devront être mené pour affirmer ou infirmer les performances mises en évidence. Un travail important reste à mener concernant l'étude des fractions de cet extrait. Il est conseillé de multiplier les recherches *in vivo* par des études histologiques, de réaliser des études sur culture cellulaire pour mieux affiner l'effet de ces extraits et de leurs fractions.

**Abderrazak M. et Joël R.** La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. **2007**. pp 177.

**Adam F., Abert-Vian M., Peltier G., Chemat F. (2012)** “Solvent-free” Ultrasound-Assisted Extraction of Lipids from Fresh Microalgae Cells: A Green, Clean and Scalable process, *Bioresource Technology*, 114, 457-465.

**AFIF CHAOUCHE Thanina** ; Etude ethno-pharmacologique et évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de quelques plantes médicinales de la région de Tizi Ouzou – Algérie, thèse de doctorat, FACULTE DES SCIENCES UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN.**2015**

**Akharaiyi F.C., and Boboye B., J. Nat. Prod. (3) (2010) 27-34.**

**Allali H, Benmehdi H, Dib M A, Tabti B, Ghalem S and Benabadji N.** *Asian J Chem* **2008**;20(4): 2701- 2710.

**ANDERSEN O.M. and MARKHAM K.R. (2006).** FLAVONOIDS Chemistry, Biochemistry and Applications. Taylor & Francis. Washington.

**ANEES AHMAD., ABBAS F.M ALKARKHLI., SUFIA HENA., BAZLUL MOBIN SIDDIQUE et KHOO WAI DUR. (2010)**-Optimization of Soxhlet Extraction of Herba Leonuri Using Factorial Design of Experiment. *International journal of chemistry.Environmental Technology Division, School of Industrial Technology. University Sains Malaysia, 11800 Penang, Malaysia.Vol 2, N°1*

**Arif T, Bhosale J D, Kumar N, Mandal T K, Bendre R S, Lavekar S, Dabur R.** Natural products antifungal agents derived from plants. *J Asian Nat Prod Res.* **2009** ; 11, 7 : 626 – 638.

**Ayaidia.B.2011.**Etude comparative de trois variétés d'huiles essentielles de menthe dans la région d'Ouargla, Mémoire de master en génie chimique, Université kasdimarbah ouargla.P :18-36.

**Babar Ali, M., Hahn, E.J., Paek, K.Y.** Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in Panax ginseng Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules.* **2007**, Vol. 12 ; pp 607-621.

**BANSOD SUNITA and RAI MAHENDRA. (2008)**- Antifungal Activity of Essential Oils from Indian Medicinal Plants Against Human Pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger*. Department of Biotechnology, Amravati University, Amravati-444107India. *World Journal of Medical Sciences* 3 (2): 81-88

**Bardeau Fabrice(2009)** les huiles essentielles.découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Santé pratique.Collection dirigée par Alice Machado. Edition Lanore.315p.



**BARDEAU FABRICE. (2009)**- Les huiles essentielles. Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Santé pratique. Collection dirigé par Alice Machado. Editions Lanore, P: 161-162-164.

**BASER K.H.C. AND BUCHBAUER G., 2010.** Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America. 994p

**Béliveau R., Gingras D. (2006).** Les aliments contre le cancer. Édition du Trécarré. Outremont. p.213.

**BEN YAHIA Née BOUAYAD ALAM SAMIRA,** Activités antimicrobiennes et insecticides de *Thymus capitatus*, *Daucus crinitus* et *Tetraclinis articulata* sur la mineuse *Tuta absoluta* (Meyrick) et la microflore pathogène de la tomate *Lycopersicon esculentum*, thèse de doctorat, Faculté des sciences UNIVERSITE ABOU-BAKR BELKAID TLEMCEM, 2015

**BENDINI A., CERRETANI L, CARRASCO-PANCORBO A., ANA MARIA GÓMEZ-CARAVACA A.M., SEGURA-CARRETERO A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ A. and LERCKER G. (2007).** Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Mol.*, 12 : 1679-1719.

