

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA-BEJAIA
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie



Mémoire

Présenté Par

Mr **BOUSSAA Abdelhalim**
Pour l'obtention du diplôme de Magister

Filière : Biologie

Option : Microbiologie Appliquée aux Substances Antimicrobiennes

Thème

Séparation des composés phénoliques de *Pulicaria odora* par chromatographie et étude de leurs activités antimicrobiennes

Soutenu le : 23/06/2013

Devant le jury composé de :

Mr. BENALLAOUA Said	Professeur	UAM Bejaia	Président
M ^{me} BEDJOU Fatiha	Professeur	UAM Bejaia	Rapporteur
Mr TOUATI Abdelaziz	Professeur	UAM Bejaia	Examineur
M ^{me} BENABDESSLAM Fadila	Professeur	UAM Bejaia	Examinatrice
M ^{me} OUKIL Naima	M.C.B	UAM Bejaia	Invitée

Année Universitaire : 2012/2013

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

Mes remerciements s'adresse en premier lieu à Mme Bedjou Fatiha membre du laboratoire de biotechnologie végétale et ethnobotanique pour avoir accepté de superviser ce travail ; mais également pour la confiance qu'il m'a témoignée et la liberté qu'il m'a accordée tant dans le choix du sujet que dans la prise d'initiatives. Qu'il reçoive l'expression de ma vive gratitude.

Je souhaite remercier également Mme Oukil Naima pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie Mr Benallaoua Saïd professeur à l'université A.M de Béjaïa qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

Egalement, je remercie les membres de jury ; Mr Touati Abdelaziz maître de conférences A à l'université A.M. de Béjaïa et Mme Benabdesslam Fadila maître de conférences A à l'université A.M. de Béjaïa, pour le temps qu'ils ont bien voulu consacrer à lire et à juger ce travail en tant qu'examineurs.

Je remercie Mme Oukil Naima maître de conférences B à l'université A.M. de Béjaïa qui a bien voulu apporter une appréciation à ce mémoire et être parmi les membres du jury.

Je remercie Mr Idoui Tayeb professeur à l'université de Jijel pour me permettre de faire une analyse par HPLC.

Je remercie également Mme Makhlouf Hassina responsable de la P.G de la FSNV ainsi que tous mes collègues de l'université A.M. pour l'aide qu'ils m'ont apportée et leur soutien pendant ces deux années de formation.

Il m'est particulièrement agréable d'exprimer mes remerciements au Dr Touati, chef de Département de microbiologie pour m'avoir procuré leur aide matériel.

Ma profonde reconnaissance à Mr Bensaid et Mlle Bouktite pour leurs précieuses formations en analyse des données et techniques d'analyses biologiques.

Un immense merci également aux ingénieurs de laboratoire dont je citerai, Mme Guechtal, Mme Azil, Mme Galloul, Mlle Belhadi, Mr Bouchenoua, Mr Amrouche, Mme Rahmani, Mme Kharbachi (université de Béjaïa), Bouhali Souhila, Mme Roula Massikaet et Wasina (Université de Jijel).

Mes grands remerciements s'adressent à Boucheffa Karima, Guellel Drifa et Aroune Nadia.

Je fini par remercier toute personne que je n'ai pas cité, ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

CGP: Chromatography en phase gazeuse.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography.

UV: Ultra-violet.

DI: Diamètre Interne.

ϵ : coefficient d'absorption molaire.

RMN : Résonance magnétique nucléaire.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

DCVC: Dry column vacuum chromatography.

R_f : Rapport frontale.

mg Eq AG : milligramme équivalent l'Acide gallique.

mg EQ : milligramme équivalent la quercétine.

DMSO : Diméthyle sulfoxyde.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

CMB : Concentrations minimales bactéricides.

CMF : Concentrations minimales fongicides.

HSD: Honestly significant difference.

Liste des tableaux

Tableau I : Taxonomie de <i>Pulicaria odora</i>	5
Tableau II : Composition de l'huile essentielle de <i>Pulicaria odora</i>	9
Tableau III: Gradient descendant du système d'élution	37
Tableau IV: Résultats de l'activité antibactérienne des différents extraits de <i>Pulicaria odora</i>	42
Tableau V: Résultats de l'activité antifongique des différents extraits de <i>Pulicaria odora</i>	44
Tableau VI: Les concentrations minimales inhibitrices, bactéricides et fongicides de l'extract éthanolique à 100% de <i>Pulicaria odora</i> .	45
Tableau VII: Résultats de la séparation des composés phénoliques de <i>Pulicaria odora</i> par CCM	47
Tableau VIII: Activité antibactérienne des fractions récupérées par chromatographie sous vide sur colonne sèche, de l'extract de <i>Pulicaria odora</i>	49
Tableau IX: Identification de quelques composés phénoliques de <i>Pulicaria odora</i> , en utilisant des standards	50
Tableau X : Résultats de l'analyse par HPLC de la fraction active I	51
Tableau XI : Résultats de l'analyse par HPLC de la fraction active II	51
Tableau XII : Résultats de l'analyse par HPLC de la fraction active III	51
Tableau XIII : Résultats de l'analyse par HPLC de la fraction active IV	51
Tableau XIV: Lignes directrices sur les paramètres de taille et volume pour la chromatographie	Annexe I
Tableau XV : Résultats du rendement d'extraction	Annexe II
Tableau XVI : Résultats du dosage des polyphénols totaux	Annexe II
Tableau XVII : Résultats du dosage des flavonoïdes	Annexe II
Tableau XVIII : Résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de <i>E.coli</i>	Annexe II
Tableau XIX : Résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de <i>P.aeruginosa</i>	Annexe II
Tableau XX : Résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de <i>S.aureus</i>	Annexe II
Tableau XXI : Résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de <i>L.innocua</i>	Annexe II
Tableau XXII : Résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de <i>A.flavus</i>	Annexe II
Tableau XXIII : Résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de <i>A.niger</i>	Annexe II
Tableau XXIV: Résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de <i>T.reesei</i>	Annexe II

Liste des figures

Figure 1 : Capitule avec bractées	3
Figure 2 : Type d'inflorescence de la famille des Astéracées	4
Figure 3 : <i>Pulicaria odora</i>	5
Figure 4 : Structure du 2-isopropyl-4-méthyl et de l'acide isobutyrique-2-isopropyl-4-méthyl-phénylester, isolés à partir de l'huile essentielle de <i>Pulicaria odora</i>	8
Figure 5 : Dispositifs de la chromatographie sous vide sur colonne sèche	25
Figure 6 : Photos de <i>Pulicaria odora</i> dans son milieu naturel	27
Figure 7 : Schéma d'extraction des composés phénoliques	28
Figure 8 : Dosage des polyphénols totaux	29
Figure 9 : Schéma du dosage des flavonoïdes	30
Figure 10 : Schéma du test d'activité antimicrobienne	31
Figure 11: Schéma de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)	32
Figure 12: Détermination des concentrations minimales bactéricides CMB et fongicides CMF	32
Figure 13 : Séparation des composés phénoliques par CCM	34
Figure 14 : Dispositif utilisé pour la chromatographie sous vide sur colonne sèche	35
Figure 15 : Tassement de du gel	35
Figure 16: Colonne sèche prête à l'utilisation	36
Figure 17 : Pré-élution de la colonne	37
Figure 18 : Elution des composés phénoliques	38
Figure 19 : Rendement d'extraction des composés phénoliques de <i>Pulicaria odora</i>	38
Figure 20 : Teneur en polyphénols totaux des différents extraits de <i>Pulicaria odora</i>	39
Figure 21 : Teneur en flavonoïdes des différents extraits de <i>Pulicaria odora</i>	41
Figure 22 : Zones d'inhibition de l'extrait éthanolique à 100% de <i>Pulicaria odora</i>	43
Figure 23 : Quelques plaques CCM révélées par UV à 365 nm	48
Figure 24 : Quelques plaques CCM révélées par UV à 254 nm	48
Figure 25: Chromatogramme de la fraction active I	51
Figure 26 : Chromatogramme de la fraction active II	52
Figure 27 : Chromatogramme de la fraction active III	53
Figure 28 : Chromatogramme de la fraction active IV	53
Figure 29 : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux	Annexe III
Figure 30 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes	Annexe III

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

SOMMAIRE

Introductionë ...ë 1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : *Pulicaria odoraë* ë ..3

I. 1. Présentation de la famille Asteraceaeë ..3

I. 2. Description de *Pulicaria odoraë* ë ...4

I. 2. 1. Description botaniqueë ..4

I. 2. 2. Nomenclature et classificationë 5

I. 2. 3. Habitat et répartition géographiqueë .6

I. 2. 4. Utilisation traditionnelleë ..6

I. 3. Substance bioactive de *Pulicaria odoraë* ë ..6

I. 3. 1. Huile essentielles de *Pulicaria odoraë* ë ..7

I. 3. 2. Les flavonoïdes de *Pulicaria odoraë* ë 8

Chapitre II : Activités biologiques des composés phénoliquesë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ..10

II. 1. Rôles biologiques des composés phénoliques dans la planteë ë ë ë ë ë ..ë ë ..10

II. 2. Propriétés pharmacologiques des composés phénoliquesë ë ë ë ë ..ë ë ë ë ë ..10

II. 3. Composés phénoliques et activité antimicrobienneë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ..11

II. 3. 1. Activité antimicrobienne et mode d'äaction des acides phénoliquesë ë ë ë ë ë ë 11

II. 3. 2. Activité antimicrobienne et mode d'äaction des quinonesë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë 12

II. 3. 3. Activité antimicrobienne et mode d'äaction des coumarinesë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë 13

II. 3. 4. Activité antimicrobienne et mode d'äaction des flavonoïdesë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë 14

II. 3. 5. Activité antimicrobienne et mode d'äaction des tanninsë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ...18

Etude expérimentale

Matériel et méthodes

I. Matériel végétalë ..21

I. 1. Collecte de la planteë ..ë 21

I. 2. Préparation de l'échantillonë ..ë 21

II. Extraction des composés phénoliquesë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ..ë ë ë 22

III. Analyse phytochimiqueë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ..ë ë ..23

III. 1. Dosage des polyphénols totauxë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ..ë 23

III. 2. Dosage des flavonoïdesë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ..ë 23

IV. Etude de l'äactivité antimicrobienneë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ..ë 24

IV. 1. Les souches testéesë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ..ë 24

IV. 2. Standardisation des inoculaë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ..ë 24

IV. 3. Tests d'äactivité antimicrobienne..ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ..ë 25

IV. 3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)ë ë ë ë ë ë ..ë 25

IV. 4. Détermination des concentrations minimales bactéricides et fongicidesë ë ë ë ..ë 26

V. Séparation des composés phénoliquesë ë ë ë ..ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ..ë ë 27

V. 1. Détermination du meilleur système de séparation par CCMë ë ë ë ë ë ë ..ë 27

V. 2. Chromatographie sur sous vide colonne sèche	28
V. 2. 1. Préparation de la colonne	28
V. 2. 2. Application de l'échantillon	30
V. 2. 3. Préparation de la phase mobile	31
V. 3. Analyse des fractions actives par HPLC	32
VI. Analyses statistiques	32

Résultats et discussion

I. Rendement de l'extraction des composés phénoliques	33
II. Analyse phytochimique	34
II. 1. Dosage des polyphénols totaux	34
II. 2. Dosage des flavonoïdes	35
III. Etude de l'activité antimicrobienne	37
II. 1. Etude de l'activité antibactérienne	37
III. 2. Etude de l'activité antifongique	39
III.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices, bactéricides et fongicides	40
IV. Séparation des composés phénoliques	42
IV. 1. Détermination du meilleur système de séparation par CCM	42
IV. 2. Chromatographie sous vide sur colonne sèche	43
IV. 3. Analyse des fractions actives par HPLC	45
IV. 3. 1. Le chromatogramme de la fraction active I	46
IV. 3. 2. Le chromatogramme de la fraction active II	47
IV. 3. 3. Le chromatogramme de la fraction active III	48
IV. 3. 4. Le chromatogramme de la fraction active IV	49
Conclusion	52
Références bibliographiques	55

Annexes

INTRODUCTION

La maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale.

Cependant, il y a une préoccupation concernant les effets indésirables des molécules synthétiques destinées à la lutte contre les infections bactériennes. Il semble donc important de trouver une alternative à l'utilisation des antibiotiques classiques.

Les remèdes à base de plantes constituent une alternative dans les systèmes de soins primaires et donc, une voie prometteuse pour le développement des médicaments utilisés traditionnellement et améliorés. Pour en faire des molécules utilisables en thérapeutique (**Al-Hazimi et Al-khatan, 1992**).

Actuellement, l'intérêt pour les extraits des plantes grandit considérablement, ceci est dû à : la prise de conscience publique, qui va grandissante, à propos de l'abus de l'utilisation anarchique des antibiotiques qui induit à l'apparition rapide de résistance, les effets indésirables vis-à-vis de certains produits synthétiques, le coût élevé des nouvelles générations d'antibiotiques, la pollution environnementale due à la non biodégradation des substances synthétiques comparées aux substances naturelles (**El-Seedi et al., 2013**).

Notre travail est consacré à une plante médicinale locale *Pulicaria odora*, utilisée traditionnellement par la population maghrébine pour soulager certaines affections (plaies, blessures, ulcère gastrique).

Plusieurs activités biologiques ont été rapportées de quelques espèces du genre *Pulicaria*, tel que la cytotoxicité de *Pulicaria crispa* et *Pulicaria orientalis* (**Al-Yahya et al., 1988; Awadh et al., 2001**), activité antibactérienne de *Pulicaria undulata* et *Pulicaria dysenterica* (**El-Kamali et al., 1998; Bahman et al., 2002**), activité antispasmodique de *Pulicaria glutinosa* (**Tanira et al., 1996**), et l'effet antihistaminique de *Pulicaria dysenterica* (**Mahfouz et al., 1973**). Ainsi que deux études sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pulicaria odora* (**Ezoubeiri et al., 2005; Hanbali et al., 2005**).

Ce travail et la première étude consacrée pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des composés phénoliques de *Pulicaria odora*.

Ce mémoire s'articule en deux parties :

La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique contenant trois chapitres, dont le premier décrit le matériel végétal étudié à savoir *Pulicaria odora*, son utilisation et sa composition.

Le deuxième chapitre explique les différentes activités biologiques des composés phénoliques.

Le troisième chapitre est consacré aux techniques de séparation des composés phénoliques qui sont utilisés au cours notre étude.

La deuxième partie est consacrée à une étude expérimentale divisée en trois parties :

La première est l'analyse phytochimique qui s'intéresse à la détermination des taux des polyphénols totaux et des flavonoïdes.

La deuxième partie est consacrée à l'estimation de l'activité antimicrobienne avec la détermination des CMI, CMB et CMF.

La troisième partie est consacrée à la séparation des composés phénoliques par CCM, puis sur colonne sèche sous vide, avec une analyse par RP-HPLC des fractions actives.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPTER I

Zulicaria odora

Chapitre I : *Pulicaria odora*

Pulicaria est un genre appartenant à la famille des Astéracées, contenant plus de 77 espèces à travers le monde (Algabr et al., 2012). De manière générale, ce genre n'est pas homogène du point de vue chimique. Toutefois, les sesquiterpènes et les flavonoïdes sont les produits les plus communs chez les espèces de *Pulicaria* déjà étudiées (Al-Hazimi et Al-khathlan, 1992).

I. 1. Présentation de la famille Asteraceae

Les Astéracées représentent 8 to 10% des espèces d'angiospermes, avec 1600-1700 genres, environ 24000 espèces (Petacci et al., 2012).

Les plantes de la famille des astéracées sont principalement des herbes, vivaces (tubéreuses) ou non, mais aussi des arbustes ou sous-arbrisseaux, parfois des arbres, rarement des plantes aquatiques ou des plantes grimpantes ou des épiphytes (Gaussen et al., 1982). Les feuilles sont alternes, opposées ou basilaires, simples ou composées. Les inflorescences sont en capitule (s), simulant une fleur unique entourée de bractées formant l'involucre (Fig. 1) (Timbal et al., 1989).

Les fleurs sont tubulées actinomorphes ou ligulées zygomorphes (Fig. 2). Elles sont hermaphrodites ou unisexuées. Le calice est réduit avec un réceptacle du capitule nu, ou avec des paillettes entre les fleurs (Timbal et al., 1989).

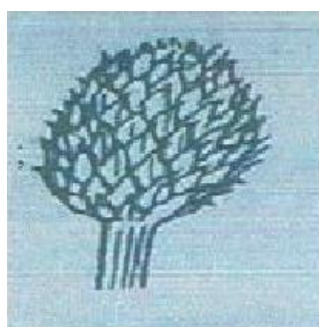


Figure 1 : Capitule avec bractées (Timbal et al., 1989).

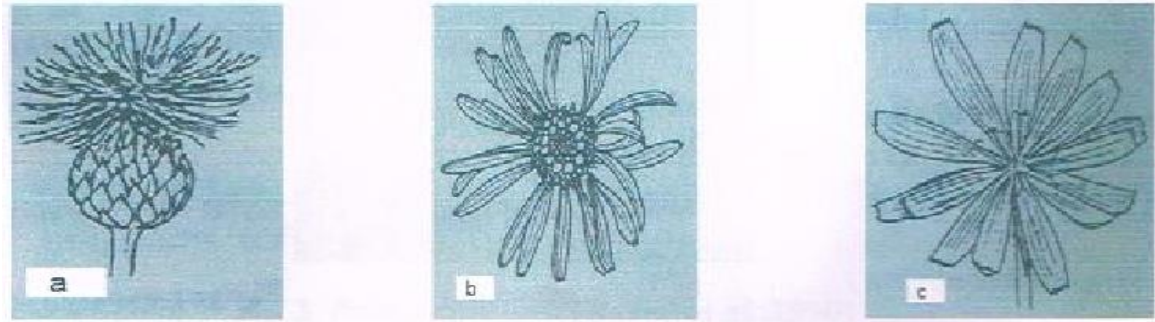


Figure 2 : Type d'inflorescence de la famille des Astéracées. (a) fleurs toutes tubulées, (b) fleurs ligulées autour, tubulées au centre, (c) fleurs toutes ligulées (Timbal et al., 1989).

I. 2. Description de *Pulicaria odora*

I. 2. 1. Description botanique

Pulicaria est une plante vivace à tige atteignant 20 à 90 cm de haut, dressée, simple ou rameuse au sommet. Elle est peu odorante malgré son nom, velue ou laineuse à souche tubériforme et émettant des fibres épaisses mais non des rejets (Quezel et Santa, 1963).

Pulicaria n'a pas de stolons, des tiges plus ou moins à poils laineux, simples ou ramifiées, scabreuses, des feuilles basales à pétiole court, ovoïdes, pointues, verte en floraison. Les feuilles de la tige sont alternes, allongées, à demi engainantes, les feuilles inférieures auriculées, à dents glanduleuses, face supérieure verte, rugueuse, inférieure gris laineux. Les capitules sont isolés ou groupés par quelques-uns, 2-3 cm de large, à demi sphérique, pédoncule 3-15 cm de long, en haut épaissi, à bractées, involucre sur plusieurs rangées. Les feuilles de l'involucre sont linéaires, pointues, plus ou moins laineuses et glanduleuses. Les fleurs sont linguiformes jaune or, dépassant l'involucre de 8mm, à tube jaune (Fig. 3). Les fruits vont jusqu'à 1,8 mm de long, entourés à la base d'une petite corolle membraneuse (Bayer et al., 1990).



Figure 3 : *Pulicaria odora* (Bayer et al., 1990).

I. 2. 2. Nomenclature et classification

Selon Emberger et Chadeaud (1960), le genre *Pulicaria* appartient à la famille des compositeae, tribu des Inuleae qui contient 100 espèces (Ezoubeiri et al., 2005).

Cette plante est connue au Maroc sous le nom d'Ouden El hallouf (Hanbali et al., 2005). En Algérie, exactement en petite Kabylie, elle est connue sous le nom de Ouden eñadjaö cependant le nom Ouden El halloufö est destiné pour une autre plante non utilisée traditionnellement.

Nomenclature binomiale : *Pulicaria odora* (L.) Rchb (Quezel et Santa, 1963).

Nom commun : Pulicaire odorante.

Nom Kabyle : Amzough näixsi.

La taxonomie de *Pulicaria odora* est résumée dans le **tableau I**.

Tableau I : Taxonomie de *Pulicaria odora*.

Règne	Plantae	
Division	Magnoliophyta	(Takht et Zimmerm, 1996)
Classe	Rosopsida	(Jenens, 1788)
Ordre	Asterales	(Lindl, 1833)
Famille	Asteraceae	(Dumort, 1822)
Genre	Pulicaria	(Gaertn, 1822)
Espèce	<i>Pulicaria odora</i> (L.) Rchb	

I. 2. 3. Habitat et répartition géographique

Pulicaria odora est une plante qui colonise les maquis, clairières et les essarts (**Bayer et al., 1990**). Cette plante se trouve dans les lieux frais de la région méditerranéenne, Alpes-Maritimes, Var, Bouches-du-Rhône, Pyrénées-Orientales, Corse, mais aussi en Espagne, Portugal, Italie et Afrique septentrionale. C'est une plante qui accepte quelques variations climatiques comme l'ensoleillement. Elle tolère aussi la variation de la texture du sol et la variation de pH (**Bayer et al., 1990**). En Algérie elle se trouve dans les lieux frais particulièrement dans la grande et petite Kabylie.

I. 2. 4. Utilisation traditionnelle

Pulicaria odora est une plante médicinale couramment utilisée en médecine traditionnelle dans le nord-africain pour traiter les douleurs de dos, les troubles intestinaux et les crampes menstruelles. Elle est également utilisée pour soigner les blessures et surtout pour guérir l'ulcère gastrique.

Elle est aussi utilisée en Maroc comme remède traditionnelle appelé "Mssakhen", donné aux femmes après l'accouchement. Elle est considérée comme épice appréciée pour sa saveur pour parfumer le pain et la viande (**Ezoubeiri et al., 2005**). Selon Bellekhdar (1977), traditionnellement, les racines de cette plante sont utilisées pour leurs propriétés anti-inflammatoires (**Hanbali et al., 2005**).