**BENMEDDOUR Tarek, LAOUAR Hocine, BENABDI Amira Afaf, BRAHIMI Safa.** EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE ET ANTIFONGIQUES DES EXTRAITS DE TROIS ESPECES DU GENRE *Allium* : *A. cepa*, *fistulosum* ET *sativum* CULTIVEES DANS LE PERIMETRE AGRICOLE DE DOUSSEN (WILAYA DE BISKRA). 2015

**Benmehdi hocine, Siata wahiba, Hasnaoui okkacha .Benali omar, Fellah khadija, Amrouche abdelillah.** The in vitro antioxidant properties of tannins isolated from the fibre of *chamaerops humilis L.* (2014).

**Benmehdi. H, Hasnaoui.O, Benali.O, Salhi.F** Phytochemical investigation of leaves and fruits extracts of *Chamaerops humilis L.* (2012)

**Benzeggouta Naïrouz, 2015.** Evaluation des Effets Biologiques des Extraits Aqueux de Plantes Médicinales Seules et Combinées, Thèse de Doctorat en Sciences Option : Pharmaco-Chimie

**Bermúdez-Aguirre D., Barbosa-Cánovas G.V. (2011)** Power Ultrasound to Process Dairy Products. In: Feng H., Barbosa-Cánovas G.V., Weiss J. (Eds.) *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing.* Springer. p445-465.

**Biyiti L F, Meko'oDJ L, Tamzs V, Amvam Zollo P H.2004.** Recherche de l'activité antibactériennes de quatre plantes Médicinales camerounnaises. *Pharm.Méd.Trad.Afr.* Cameroun: p11-13.

**Blanc P., Goma G.** Valorisations non alimentaires de productions agricoles par voie biologique. In : COLONNA P. La chimie verte. Lavoisier, (2006) : 79-98.

**Bnouham M., Mekhfi H., Legssyer A., Ziyyat A (2002) 33-50.** , Int J Diabetes & Metabolism 10

**Both S., Chemat F., Strube J. (2014)** Extraction of Polyphenols from Black Tea -

**Bougandoura et Bendimerad. 2012.** EFFET ANTIFONGIQUE DES EXTRAITS AQUEUX ET METHANOLIQUE DE Satureja calaminthassp.(Nepeta) briq. Laboratoire des Produits Naturels, Université Abou Bakr Belkaid, BP 119, Tlemcen 13000, Algérie

**BOUGANDOURA Nabila , BENDIMERAD Nassima,** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de Satureja calamintha ssp.Nepeta(L.) Briq, (2012)

**BOUGANDOURA Nabila , BENDIMERAD Nassima,** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de Satureja calamintha ssp.Nepeta(L.) Briq, (2012)

**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.** Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian Thymus capitatus Hoff.et Link. Food Chemistry; 2007, Vol. 105; pp 146-155.

**Bousbia (Nj, 2004-** Extraction et identification de quelques huiles essentielles (Nigelle, Coriandre, Origan, Thym, Romarin). Etude de leur activité antibactérienne. Option Science alimentaire, INA. Algérie.

**BOZ I., BURZO I., ZAMFIRACHE M.M., TOMA C. AND PADURARIU C., 2009.** Glandular trichomes and essential oil composition of Thymus pannonicus All. (Lamiaceae). Analel Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie, pp.36-39.

**BRUNETON J., 1999.** Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. Tec. & Doc. Lavoisier 3ème édition, Paris.

**Bruneton, J.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4ème ed. Paris: Tec & Doc Lavoisier, 2009.

**CATIER ODILE et ROUX DANIELLE. (2007)-** Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. Cahier du préparateur en pharmacie, P:13-14-15.

**Catier, O., Roux, D.** Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie : Cahiers du préparateur en pharmacie. 3ème ed. France : Wolters Kluwer, 2007

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

**CHARPENTIER BRIGITTE; HAMON-LORLÉAC'H FLORENCE; HARLAY ALAIN; HUARD ALAIN; RIDOUX LIONEL et CHANSELLÉ SERGE. (2008)**- Guide du préparateur en pharmacie. Toutes les matières du programme. Cours détaillés et complets. Entraînement aux épreuves. Préparation à l'épreuve pratique. 3eme édition. Editions Elsevier Masson, 1358p.

**Chavéron H.**, Molécules toxiques. Dans « Introduction à la toxicologie nutritionnelle », TEC & DOC, Lavoisier, Paris, **1999**, pp. 98.

**Chemat F., Huma Z.E., Khan M.K. (2011)** Applications of Ultrasound in Food Technology: Processing, Preservation and Extraction, Ultrasonics Sonochemistry, 18, 813-835.

**CHIKHI ILYAS ; COMPOSITION CHIMIQUE ET ACTIVITES BIOLOGIQUES DES EXTRAITS DE CINQ PLANTES AROMATIQUES ET MEDICINALES DE L'OUEST D'ALGERIE**, thèse de doctorat FACULTE DES SCIENCES UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN.(**2014**)

**CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2006)** Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Ninth Edition (M2-A9). 26 (1)

**CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard M27-A2, 2nd ed. Clinical a **Schwalbe R., Steele-Moore L., Goodwin A.C.**, Antimicrobial susceptibility testing protocols Ed.Goodwin Boca Raton: CRC Press, 2007, pp.75–79.nd Laboratory Standards Institute, Villanova, PA, Vol. 22, Issue: 15, **2002**.

**Collin, S., Crouzet, J. Polyphénols et procédés :** Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire. Paris : Tec & Doc Lavoisier, **2011**

**Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2006).** Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd.

**CROZIER, A., I.B. JAGANATH AND M.N. CLIFFORD (2009).** Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health.Nat. Prod. Rep., 26:1001-1043.

**da Rocha, J.C., Gomes, J.A.P., D'Elia, E.,Corros. Sci. 52(2010)2341–2348.**

**Debray M, Jacquemin H, Razafindrambo R.** Travaux et documents de l'Orstom. (Paris, N°8). **1971**

**Degryse A. C., Delfa I et Voinier M. A. (2008).** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique. 94, 8-11.

**DEGRYSE A.C., DELPLA I. & VOINIER M.A., 2008.** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Atelier santé environnement-IGS- EHESP, 87p.

**Djennane (D.), Meddahi (A.) et Roncales (P.), 2006-** Les systèmes antioxydants et antimicrobien pour la conservation de la viande. *Sciences des aliments*.26 : 37-73.

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

**Dorante (L.), Colmenro (Rj, Hernandez (H.), MOTA (L.), Jaramillo (M.E.), Fernandez(E.) et Solano (C.), 2000-** Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extract. *International Journal Food Microbiology*. 57: 125-128.

**DOUMBOUYA MOHAMED., ABO KOUABENAN. LEPENGUE. NICAISE A., CAMARA BRAHIMA ., KANKO KOFFI .,AIDARA DAOUDA et KONE DAOUDA. (2012)-**Activités comparées in vitro de deux fongicides de synthèse et de deux huiles essentielles, sur des champignons telluriques des culture smaraîchères en Côte d'Ivoire. *J. Appl. Biosci.* P 3523-3530.

**Dransfield J., Beentje H.,** " The palms of Madagascar. Royal Botanic Gardens, Kew and The International Palm Society", United Kingdom (**1995**).

**Edris A. E. (2007).** Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytotherapy Research*. 21: 308 -323.

**El Haib.A.2011.**Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques, Thèse de doctorat en chimie organique et catalyse, Université Toulouse - Paul Sabatier.P :6-25.

**El Kalamouni C.,** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de M idi-Pyrénées. Doctorat de l'Université de Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse, spécialité : Sciences des Agro ressources, **2010**, pp.107.