I. 3. Substances bioactives de *Pulicaria odora*

De nombreuses recherches ont été menées sur les différentes espèces du genre *Pulicaria* pour évaluer la composition de leurs huiles essentielles. Cependant dans ce terme il y a qu'une seule étude menée sur *Pulicaria odora* (**Hanbali et al., 2005**).

Les travaux de **Williams et al. (2003)**, ont conduit à la caractérisation et l'isolement des flavonoïdes vasculaires et ceux de la surface des feuilles de *Pulicaria odora*. Une autre étude de **Ezoubeiri et al. (2005)**, qui est complémentaire à celle de **Hanbali et al. (2005)**, a permis d'isoler et caractériser deux nouveaux composés à partir de l'huile essentielle de *Pulicaria odora*, dont l'un est doté d'une forte activité antibactérienne.

Aucune étude n'a été menée sur les polyphénols de *Pulicaria odora*, et leurs activités biologiques.

I. 3. 1. Huile essentielle de *Pulicaria odora*

Une étude réalisée par **Hanbali et al. (2005)**, a montré que la distillation à la vapeur des racines de *Pulicaria odora* produit de l'huile jaune. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) de cette huile essentielle a indiqué qu'elle se compose d'un mélange de plus de 70 composés, donc cinq non identifiés.

Cette étude a montré que l'huile de *Pulicaria odora* est riche en composés oxygénés, qui représentent 93,77% de l'huile. Le thymol (47,83%) et l'isobutyrate thymol (30,05%) ont été les principaux constituants. La teneur élevée en composés oxygénés peut expliquer l'odeur caractéristique et parfumée de l'huile essentielle de *Pulicaria odora* (**Hanbali et al., 2005**).

La composition de l'huile essentielle de *Pulicaria odora* est résumée dans le **tableau II**.

La séparation sur colonne chromatographique de gel de silice par **Ezoubeiri et al. (2005)**, a conduit à l'isolement de deux composés purs avec un rendement de 20,26% et 61,93% respectivement (**Fig. 4**). La structure du premier composé correspond au 2-isopropyl-4-méthyl et le deuxième composé est l'acide isobutyrique-2-isopropyl-4-méthyl-phénylester.

Ce dernier représente le constituant majeur de l'huile essentielle de *Pulicaria odora*. Ces deux composés peuvent être considérés comme des isomères du thymol isolés pour la première fois à partir du genre *Pulicaria*. Certains dérivés du thymol ont été déjà signalés dans d'autres espèces de *Pulicaria* (**Ezoubeiri et al. 2005**).

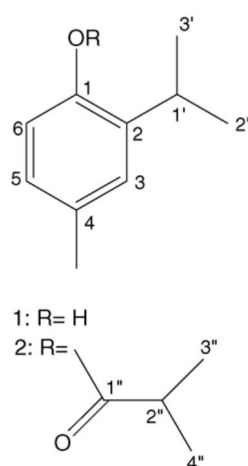


Figure 4 : Structure du 2-isopropyl-4-méthyl et de l'acide isobutyrique-2-isopropyl-4-méthyl-phénylester, isolés à partir de l'huile essentielle de *Pulicaria odora* (**Ezoubeiri et al. 2005**).

Des tests d'activité antibactérienne ont été effectués par la méthode de diffusion. Cela a montré que l'huile essentielle et le composé 2-isopropyl-4-méthyl-phénol de *Pulicaria odora* possèdent une activité inhibitrice contre toutes les souches testées (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pyogenes* et *Candida albicans*), à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*. Par contre le composé isobutyrique-2-isopropyl-4-méthyl-phényl-ester s'est montré inactif vis-à-vis de toutes les souches testées (**Ezoubeiri et al. 2005**).

I. 3. 2. Les flavonoïdes de *Pulicaria odora*

Pulicaria odora diffère de toutes les autres espèces européennes étudiées par la production fortement élevée d'une série de dérivés du 6-hydroxy-keampferol méthyle, qui est le principal flavonoïde des feuilles et des inflorescences, et un composé complémentaire méthylé : éther 3, 5, 6, 7, 4'-penta-méthyl. Un autre composé qui est le 3, 7, 4'-triméthyl de -hydroxy-keampferol ether a été aussi retrouvé dans les feuilles de *Pulicaria odora* en quantité suffisante. Mais seules des traces des dérivés de la quercétagine ont été détectés (**Williams et al., 2003**).

Une analyse plus approfondie a montré que les glucosides de flavonols sont des constituants caractéristiques des flavonoïdes de *Pulicaria odora*, par contre aucun glucoside de flavone n'a été détecté. La quercétine 3-glucoronide est présente seulement sous forme de traces dans les inflorescences de cette plante (**Williams et al., 2003**).

Pulicaria odora est l'espèce unique qui est capable de produire le 7-glucoside de la patuletin (quercétine 6-méthyl ether), et le 6-hydroxy-keampferol ether, qui sont de couleur jaune, fluorescent à la lumière UV (**Williams et al., 2003**).

Tableau II : Composition de l'huile essentielle de *Pulicaria odora* (Hanbali et al., 2005).

Composé	Indice de rétention	Pourcentage
Methylpropanoic acid	648	4.46
Methylbutanoic acid	730	0.712
α-Pinene	939	0.02
Camphene	954	tr
Benzaldehyde	960	tr
5-Methyl furfural	964	tr
6-Methy-5-hepten-2-one	986	tr
•-Myrcene	992	tr
α-Phellandrene	1006	tr
α-Terpinene	1017	tr
p-Cymene	1026	tr
•-Phellandrene	1030	0.01
1,8-Cineole	1031	0.01
Benzylalcohol	1032	tr
Artemesia ketone	1062	0.02
Cresol	1076	0.02
Linalool	1100	0.01
Camphor	1149	0.03
p-Cymene-8-ol	1189	0.03
α-Terpineol	1192	0.02
Thymol	1293	47.83
Carvacrol	1302	2.78
Modhephene	1384	0.05
Epi_-santalene	1447	0.11
•-santalene	1460	0.02
Thymol isobutyrate	1513	30.05
Caryophyllene oxide	1583	0.24

CHAPITRE II

Activités biologiques des composés phénoliques

Chapitre II : Activités des composés phénoliques**II. 1. Rôles biologiques des composés phénoliques dans la plante**

Ces composés phénoliques sont synthétisés par les plantes, pendant leur développement normale et en réponse à certaines conditions de stress, telles que les radiations UV et l'infection par des phytopathogènes (**Heim et al., 2002 ; Dembitsky 2005 ; Naczki et Shahidi, 2006**).

L'intégration du métabolisme phénolique dans le programme générale de développement d'un organe végétal pose en elle-même la question d'un rôle éventuel de ces substances. Il a été montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : la croissance cellulaire, la différenciation organogène, la dormance des bourgeons, la floraison, la tubérisation. Ils sont impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures et aboutissent à la formation au niveau de la blessure d'un tissu cicatriciel résistant aux infections. La capacité d'une espèce à résister à l'attaque des insectes et des micro-organismes et souvent corrélée à la teneur en composés phénoliques (**Bahorun, 1997**).

II. 2. Propriétés pharmacologiques des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont actuellement l'objet de nombreuses études car il sont reconnus pour leur différentes activités biologiques (**Trabelsi et al., 2010**), et ils sont rapportés pour des propriétés pharmacologiques intéressantes et variées, à savoir leurs propriétés anti-inflammatoires (**Vergé et al., 1999**), anticancéreuse (**Derbel et Ghadira, 2005**), anti athérosclérose (**Halliwel, 2008**), anti-agrégation plaquettaire (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**), antiallergique (**Cevallo-Casals et Cisneros-Zevallos, 2010**), inhibitrice d'enzymes (**Pietta 2000, Manthey et al., 2001**), antioxydants et anti-radicalaires (**Smail et al., 2010**), antivirale (**Nijveldt et al., 2001**), antifongique (**Harborne et Williams, 2000**) et antibactérienne (**Kuete et al., 2010**).

II. 3. Composés phénoliques et activité antimicrobienne

L'activité de ces substances vis-à-vis des microorganismes peut s'exercer selon des modalités extrêmement diverses. Certaines exercent leur activité en oxydant ou en dénaturant les protéines bactériennes (**Shiota et al., 2004**) ; d'autres ont un pouvoir plus spécifique en altérant des structures membranaires ou en inactivant des composés ou des fonctions essentielles de la cellule (**Awadh-Ali et al., 2001 ; Eldeen et al., 2005 ; Song et al., 2007**).

De ce fait il sont bactéricides ou bactériostatiques selon les concentration (**De Bruyne et al., 1999 ; Alcaráz et al., 2000**).

En dehors de l'influence du caractère lipophile de la molécule, l'activité antibactérienne des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes, dépend essentiellement de la longueur, la ramification et la position de la chaîne de substitution liée au noyau phénolique, mais aussi de la nature des substituants et du degré d'encombrement du noyau phénolique (**Basile et al., 1999 ; Alcaráz et al., 2000**).

II. 3. 1. Activité antimicrobienne des acides phénoliques

Les plantes médicinales contenant des acides phénoliques se sont avérées efficaces contre les bactéries (**Samy et Gopalakrishnakone, 2008**). Les acides phénoliques (acide cinnamique, acide coumarique, acide caféique et férulique) ont montré une bonne activité contre les bactéries à Gram positif et seulement une faible activité contre les bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) à forte concentration (**Rodríguez-Vaquero et al., 2007a**).

Ces variations de sensibilité vis-à-vis des composés phénoliques purs peuvent refléter les différences au niveau structural de la surface des cellules entre les bactéries Gram positif et Gram négatif (**Puupponen-Pimi et al., 2005a**).

Les composés phénoliques purs et les différentes concentrations de trois variétés de vin ont été évalués pour leur effet sur la croissance de *Listeria monocytogenes*. L'acide caféique dérivé de l'acide hydroxycinnamique, était le plus puissant inhibiteur de sa croissance (**Puupponen-Pimi et al., 2005a ; Rodríguez-Vaquero et al., 2007a,b**).

Dans une étude menée par **Chanwitheesek et al. (2007)**, l'activité antimicrobienne de l'extraît éthanolique de *Caesalpinia mimosoides* est attribuée à la présence d'une substance antimicrobienne active, l'acide gallique, qui a montré une activité contre *Salmonella Typhi* et *Staphylococcus aureus* avec des valeurs de CMI de 2,5 et 1,25 mg/ml, respectivement. L'hydrophobicité partiel de l'acide gallique lui permet d'agir efficacement ; en effet, il a perméabilisé la souche de *Salmonella* par déstabilisation de sa membrane externe, en chélatant les cations bivalents (**Puupponen-Pimi et al., 2005b**).

Il est démontré que la position et le nombre de groupements OH des acides phénoliques sont déterminants pour leur activité antimicrobienne et proportionnels à leur toxicité (**Kuete et al.,**

2007). De plus, les phénols hautement oxydés, tels que les acides cinnamique et caféique, sont les plus toxiques (Cowan, 1999). L'acide gallique et l'acide protocatéchique ont trois et deux groupements hydroxyles dans leurs structures, respectivement, alors que l'acide vanillique a un seul groupement hydroxyle, et un groupement méthoxy. Le faible effet inhibiteur de l'acide vanillique comparativement aux acides gallique et protocatéchique pourrait être dû à cette substitution (Rodríguez-Vaquero et al., 2007b).

II. 3. 2. Activité antimicrobienne et mode d'action des quinones

La littérature rapporte la toxicité des quinones pour des microorganismes pathogènes (Beattie et al., 2010 ; Yu et al., 2010), par leurs propriétés de tannage et d'alkylation des protéines (Dietrich et Pour-Nikfardjam, 2009). En effet, une anthraquinone de *Cassia italica*, un arbre pakistanais, a montré un effet bactériostatique contre *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium pseudodiphthericum* et *Pseudomonas aeruginosa*, et bactéricide contre *Pseudomonas pseudomalliae* (Cowan, 1999). L'anthraquinone de *Cassia occidentalis* présente une activité antibactérienne contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Yadav et al., 2009).

Les quinones peuvent se complexer irréversiblement avec des acides aminés nucléophiles des protéines, menant souvent à l'inactivation de ces protéines et à la perte de leurs fonctions. Pour cette raison, les effets antimicrobiens des quinones sont élevés et les cibles probables dans la cellule microbienne sont; les adhésines exposées en surface, les polypeptides de la paroi cellulaire et les enzymes membranaires. Les quinones peuvent également rendre des substrats indisponibles aux microorganismes (Cowan, 1999).

L'effet bactéricide des extraits de plantes n'a pas été entièrement compris ; on croit que les composés actifs exercent des effets toxiques directs sur les microorganismes pathogènes (Nikitina et al., 2007). Dans le cas des phénols, cependant, les effets chimiques et biologiques sont connus pour être dus au système redox ; phénol/semiquinone/quinone ayant comme conséquence la formation d'une quinone plus active et d'un radical intermédiaire semiquinone qui constitue la molécule de base responsable des effets chimiques et biologiques des composés phénoliques. Les quinones peuvent former des complexes et font intervenir des réactions chimiques variées (Nikitina et al., 2007). Pour cette raison, les

polyphénols et les produits de leur oxydation ont des propriétés inhibitrices d'enzymes (Nikitina et al., 2007).

Les hydroquinones et les quinones provenant d'*Urcinia spinulosa* ont été étudiées pour leur activité antimicrobienne. Par conséquent, des études sur la relation structure-activité ont indiqué que la longueur optimale de la chaîne latérale des composés à activité antimicrobienne devrait être de 5-15 atomes de carbone, suggérant que l'activité maximale contre *Staphylococcus aureus* dépend du nombre d'atomes de carbone dans la chaîne hydrophobe, des configurations des groupements fonctionnels et des doubles liaisons (Orhan et al., 2007).

II. 3. 3. Activité antimicrobienne et mode d'action des coumarines

Les propriétés antimicrobiennes et antivirales de plusieurs coumarines ont été rapportées (Wong et Kitts, 2006 ; Kuete et al., 2007 ; Samy et Gopalakrishnakone, 2008 ; Kong et al., 2010). L'association de l'acide hydroxycinnamique aux coumarines semble avoir une activité inhibitrice des bactéries à Gram positif. Selon Cottiglia et al. (2001) ; quelques composés appartenant à cette classe montrent une activité vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus lentus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Kuete et al. (2007), ont conclu, d'après une étude sur la relation structure-activité des coumarines, que le cycle supplémentaire « furo » augmente l'activité antimicrobienne des coumarines. De ce fait les coumarines à trois cycles ont une meilleure activité antimicrobienne que celles à deux cycles (Kuete et al., 2007).

Il a été rapporté que les furocoumarines interagissent avec l'ADN et interrompent sa réplication (Wong et Kitts, 2006). La photoréactivation des furocoumarines (psoralène) contenues dans les plantes par les rayonnements UV présente des activités mutagènes ou même létales sur des microorganismes fongiques ou bactériens. L'activation des furocoumarines linéaires conduit tout d'abord à des réactions de cycloaddition sur les carbones C-3, C-4 et/ou C-4' C-5' avec les bases pyrimidine de l'ADN ou l'ARN ; ainsi, ils peuvent établir des liaisons croisées entre les paires de bases des acides nucléiques (Brunton, 1999). La duplication des brins d'ADN ainsi que la traduction des ARN sont alors bloquées. L'activation des dérivés du psoralène conduit également à des cycloaddition sur les acides gras insaturés membranaires (Gravot, 2002). L'intercalation des psoralènes dans l'ADN est importante dans leurs effets photobiologiques (Dembitsky, 2008).

II. 3. 4. Activité antimicrobienne et mode d'action des flavonoïdes

Une des fonctions incontestées des flavonoïdes est leur rôle protecteur des plantes contre l'invasion microbienne. Ceci implique pas seulement leur présence dans les plantes en tant qu'agents constitutifs mais également leur accumulation comme phytoalexines en réponse à l'attaque microbienne (Harborne et Williams, 2000 ; Peer et Murphy, 2006 ; Orhan et al., 2007).

La littérature rapporte que les flavonoïdes ont des cibles cellulaires multiples et peuvent viser différents composants et fonctions dans la cellule microbienne (Rodríguez-Vaquero et al., 2007b ; Boban et al., 2010). Cushnie et Lamb (2005a), ont rapporté que les mécanismes antimicrobiens de plusieurs flavonoïdes pourraient être attribués à l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques, l'inhibition de la fonction de la membrane cytoplasmique ou l'inhibition du métabolisme énergétique.

Les flavonoïdes sont des substances antimicrobiennes efficaces contre une large gamme de microorganismes (Basil et al., 1999 ; Ghedira, 2005 ; Al-Momani et al., 2007 ; González-Segovia et al., 2008 ; Orhan et al., 2010). Leur activité est probablement due à leur capacité à se complexer avec les protéines extracellulaires et à se complexer avec la paroi bactérienne. Les flavonoïdes les plus lipophiles peuvent également perturber les membranes bactériennes (Cowan, 1999). Plusieurs études ont rapporté l'effet inhibiteur de certains anthocyanines sur les bactéries (Lev-Yadun et Gould, 2009), et de la quercétine contre *Helicobacter pylori* *in vitro* (González-Segovia et al., 2008).

La rutine, forme glycosylée de la quercétine, est la plus active des flavonoïdes avec une activité anti-Listeria (Rodríguez-Vaquero et al., 2007b). Les flavones sont de forts inhibiteurs des bactéries à Gram négatif, alors que les flavonoïdes contenant deux ou trois groupements hydroxyles sur les cycles A et B sont plus actifs contre les bactéries à Gram positif (Orhan et al., 2010). Rauha et al. (2000), ont rapporté que la quercétine et la naringénine sont actives contre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Le degré d'hydroxylation pourrait affecter l'activité des composés phénoliques. La myricétine ; flavonol (trois groupement hydroxyle sur le cycle B) était le seul composé qui a montré des effets inhibiteurs importants sur la croissance des bactéries lactiques provenant de l'appareil gastro-intestinal humain, aussi bien que pour *Enterococcus faecalis* et

Bifidobacterium, par contre, les salmonelles n'ont pas été affectées (**Puupponen-Pimi et al., 2005a**). De ce fait, le nombre de groupements hydroxyles sur le cycle B des flavonols et des flavones semble être associé à l'activité antimicrobienne (**Puupponen-Pimi et al., 2005a**).

Il est évident qu'une relation structure-activité existe entre divers flavonoïdes et leurs activités antimicrobiennes dans la plupart des cas (**Orhan et al., 2007**). Une étude comparative avec d'autres flavonoïdes a indiqué que la structure de base d'un flavonoïde avec un groupement hydroxyle libre en position 3, une double liaison entre 2 et 3, un groupement cétonique en position 4 et une structure qui permet au proton du groupement hydroxyle en position 3 de se tautomériser en un composé 3-céto sont essentiels pour l'activité mutagénique des flavonols (**Ong et Khoo, 1997**). D'autre part, l'activité antimicrobienne de l'épigallocatechine (EGC) a été liée à la présence de résidus galloyls dans sa structure (**Taguri et al., 2006**).

Les résultats de l'étude de **Tsuchiya et ses collaborateurs (1996)**, ont indiqué que 2, 4 ou 2, 6-dihydroxylation du cycle B et 5,7-dihydroxylation du cycle A dans la structure du flavonone étaient importantes pour l'activité anti-MRSA. **Alcaráz et al. (2000)** ont également rapporté l'importance du groupement hydroxyle en position 5 des flavonones et des flavones contre cette même souche. De plus, ils affirment que les chalcones sont plus efficaces contre ces souches que les flavonones et les flavones, et que le groupement hydroxyle en position 2 est important pour leur activité anti staphylococcique. **Yamamoto et Ogawa (2002)** ont rapporté que l'activité antibactérienne de la lutéoline contre *Porphyromonas gingivalis* (provoquant des parodontites) est due à la présence du groupement OH en position 3 du cycle B. La substitution en position 6 ou 8 avec un groupe aliphatique à longue chaîne C8 et C10 augmente l'activité des flavonoïdes appartenant à la classe des flavane-3-ol (**Stapleton et al., 2004**). En revanche, les substitutions par des groupements méthoxy diminuent largement l'activité antimicrobienne des flavonoïdes (**Alcaráz et al., 2000**).

L'action des flavonoïdes sur la membrane cellulaire a été largement étudiée (**Ikigai et al., 1993 ; Tsuchiya et Iinuma, 2000 ; Caturla et al., 2003 ; Cushnie et Lamb, 2005b ; Poklar Ulrik et al., 2010**). En effet, il a été démontré par Sato et ses collaborateurs que les chalcones 2, 4, 2, 4-trihydroxy-5-méthylchalcone peuvent induire la fuite de substances qui absorbent à 260 nm chez *S. mutans*. Ces auteurs ont proposé que le 2, 4, 2, 4-trihydroxy-5-méthylchalcone exerce son effet antibactérien en modifiant la perméabilité de la membrane cellulaire et en perturbant sa fonction (**Sato et al., 1997**).

Haraguchi et ses collaborateurs ont étudié le mode d'action antibactérien de deux rétrochalcones (licochalcones A et C) des racines du *Glycyrrhiza inflata* doués d'une activité inhibitrice contre les Gram positif. Les licochalcones se sont avérés de forts inhibiteurs de la consommation de l'oxygène chez les souches susceptibles, en plus ils ont démontré que les licochalcones A et C inhibent effectivement la NADH-cytochrome *c* réductase, mais pas le cytochrome *c* oxydase, NADH-CoQ réductase et NADH-FMN oxydoréductase. Donc ils ont suggéré que le site d'inhibition de ces rétrochalcones est entre le CoQ et le cytochrome *c* dans la chaîne de transport des électrons de la chaîne respiratoire bactérienne (**Haraguchi et al., 1998**).