**El-Olemy M.M., Al-Muhtadi F.J., Afifi A.A. (1994)** Experimental Phytochemistry. A Laboratory Manual. King Saud University Press, Riyadh, Saudi Arabia.

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

**FANDOHAN P., GBENOU J. D. and GNONLOFIN B. (2004).** Effect of Essential Oils on the Growth of *Fusarium verticilloides* and Fumonisin Contamination in Corn. *J. Agric. Food Chem.*52, pp. 6824-6829.

**Farhat Asma (2010).**Vapo-Diffusion assistée par Micro-ondes :Conception, optimisation et Application. Thèse Docteur en Sciences de L Université d Avignon et des Pays deVaucluse &L Ecole Nationale d Ingénieurs de Gabès.SPECIALITE : Sciences des Procédés, Sciences des Aliments.

**FERDOUSI BEGUM M.S.T. FERDOWSI MAHAL and SHAHIDUL ALAM M.D. (2010)**-Inhibition of spore germination and mycelial growth of three fruit rot pathogens using some chemical fungicides and botanical extracts. *J. Life Earth Sci.*, Vol. 5: 23-27

**Ferhat M.A., Meklati B. Y., Chemat F. (2010)** Citrus d'Algérie, Les Huiles Essentielles et leurs Procédés d'Extractions. O.P.U. Algérie.

**FRAYSSINET C et CAHAGNIER B. (1982)**- Recherché et dosage des toxines dans les grains et graines et produits dérivés : céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux. Paris: technique et documentation (Lavoisier). p. 558-559

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

**Gibbons S.**, Phytochemicals for bacterial resistance-strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Medica*, Vol. 74, Issue: 6, 2008, pp. 594-602.

**Goetz P., Busser C. (2007)** La Phytocosmétologie Thérapeutique. Springer-Verlag France, Paris. p53-54.

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

**Goula A.M. (2013)** Ultrasound-Assisted Extraction of Pomegranate Seed Oil – Kinetic Modeling, *Journal of Food Engineering*, 117, 492-498. *onventional and Ultrasound Assisted Extraction, Ultrasonics Sonochemistry*, 21, 1030-1034.

**GRESELE P., CERLETTI C., GUGLIELMINI G., PIGNATELLI P., DE GAETANO G. and VIOLI F. (2011).** Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update. *J. of Nutr. Biochem.*, 22 : 201–211

**GRESELE P., CERLETTI C., GUGLIELMINI G., PIGNATELLI P., DE GAETANO G. and VIOLI F. (2011).** Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update. *J. of Nutr. Biochem.*, 22 : 201–211.

**GROSJEAN NELLY. (2008)**- La beauté par les huiles essentielles. ISBN 978-2-212-54076-5, Groupe Eyrolles.

**GUPTA C; GARG A; UNİYAL R and GUPTA S. (2009)**-Comparison of antimicrobial activities of clove oil & its extract on some food borne microbes. Volume 7 Number 1, India. Hall International Editions.

**Guy Roger Kabran, Janat Akhanovna Mamyrbekova-Bekro, Jean-Luc Pirat, Yves-Alain Bekro, Nicolas Sommerer , Arnaud Verbaere, Emmanuelle Meudec ,** *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie J. Soc. Ouest-Afr. Chim.*(2014), 038 : 57 – 63 19ème Année, Décembre 2014

**HADDOUCHI F., LAZOUNI HAMADI A. MEZIANE A et BENMANSOUR A. (2009)-Etude** physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. Laboratoire des Produits Naturels, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaid, B.P. 119, 13000 Tlemcen, Algérie. *Afrique science* 05(2): 246 – 259.

**Halimi A.:** Rapport sur les plantes médicinales d'Algérie. I. U. C. N et A. N. N, Alger; **1997**.

**Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. (2003)** - Antifungal activity of the components of

**Hartmann T., 2007.** From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant

**Hartzfeld .P.W., Forkner R., Hunter .M .D., Hagerman .A .E.(2002).** Determination of Hydrolyzable Tannins (Gallotannins and Ellagitannins) after Reaction with PotassiumIodate. *J.Agric. Food Chem.* 50, 1785-1790.

**Hasnaoui O, Benali O, Bouazza M and Benmehdi H.** *Res J Pharm Biol Chem Sci* **2013**;4(2):910-918.

**Hasnaoui O.,** Contribution à l'étude de *Chamaerops* dans la région de Tlemcen: Aspects Ecologiques et Cartographie, Thèse Doctorat, Université d'Abou Bakr Belkaid, Tlemcen, Algérie (**2008**).

**Hasnaoui O, Benali O, Bouazza M and Benmehdi H** Ethnobotanical approaches and phytochemical analysis of *Chamaerops humilis*L. (Arecaceae) in the area of Tlemcen (western Algeria). (**2013**)

**HASNAOUI Okkacha , Bouabdellah GACEMI, Fatima HAMDANE** EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES DU PALMIER NAIN (*CHAMAEROPS HUMILIS* L.) ET CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LEUR EFFET ANTIBACTERIEN SUR CERTAINES SOUCHES PATHOGENES , Le 2ème Séminaire International sur les Plantes Médicinales SIPM'2 (**2011**).

**HASNAOUI Okkacha, ADLI Djallal Eddine Houari, HALLA Nouredine, KAHLOULA Khaled (2014).** Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles de *Chamaerops humilis*L. sur des souches isolées des silos de stockage

**Hasnaoui, O., Bouazza, M., Benali, O., Thinon, M., Agricul. J.6 (2011)1.Gaamoussi, F., Israili, ZH., Lyoussi, B., Pak. J. Pharm. Sci., 23(2) (2010) 212.**

**Hazwan Hussin M., Jain Kassim M., Hazwan Hussin M., Jain Kassim M., Materials** 125 (**2011**) 461–468

**Hellal Zohra (2010-2011).**Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et anti oxydantes de certaines huiles essentielles des citrus.Application sur la sardine (*sardinepilchardus*). Mémoire pour l'obtention du diplome de magister en Biologie, Option:Biochimie Appliqué et Biotechnologies. Département des sciences biologique, Faculté des sciences

**Hellal Zohra, (2011).** Contribution à l'étude des propriétés antibatériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extradites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardine pilchardus*). Mémoire magister option ; Biochimie Appliquée et Biotechnologies. Université Mouloud Mammeri De Tizi-ouzou

**Hopkins, W. G.** Physiologie végétale. 1ère ed. Bruxelles : De Boeck & Larcier s. a., **2003**.

**Ihsanullah.Daur.2013.**Chemical composition of selected Saudi medicinal plants,Arabian Journal of Chemistry.

**Jenis J., Burasheva G.S., Aisa H.A., Hang B.A., Abilov Z.A.,** Volatile Constituents from *Atriplex tatarica*, Natural Product Research and Development, **2010**, Vol. 22, Issue: 6, pp. 1040-1 044.

**Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P.** Botanique systématique : Une perspective phylogénétique. 1ère ed. Paris : De Boeck Supérieur, **2002**.

**Kardong D., Upadhyaya S., Saikia L.R. (2013)** Screening of phytochemicals, antioxidant and antibacterial activity of crude extract of *Pteridium aquilinum*Kuhn, Journal of Pharmacy Research, 6, 179-182.