Mirzoeva et ses collaborateurs ont conclu que les flavonoïdes de propolis provoquent une augmentation de la perméabilité de la membrane bactérienne interne et une dissipation du potentiel membranaire (**Mirzoeva et al., 1997**). Le gradient électrochimique des protons de part et d'autre de la membrane est essentiel pour que les bactéries maintiennent la capacité de synthèse d'ATP et le transport membranaire (**Cushnie et Lamb, 2005a**). Ces auteurs ont suggéré que l'effet du propolis sur la perméabilité membranaire et le potentiel membranaire peut contribuer énormément à son activité antibactérienne et peut diminuer la résistance des cellules à d'autres agents antimicrobiens, ce qui pourrait expliquer l'effet synergique qui produit entre le propolis et d'autres antibiotiques (**Stepanovic et al., 2003**).

Les polyphénols de thé (TPP) extraits du thé vert coréen (*Camellia sinensis*) ont montré un effet bactéricide dose-dépendant sur *E.coli*. L'analyse des acides gras de la membrane cellulaire des cultures d'*E.coli* traité avec TPP a mis en évidence des changements uniquement des acides gras saturés et insaturés, tandis que l'analyse au microscope électronique à balayage a révélé la présence des perforations et des formes triangulaires irrégulières avec des surfaces froissées (rugueuses) des cellules traitées avec les TPP (**Cho et al., 2007**).

Zhang et Rock (2004) ont montré que l'EGCg est un puissant inhibiteur de $\bullet$ -ketoacyl-ACP réductase (FabG) et de *trans*-2-enoyl-ACP réductase (FabI), enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras de type II d'*E. coli*. EGCg inhibe les deux enzymes d'une façon compétitive en se liant sur le site de fixation du cofacteur NADHP. L'EGCg inhibe aussi le complexe enzyme-cofacteur (FabG-NADHP) pour empêcher la liaison du substrat (**Zhang et al., 2004**). L'effet des flavonoïdes sur la synthèse des acides mycoliques a été confirmée par les travaux de Brown et ses collaborateurs qui ont observé l'inhibition de la croissance de

Mycobacterium bovis par l'inhibition de l'activité des enzymes FAS-I et FAS-II impliquées dans leur synthèse (**Brown et al., 2007**).

Sudano Roccaro et al., (2004) ont constaté que l'EGCg peut inverser la résistance à la tétracycline dans les isolats de *Staphylococcus*. Cette interaction synergique agit par l'inhibition de l'activité des pompes d'efflux de la tétracycline dans la cellule bactérienne, induisant une plus grande rétention intracellulaire de l'antibiotique. **Zhao et al. (2001)** ont étudié 25 isolats de MRSA et ont trouvé que l'EGCg et les β -lactamines se fixent sur le même site ; ils ont observé un effet synergique entre eux contre cette souche, en interférant avec l'intégrité de la paroi cellulaire à travers une liaison directe au peptidoglycane. L'inhibition de l'activité de la pénicillinase a été également utilisée pour expliquer la synergie observée entre ces catéchines et la pénicilline chez les bactéries à Gram positif. Cependant, dans une autre étude **Zhao et al. (2003)** n'ont observé aucune restauration de l'activité antibactérienne par la combinaison des β -lactamines et de l'EGCg contre les Gram négatif. Cela est peut être lié à la localisation des β -lactamases chez ces bactéries.

L'activité antimicrobienne des flavonoïdes a été attribuée à l'inhibition de synthèse d'ADN (**Shinozuka et al., 1988**) et d'ARN (**Ong et Khoo, 1997**) et d'autres macromolécules. De plus, les composés phénoliques avec plus de trois 3-OH sont doués d'une activité antibactérienne (**Ani et al., 2006**).

Plaper et ses collaborateurs ont rapporté que la quercétine se lie à la sous-unité GyrB de l'ADN gyrase de *E.coli* et inhibe ses activités ATPasique (**Plaper et al., 2003**). L'activité antibactérienne de la quercétine contre *E.coli* peut être en moins partiellement attribuée à l'inhibition de l'ADN gyrase (**Ohemeng et al., 1993**). **Bernard et ses collaborateurs (1997)** ont constaté que le flavonoïde glycosylé, la rutine, était un inhibiteur spécifique de la topoisomerase IV d'*E.coli*. **Mori et ses collaborateurs (1987)** ont prouvé que la synthèse de l'ADN a été fortement inhibée par des flavonoïdes (EGC) chez *Proteus vulgaris*, tandis que la synthèse d'ARN était la plus affectée chez *S.aureus*. Ces auteurs ont suggéré que 3, 4, 5-trihydroxy libre du cycle B et 3-OH libre des flavonoïdes étaient nécessaires pour leur activité antimicrobienne, ceci peut expliquer l'action inhibitrice sur la synthèse d'ADN et d'ARN.

II. 3. 5. Activité antimicrobienne et mode d'action des tannins

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'effet antimicrobien des extraits de plantes riches en tannins (Luthar, 1992 ; Puupponen-Pimi et al., 2005a ; Al-Momani et al., 2007 ; Briones-Nagata et al., 2007 ; Cimolai et Cimolai, 2007, Liu et al., 2008 ; Shuaibi et al., 2008 ; Kim et al., 2010).

Les plantes riches en tannins ont une nature astringente et sont utilisées dans le traitement des désordres intestinaux tels que les diarrhées et les dysenteries, de ce fait exhibant une activité antimicrobienne (Sharma et al., 2009). Les tannins hydrosolubles sont plus toxiques que les tannins condensés et leur toxicité est liée à leur taille moléculaire (Frutos et al., 2004 ; Widsten et al., 2010). Okuda (2005) a démontré l'effet inhibiteur de plusieurs tannins hydrolysables sur *Helicobacter pylori*.

Taguri et al. (2006) ont déduit que la présence de 3, 4, 5-trihydroxyphenyle (groupement pyrogallole) est liée à une forte activité antimicrobienne. Contrairement au gallotannins, les ellagitannins sont plus difficiles à être dégradés par les microorganismes à cause de leur structure complexe (Scalbert, 1991 ; Min et al., 2008). Puupponen-Pimi et al. (2005b) ont trouvé que *Candida albicans* et *Campylobacter jejuni* sont sensibles aux extraits de mûrier, de framboise et de fraise et de toutes les baies, suggérant que les ellagitannins sont les principaux composés antimicrobiens qui sont à l'origine de cette activité.

La propriété astringente des tannins peut induire leur complexation avec les protéines (Akiyama et al., 2001) par des interactions non spécifiques, telles que les liaisons hydrogènes et hydrophobes, aussi bien que la formation des liaisons covalentes. Ainsi, leur mode d'action antimicrobien peut être lié à leur capacité à inactiver les adhésines microbiennes, les enzymes et les protéines du transport membranaire (Karou et al., 2005 ; Samy et Gopalakrishnakone, 2008).

Les tannins empêchent les substrats à traverser la paroi cellulaire, en diminuant sa perméabilité en formant des complexes avec les protéines de la paroi cellulaire. Ils sont également responsables des changements morphologiques de plusieurs espèces bactériennes (Goel et al., 2005). Jones et al. (2004) cité par Buzzini et al. (2007) ont postulé que la capacité des tannins à lier les polymères extracellulaires des bactéries pourrait être considérée à l'origine de l'activité observée. Néanmoins, malgré la formation des complexes avec des polymères extracellulaires, les pro anthocyanidines pénètrent dans la cellule en concentration

suffisante pour réagir avec un ou plusieurs composants internes et empêchent sélectivement la synthèse de la paroi cellulaire (**Buzzini et al., 2007**).

La complexation des tannins avec les ions métalliques dans l'environnement bactérien pourrait être aussi un mécanisme possible de leurs propriétés antimicrobiennes (**Buzzini et al., 2007 ; Min et al., 2008**). **Akiyama et al., (2001)** ont rapporté que l'acide tannique a une grande capacité à lier le fer et peut fonctionner comme un sidérophore (**Akiyama et al., 2001 ; Widsten et al., 2010**). Ainsi, l'épuisement en métal peut affecter l'activité des métalloenzymes des cellules microbiennes et la séquestration des minéraux (cuivre, cobalt et fer) peut influencer leurs réactions métaboliques (**Scalbert, 1991 ; Puupponen-Pimi et al., 2005a**). L'inhibition de la croissance des bactéries intestinales (*B.fragilis*, *C. perfringens*, *E.coli* et *E. cloacae*) par l'acide tannique est probablement liée à sa capacité élevée à lier le fer (**Zaidi-Yahiaoui et al., 2008**).

La diminution de l'activité enzymatique en contact des composés phénoliques est liée à leur liaison avec les sites actifs des enzymes ou la précipitation des protéines enzymatiques, les empêchant de ce fait d'atteindre leur substrats (**Zaidi-Yahiaoui et al., 2008**). **Goel et al. (2005)** ont suggéré que le changement conformationnel des enzymes en présence des tannins peut être une raison pour leur inhibition. La position et le nombre de groupements hydroxyle (OH) dans les tannins semblent être associés à leur toxicité relative pour les microorganismes, qui est proportionnelle au degré d'hydroxylation (**Min et al., 2008**).

L'activité antimicrobienne peut être aussi liée à l'empêchement de l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales, qui est une étape préalable à la colonisation et à l'infection de la plupart des microorganismes pathogènes (**Puupponen-Pimi et al., 2005a ; Puupponen-Pimi et al., 2005b ; Dietrich et Pour-Nikfardjam, 2009**). En effet Cimolai et Cimolai (2007) ont montré que les pro anthocyanidines de la canneberge ont une action antiadhésive sur *E.coli* (**Cimolai et Cimolai, 2007**) et sur *Helicobacter pylori* (**Burger et al., 2002**).

Akiyama et al. (2001) ont examiné l'action antibactérienne de plusieurs tannins sur la coagulation du plasma par *S.aureus*. Ils ont suggéré que le mécanisme d'action antibactérien passe par l'inhibition de la formation des fibrines par *S.aureus*. Ils ont observé que l'acide tannique inhibe la croissance de toutes les bactéries testées, mais l'acide gallique et l'acide ellagique n'inhibent aucune d'entre elles. De ce fait, ils ont conclu que la liaison ester entre

l'acide gallique et le glucose (pour former l'acide tannique) était importante pour le potentiel antimicrobien de ces composés (**Akiyama et al., 2001 ; Widsten et al., 2010**).

STUDIE
EXPERIMENTALIS

Matériel et méthodes

I. Matériel végétal

I. 1. Collecte de la plante

La partie aérienne de *Pulicaria odora* a été récoltée de son milieu naturel au mois de juin 2011 entre 7h et 9h du matin dans la région d'Aïn-skhoune, (W) de Bejaia. L'identification est faite selon Quezel et Santa (1963), au niveau du laboratoire de biologie végétale de l'université de Bejaia.



Figure 6 : Photos de *Pulicaria odora* dans son milieu naturel.

I. 2. Préparation de l'échantillon

Les feuilles de *Pulicaria odora* sont soumises à un triage (pour éliminer les feuilles endommagées ou attaquées par des microorganismes), et un lavage à l'eau de robinet (2 à 3 fois), les feuilles sont ensuite séchées à l'air libre à l'abri du soleil pendant 2 mois. Elles sont par la suite broyées à l'aide d'un broyeur (Janke et Kunkel, IKA labortechnik). La poudre est conservée dans des bocaux à l'abri de la lumière et de l'humidité.

II. Extraction des composés phénoliques

L'extraction est réalisée par la méthode de macération dans différents solvants (Ethanol, méthanol, acétone) ayant différentes polarités (100, 70 et 50%) selon le protocole de **Djeridane et al., 2006**. 1g de poudre de *Pulicaria odora* est additionné de 50 ml de solvant, la macération est faite pendant 24 heures au bain marie agitateur, à 35°C. Après cela l'extract est soumis à une centrifugation à 3000g /min pendant 5 minutes (Hettich MIKRO 120) et une filtration, le filtrat obtenu est ensuite séché à l'aide d'un appareil rota vapor à 40°C. L'extract est reconstitué dans le méthanol absolu à une concentration de 50 mg/ml et conservé à 4°C à l'abri de la lumière (**Fig. 7**).

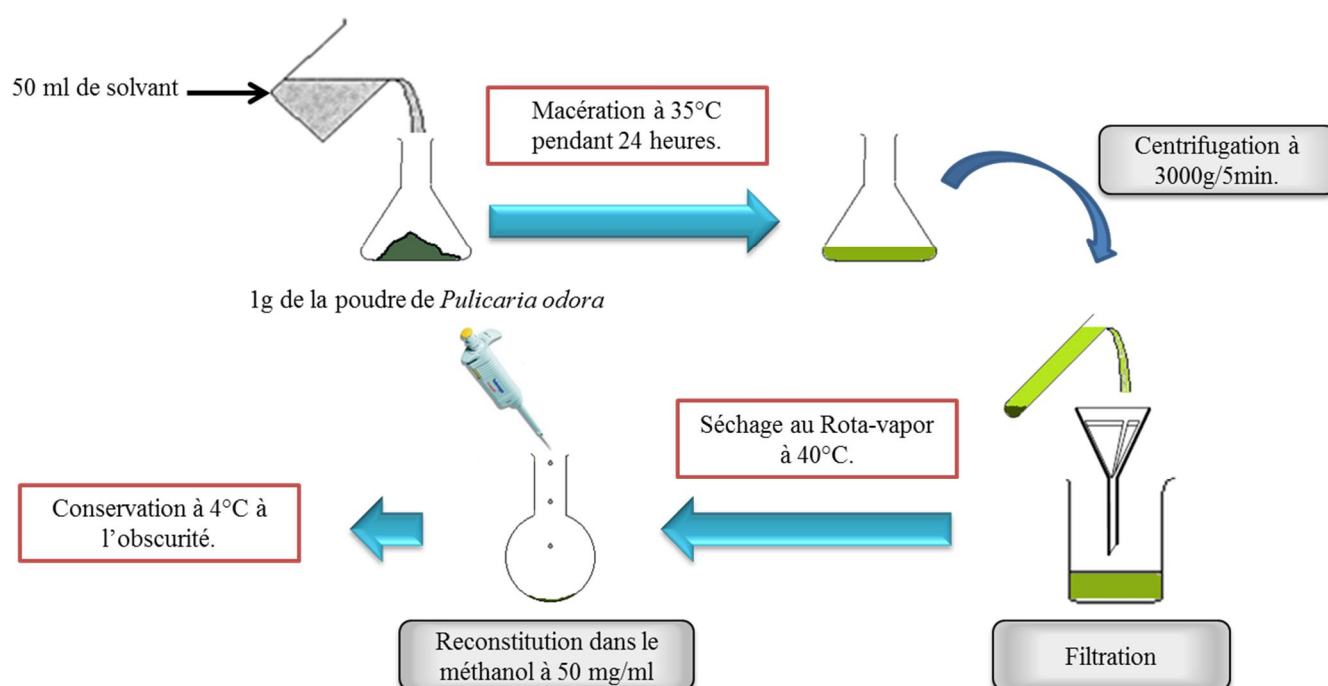


Figure 7 : Schéma d'extraction des composés phénoliques.

Le rendement de l'extraction est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'extraction} = [(P_1 - P_0) / E] \times 100$$

Avec :

P_0 : poids du bécher vide (g).

P_1 : poids du bécher après évaporation (g).

E : poids de l'échantillon (g) (**Djeridane et al., 2006**)

III. Analyse phytochimique

III. 1. Dosage des polyphénols totaux

Il est réalisé selon le protocole de **Stanisavljević et al. (2009)**: 1,23 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué à 1/10 dans l'eau distillée) est ajouté à 0,25 ml d'extract (dilué à 1/100 dans le méthanol absolu). Après 2 minutes, 1ml de Na_2CO_3 (7,5%) est ajouté, le mélange réactionnel est incubé dans le bain-marie (memmert) à 50°C pendant 5min, puis refroidi rapidement dans la glace. Un témoin est réalisé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extract par le méthanol. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Zuzi 4111 RS) à 760 nm. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg Eq AG/ g de matière sèche) en comparant avec une courbe d'étalonnage standard de l'acide gallique (**Fig. 8**).

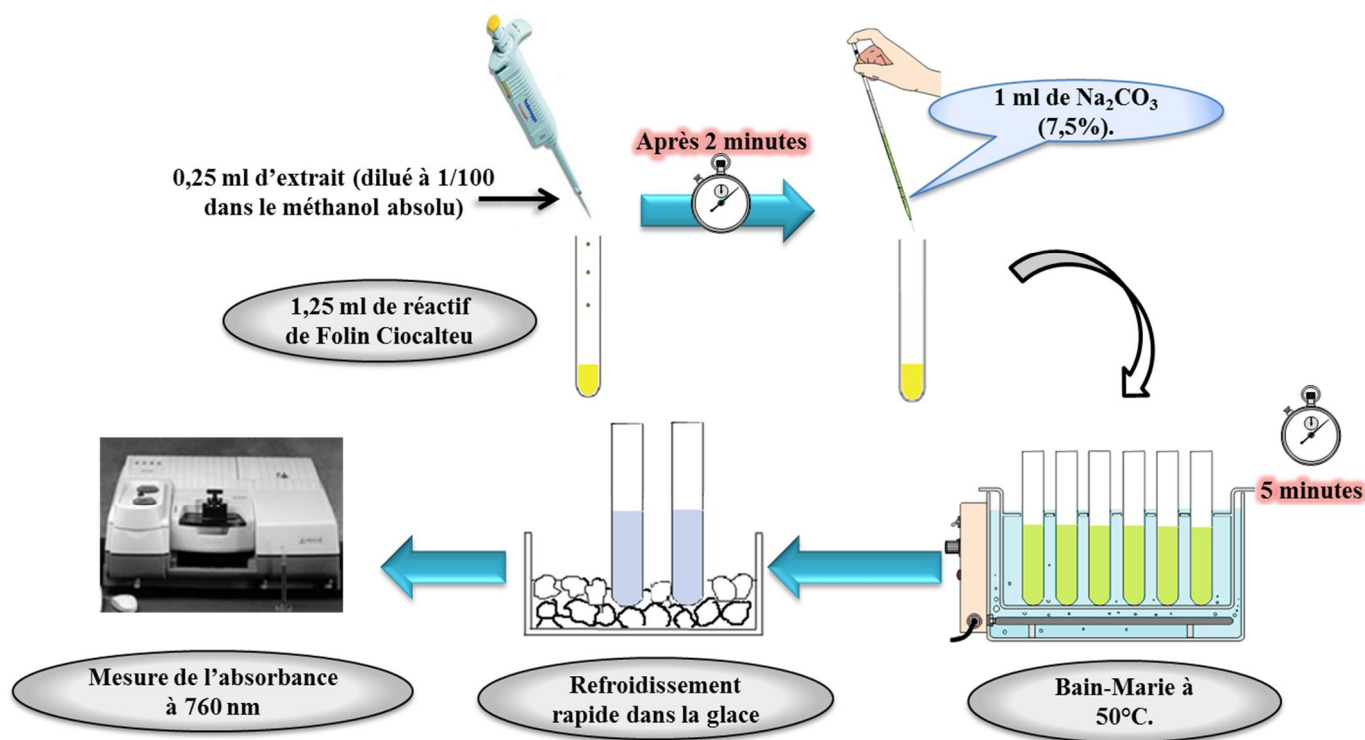


Figure 8 : Dosage des polyphénols totaux.

III. 2. Dosage des flavonoïdes

Il est réalisé selon le protocole de **Djeridane et al., 2005** : un volume de 1ml de l'extract (dilué à 1/100) est ajouté à un volume égal de AlCl_3 (2%), après 15 min de réaction à l'obscurité les absorbances sont mesurées à 430 nm (**Fig. 9**). Le témoin est préparé en remplaçant l'extract par le méthanol. La courbe d'étalonnage est tracée en utilisant la

quercétine comme standard et les résultats sont exprimés en mg équivalent quercétine par g de la matière sèche (mg EQ/g matière sèche).

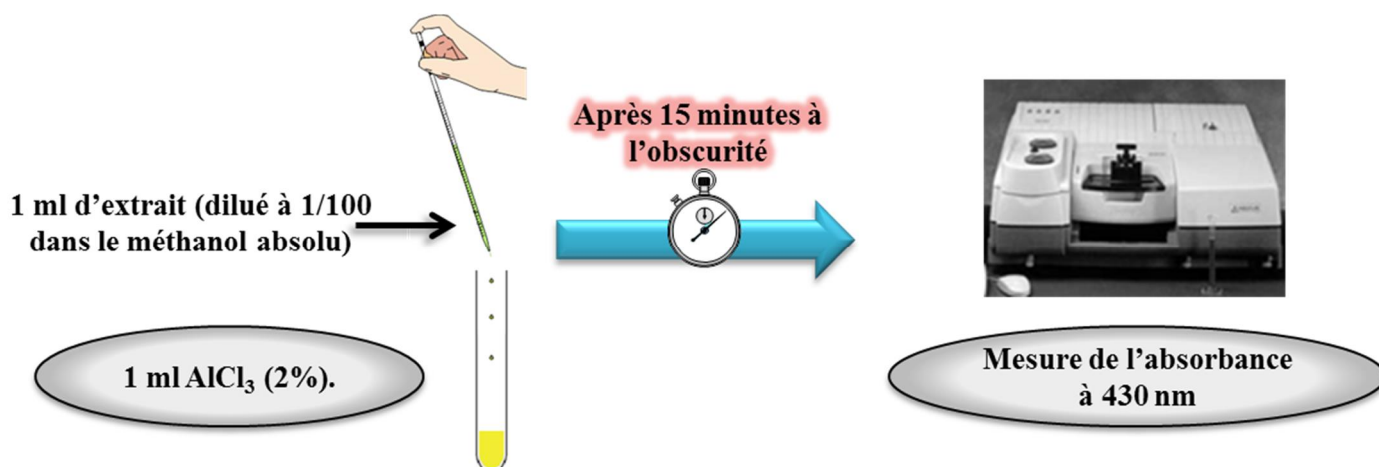


Figure 9 : Schéma du dosage des flavonoïdes.