**Khey, A. Ouabbou, K. Selmaoui, A. Ouazzani Touhami, R. Benkirane et A. Douira.,** CHAMAEROPS HUMILIS, UN NOUVEL HÔTE DE PESTALOTIOPSIS CRUENTA (KLEB.)STERYAERT AU MAROC Laboratoire de Botanique et de Protection des Plantes, U.F.R. de Mycologie, Faculté des Sciences, B.P. 133, Université Ibn Tofaïl, Kénitra, Maroc **(2013)**

**KHOLKHAL Fatima. (2014)** Etude Phytochimique et Activité Antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *euciliatus*, Thèse de Doctorat en Biologie Option: Produits naturels, Aspects nutritionnels et Activités Biologiques

**Khoudali S. , D. Benmessaoud left, A. Essaqui, M. Zertoubi, M. Azzi, M. Benaissa.,** Étude de l'activité antioxydante et de l'acti on anti corrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (*Chamaerops humilis* L.) du Maroc **(2014)**

**König G. M., Wright A. D., Franeblau S. G., Planta Medica(2000),** 66, 337-342.

**Kpodekon.T.M, Boko.C.K, Mainil.J.G, Farougou.F, Sessou.Ph, Yehouenou.B,Gbenou.J, Duprez.N.J, Marjorie and Bardiau.2013.** Composition chimique et test d'efficacité in vitro des huiles essentielles extraites de feuilles fraîches du basilic commun (*Ocimum basilicum*) et du basilic tropical(*Ocimum gratissimum*) sur *Salmonella enterica* sérotype Oakland et *Salmonella enterica* sérotype Legon. J. Soc.Ouest-Afr. Chim. 035 ; 41 - 48.(Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie).

**Kraft K., Hobbs C. (2004)** Pocket Guide to Herbal Medicine. Thieme, Stuttgart, New York. p16.

**Krief, S.** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : Surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de Doctorat. Gif-sur-Yvette: MNHN, **2003**

**KSOURI, R., MEGDICHE, W., DEBEZ, A., FALLEH, H., GRIGNON, C., ABDELLY. C. (2007).** Salinity effects on polyphenol content and antioxidantactivities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant. Physiol Bioch*, 45:244-249.

**Kuda (T.), Iwai (A.) et Yanot (T.), 2004 -** Effect of red pepper *Capsium annum* var. *Conidies* and garlic *Allium sativum* on plasma lipid level and cecal microflora in mice fed beef tallow. *Food Chemistry Toxxicology*, 42: 1695-1700.

**Kumar U., Kumar B., Bhandari A., Kumar Y. (2010)** Phytochemical investigation and comparison of antimicrobial screening of clove and cardamom. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1, 138-147.

**LAU E.V; GAN S and NG H.K.(2010)-** Extraction Techniques for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils. Faculty of Engineering, The University of Nottingham Malaysia Campus, Jalan Broga, Semenyih, Selangor Darul Ehsan 43500, Malaysia. Corporation International Journal of Analytical Chemistry, Article ID 398381. Editor: Peter S. Haglund 9 p

**Leonelli C., Veronesi P., Cravotto G. (2013)** Microwave-Assisted Extraction: An Introduction to Dielectric Heating. In: Chemat F., Cravotto G. (Eds.), *Microwave assistedExtraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*. Springer. p1-14

**LEONG LP. And SHUI G. (2002).** An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.*, 76: 69-75.

**Lutge U., Kluge M., Bauer G.** Botanique 3ème Ed : Technique et documentation. Lavoisier .Paris. **2002**, pp 211.

**Macheix .J. J., Fleuriet .A et Jay–Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. P 4-5

**MACHEIX J.J., FLEURIET A. and P. SARNI-MANCHADO (2006).** Composés phénoliques dans la plante - Structure, biosynthèse, répartition et rôles. Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier, Paris.

**Madaoui Kh, Medjadji N,** "Contribution à l ' effet antioxydant de deux plantes médicinales locales", Thèse de doctorat , Faculté des sciences, Université de Hassiba Ben Bouali-Chlef, **2014**.

**MEDJATI Nadjat,** Contribution à l'étude biologique et phytoécologique du *Chamaerops humilis* L., dans la partie occidentale de l'Algérie. Thèse de doctorat (**2014**), Faculté des Sciences UNIVERSITE ABOUBAKR BELKAÏD – TLEMCEM.



Melaleuca alternifolia (tea tree) oil. - J. Appl. Microbiol., 95(4), 853-860

**MIDDLETON, E., KANDASWAMI, C. and THEOHARIDES, T.C. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev.*, 52: 673-839.

**MM. Robinson, X. Zhang.** World Health Organization. Geneva (2011) **Abayomi S,** "plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique", Edition Karthala (1<sup>er</sup> édition), Ibadan, Nigeria, **2010.**

**MOHAMMEDI Z., 2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse magistère, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, 155p.

**Moss, G. P.** Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry*, **2000**, vol. 72, n° 8, pp. 1493-1523.

**Nahrstedt A and Butterwick V.** *Pharmacopsychiatry* **1997**; 30(2): 129-134

**NIJVELDT R. J., NOOD E., HOORN D. E., BOELENS P.G., NORREN K. and LEEUWEN, P. (2001).** Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am.J. Clin Nutr.*, 74: 418–425.

**OUIBRAHIM Amira.2015.** Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis* L., *Ocimum basilicum* L. et *Rosmarinus officinalis* L.) de l'Est Algérien, thèse de doctorat UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA .

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

**Penchev P.I. (2010)** Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, France.

**pereira R. C., P. Da Gama B. A., Teixeira V. L., Yoneshigue-valentin Y. Y., Braz. J. Bio. (2003),** 63, (4), 667-672.

**Peronny S.(2005)** La perception gustative et la consommation des tannins chez le maki (*Lemur catta*). Thèse de doctorat, 151p.

**PIBIRI M.C. (2005)-** Thèse de science : Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, Suisse. 161 p.

**Pierangeli G., Vital G., Windell Rivera L., J. Medic. Plants Res. 3 (7) (2009) 511.**

**Pierron.C.2014.** Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France : exemples d'applications en gériatrie-gérontologie et soins palliatifs, Thèse de doctorat en pharmacie, Université de lorraine. P :19-30

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

**PULIDO R., BRAVO L., and SAURA-CALIXTO F. (2000).** Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem.*, 48 (8) : 3396-402.

**Quezel P. & Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales : 2, C.N.R.S., Paris : 571-1091. *Research*, 6, 179-182.

**RIBEREAU-GAYON P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod, Paris, pp 254.

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

**Roberts, M. F., Wink, M. Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications.** New York: Plenum Press, **1998**.

**Sarni-Manchado .P et Cheynier .V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. EdLavoisier. p2- 10Secondary metabolism. *Photochemistry* 68: 2831 - 2846.

**Sefidkon (F.), Jalili (A.), Mirhaji (T.) -** Essential oil composition of three *Artemisia spp.* from Iran. - *Flavour Fragr. J.*, **2001**, 17(2), 150-152.

**Senhaji O., Faid M., Elyachioui M., Dehhaoui M. (2005)** Etude de l'activité antifongique de divers extraits de cannelle. *Journal de Mycologie Médicale*, 15, 220-229.

**SOUSA E; CHIAVONE-FILHO O; MORENO M.T; SILVAD N et MARQUES M.A.(2002)-** Experimental Results for the extraction of oil from lippia sodoides chum. Using pressurized carbon Dioxide. *Brazilian journal of chemical Engineering*.19(02). Vol. 19, No. 02, pp. 229 – 241.

**Stöckigt, J., Sheludk, Y., Unger, M., Gerasimenko, I., Warzecha, H., Stöckigt, D.** Highperformance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoreticelectrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of Chromatography A*, **2002**, vol. 967, n° 1, pp. 85-113

**SUTOUR S. (2010)-**Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthes de corse et de kumquats. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de corse. Discipline : chimie organique et analytique, P12-13.

**Talbi. H, Boumaza. A, El-mostafa K, Talbi J , Hilali A.** Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa L.* (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic andaqueous extracts of *Nigella sativa L.*).(2015).

**TAO L. and LAMBERT J.D. (2014).** Polyphenols in the Prevention and Treatment of Vascular and Cardiac Disease, and Cancer. *Polyphenols in Human Health & Disease*, 2 : 1191-1198.