IV. Etude de l'activité antimicrobienne

IV. 1. Les souches testées

Les extraits de *Pulicaria odora* sont testés à l'égard de 4 souches bactériennes (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria innocua* CLIP 74915 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) et 3 souches fongiques (*Aspergillus flavus* 2CA 936, *Aspergillus niger* NRRL 391 et *Trichoderma reesei* ATCC 76765).

IV. 2. Standardisation des inocula

a) Souches bactériennes

Pour assurer leur pureté, les souches bactériennes sont repiquées successivement sur les milieux suivant : EMB pour *Escherichia coli*, Chapman pour *Staphylococcus aureus*, BCP pour *Pseudomonas aeruginosa* et sur gélose nutritive pour *Listeria innocua*.

A partir des cultures jeunes (18-24 heures) des suspensions bactériennes sont préparées à une absorbance entre 0,08 et 0,10 équivalent à 10^6 - 10^8 UFC/ml (**Communiqué du CASFM, 2010**).

b) Souches fongiques

A partir d'une culture de 3 jours sur milieu Pomme de terre Dextrose Agar (PDA) des suspensions sporales sont préparées en coulant 5ml de Tween 20 (0,1%) sur chaque boîte de

Pétri. Ensuite un comptage des spores est réalisé en utilisant la cellule de Malassez. Les suspensions sont ajustées à une concentration de $1-5.10^6$ spores/ml (**Rodriguez-Tudela, 2003**).

IV. 3. Test d'activité antimicrobienne

20 ml de gélose Muller-Hinton sont coulés dans une boîte de Pétri, après solidification la gélose estensemencée par écouvillonnage à partir des suspensions microbiennes. $20 \mu\text{l}$ de chaque extrait de *Pulicaria odora* (reconstitué dans le DMSO à 1%) sont déposés sur la surface de la gélose (**Stein et al., 2005**). Après une pré-incubation à 4°C pendant 3 heures, les boîtes sont incubées à 37°C pour les souches bactériennes et à 30°C pour les souches fongiques. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés après 18-24h (**Salie et al., 1996**)(Fig. 10). Le test du témoin négatif est effectué en remplaçant l'extrait par le DMSO à 1%, et les tests des témoins positifs sont réalisés en utilisant des solutions de l'acide gallique, l'acide tannique et la quercétine à des concentrations de 50mg/ml.

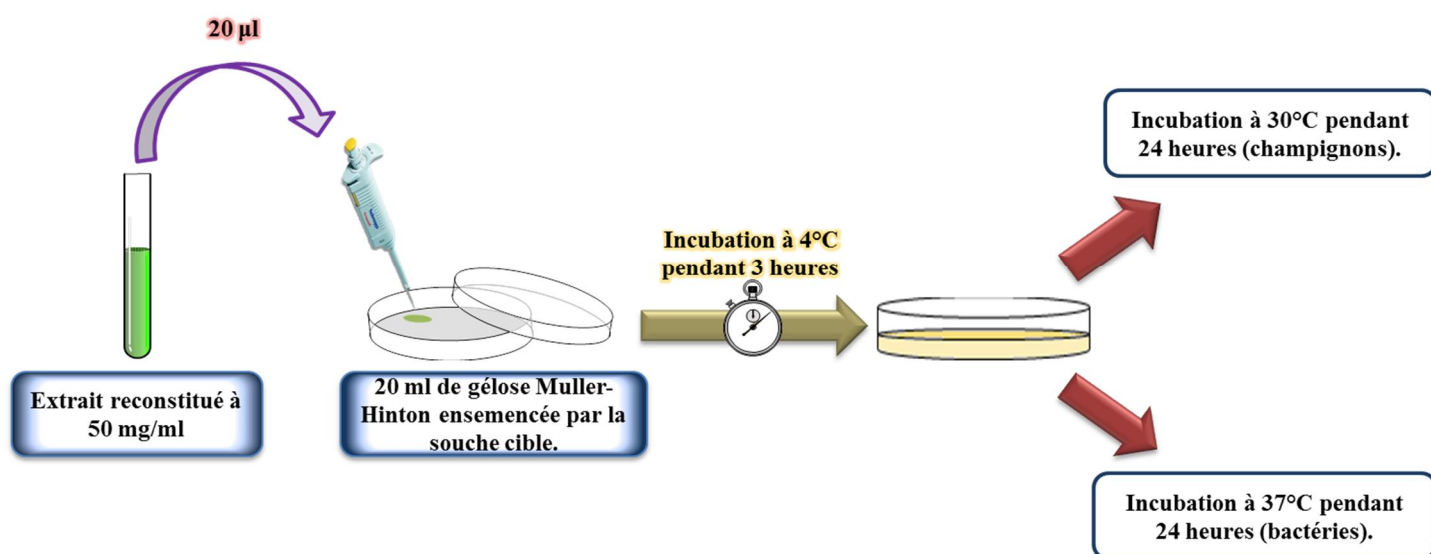


Figure 10 : Schéma du test de l'activité antimicrobienne.

IV. 3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

L'extrait montrant la meilleure activité antimicrobienne, a subi des dilutions successives ($1/2$, $1/4$, $1/8$, $1/16$, $1/32$ et $1/64$) afin de déterminer la faible concentration donnant une zone d'inhibition, en mettant $20 \mu\text{l}$ de chaque dilution sur une gélose préalablementensemencée par les souches décrites précédemment (**Urzua et al., 1998**)(Fig. 11).

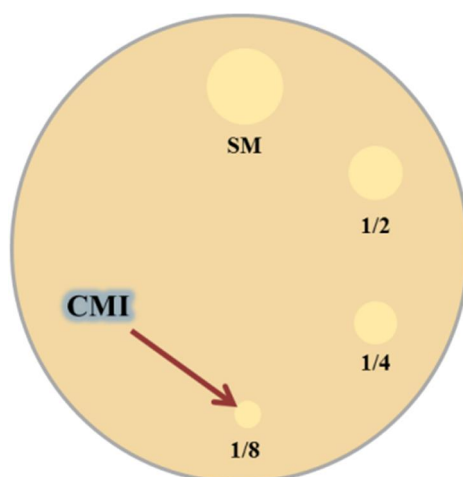


Figure 11: Schéma de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).

IV. 4. Détermination des concentrations minimales bactéricides CMB et fongicides CMF

La CMB est la concentration de la substance antimicrobienne permettant d'obtenir, après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C, 0,1% de germes, c'est-à-dire une bactérie pour 1000 de l'inoculum initial (Rodríguez-Vaquero *et al.*, 2010). La surface de chaque zone d'inhibition 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 et 1/64 (Test de CMI) est raclée à l'aide d'une pipette Pasteur. En suite des tubes de bouillon nutritif pour les bactéries, et de milieu Sabouraud pour les champignons sont ensemencés. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24h. Le tube contenant aucune croissance (pas de trouble) est déclaré comme contenant la CMB ou CMF (Fig. 12).

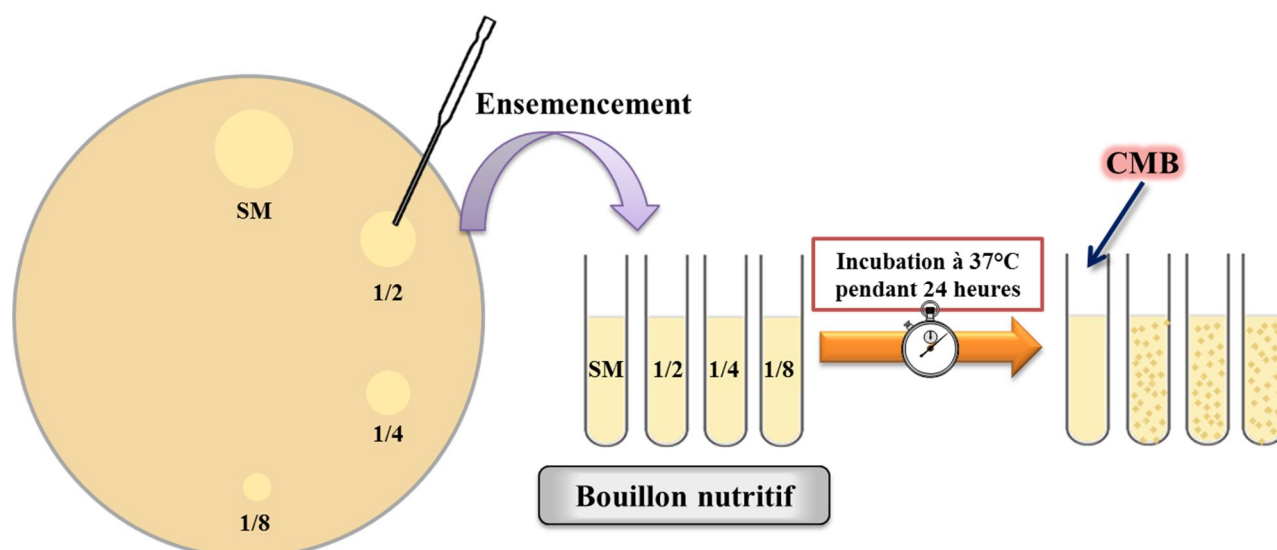


Figure 12: Détermination des concentrations minimales bactéricides CMB et fongicides CMF.

V. Séparation des composés phénoliques

V. 1. Détermination du meilleur système de séparation par CCM

26 combinaisons de systèmes solvants en utilisant cinq solvant, ont été testés pour leur aptitude à séparer les composés phénoliques de l'extract de *Pulicaria odora*, à savoir : Ether de pétrole/méthanol (1/1, 5/3, 8/3, 5/1, 2/1), Hexane/méthanol (8/3, 5/1, 2/1), Ether de pétrole/Chloroforme/Acétate d'éthyle (2/2/1, 2/3/1, 1/1/3), Chloroforme/Acétate d'éthyle (3/1, 2/5), Chloroforme/Acétone (1/4, 1/2), Ether de pétrole/Acétate d'éthyle (1/2, 1/4, 1/3), Ether de pétrole/Méthanol (1/4, 1/3), Ether de pétrole/Chloroforme (5/1, 3/1, 3/2), Hexane/Acétate d'éthyle/Méthanol (5/1/1, 5/0,5/1), Hexane/Chloroforme/Acétate d'éthyle (1/3/1).

Le meilleur système sur CCM est destiné pour la chromatographie sur colonne sèche. La CCM est réalisée selon le protocole de **Kannan et al. (2010)** comme suit :

1. La cuve est remplie par le système solvant, jusqu'à que ce dernier atteigne 5 mm de hauteur.
2. La cuve est laissée pendant 30min, pour qu'elle soit saturée par la vapeur de la phase mobile.
3. La ligne de départ est tracée soigneusement à 1 cm de l'extrémité de la plaque en utilisant une règle.
4. En utilisant une micro capillaire ou une micro pipette, les spots sont déposés soigneusement sur la ligne de départ.
6. La migration est arrêtée lorsque le solvant atteint 1cm de l'autre extrémité de la plaque (**Fig. 13**).
7. Les spots sont révélés en utilisant la lampe à UV à une longueur d'onde de 254 et 365 nm.

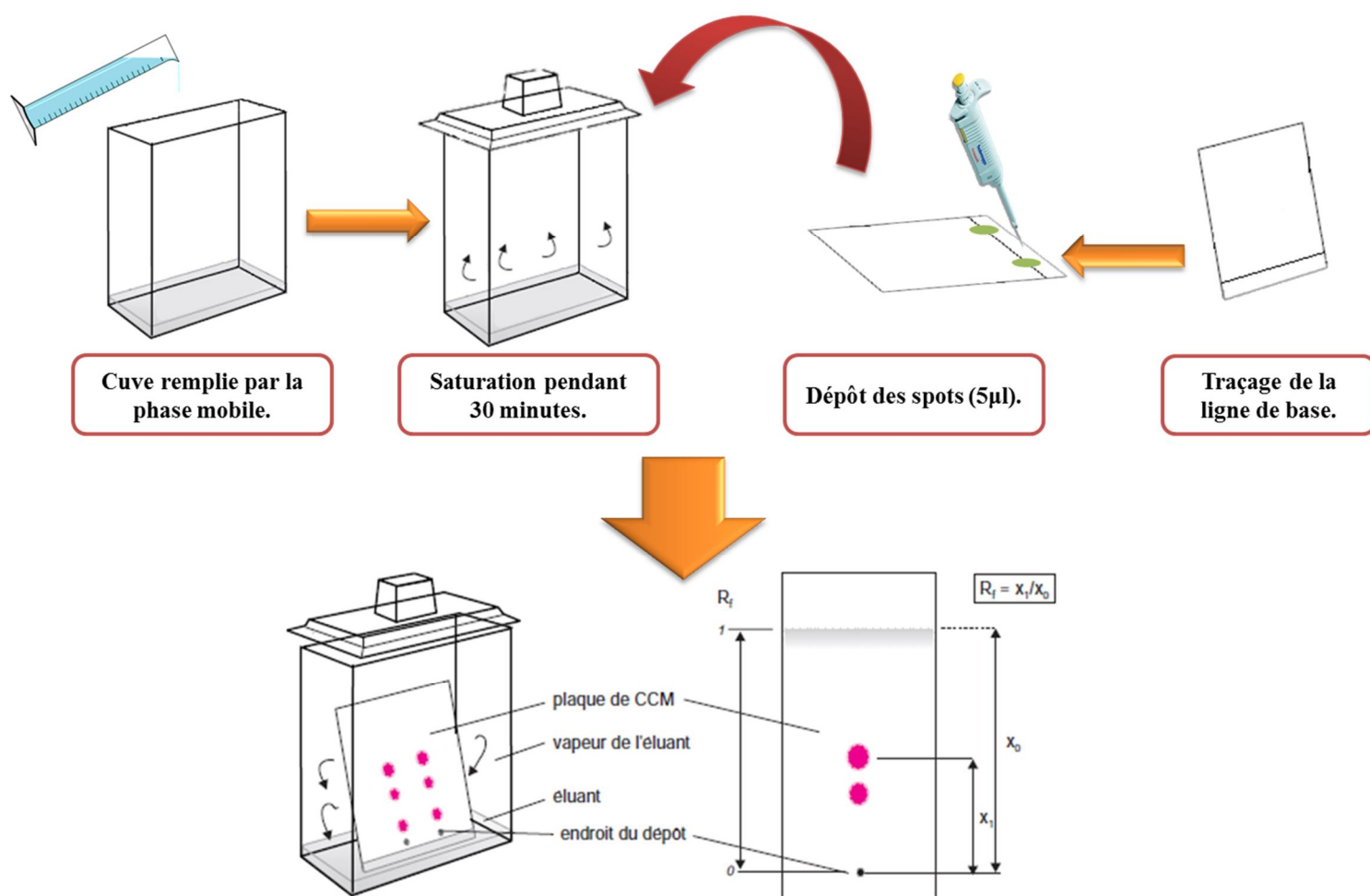


Figure 13 : Séparation des composés phénoliques par CCM.

V. 2. Chromatographie sous vide sur colonne sèche

V. 2. 1. Préparation de la colonne

La colonne est préparée selon le protocole de **Pedersen et Rosenbohm (2001)**, comme suit :

1. 15 g du gel de silice 60 Merck 15111 ($15\text{ }\mu\text{m}$) est pesé. Des lignes directrices suggérées sont présentés dans (**Tableau I, Annexe I**).
2. Le dispositif utilisé est représenté dans la figure 14 :

Remplacé par le papier parafilm pour faciliter la manipulation.

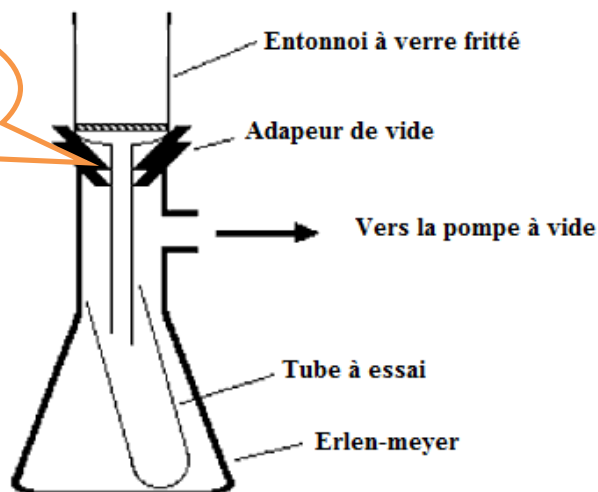


Figure 14 : Dispositif utilisé pour la chromatographie sous vide sur colonne sèche.

3. La colonne est remplie par la moitié de la quantité du gel pesée.
4. Le gel subit une vibration pour qu'il soit bien tassé en mettant le dispositif sur le vortex (Fig. 15).



Figure 15 : Tassement de du gel.

5. Le reste du gel est ajouté dans la colonne. Une autre vibration est indispensable pour avoir une phase stationnaire homogène.
6. Le dispositif est bien fermé en utilisant le papier parafilm, ensuite la pompe à vide est mise en marche. Ce qui permet la condensation du gel.
7. Le gel est soigneusement compressé sur tout le pourtour de l'entonnoir en utilisant une spatule ou un bouchon en verre (**Fig. 16**).



Figure 16: Colonne sèche prête à l'utilisation.

V. 2. 2. Application de l'échantillon

1. 1ml de l'extract (200mg/ml) est mélangé avec une petite quantité de gel de silice.
2. Après évaporation du solvant dans l'étuve à 37°C pendant quelques minutes, l'échantillon est déposé au haut de la colonne sous forme d'une couche mince en utilisant une spatule.
3. la couche mince est ensuite compressée en appliquant le vide comme dans l'étape de préparation de la colonne

V. 2. 3. Préparation de la phase mobile (Système éluant)

1. La colonne est éluée par un gradient de polarité en utilisant le meilleur système de séparation sur CCM.

2. Le gradient est préparé en ajoutant le solvant le moins polaire en premier, et en augmentant la polarité avec des pas 5% comme suit (**Tableau III**) :

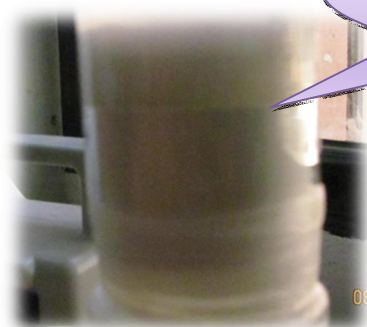
Tableau III: Gradient descendant du système d'élution.

N° de tube	Solvant	Proportions V/V (ml)
1	Ether de pétrole	10
2	Ether de pétrole/Chloroforme	9,5/0,5
3	Ether de pétrole/Chloroforme	9/1
4	Ether de pétrole/Chloroforme	8,5/1,5

Et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de la combinaison Ether de pétrole/chloroforme 0/10, en suite un gradient similaire est préparé en utilisant le chloroforme et acétate d'éthyle.

V. 2. 3. Elution

1. Avant d'ajouter l'échantillon il est indispensable de faire passer le solvant le plus apolaire à travers la colonne (dans notre cas 50 ml l'ether de pétrole), en utilisant la pompe à vide (**Fig. 17**).



Un trait horizontal : un indice sur le bon tassement du gel.

Figure 17 : Pré-élution de la colonne.

2. Après le dépôt de l'échantillon au haut de la colonne, l'élution est réalisée en passant le gradient par ordre ascendant de polarité (**Fig. 18**).



Figure 18 : Elution des composés phénoliques.

3. Des fractions de 10 ml sont récupérées dans des tubes à essai.
4. Les fractions récupérées sont, ensuite séchées à l'étuve à 40°C.
5. Les fractions sèches sont reconstituées dans le DMSO à 1% pour réaliser les tests d'activité antibactérienne.

V. 3. Analyse des fractions actives par HPLC

Les fractions ayant une activité antibactérienne ont subi une analyse par HPLC sous les conditions suivantes :

Appareille: HPLC (LC-20AT Shimadzu)

Colonne : Nucleosil 100-5 C₁₈ (phase inverse).

Détecteur : UV/VIS SPD-201V Prominence.

Longueur d'onde : 254 nm.

Phase mobile : méthanol/eau (60/40 v : v).

Débit : 0,5 ml/min.

Echantillon : 5 µl de chaque fraction, sont déposés dans l'injecteur.

VI. Analyses statistiques

Les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification sont faites par le test ANOVA suivi du test HSD. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de $p < 0,05$.

Résultats et discussion

I. Rendement de l'extraction des composés phénoliques

La macération de la poudre de *Pulicaria odora* (feuilles) dans différents solvants organiques, a donné un extrait de couleur vert foncé avec le méthanol et l'éthanol, et un extrait de couleur marron foncée avec l'acétone. Les résultats ont montré que le rendement d'extraction varie entre 3,66 % et 32,66 %. La valeur maximale est enregistrée pour le méthanol 50%, et la valeur minimale pour l'acétone 100% (Fig.19).

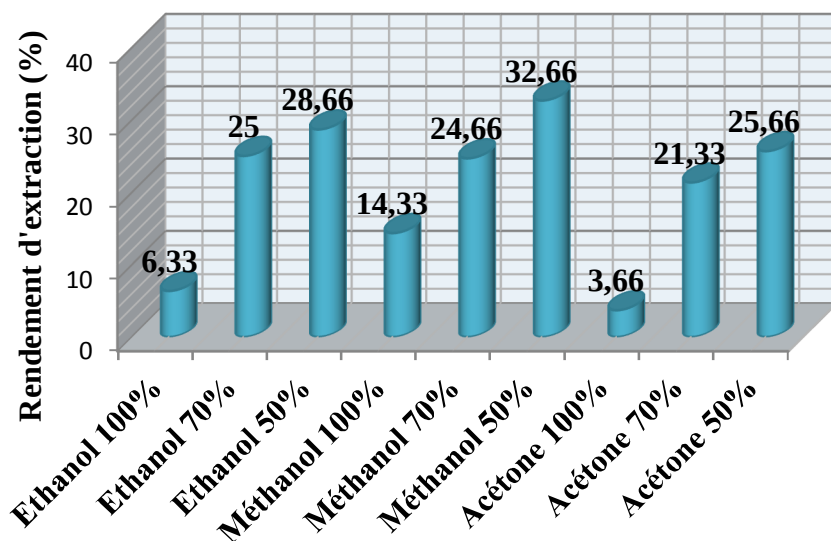


Figure 19 : Rendement d'extraction des composés phénoliques de *Pulicaria odora*.