**Tatsadjieu N.L. (2003)-** Etude de l'activité inhibitrice des huiles essentielles de quelques épices et plantes aromatiques du Cameroun sur la croissance et la toxico-génèse des moisissures du genre *Aspergillus*. Thèse Doct. E.N.S. des Scie. Agro-industrielles, 176 p

**TELA BOTANICA., 2013-** *Chamaerops humilis*. Base de Données Nomenclature de la Flore de France par Benoît Bock. BDNFF v4.02 <http://www.tela-botanica.org>.

**Trease E., Evans W.C. Pharmacognosie. Billiare Tindall.** London 13th 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*. **1987**, Vol.4 (3); pp 179-182. Nigeria. ISSN 1682-4474

**Trease E., Evans W.C. Pharmacognosie. Billiare Tindall.** London 13th 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*. **1987**, Vol.4 (3); pp 179-182. Nigeria. ISSN 1682-4474

**Tsimogiannins, D.I., Oreopoulou, V. (2006).** The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat Food Sci Emerg Tech*, 7: 140-146.

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

**WANG S.Y., CHEN P.F., CHANG S.T. (2005).** Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology* 96, pp. 813- 818.

**Wang L., Weller C.L. (2006)** Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants, *Trends in Food Science and Technology*, 17, 300-312.

**Wilfred .V et Ralph .N. (2006).** *Phenolic compound biochemistry* Ed Springer .USA. 24p.

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

**YAO L.H., JIANG Y.M., SHI J., TOMAS-BARBERAN F.A., DATTA N., SINGANUSONG R. and CHEN S.S. (2004).** Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr*, 59: 113-122.

**Zenk, M. H., Juenger, M.** Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry*, **2007**, vol. 68, n° (22-24), pp. 2757-2772.

**Zhiri (A.), 2006-** *Aromatherapie*. Natranuws. Ed : Fondation libre choix: 2-16.

**Annexe : Composition des milieux de culture.****PDA (Potatoes Dextrose agar)**

Eplucher, laver et couper en petits morceaux 200 g de pomme de terre, les mettre dans 700 ml d'eau distillée et porter à ébullition, après filtrer et compléter à 1 litre.

<b>Dextrose (ou saccharose).....</b>	<b>10 g</b>
<b>Agar.....</b>	<b>20 g</b>
<b>Eau distillée.....</b>	<b>1000 ml</b>

**YES (Yeast Extract Sucrose)**

<b>Dextrose (ou saccharose).....</b>	<b>40 g</b>
<b>Extrait de Levure.....</b>	<b>20 g</b>
<b>Eau distillée.....</b>	<b>1000 ml</b>

**Eau physiologique**

<b>Na Cl.....</b>	<b>9 g</b>
<b>Eau distillée.....</b>	<b>1000 ml</b>

**Mueller-Hinton**

<b>Infusion de viande de bœuf.....</b>	<b>02,0g</b>
<b>Hydrolysate acide de caséine.....</b>	<b>17.5g</b>
<b>Amidon.....</b>	<b>01.5g</b>
<b>Agar .....</b>	<b>10g</b>
<b>Eau distillée.....</b>	<b>1000ml</b>

**PH : 7.4**

**Gélose nutritive**

<b>Extrait de levure.....</b>	<b>2 g</b>
<b>Extrait de viande.....</b>	<b>10g</b>
<b>Peptone.....</b>	<b>5 g</b>
<b>Glucose.....</b>	<b>20 g</b>
<b>Nacl.....</b>	<b>5g</b>

---

Eau distillée.....	1000 ml
Agar agar.....	20g

**Sabouraud (BS)**

D.Glucose.....	20 g
Peptone.....	10 g
Extrait de levure.....	3g
Agar agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml
<b>Ph= 5.8 ± 0.2</b>	

**Bouillon nutritif**

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