Alzoreky et Nakahara (2003), qui ont utilisé l'acétone et le méthanol tamponné pour l'extraction des composés phénoliques de *Pulicaria orientalis*, ont obtenu des taux d'extraction de 8 et 6 % respectivement.

Des valeurs plus basses ont été retrouvées par Mothana et Lindequist (2005), avec l'espèce *Pulicaria stephanocarpa*, en utilisant le chloroforme, le méthanol et l'eau (1,40, 2,98 et 2,20 % successivement).

En effet, l'efficacité de ce type d'extraction est susceptible d'être influencée par plusieurs facteurs comme la température, le temps de la macération et le type de solvant utilisé, car ils

sont capables de modifier le transfert de la matière dans l'extraction solide-liquide (**Pinello et al., 2005**).

Les solvants alcooliques sont capables d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules polaires, de moyenne et de faible polarité (**Seidel, 2005**).

II. Analyse phytochimique

II. 1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des feuilles de *Pulicaria odora*, a été déterminée à partir d'une courbe standard en utilisant l'acide gallique comme étalon de référence (**Annexe III**).

Selon les résultats, le taux le plus élevé des polyphénols totaux est obtenu avec l'éthanol 100% suivi par l'acétone 100%, avec des valeurs de $158,38 \pm 0,60$ et $128,27 \pm 5,41$ mg Eq Ac gallique/g respectivement, tandis que le taux le plus bas est enregistré pour le méthanol 50% avec une valeur de $62,48 \pm 3,66$ mg Eq Ac gallique/g (**Fig. 20**).

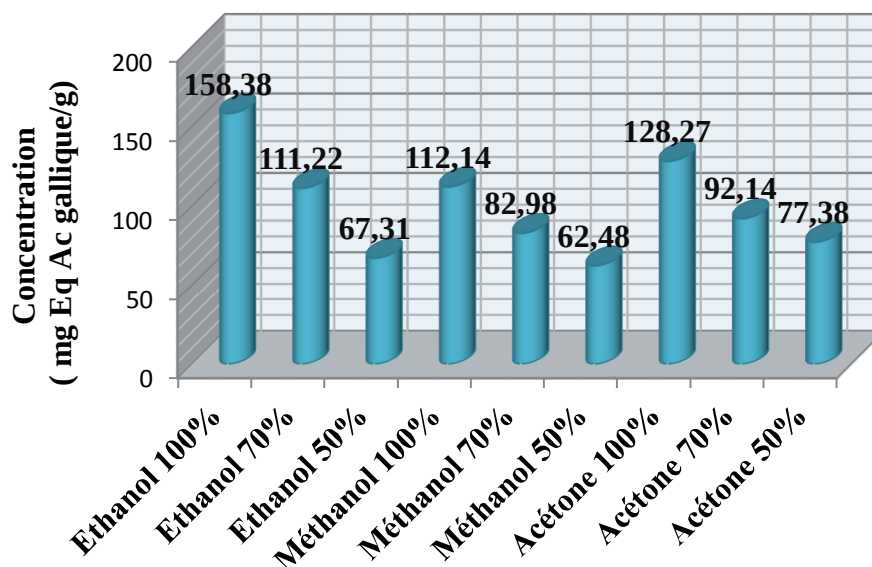


Figure 20 : Teneur en polyphénols totaux des différents extraits de *Pulicaria odora*.

Marwah et al. (2007), ont obtenu des valeurs très inférieures à nos résultats avec *Pulicaria crispa* et *Pluchea arabica*, soit 96.6 et 76.9 mg Eq Ac gallique par gramme d'extrait sec, ces résultats ont été obtenus, en réalisant deux extractions successives avec le chloroforme et le méthanol aqueux à 20%, pendant deux semaines pour chaque extraction, en utilisant toute la plante et non pas les feuilles uniquement.

Une autre étude réalisée par **Petacci et al. (2012)**, sur les feuilles de 12 espèces d'Asteraceae a donné des valeurs allant de 32.65 (*Lychnophora ramosissima*) à 147.97 mg Eq Ac gallique par gramme d'extract sec (*Lychnophora ericoides*), en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction.

Le taux de polyphénols varie selon la partie de la plante étudiée (**Bouayed et al., 2007**), ceci est expliquée par le fait que les polyphénols sont plus présents dans les cellules photosynthétiques (**Çkerget et al., 2005**), pour lutter contre les insectes et l'invasion microbienne (**Harborne et Williams, 2000**).

Djeridane et al. (2006), ont trouvé que l'abondance des polyphénols dans les feuilles est caractéristique de la famille des astéracées.

Selon **Albano et Miguel (2011)**, des concentrations en composés phénoliques similaires peuvent être trouvées dans différentes plantes, en particulier si elles font partie de la même famille, d'après les résultats obtenus dans notre cas avec *Pulicaria odora*, cette plante est peut être considérée comme la plus riche en composés phénoliques par rapport aux autres espèces étudiées du genre *Pulicaria*.

L'analyse statistique de ces données a montré que, l'éthanol 100% est le meilleur solvant pour l'extraction des polyphénols totaux de *Pulicaria odora*, suivi par l'acétone 100%, et en dernier le méthanol 100%, avec une différence très hautement significative ($p < 0,0001$) (**Annexe IV**).

II. 2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage utilisant la quercétine (**Annexe III**).

Les résultats du dosage des flavonoïdes ont montré que l'extract de l'éthanol 100 % a donné la concentration la plus élevée ($23,96 \pm 1,55$ mg Eq Quercétine/g), suivi par celui du méthanol 100% avec une valeur de $17,47 \pm 1,65$. Cependant, la valeur minimale est notée pour l'extract du méthanol 50% ($6,12 \pm 0,62$ mg Eq Quercétine/g) (**Fig. 21**).

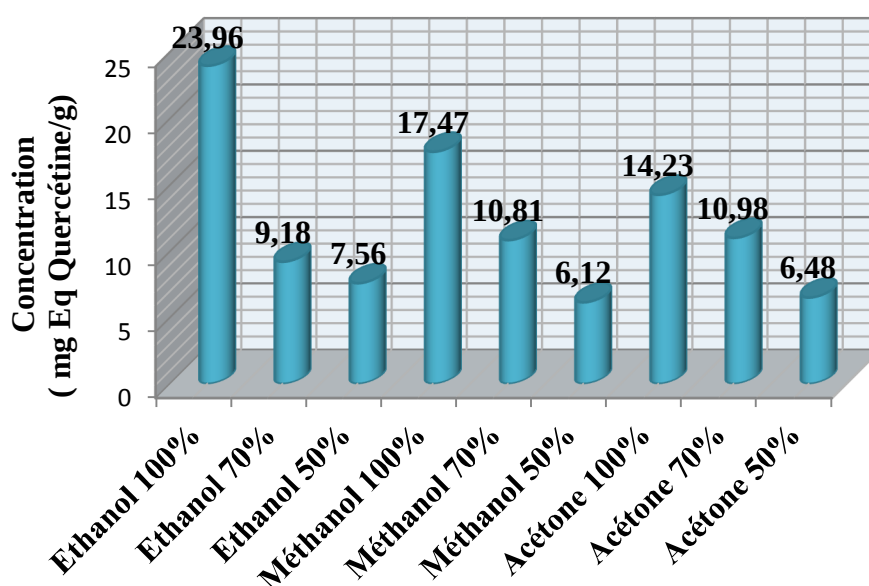


Figure 21 : Teneur en flavonoïdes des différents extraits de *Pulicaria odora*.

Conforti et al. (2009), ont trouvé des valeurs allant de 7,49 à 32,9 mg Eq Quercétine/g de matière sèche, en utilisant les feuilles de cinq espèces de la famille des astéracées, et l'éthanol aqueux à 70% pour l'extraction.

Dans l'étude de **Liu et al. (2008)**, des valeurs proches de nos résultats ont été retrouvées dans trois espèces de la famille des Asteraceae (de 24,26 à 28,35) en utilisant l'éthanol à 60% pour l'extraction.

D'autres études ont suggéré la richesse en flavonoïdes des espèces végétales appartenant à la famille des Astéracées (**Bohm et Tod, 2001**).

Le traitement des résultats par le test des comparaisons multiples (HSD), a donné l'ordre suivant, en termes d'efficacité à extraire les flavonoïdes de *Pulicaria odora* : l'éthanol 100% ($p < 0,0001$), suivi par le méthanol 100% et l'acétone 100%, sans différence significative entre ces deux derniers au risque de 5% ($p > 0,132$) (**Annexe IV**).

Selon **Seidel (2005)**, l'eau et le méthanol sont deux solvants polaires qui extraient particulièrement les flavonoïdes glycosylés et les tannins. Tandis que les flavonoïdes aglycones sont extraits par les alcools ou les mélanges eau-alcool (**Marston et Hostettmann, 2006**).

Les travaux menés par **Spigno et al. (2007)**, ont montré que l'éthanol extrait efficacement les flavonoïdes et catéchols des matières végétales. La différence dans la polarité des solvants d'extraction influence la solubilité des constituants chimiques d'un échantillon ainsi que le rendement d'extraction (**Sulaiman et al., 2011**).

C'est pourquoi, le choix d'un bon système de solvant est l'étape la plus décisive pour l'obtention d'une bonne teneur en composés phénoliques, en flavonoïdes ou toute autre composé, à partir d'un échantillon donné (**Sulaiman et al., 2011**).

III. Etude de l'activité antimicrobienne

III. 1. Etude de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits de *Pulicaria odora* est estimée en utilisant la méthode des spots vis-à-vis de quatre souches bactériennes (deux souches à Gram positif et deux autres à Gram négatif). Les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité : faible : $D < 8\text{mm}$, moyenne : $9 \leq D \leq 14\text{mm}$, forte $15 \leq D \leq 19\text{mm}$ et très forte $D > 20\text{mm}$ (**Bssaibis et Meziane 2009**)(Tableau IV).

L'extrait éthanolique à 100% a montré la plus haute activité contre les différentes souches testées, suivi par l'extrait de méthanol 100% qui a une activité remarquable contre les quatre souches testées, et en dernier l'extrait de l'acétone qui a une activité vis-à-vis des bactéries à Gram positif uniquement (**Tableau IV**).

Tableau IV: Résultats de l'activité antibactérienne des différents extraits de *Pulicaria odora*.

Solvant d'extraction	Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. innocua</i>
Ethanol 100%	$20 \pm 1,00$	$19 \pm 0,57$	$20 \pm 1,15$	$20 \pm 0,57$
Ethanol 70%	$17 \pm 1,15$	$17 \pm 1,15$	$17 \pm 0,00$	$18 \pm 0,57$
Ethanol 50%	$15 \pm 1,00$	$14 \pm 0,00$	$16 \pm 0,00$	$16 \pm 0,57$
Méthanol 100%	$18 \pm 0,57$	$16 \pm 0,57$	$17 \pm 0,00$	$17 \pm 0,57$
Méthanol 70%	$15 \pm 0,57$	$15 \pm 1,15$	$15 \pm 0,57$	$14 \pm 0,57$
Méthanol 50%	$14 \pm 0,57$	$12 \pm 0,00$	$12 \pm 0,57$	$12 \pm 0,00$
Acétone 100%	0	0	$15 \pm 0,57$	$18 \pm 1,52$
Acétone 70%	0	0	$14 \pm 0,57$	$17 \pm 1,15$
Acétone 50%	0	0	$10 \pm 1,15$	$12 \pm 1,15$
Acide gallique	$17 \pm 0,57$	$15 \pm 0,00$	$19 \pm 0,57$	$22 \pm 1,15$
Acide tannique	$18 \pm 1,52$	$17 \pm 0,57$	$20 \pm 0,57$	$19 \pm 0,57$
Quercétine	$16 \pm 0,57$	$14 \pm 1,52$	$22 \pm 1,15$	$20 \pm 0,00$
DMSO 1%	0	0	0	0

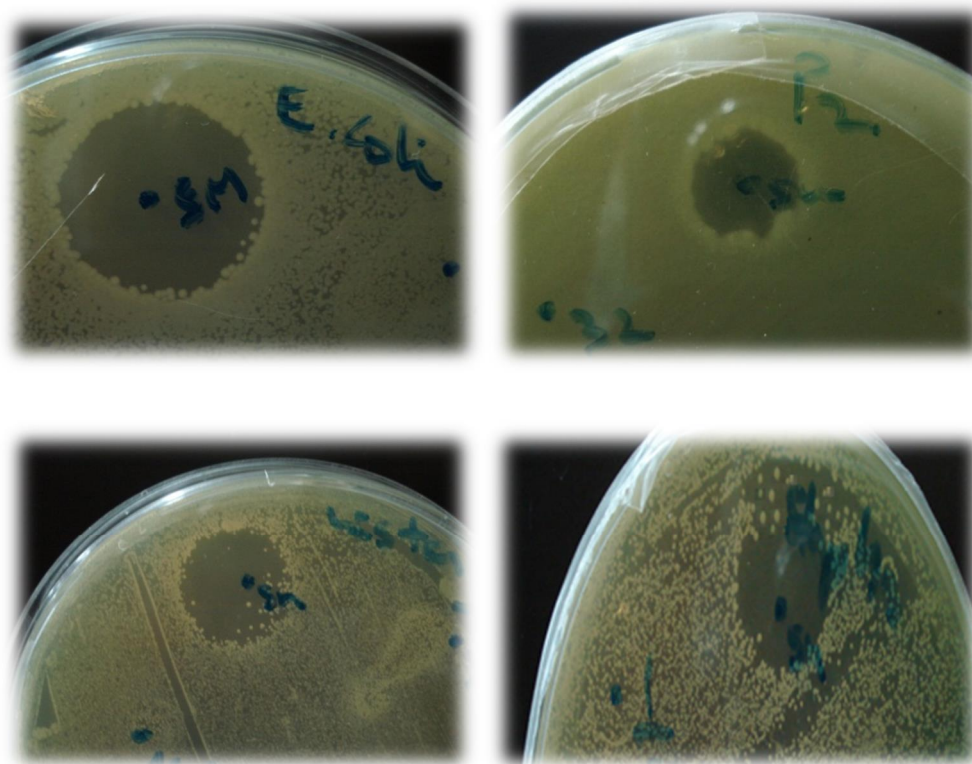


Figure 22 : Zones d' inhibition de l' extrait éthanolique à 100% de *Pulicaria odora*. (A) : *E.coli* ; (B) : *P.aeruginosa* ; (C) : *L.innocua* et (D) : *S.aureus*.

A l' exception des extraits acétoniques, les résultats ont montré une forte activité antibactérienne des composés phénoliques de *Pulicaria odora*, sur les deux types de bactéries (Gram négatif et positif), aucune différence significative n' a été observée en terme de sensibilité entre les Gram négatif et positif ($p > 0,734$) (**Annexe IV**).

Des études ont rapporté le pouvoir antibactérien d' autres espèces du genre *Pulicaria*, à savoir :

Pulicaria orientalis qui a inhibé la croissance des Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*), avec des zones d' inhibition allant de 12 à 17 mm (**Alzoreky et Nakahara, 2003**).

Pulicaria Crispa, qui a montré une activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Vibrio cholera* avec des zones d' inhibition de 13-17mm. Ces deux dernières plantes n' ont aucune activité contre *E.coli*. (**Nickavar et Mojab 2003**).

L'extract méthanolique de *Pulicaria stephanocarpa* a donné une bonne activité contre les Gram positifs (*S.aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus*). Aucune activité n'a été détectée vis-à-vis d'*E.coli* et *P. aeruginosa* (Mothana et Lindequist, 2005).

Contrairement à ces espèces, *Pulicaria undulata* a montré une activité comparable à celle de notre plante vis-à-vis *Staphylococcus aureus* (19mm), *Escherichia coli* (20mm) et *Pseudomonas aeruginosa* (20mm). On note que l'extract utilisé étant 10 fois plus concentré que le nôtre (El-Kamali et Mahjoub, 2009).

Comparativement avec ces résultats, *Pulicaria odora* a donné une meilleure activité antibactérienne.

III. 2. Etude de l'activité antifongique

Les résultats ont montré que les composés phénoliques de *Pulicaria odora*, sont dotés d'une bonne activité antifongique vis-à-vis des trois souches fongiques testées. L'extract de l'éthanol 100% a donné la plus haute activité, et l'extract de l'acétone 50% semble le moins actif avec une faible activité contre *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*, et aucune activité vis-à-vis de *T. reesei* (Tableau V). Il a été observé que *Trichoderma reesei* est la moins sensible parmi les souches testés, et *Aspergillus niger* est le plus sensible (Tableau V).

Tableau V: Résultats de l'activité antifongique des différents extraits de *Pulicaria odora*.

Solvant	Diamètres des zones d'inhibition (mm)		
	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>T. reesei</i>
Ethanol 100%	17 ± 0,57	20 ± 0,57	14 ± 0,57
Ethanol 70%	15 ± 0,57	17 ± 0,57	11 ± 0,57
Ethanol 50%	13 ± 0,57	14 ± 0,57	10 ± 0,57
Méthanol 100%	13 ± 1,00	15 ± 0,57	10 ± 0,57
Méthanol 70%	10 ± 0,57	12 ± 0,57	0
Méthanol 50%	8 ± 0,57	10 ± 0,57	0
Acétone 100%	12 ± 0,57	13 ± 0,57	0
Acétone 70%	11 ± 0,57	12 ± 0,57	0
Acétone 50%	8 ± 0,57	10 ± 0,57	0
Acide gallique	17 ± 0,57	15 ± 0,00	12 ± 0,57
Acide tannique	15 ± 1,52	13 ± 0,57	14 ± 0,57
Quercétine	10 ± 0,57	13 ± 1,52	11 ± 1,15
DMSO 1%	0	0	0

Aucune activité antifongique n'a été détectée pour les autres espèces du genre *Pulicaria* précédemment citées. Par contre d'autres études ont montré l'activité antifongique de quelques plantes de la famille des Asteraceae.

Karabegović et al. (2011), ont montré une forte activité antifongique de *Artemisia campestris* et *Artemisia vulgaris* vis-à-vis de *Aspergillus niger*, *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae* avec des zones d'inhibition de 33,1 ; 26,5 et 30,6 mm, respectivement.

Une autre étude de **Salie et al. (1996)**, a révélé une faible activité antifongique de *Falicia erigeroides* et *Eriocephalus africanus* (Asteraceae) vis-à-vis de *Candida albicans* avec des zones d'inhibition allant de 6 à 9 mm.

L'analyse statistique a montré que les souches fongiques sont moins sensibles (sauf *Aspergillus niger*), que les souches bactériennes avec $p < 0,01$ (**Annexe IV**).

À la lumière des résultats du dosage des polyphénols totaux, les tests d'activité antimicrobienne et l'analyse statistique des données ; on a suggéré que l'éthanol 100% est le meilleur solvant pour l'extraction des composés phénoliques présentant une activité antimicrobienne, de *Pulicaria odora*.

III.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices, bactéricides et fongicides

Les CMI sont déterminées en utilisant différentes concentrations de l'extrait éthanolique à 100%. Il est notable que les CMI sont éloignées des CMB/CMF pour toutes les souches testées. Afin de déterminer l'effet bactériostatique ou bactéricide (fongicide/fongistatique) **Loukabi, 1999**, a proposé le classement suivant :

CMI/CMB < 4 : Bactéricide/fongicide.

CMI/CMB ≥ 4 : Bactériostatique/fongistatique.

Les résultats sont résumés dans le **tableau VI**.

Tableau VI: Les concentrations minimales inhibitrices, bactéricides et fongicides de l'extract éthanolique à 100% de *Pulicaria odora*.

Concentrations Souches	CMI g/ml	CMB/CMF g/ml	CMI/CMB (CMI/CMF)
<i>P. aeruginosa</i>	1250	>5000	4
<i>S. aureus</i>	106	2500	23,58
<i>L. innocua</i>	625	2500	4
<i>E. coli</i>	625	2500	4
<i>A. flavus</i>	106	5000	23,58
<i>A. niger</i>	312	5000	16,06
<i>T. reesei</i>	312	5000	16,06

Selon le tableau VI, la CMI la plus élevée a été retrouvée pour *P. aeruginosa*, tandis que les plus basses CMI et CMB ont été trouvées dans le cas de *S. aureus*, cette remarque est prouvée statistiquement ($p < 0,01$) : *Pseudomonas aeruginosa* est statistiquement la souche la moins sensible parmi les sept souches testées (**Annexe IV**).

Les résultats obtenus ont révélé une meilleure activité à l'égard des souches Gram positif contrairement aux souches Gram négatif testées. Généralement les extraits de plantes sont plus actifs à l'égard des Gram positif que des Gram négatifs (**Okoro et al., 2010**).

Les résultats obtenus par **Alzoreky et Nakahara, 2003** et **El-Kamali et Mahjoub, 2009** concordent avec ceux observés dans notre étude. La résistance des bactéries Gram négatif à l'encontre des substances naturellement antibactériennes est liée à leur surface hydrophile et leur membrane externe riche en lipopolysaccharides (LPS) qui servent de barrière de protection (**Russell et Donnell, 1999**).

Dans une synthèse bibliographique de **Tajkarimi et al. (2010)**, il a été rapporté que les *Pseudomonas*, et plus particulièrement *Paeruginosa*, sont le groupe bactérien le moins sensible à l'effet des composés bioactifs.

En fin, selon les résultats des rapports CMI/CMB et CMI/CMF on suggère que les composés phénoliques de *Pulicaria odora* ont une activité bactériostatique et fongistatique vis-à-vis des souches testés.

IV. Séparation des composés phénoliques

IV. 1. Détermination du meilleur système de séparation par CCM

Vingt-six systèmes solvants ont été testés pour leur aptitude à séparer les composés phénoliques de *Pulicaria odora* (**Tableau VII**), le meilleur système sera utilisé pour la séparation sur colonne. Après migration et révélation, tous les spots sont dénombrés et les R_f sont calculés, une étude statistique est menée pour le choix du meilleur système.

Tableau VII: Résultats de la séparation des composés phénoliques de *Pulicaria odora* par CCM.

Système solvant	Composition	Proportions	Spots	R_f
A	Ether de pétrole/méthanol	1/1	2	0,08; 0,15
A	//	5/3	3	0,02; 0,08; 0,18
A	//	8/3	3	0,02; 0,06; 0,13
A	//	5/1	1	0,13
A	//	2/1	3	0,04; 0,10; 0,18
B	Hexane/méthanol	8/3	2	0,09; 0,14
B	//	5/1	3	0,05; 0,07; 0,10
B	//	2/1	3	0,16; 0,21; 0,27
C	Ether de pétrole/Chloroforme/Acétate d'éthyle	2/2/1	8	0,07; 0,12; 0,26; 0,46; 0,60; 0,73; 0,92; 1
C	//	2/3/1	12	0,17; 0,29; 0,34; 0,4; 0,46; 0,52; 0,56; 0,69; 0,78; 0,84; 0,9; 0,94
C	//	1/1/3	7	0,18; 0,22; 0,36; 0,47; 0,54; 0,77; 0,88; 0,96
D	Chloroforme/Acétate d'éthyle	3/1	2	0,43; 0,51
D	//	2/5	4	0,08; 0,18; 0,55; 0,81
E	Chloroforme/Acétone	1/4	2	0,09; 0,97
E	//	1/2	3	0,12; 0,53; 7,26
F	Ether de pétrole/Acétate d'éthyle	1/2	4	0,20; 0,25; 0,44; 1
F	//	1/4	5	0,30; 0,41; 0,51; 0,70; 1
F	//	1/3	3	0,19; 0,28; 0,65
G	Ether de pétrole/Méthanol	1/4	2	0,13; 0,66
G	//	1/3	2	0,62; 0,78
H	Ether de pétrole/Chloroforme	5/1	1	0,96
H	//	3/1	2	0,88; 0,97
H	//	3/2	1	0,90
I	Hexane/Acétate d'éthyle/Méthanol	5/1/1	2	0,02; 0,06
I	//	5/0,5/1	5	0,02; 0,04; 0,09; 0,18; 2,70
J	Hexane/Chloroforme/Acétate d'éthyle	1/3/1	3	0,15; 0,27; 0,38

L'analyse statistique a montré que le mélange (Acétate d'éthyle/ Chloroforme/ Ether de pétrole) est le meilleur système pour la séparation des composés phénoliques de *Pulicaria odora*, avec une haute signification ($p < 0,001$) (**Annexe IV**).

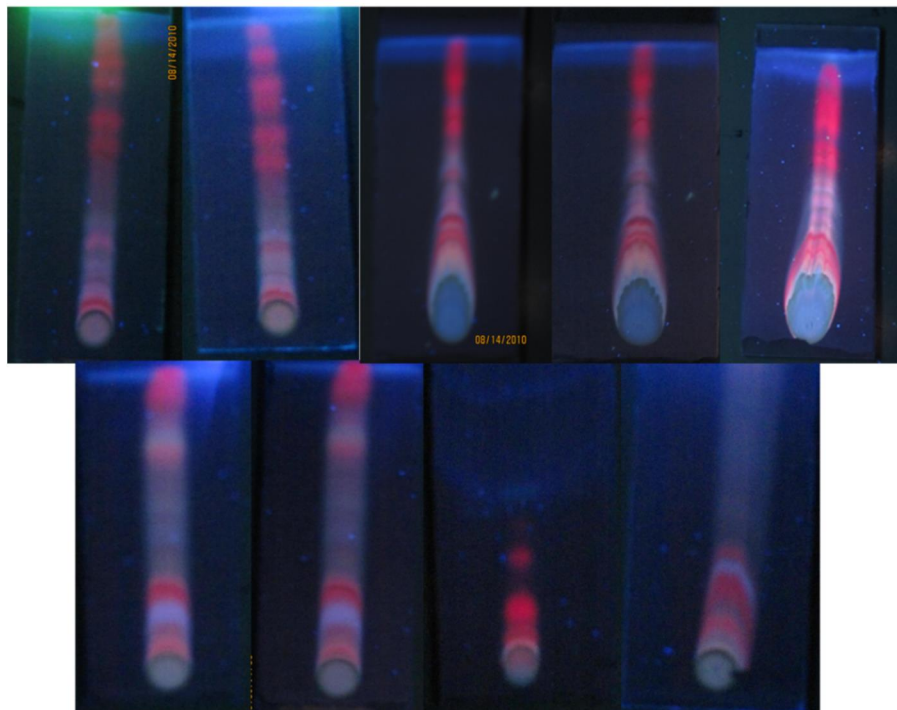


Figure 23 : Quelques plaques CCM révélées par UV à 365 nm.

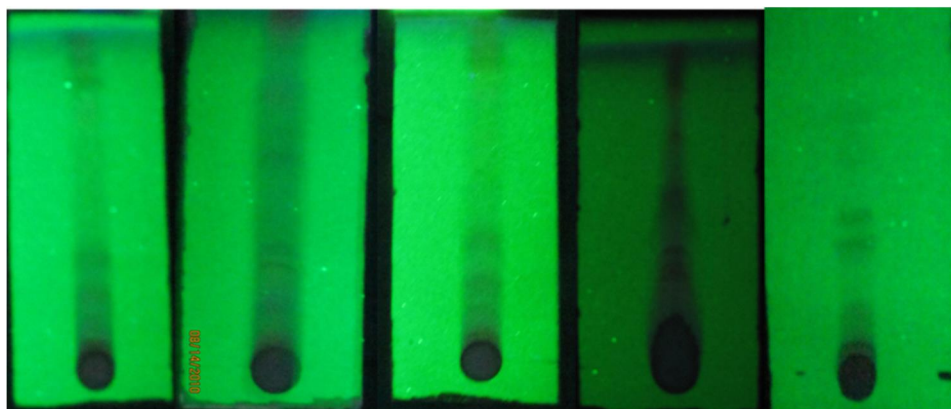


Figure 24 : Quelques plaques CCM révélées par UV à 254 nm.

IV. 2. Chromatographie sous vide sur colonne sèche

L'élution est réalisée en utilisant un gradient de polarité ascendant (Ether de pétrole/Chloroforme/Acétate d'éthyle). 36 fractions ont été récupérées, et testées pour leur activité antibactérienne. Les résultats sont consignés dans le **Tableau VIII**.

Tableau VIII: Activité antibactérienne des fractions récupérées par chromatographie sous vide sur colonne sèche, de l'extract de *Pulicaria odora*.

Fractions	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>L.innocua</i>	<i>P.aeruginosa</i>
1	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
2	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
3	ĩ	±	±	ĩ
4	ĩ	ĩ	±	ĩ
5	ĩ	±	±	ĩ
6	ĩ	±	±	ĩ
7	ĩ	±	ĩ	ĩ
8	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
9	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
10	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
11	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
12	+	+	ĩ	ĩ
13	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
14	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
15	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
16	+	ĩ	ĩ	+
17	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
18	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
19	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
20	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
21	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
22	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
23	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
24	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
25	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
26	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
27	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
28	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
29	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
30	ĩ	ĩ	+	ĩ
31	ĩ	ĩ	±	ĩ
32	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ
33	+	+	+	ĩ
34	ĩ	ĩ	ĩ	ĩ

Selon le tableau VII, on dénombre 10 fractions actives, regroupées sur 5 groupes comme suit :

Les fractions actives (3, 4, 5, 6 et 7), n'ayant qu'une faible activité vis-à-vis des Gram positifs, elles ne sont pas destinées à être analysées par HPLC.

Fraction 12, élue à l'Éther de pétrole/ chloroforme (1/9), active contre *E.coli* et *S.aureus* (**Fraction active I**).

Fraction 16, élue au Chloroforme/Acétate d'éthyle (9/1), douée d'une activité contre les Gram négatifs, (la seule fraction active vis-à-vis de *P.aeruginosa*) ; **Fraction active II**.

Fractions 30, élue au Chloroforme/Acétate d'éthyle (2/8 et 1,5/8,5 respectivement), ayant une activité vis-à-vis de *L.innocua* uniquement, ce spectre étroit rend cette fraction très intéressante du point de vue thérapeutique (**Fraction active III**).

Fraction 33, élue par le Chloroforme/Acétate d'éthyle (0,5/9,5), ayant un spectre d'activité large vis-à-vis de toutes les souches testées sauf *P.aeruginosa* ; c'est la **Fraction active IV**.

IV. 3. Analyse des fractions actives par HPLC

Les 4 fractions actives, issues de la séparation sur colonne sèche des composés phénoliques de *Pulicaria odora*, ainsi que des standards ont subi une analyse par RP-HPLC analytique, (Tableau IX).

Tableau IX : Identification de quelques composés phénoliques de *Pulicaria odora*, en utilisant des standards.

Standards	Temps de rétention	Fraction I	Fraction II	Fraction III	Fraction IV
Ac. caféique	3,13	-	-	-	+
Ac. p-coumarique	3,86	-	+	-	-
Rutine	5,33	-	+	-	-
Quercétine	3,57	+	-	-	-
Ac. gallique	3,61	-	+	-	-
Ac. tannique	2,85	+	-	-	-

IV. 3. 1. Chromatogramme de la fraction active I

La fraction active I est caractérisée par la présence de la quercétine (pic numéro 7), et de l'acide tannique (pic numéro 6), en grande quantité (21,49 % et 16,26 % respectivement), avec un composé majeur (23,30%) ayant un temps de rétention de 7,67 min. Cette fraction présente une activité antibactérienne vis-à-vis de *S.aureus* et *E.coli* (**Fig. 25**) et **Tableau X**.

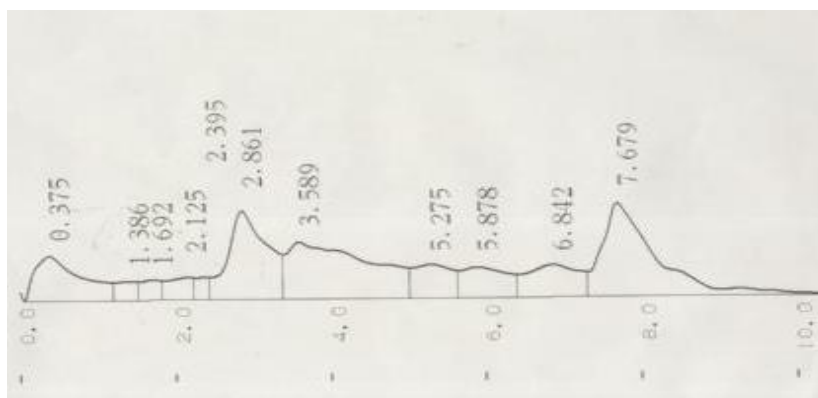


Figure 25 : Le chromatogramme de la fraction active I.

Tableau X : Résultats de l'analyse par HPLC de la fraction active I.

Numéro du pic	Temps de rétention (min)	Pourcentage
1	0,37	9,76
2	1,38	1,82
3	1,69	1,87
4	2,12	2,66
5	2,39	1,43
6	2,86	16,26
7	3,58	21,49
8	5,27	6,07
9	5,87	6,36
10	6,84	7,69
11	7,67	23,30

L'activité antibactérienne de la fraction active I vis-à-vis de *S.aureus* et *E.coli* est peut être liée à la richesse en quercétine et acide tannique. Plusieurs études ont rapporté l'activité inhibitrice de ces derniers vis-à-vis de divers microorganismes.

Rauha et al. (2000), ont rapporté que la quercétine est active contre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Plaper et ses collaborateurs ont rapporté que la quercétine se lie à la sous-unité GyrB de l'ADN gyrase de *E.coli* et inhibe ses activité ATPasique (**Plaper et al., 2003**). L'activité antibactérienne de la quercétine contre *E.coli* peut être en moins partiellement attribuée à l'inhibition de l'ADN gyrase (**Ohemeng et al., 1993**).

Widsten et ses collaborateurs, ont observé que l'acide tannique a inhibé la croissance de *S.aureus* (**Widsten et al., 2010**).

Akiyama et al., (2001) ont rapporté que l'acide tannique a une grande capacité à lier le fer et peut fonctionner comme un sidérophore. L'inhibition de la croissance des bactéries intestinales (*B.fragilis*, *C. perfringens*, *E.coli* et *E. cloacae*) par l'acide tannique est probablement liée à sa capacité élevée à lier le fer (**Zaidi-Yahiaoui et al., 2008**).

IV. 3. 2. Chromatogramme de la fraction active II

Caractérisée par une activité anti Gram négatif, riche en rutine (18,15%) (Pic numéro 8), elle contient de l'acide p-coumarique (5,40 %) (Pic numéro 5) et de l'acide gallique (5,68%) (Pic numéro 4), cette fraction est constituée majoritairement par le composé ayant un temps de rétention $t_r = 7,70$ min (47,16%) (**Fig. 26**)(Tableau XI).

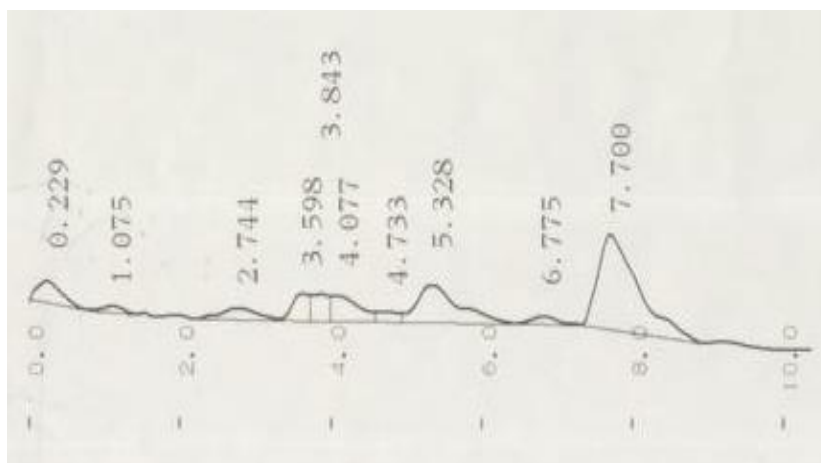


Figure 26 : Le chromatogramme de la fraction active II.

Tableau XI : Résultats de l'analyse par HPLC de la fraction active II.

Numéro du pic	Temps de rétention (min)	Pourcentage
1	0,22	6,03
2	1,07	1,46
3	2,74	5,14
4	3,59	5,68
5	3,84	5,40
6	4,07	8,25
7	4,73	2,58
8	5,32	18,15
9	6,77	2,10
10	7,7	45,16

Les acides phénoliques (acide cinnamique, acide coumarique, acide caféique et férulique) ont montré une bonne activité contre les bactéries à Gram positif et seulement une faible activité contre les bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) à forte concentration (Rodríguez-Vaquero et al., 2007a).

Il est rapporté que la rutine, forme glycolysée de la quercétine, est la plus active des flavonoïdes avec une activité anti-*Listeria* (Rodríguez-Vaquero et al., 2007b).

L'activité antibactérienne de la fraction active II vis-à-vis uniquement les bactéries à Gram négatif ne peut pas être liée à la présence de la rutine, de l'acide p-coumarique et de l'acide gallique, mais plutôt au composé majoritaire ayant un temps de rétention de (7,70 min), une analyse supplémentaire pour caractériser ce composé est donc nécessaire.

IV. 3. 3. Chromatogramme de la fraction active III

Le chromatogramme de la fraction active III est caractérisé par trois pics principaux (pics 3, 6 et 8) ayant des temps de rétention de 3,25 ; 5,36 et 8,39 min, avec des pourcentages de 21,01 %, 52,51% et 6,98 % respectivement. Cette fraction est douée d'une activité anti *Listeria* (Fig. 27) (Tableau XII).

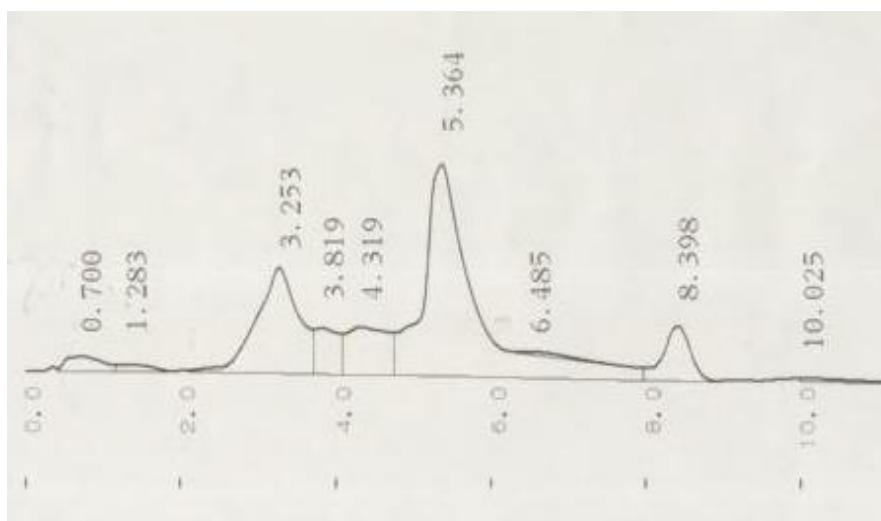


Figure 27 : Le chromatogramme de la fraction active III.

Tableau XII : Résultats de l'analyse par HPLC de la fraction active III.

Numéro du pic	Temps de rétention (min)	Pourcentage
1	0,7	2,58
2	1,28	0,98
3	3,25	21,01
4	3,81	5,14
5	4,31	9,48
6	5,36	52,51
7	6,48	0,70
8	8,39	6,98
9	10,02	0,59

IV. 3. 4. Chromatogramme de la fraction active IV

Cette fraction est caractérisée par un spectre d'activité large, elle est constituée principalement par la présence d'un composé ayant un temps de rétention de 5,06 min (71,94%), avec la présence de l'acide caféique avec un taux de 3,49% ($t_r = 3,10$) (**Fig. 28**) (**Tableau XIII**).

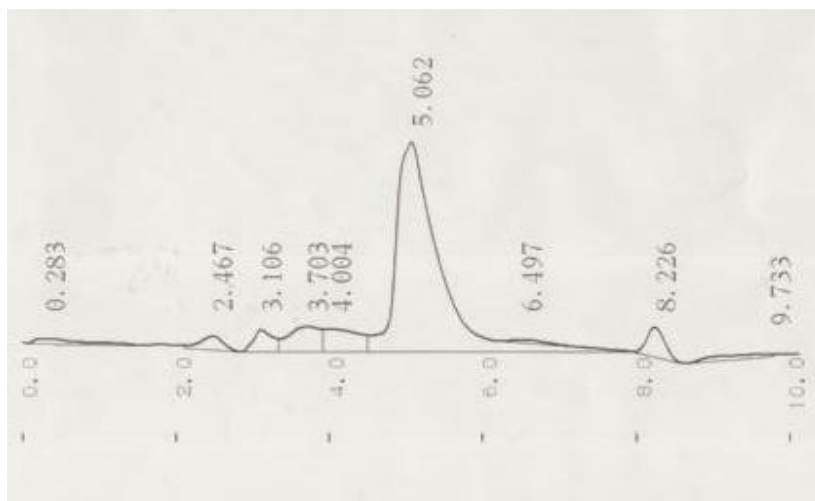


Figure 28 : Le chromatogramme de la fraction active IV.

Tableau XIII : Résultats de l'analyse par HPLC de la fraction active VI.

Numéro du pic	Temps de rétention (min)	Pourcentage
1	0,28	1,94
2	2,46	2,63
3	3,10	3,49
4	3,70	6,43
5	4,00	6,13
6	5,06	71,94
7	6,49	0,95
8	8,22	4,25
9	9,73	2,19

Dans notre étude, la résolution de la chromatographie sous vide sur colonne sèche été très variable entre les différentes fractions actives. Le plus haut taux de purification a été trouvé avec la fraction active IV (71,94%).

Selon **Pedersen et Rosenbohm (2001)**, il est possible d'avoir des produits purs à 95% par HPLC en utilisant cette technique. La résolution est influencée directement par la qualité du gel, la longueur de la colonne, et le gradient utilisé.

Dans notre cas, il est possible d'augmenter la résolution en utilisant un gradient avec des pas de 1%. **Harwood (1985)**, a suggéré que l'utilisation du gel de silice pour la CCM sans liant

ce gel. En plus de cette propriété, il est moins cher que ceux utilisés pour les chromatographies sur colonne, ce qui abaisse significativement le coût de cette technique.

Selon Harwood et *al.* (1999), une meilleure séparation est obtenue si le mélange à séparer ne contient aucun composé polymère. Donc il est préférable d'éliminer préalablement toutes les substances polymères avant l'application de cette technique.

CONCLUSION

Conclusion

Dans le but de déterminer la teneur en composés phénoliques, et d'évaluer l'activité antimicrobienne d'une plante médicinale locale *Pulicaria odora* ; les extraits méthanoliques, éthanoliques et acétoniques ont fait l'objet de cette étude.

Le rendement de l'extraction obtenu varie entre 3,66 % et 32,66 %, selon les solvants utilisés il peut être considéré comme un bon taux d'extraction par rapport aux autres études rapportées précédemment. La méthode utilisée pour l'extraction est la macération dans le bain marie à 37°C pendant 24h, cette méthode s'est révélée très efficace pour l'extraction des polyphénols de *Pulicaria odora*.

Notre plante peut être considérée comme l'une des espèces riches en polyphénols et en flavonoïdes : les taux allant jusqu'à $158,38 \pm 0,60$ mg EQ Ac gallique/g et $23,96 \pm 1,55$ mg Eq Quercétine/g respectivement. Les valeurs les plus élevées ont été obtenues avec l'extrait éthanolique à 100%.

Les 9 extraits ont été testés pour leur activité antimicrobienne à l'égard de 7 souches, dont quatre souches bactériennes (*E.coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 25923, *L.innocua* CLIP 74915 et *P.aeruginosa* ATCC 27853) et 3 souches fongiques (*Aspergillus flavus* 2CA 936, *Aspergillus niger* NRRL 391 et *T. reesei* ATCC 76765).

A l'exception des extraits acétoniques, tous les extraits ont montré une bonne activité antimicrobienne vis-à-vis des sept souches testées. L'extrait éthanolique à 100% a été le plus actif vis-à-vis de toutes les souches testées. Il est à noter que les souches fongiques sont moins sensibles que les souches bactériennes, et les Gram négatives sont moins sensibles que les Gram positives : *P.aeruginosa* a enregistré la plus haute CMI à savoir 25mg/ml.

Par ailleurs *T. reesei* a été la souche la moins sensible parmi les sept souches testées dont la plus grande zone d'inhibition a été obtenue avec l'extrait éthanolique à 100%, avec un diamètre de 14,33 mm. A la lumière de ces résultats et des tests statistiques, on a estimé que l'éthanol à 100% peut être considéré comme le meilleur solvant pour l'extraction des composés phénoliques, à activité antimicrobienne, de la plante *Pulicaria odora*.

Pour la séparation des composés phénoliques de *Pulicaria odora*, nous avons testé la méthode de la chromatographie sous vide sur colonne sèche (DCVC). Le choix de cette méthode est basé sur le fait qu'elle est non coûteuse, facile à réaliser, rapide.

Conclusion

Le choix du meilleur système solvant été réalisé en utilisant le test de comparaisons multiples (HSD), pour les résultats de la séparation par CCM. Un bon système solvant est déterminé par : le nombre de spots, la moyenne de la distance entre les spots et la distance entre le premier et le dernier spot. Dans notre test statistique nous avons pris en compte qu'une seule variable (nombre de spots).

26 systèmes solvant ont été testés, l'analyse statistique a révélé que le mélange (Ether de pétrole/Chloroforme/Acétate d'éthyle) a été le meilleur système de séparation parmi les systèmes solvant testés.

Ce meilleur système a été utilisé pour préparer un gradient de polarité ascendant avec des pas de 5%, pour l'élution des composés phénoliques dans la chromatographie sur couche mince sur colonne sèche. 34 fractions ont été récupérées et testées pour leur activité antibactérienne. Seulement cinq fractions ont été trouvées actives.

Pour évaluer l'efficacité de la méthode de séparation sur colonne sèche, on a réalisé une analyse par HPLC en phase inverse pour les quatre fractions les plus actives contre les souches testées. L'analyse des quatre chromatogrammes obtenus, suggère que la méthode de la chromatographie sous vide sur colonne sèche peut être considérée comme efficace et prometteuse pour la séparation de grande quantité de polyphénols (jusqu'à quelque grammes en cas d'utilisation de grandes colonnes).

Le plus haut taux de purification a été obtenu avec la fraction active IV avec 71,94% de pureté, cette valeur peut être facilement améliorée en utilisant un système d'élution avec des pas de 1% pour la préparation du gradient.

L'identification de composés phénoliques présents dans les différentes fractions actives, n'a pas eu lieu à cause de l'absence d'une base de données liée à l'appareil HPLC utilisé. Néanmoins on a pu caractériser quelques-uns en utilisant des standards à savoir la quercétine, la rutine, l'acide tannique, l'acide p-coumarique, l'acide gallique, l'acide caféique.

La plante *Pulicaria odora* s'est avérée riche en polyphénols et flavonoïdes, dotée d'une forte activité antimicrobienne, avec un effet bactériostatique et fongistatique.

La chromatographie sous vide sur colonne sèche a permis d'avoir des produits semi purs très faciles à purifier par RP-HPLC préparatoire, dans le but d'avoir des composés purs à 95%, qui

Conclusion

peuvent être subit une caractérisation par spectroscopie de masse (SM) et résonance magnétique nucléaire (RMN).

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Notre plante *Pulicaria odora* est une source prometteuse d'agents antimicrobiens. D'autres études concernant la purification et l'identification des molécules bioactives sont nécessaires.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches. A cet effet, et comme perspectives nous proposons de :

- Purifier et caractériser les molécules à activité anti *Pseudomonas*.
- Approfondir l'étude de l'activité antifongique de *Pulicaria odora*.
- Caractérisation de nouvelles substances à activité antimicrobienne en utilisant la spectroscopie de masse et la résonance magnétique nucléaire.
- Une identification complète des composés de *Pulicaria odora*.
- L'étude du mécanisme de l'action bactéricide ou fongicide des composés à effets antimicrobien.
- Faire une étude complémentaire sur l'activité antioxydante de *Pulicaria odora*.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Akiyama H, Fujii K, Yamasaki O, Oono T et Iwatsuki K. (2009). Antimicrobial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **48**, 487-491.

Albano SM. et Miguel MG. (2011). Biological activities of extract of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*. **33**: 338-343.

Alcaráz LE, Blanco SE, Puig ON, Tomas F et Ferreti FH. (2000). Antibacterial activity of flavonoids against méthicilin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Theoretical Biology*. **205**, 231-240.

Algabr MN, Ameddah S, Menad A, Mekkiou R, Chalchat JC, Benayeche S et Benayeche F. (2012). Essential oil composition of *Pulicaria Jaubertii* from Yemen. *International journal of medicinal and aromatic plants*. **2(4)**. 688.

Al-Hazimi M et Al-khatan Z. (1992). Chemistry of various *Pulicaria* species (Asteraceae). *Journal of the chemical society of Pakistan*. **14** (3): 233.

Al-Momani W, Abu-Basha E, Janakat S, Nicolas RAJ et Ayling RD. (2007). *In vitro* antimycoplasmal activity of six Jordanian medicinal plants against three Mycoplasma species. *Trop Anim Health Prod*. **39**, 515-519.

Al-Yahya MA, El-Sayed AM, Mossa JS, Kozlowski JF, Antoun MD, Ferin M, Baird WM, Cassady JM. (1988). Potential cancer chemopreventive and cytotoxic agents from *Pulicaria cripa*. *Journal of Natural Products*. **51** (3), 621-624.

Alzoreky NS et Nakahara K. (2003). Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*, **80**: 225.

Ani V, Varadaraj MC, Naidu KA. (2006). Antioxydant and antimicrobial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.). *Eur Food Res Technol*. **224**, 109-155.

Awadh NAA, Julich WD, Kusnick C et Lindequist U. (2001). Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*. **74**, 173-179.



Bahurun T. (1997). Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement visionnément potentielle. Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius. 83-94.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Basile A, Giordano S, Lopez-Sáez JA et Cobianchi RC. (1999). Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry*. **52**, 1479-1482.

Bayer E, Butter KP, Finkenzeller X et Grau J. (1990). Guide de la flore méditerranéenne. Edition : Delachaux et Niestlé, S. A. Paris. p : 206-207.

Beattie KD, Raouf R, Gander L, May TW, Ratcowsky CD, Donner CD, Gill M, Grice ID et Tiralongo E. (2010). Antimicrobial metabolites from Australian macrofungi from genus *Cortinarius*. *Phytochemistry*, xxx, xxx-xxx. (Article in press).

Bernard FX, Sable S, Cameron B, Provost J, Desnottes JF, Crouzet J et Blanche F. (1997). Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **41**, 992-998.

Boban N, Tonkic M, Modun D, Budimir D, Mudnic I, Davorka Sutlovic D, Punda-Polic V et Boban M. (2010). Thermally treated wine retains antibacterial effects to food-borne pathogens. *Food Control*. **21**, 1161-1165.

Bohm BA, et Tod F. (2001). Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae). Edition Spriger. New York. 15p.

Bouayed J, Piri K, Rammel H, Dicko A, Desor F, Younos C et Soulimani R. (2007). Comparative evaluation of the antioxidant potential of some Iranian medicinal plants. *Food chemistry*. **104**: 364-368.

Briones-Nagata MP, Martinez-Goss MR et Hori K. (2007). A comparison of morphocytology and chemical composition of the two forms of the cyanobacterium, *Nostoc commune* Vauch, from Philippines and Japan. *Journal of Applied Phycology*. **19**, 675-683.

Brown AK, Papaemmanouil A, Bhowruth V, Bhatt A, Dover LG et Besra GS. (2007). Flavonoid inhibitors as novel antimycobacterial agents targeting Rv0636, a putative dehydratase enzyme involved in *Mycobacterium tuberculosis* fatty acids synthase II. *Microbiology*. **153**, 3314-3322.

Brunton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. 3^{ème} Edition. Edition. Tec et Doc. Lavoisier. Paris. 1120p.

Bssaibis G et Meziane A. (2009). Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter-Review. *Microbiol. Ind. San et Environn.* **3** (1), 44-55.

Burger O, Weiss E, Sharon N, Tabak M, Neeman I et Ofek I. (2002). Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus by a high-molecular-weight constituent of cranberry juice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **42**, 279-284.

Buzzini P, Turchetti B, Ieri F, Goretti M, Branda E, Mulinacci M et Romani A. (2007). Catechins and proanthocyanidins : naturally occurring O-heterocycles with antimicrobial activity. *Top Heterocycl Chem*. **10**, 239-263.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Caturla N, Vera-Samper E, Villalain J, Mateo CR et Micol V. (2003). The relationship between the antioxydant and antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radical Biology and Medicine*. **34**, 648-662.

Cevallos-Casals BA, et Cisneros-Zevallos L. (2010). Impact of germination on phenolic content and antioxydant activity of 13 edible seed species. *Food Chemistry*. **119**, 1485-1490.

Chanwitheesuk A, Teerawutgulrag A, Kilburn JD et Rakariyatham N. (2007). Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food Chemistry*. **100**, 1044-1048.

Cho YS, Schiller NL, Kahng HY et Oh KH. (2007). Cellular Response and Proteomic Analysis of *Escherichia coli* Exposed to Green Tea Polyphenols. *Curr Microbiol*. **55**, 501-506.

Cimolai N et Cimolai T. (2007). The cranberry and the urinary tract. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **26**, 767-776.

Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué 2010.

Conforti F, Sosa S, Marrelli M, Menichini F, Statti GA, Uzunov D, Tubaro A, Menichini F. (2009). The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: The role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. *Food Chemistry*. **112**: 592.

Cottiglia F, Loy G, Garau D, Floris C, Caso M, Pompei R et Bonsignore L. (2001). Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine*. **8** (4), 302-305.

Cowan MM. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. **12**(4), 564-582.

Cushnie TPT et Lamb AJ. (2005a). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **26**, 343-356.

Cushnie TPT et Lamb AJ. (2005b). Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *Journal of Ethnopharmacologie*. **101**, 243-248.



De Bruyne T, Pieters L, Deelstra H et Vlietinck A. (1999). Condensed vegetable tannins : Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematic and Ecology*. **27**, 445-459.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Dembitsky VM. (2005). Astonishing diversity of natural surfactants : 6. Biologically active marine and terrestrial alkaloid glycosides- a review. *Lipids*. **41**(1), 1-27.

Derbel S et Ghedira K. (2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*. **1**, 28-34.

Dietrich H et Pour-Nikfardjam MS. (2009). Influence of phenolic compounds and tannins on wine-related microorganisms. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. 307-334.

Djeridane A, Yousfi M, Nedjemi B, Boutassouna D, Stocker P et Vidal N. (2006). Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. **97**, 654-660.



Eldeen IMS, Elgorashi EE et Van Staden J. (2005). Antimicrobial anti-inflammatory anticholinesterase and mutagenic effects of extracts obtained from some trees used in South African traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. **102**, 457-464.

El-Kamali HH et Mahjoub SA. (2009). Antibacterial Activity of *Francoeuria crispa*, *Pulicaria undulata*, *Ziziphus spina-christi* and *Cucurbita pepo* Against Seven Standard Pathogenic Bacteria. *Ethnobotanical Leaflets*. **13**: 22-33.

El-Seedi RH, Burman R, Mansour A, Turki Z, Boullos L, Gullbo J et Goransson U. (2013). The traditional medical uses and cytotoxic activities of sixty-one Egyptian plants: Discovery of an active cardiac glycoside from *Urginea maritima*. *Journal of Ethnopharmacology*. **145**, 746-757

Ezoubeiri A, Gadhi CA, Fdil N, Benharref A, Jana M et Vanhaelen M. (2005). Isolation and antimicrobial activity of two phenolic compounds from *Pulicaria odora* L. *Journal of Ethnopharmacology*. **99**, 287-292.



Frutos P, Hervás G, Giráldez FJ et Mantecón AR. (2004). Review. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*. **2**(2), 191-202.



Gaussen H, Leroy J-F et Ozenda P. (1982). Précis de botanique 2 : Végétaux supérieurs. Ed. Masson, Paris. 112p.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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

Goel G, Puniya AK, Aguilar CN et Singh K. (2005). Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturwissenschaften*. **92**, 497-503.

González-Segovia R, Quintanar JL, Salinas E, Ceballos-Salazar R, Eviles-Jiménez F et Torres-López J. (2008). Effect off flavonoid quercetine on inflammation and lipid peroxydation induced by *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of guinea pig. *Journal of Gastroenterology*. **43**, 441-447.

Gravot A. (2002). Etude de P450s impliqué dans la biosynthèse des furocoumarines chez *Ruta graveolens*. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine. (INPL), 221p.



Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxydants or pro-oxydants ? What we do learn from cell culture and in vivo studies?. *Archive of Biochemistry and Biophysics*. **xxx**, xxx-xxx (Article in press).

Hanbali FEL, Akssira M, Ezoubeiri A, Gadhi CA, Mellouki F, Benherraf Ahmed, Blazquez AM et Herminio B. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Pulicaria odora* L. *Journal of Ethnopharmacology*. **99**, 399ñ401.

Haraguchi H, Tanimoto K, Tamura Y, Mizutani K et Kinoshita T. (1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata* *Phytochemistry*. **48**, 125-129.

Harborne JB et Williams CA. (2000). Advances in flavonoid research since 1992-a review. *Phytochemistry*. **55**, 481-504.

Harwood LM, Moody CJ, Percy JM. (1999). *Experimental Organic Chemistry*, 2nd Edition. Edition : Blackwell Science. Oxford. pp. 33-35.

Harwood LM. (1985). Dry-column Flash Chromatography. *Aldrichimica Acta*. **18**: 25.

Heim K, Tagliaferro AR et Bobilya DJ. (2002). Flavonoids antioxydants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **13**, 572-584.

Hesse M., Meier H et Zeeh B. (1997). *Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique*. Edition : Masson. pp. 225-250.



Ikigai H, Nakae T, Hara Y et Shimamura T. (1993). Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica Acta*. **1147**, 132-136.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ismail HI, Chan KW, Mariod AA et Ismail M. (2010). Phenolic content and antioxydant activity of cantaloupe (*Cucumis melo*) methanolic extracts. Food Chemistry. **119**, 643-647.



Kannan RRR, Arumugam R, Meenakshi S and Anantharaman P. (2010). Thin layer chromatography analysis of antioxidant constituents from seagrasses of Gulf of Mannar Biosphere Reserve, South India. International Journal of ChemTech Research. 2(3), 1526-1530.

Karabegović I, Nikolova M, Veljković D, Stojiljević S, Veljković V et Lazić M. (2011). Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanolic Extracts of the *Artemisia* sp. Recovered by Different Extraction Techniques. Chinese Journal of Chemical Engineering, **19** (3): 508.

Karou D, Dicko MH, Simpore J et Traore AS. (2005). Antioxydant and antimicrobial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. African Journal of Biotechnology. **4**(8), 823-828.

Kellner R, Mermet J-M, Otto M et Widmer HM. (1998). Analytical chemistry. Edition : Wiley-VCH. 122p.

Kim TJ, Silva JL, Kim MK et Jung YS. (2010). Enhanced antioxidant capacity and antimicrobial activity of tannic acid by thermal processing. Food Chemistry. **118**, 740-746.

Kong Y, Fu Y-J, Zu Y-G, Chang FR, Chen YH, Liu XL, Stelten J et Schiebel H-M. (2010). Cajanoslactone, a new coumarin with anti-bacterial activity from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp] leaves. Food chemistry. **121**, 1150-1155.

Kuete V, Tangmouo JG, Penlap Beng V, Ngounou FN et Lontsi D. (2006). Antimicrobial activity of the methanolic extract from the stem bark of *Tridesmostemon omphalocarpoides* (Sapotaceae). Journal of Ethnopharmacology. xxx, xxx-xxx (Article in press).



Lev-Yadun S et Gould KS. (2009). Role of anthocyanins in plant defence. Science Business Media. **150**, 22-48.

Liu H, Qiu N, Ding H et Yao R. (2008). Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. Food Research International. **41** :368.

Loukabi G. (1999). Activité antimicrobienne des extraits aqueux totaux de *Detarimicrocarpum* sur huit espèces bactériennes impliquées dans certaines maladies infectieuses au BurkinaFasso-Review. CAMES-Serie A (**1**).

Luthar Z. (1992). Polyphenol classification and tannin content of buckwheat seeds (*Fagopyrum esculentum* Moench). Fagopyrum. **12**, 36-42.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

M

- Mahfouz M, Ghazal A, El-Dakhakhny M, Ghoneim MT. (1973).** Pharmacological studies on the active principle isolated from *Pulicaria dysenterica*. Journal of Drug Research. **5** (2), 151-172.
- Manthey JA, Guthrie N et Grohmann K. (2001).** Biological properties of Citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. Current Medicinal Chemistry. **8**, 135-153.
- Marston A et Hostettmann K. (2006).** Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. Journal of Chromatography. **1112** (2): 181-194.
- Martin S, Andriantsitohaina R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. Annales de Cardiologie et d'Angéiologie. **51**(6), 304-315.
- Marwah RG, Fatope MO, Al Mahrooqi R, Varma GB, Al Abadi H et Al-Burtamani SKS. (2007).** Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. Food Chemistry, **101**: 469.
- Min BR1, Pinchak WE1, Merkel R, Walker S, Tomita G and Anderson RC. (2008).** Comparative antimicrobial activity of tannins extracts from perennial plants on mastitis pathogens. Scientific Research and Essay. **3**(2), 66-73.
- Mirzoeva OK, Grishanin RN et Calder PC. (1997).** Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effect on growth, membrane potential and motility of bacteria. Microbiol Res. **152**, 239-246.
- Mori A, Nishino C, Enoki N et Tawata S. (1987).** Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. Phytochemistry. **26**, 2231-2234.
- Mothana RAA et Lindequist U. (2005).** Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqatra. Journal of Ethnopharmacology, **96** : 180.
- Murray R. (1992).** Instrumentation in analytical chemistry. Edition: Louise Voress. pp.84-122.

N

- Naczki M et Shahidi F. (2006).** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis-a review. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. **41**, 1523- 1542.
- Narayana KR, Reddy MR, Chaluvadi MR et Krishna DR. (2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. India Journal of Pharmacology. **33**, 2-16.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Nickavar B et Mojab F.(2003). Antibacterial activity of *Pulicaria dysenterica* Extracts. Fitoterapia. **74**: 391.

Nijveldt R, Robert J, Nood E, Danny EC, Van Hoorn P, Boetens G, Klaske VN et Paul F. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential application. American Journal of Clinical Nutrition. **74**: 18-25.

Nikitina VS, Kuzmina LY, Melentiev AI et Shendelö GV. (2007). Antibacterial activity of polyphenolic compounds isolated from plants of Geraniaceae and Rosaceae families. Applied biochemistry and Microbiology. **43**(6), 629-634.



Ohemeng KA, Schwender CF, FU KP et Barrett JF. (1993). DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1). Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. **3**, 225-230.

Okoro IO, Osagie A et Asibor EO. (2009). Antioxydant and antimicrobial activities of polyphénols from ethnomedicinal plants of Nigeria. African Journal of Biotechnology. **9** (20): 2989-2993.

Okuda T. (2005). Systematic and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. Phytochemistry. **66**, 2012-2031.

Ong KC et Khoo H-E. (1997). Biological effects of Myricetin-a review. Gen Pharmac. **29**(2), 121-126.

Orhan DD, Özçelik B, Özgen S et Ergun F. (2010). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of flavonoids. Microbiological Research. xxx, xxx-xxx (Article in press).

Orhan I, Özçelik B et Sener B. (2007). Antiviral and antimicrobial evaluation of some heterocyclic compounds from Turkish plants. Top Heterocycl Chem. **11**, 303-323.



Pedersen DS et Rosenbohm C. (2001). Dry Column Vacuum Chromatography. Synthesis. **16** :2431-2434.

Peer WA et Murphy AS. (2006). Flavonoids as signal molecules: Targets of flavonoid Action. In: The science of flavonoids. The Ohio State University Columbus, Ohio, USA, pp. 239-357.

Petacci F, Tavares WS, Freitas SS, Teles AM, Serrão JE et Zanuncio JC. (2012). Phytochemistry and quantification of polyphenols in extracts of the asteraceae weeds from diamantina, minas gerais state, brazil. Planta Daninha, Viçosa-MG. **30** (1): 12.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Pietta PG. (2000). Flavonoids as antioxydants. *Journal of Natural Products*. **63**, 1035-1042.

Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K et Defraigne J-O. (2002). Mécanisme physiologique de la défense antioxydante, Physiological action of antioxydant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. **16**, 233-239.

Pinello M, Del Fabbro P, Manzocco L, José Nunez M et Nicoli MC. (2005). Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry*, **92**: 109-117.

Plaper A, Golob M, Hafner I Oblak M, Solmajer T et Jerala R. (2003). Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem Biophys Res Commun*. **306**, 530-536.

Poklar Ulrih N, Ota A, Çentjurk M, Kure S et Abram V. (2010). Flavonoids and cell membrane fluidity. *Food Chemistry*. **121**, 78-84.

Primer A. (1996). Fondamental of modern UV-visible spectroscopy. Hewlett-Packard® Company. **12**, 59-65.

Puupponen-Pimi , R, Nohynek L, Alakomi H-L. et Oksman-Caldentey K-M. (2005a). Bioactive berry compounds-novel tools against pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol*. **67**, 8-18.

Puupponen-Pimi , R, Nohynek L, Alakomi H-L. et Oksman-Caldentey K-M. (2005b). The action of berry phenolics against human intestinal pathogens. *BioFactors*. **23**, 243-251.



Quezel P et Santa S. (1963). Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition CNRS. Paris. 163p.



Rahman I, Saibal K, Biswas SK et Kirkham PA. (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary Polyphenols. *Biochemical Pharmacology*. **72**, 1439-1452.

Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, K hkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H et Vuorela P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*. **56**, 3-12.

Rodriguez-Vaquero MJ, Alberto MR et Manca de Nadra MC. (2007a). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*. **18**, 93-101.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Rodriguez-Vaquero MJ, Alberto MR et Manca de Nadra MC. (2007b). influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes* Food Control. **18**, 587-593.

Roginsky V et Lissi EA. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxydant activity in food. Food Chemistry. **92**, 235-254.

Rouessac F et Rouessac A. (2004). Analyse chimique 6^{ème} édition : Méthodes et techniques instrumentales modernes. Edition : Dunod. pp.36-107.

Russell AD et Mc Donnell G. (1999). Anticeptics and Disinfectants : Activity, Action and Resistance. Clinical Microbiology. **12**: 147-179.



Salie F, Eagles PFK et Leng HMJ. (1996). Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species. Journal of Ethnopharmacology. **52**: 30-31.

Samy RP et Gopalakrishnakone P. (2008). Therapeutic potential of plants as antimicrobials for drugs discovery-a review. eCAM, 1-12.

Sato M, Tsuchiya H, Akagiri M, Takagi N et Iinuma M. (1997). Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anticandidal chalcones. Australian Dental Journal. **42**, 343-346.

Scalbert A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry. **30**, 3875-3883.

Seidel V. (2005). Initial and Bulk Extraction. In: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. Edition: Humana Press (Totowa). pp.27-37.

Sharma A. Patel VK et Ramteke P. (2009). Identification of vibriocidal compounds from medicinal plants using chromatographic fingerprinting. World J Microbiol Biotechnol. **25**, 19-25.

Shinozuka K, Kikuchi Y, Nishino C, Mori A et Tawata S.(1988). Inhibitory effect of flavonoids on DNA-dependent DNA and RNA polymerases. **44**(10), 882-885.

Shiota S, Shimizu S, Mizushima T, Ito H, Hatano T, Yoshida T et Tsutchiya T. (2004). Mecanisms of action of Corilagin and Tellimagradin I that remarkably potentiate the activity of β -lactams against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Microbiology Immunology. **48**, 67-73.

Shuaibi MN, Wuyep PTA, Yanagi T, Hirayama K, Ichinose A, Tanake T et Kouno I. (2008). Trypanocidal activity of extracts and compounds from the stem bark of *Anogeissus leicarpus* and *Terminalia avicennoides*. Parasitol Res. **102**, 697-703.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Qkerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras AR, Simonc M et Knez Z. (2005). Phenols, proanthocyanidine, flavones and flavonols in some plants materials and their antioxidant activities. Food chemistry, **89**: 191-198.

Skoog DA, Holler FJ et Nieman TA. (1998). Principles of instrumental analysis, 5th Edition. Edition : Saunders College Publishing. pp.113-144.

Song JH, Yang T-C, Chang K-W, Han S-K, Yi H-K et Jeon JG. (2007). *In vitro* effects of a fraction separated from *Polygonum cuspidatum* root on the viability, in suspension and biofilms formation of mutans streptococci. Journal of Ethnopharmacology. **112**, 419-425.

Spigno G, Tramelli L et De Faveri DM. (2007). Effect of time, temperature and solvent on concentration activity of grape marc phenolics. Journal of Food Engineering. **81**: 200-208.

Stanislavljević I, Stojićević S, Veljković D, Veljković V et Lazić M. (2009). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Echinacea (*Echinacea purpurea* L.) Extracts Obtained by Classical and Ultrasound Extraction. Chinese Journal of Chemical Engineering. **17**(3), 478-483.

Stapleton PD, Shah S, Hamilton-Miller JMT, Hara Y, Nagaoka Y, Kumagai A, Uesato S et Taylor PW. (2004). Anti-Staphylococcus aureus activity of and oxacilline resistance modulating capacity of 3 O-acyl-catechin. International Journal of Antimicrobial Agents. **24**, 374-380.

Stein AC, Sortino M, Avancini C, Zacchino S, Poser GV. (2005). Ethnoveterinary medicine in the search for antimicrobial agents: Antifungal activity of some species of *Pterocaulon* (Asteraceae). Journal of Ethnopharmacology. **99**: 211-214.

Stepanović S, Antić N, Đakić I et Čvabić-Vlahović M. (2003). *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. Microbiological Research. **158**, 353-357.

Sudano Rocaro A, Blanco AR, Giuliano F, Rusciano D et Enea V (2004). Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline instaphylococci by inhibing its efflux from bacterial cells. Antimicrobial Agents Chemotherapy. **48**, 1968-1973.

Sulaiman SF, Sajak AB, Ooi KL, Supriatno Seow EM. (2011). Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxydants of selected raw vegetables. Journal of Food composition and Analysis. **24**: 506-515.



Taguri T, Tanaka T et Kouno I. (2006). Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extract depending upon hydroxyphenyl structure. Biology Pharmacology Bulltin. **29**(11), 2226-2235.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Tajkarimi MM, Ibrahima SA et Cliver DO. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. **21**: 1199-1218.

Tanira MOM, BH, Bashir AK, Wasfi IA, Chandranath I.(1996). Evaluation of the relaxant activity of some United Arab Emirates plants on intestinal smooth muscle. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **48** (5), 545-550.

Timbal J, Lecoïnte A, Dupont P et Keller R. (1989). Flore forestière française : Edition Institut pour le développement forestier. 102p.

Trabelsi N, Megdiche W, Ksouri R. Falleh H, Oueslati S, Soumaya B, Hajlaoui H et Abdelly C. (2010). Solvent effects on phenolic contents and the biological activities of the halophyte *Limnium monocarpum* leaves. *LWT- Food Science and Technology*. **43**, 632-639.

Troszyńska A, Narolewska O, Robredo S, Estrella I, Hernández T, Lamparski G et Amarowicz R. (2010). The effect of polysaccharides on the astringency induced by phenolic compounds. *Food Quality and Preference*. **21**, 463-469.

Tsuchiya H et Iinuma M. (2000). Reduction of membrane fluidity by antimicrobial sophoraflavone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine*. **7**, 161-165.



Urzua A, Caroli M, Vasquez L, Mendoza L, Wilkens M et Tojo E. (1998). Antimicrobial study of the resinous exudate and of diterpenoids isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. **62**: 251-254.



Vergé S, Soulet S, Lacan F, Mas T, Arnaudinaud V, Nay B, Castagnino C, Delaunay J-C, Chèze C, Monti J-P, Deffieux G, Mérillon J-M, Nuhric A et Vercauteren J. (1999). Les polyphénols du vin: de la chimie pour la vie. *Bull Soc Pharm Bordeaux*. **138**, 75-90.



Widsten P, Heathcote C, Kandelbauer A, Guebitz G, Nyanhongo GS, Prasetyo EN et Kudanga T (2010). Enzymatic surface functionalisation of lignocellulosic materials with tannins for enhancing antibacterial properties. *Process Biochemistry*. xxx, xxx-xxx (Article in press).

Williams CA, Harborne JB, Greenham JR, Grayer RJ, Kite GC et Eagles J. (2003). Variations in lipophilic and vacuolar flavonoids among European *Pulicaria* species. *Phytochemistry*. **64**: 275-283.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Wong PYY et Kitts DD. (2006). Studies on the dual antioxydant and antimicrobial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chemistry*. **97**, 505-515.



Yadav JP, Arya V, Yadav S, Panghal M, Kumar S et Seema Dhankhar S. (2009). *Cassia Occidentalis* L.: A review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile. *Fitoterapia*. xxx, xxx-xxx (Article in press).

Yamamoto H et Ogawa T. (2002). Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. **66** (4), 921-924.

Yu H, Zhang L, Li L, Zheng C, Guo L, Li W, Sun P et Qin L. (2010). Recent developpements and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Reseach*. xxx, xxx-xxx (Article in press).



Zaidi-Yahiaoui R, Zaidi F et Ait Bessai A. (2008). Influence of gallic and tannic acid on enzymatic activity and growth of *Pectobacterium chrysanthemi* (*Dickeya chrysanthemi* bv. *Chrysanthemi*). *African Journal of Biotechnology*. **7**(4). 482-486.

Zhang J, Shen Q, Lu J-C, Li J-Y, Liu W-Y, Yang J-J, Li J et Xiao K. (2010). Phenolic compounds from the leaves f *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Ijinskaja and their inhibitory activity against PTP1B. *Food Chemistry*. **119**, 1491-1496.

Zhang Y-M et Rock CH. (2004). Evaluation of epigallocatechin gallate and related plant polyphenols as inhibitors of the FabG abd FabI reductase of bacterial type II Fatty-Acid Synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, **279** (30), 30994-31001.

Zhang Y-M, Lu Y-J et Rock CH. (2004). The reductase steps of the type II Fatty Acid Synthase as antimicrobial targets. *Lipids*. **39** (11), 1055-1060.

Zhao WH, Asano N, Hu Z-Q et Shimamura T. (2003). Restoration of antibacterial activity of ñlactams by epigallocatechine galate against ñlactamase-producing species depending on location of ñlactamase. *J Pharm Pharmacol*. **55**, 735-740.

Zhao WH, Hu Z-Q, Okubo S, Hara Y et Shimamura T. (2001). Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and ñlactams against methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **45**, 1737-1742.

Zhao X, Sun H, Hou A, Zhao Q, Wei T et Xin W. (2005). Antioxydant properties of two gallotannins isolated from the leaves of *Pistacia weinmannifolia*. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1725**, 103-110.

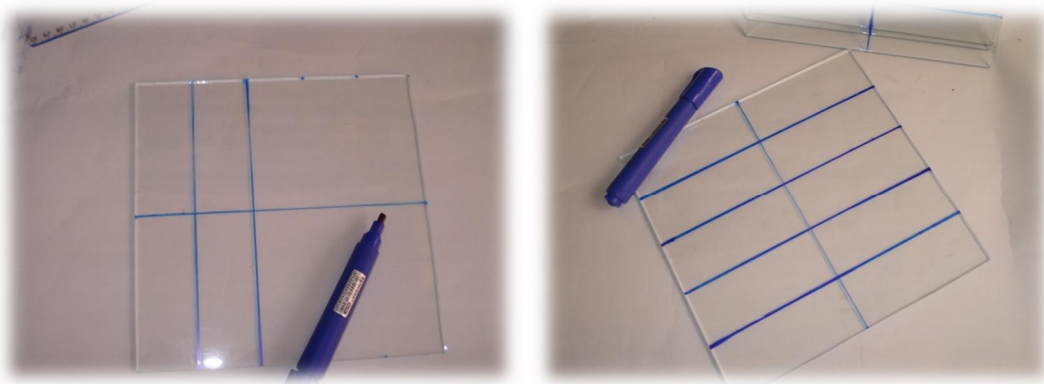
ANNEXES

Annexe I

Chromatographie sur couche mince (CCM)

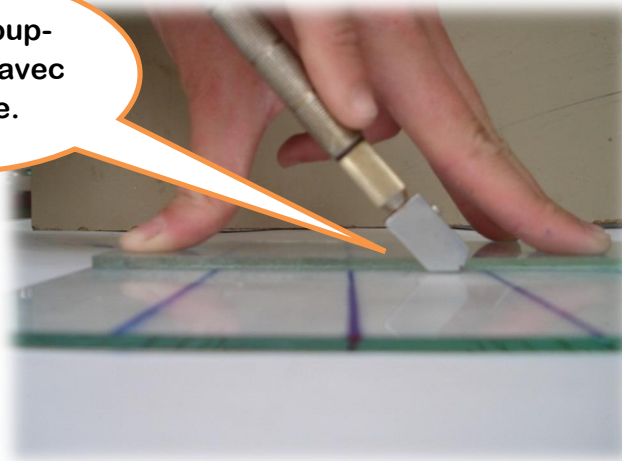
A. Comment préparer les plaques de 4x10 cm?

1. Acheter quatre plaques en verre (20 x 20 cm).
2. Nettoyer les plaques rigoureusement en utilisant un détergent.
3. Sécher les plaques à l'aire libre ou à l'étuve.
4. Tracer les plaques en utilisant un marqueur comme il est montré dans la figure.



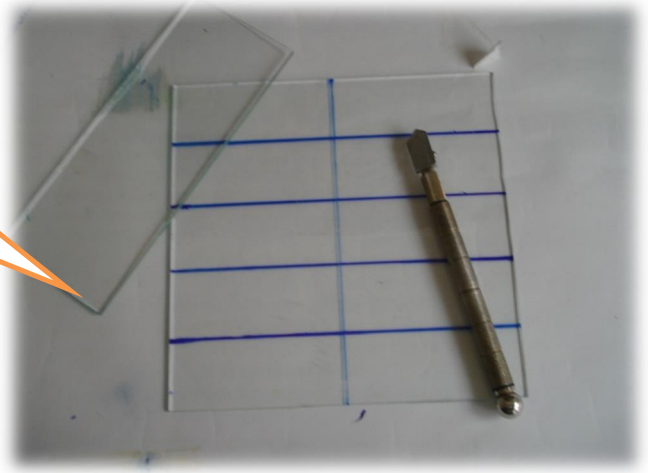
5. En utilisant un coupe-verre, repasser sur les traits (Figure).

Mettre le coupe-verre à 45° avec la plaque.



Annexe I

Ne jamais utiliser la règle, utiliser plutôt une autre plaque en verre.



6. Nettoyer les plaques une autre fois pour éliminer l'ancre.



7. Mélanger énergétiquement 50 g de gel de silice avec 100 ml d'eau distillée.



8. Déposer le gel dans le cube de l'étaleur et choisir l'épaisseur voulue.

Annexe I

9. Etaler le gel sur les plaques en déplaçant le cube rapidement le long des plaques.



10. Après que les plaques soient sèches (environ 4 heures), activer les plaques en les mettre dans l'œtuve à 100 °C pendant 30 min.



11. Après refroidissement des plaques à l'aire libre, découper ces dernières comme il est montré dans la figure.

Annexe I

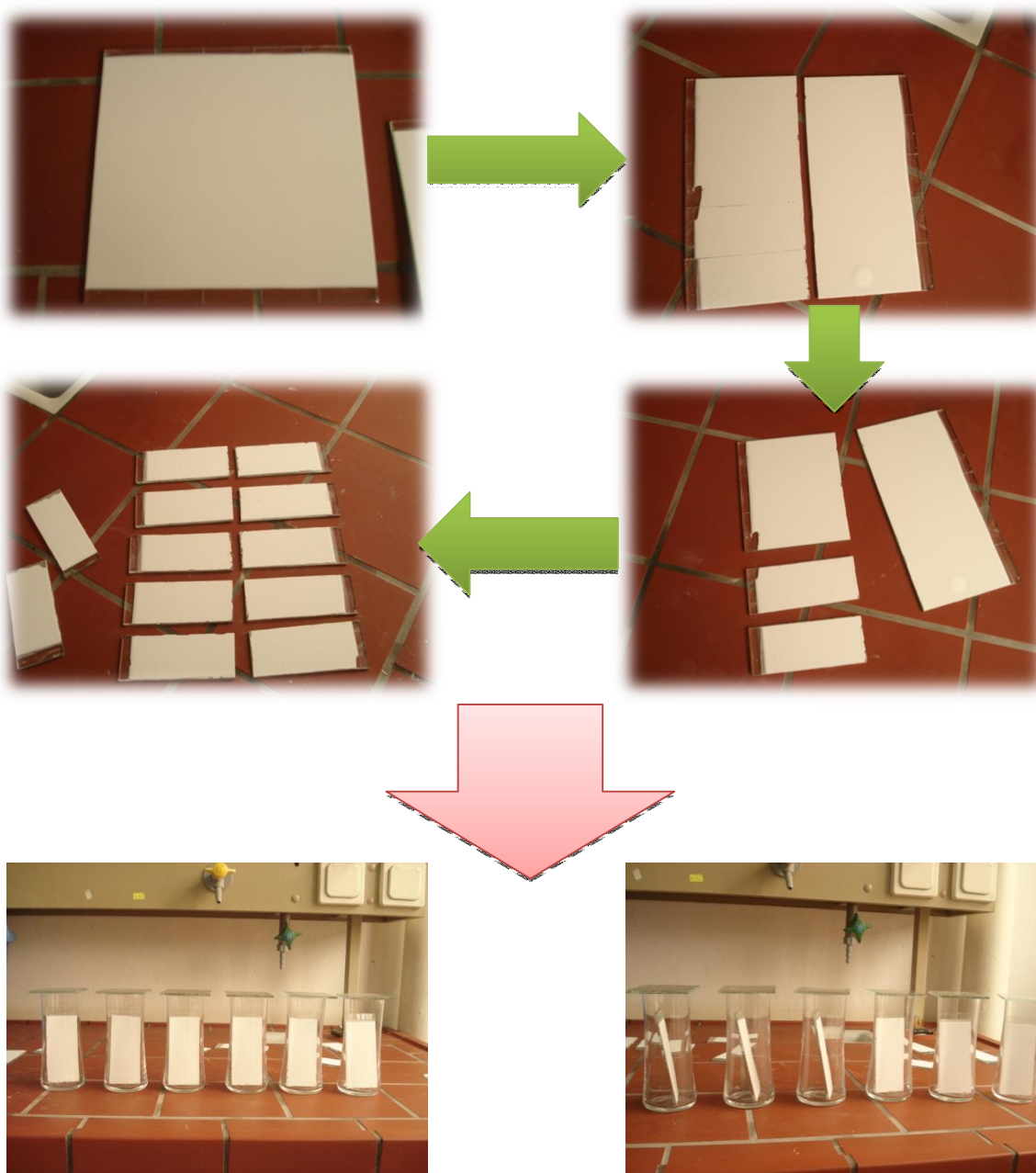


Tableau XIV: Lignes directrices sur les paramètres de taille et volume pour la chromatographie sur colonne sèche (Harwood et al., 1999).

Diamètre de l'entonnoir	Poids de la silice	Poids de l'échantillon	Volume des fractions récupérées
30 mm	15 g	15-500 mg	10-15 ml
40 mm	30 g	0,5 - 3 g	15-30 ml
70 mm	100 g	2-15 g	20-50 ml

Annexe II

Résultats bruts

Tableau XV : Résultats du rendement d'extraction.

Solvant	Rendement %			Moyenne	Ecart type
	Essai 1	Essai 2	Essai 3		
Ethanol 100%	7	6	6	6,33333333	0,577350269
Ethanol 70%	24	26	25	25	1
Ethanol 50%	28	30	28	28,6666667	1,154700538
Méthanol 100%	13	14	16	14,3333333	1,527525232
Méthanol 70%	24	25	25	24,6666667	0,577350269
Méthanol 50%	31	34	33	32,6666667	1,527525232
Acétone 100%	3	5	3	3,66666667	1,154700538
Acétone 70%	21	21	22	21,3333333	0,577350269
Acétone 50%	26	26	25	25,6666667	0,577350269

Tableau XVI : Résultats du dosage des polyphénols totaux.

Solvant	Absorbance 765 nm			Concentration (mg Eq Ac gallique/g)			Moyenne	Ecart type
	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 1	Essai 2	Essai 3		
Ethanol 100%	1,374	1,376	1,384	157,93	158,16	159,07	158,38667	0,6028543
Ethanol 70%	0,969	0,968	0,966	111,37	111,26	111,03	111,22	0,1734935
Ethanol 50%	0,586	0,583	0,588	67,35	67,01	67,58	67,313333	0,2867635
Méthanol 100%	0,98	0,972	0,975	112,64	111,72	112,06	112,14	0,4651881
Méthanol 70%	0,776	0,717	0,673	89,19	82,41	77,35	82,983333	5,9407856
Méthanol 50%	0,579	0,517	0,535	66,55	59,42	61,49	62,486667	3,6680013
Acétone 100%	1,071	1,165	1,112	123,1	133,9	127,81	128,27	5,4146745
Acétone 70%	0,822	0,772	0,811	94,48	88,73	93,21	92,14	3,0206456
Acétone 50%	0,7	0,696	0,624	80,45	79,99	71,72	77,386667	4,9128641

Tableau XVII : Résultats du dosage des flavonoïdes.

Solvant	Absorbance 430 nm			Concentration (mg Eq Quercitine/g)			Moyenne	Ecart type
	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 1	Essai 2	Essai 3		
Ethanol 100%	0,046	0,046	0,041	24,86	24,86	22,16	23,96	1,5588457
Ethanol 70%	0,017	0,015	0,019	9,19	8,1	10,27	9,1866667	1,0850038
Ethanol 50%	0,014	0,014	0,014	7,56	7,56	7,56	7,56	0
Méthanol 100%	0,035	0,029	0,033	18,92	15,67	17,84	17,476667	1,6551838
Méthanol 70%	0,023	0,02	0,017	12,43	10,81	9,19	10,81	1,62
Méthanol 50%	0,012	0,01	0,012	6,48	5,4	6,48	6,12	0,6235383
Acétone 100%	0,027	0,025	0,027	14,59	13,51	14,59	14,23	0,6235383
Acétone 70%	0,015	0,023	0,023	8,1	12,43	12,43	10,986667	2,4999267
Acétone 50%	0,012	0,012	0,012	6,48	6,48	6,48	6,48	0

Annexe II

Résultats bruts

Tableau XVIII : Résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *E.coli*.

	Zone d'inhibition d' <i>E. coli</i> (mm)				
Solvant	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	Ecart type
Ethanol 100%	21	19	20	20	1
Ethanol 70%	18	16	18	17,333333	1,1547005
Ethanol 50%	16	15	14	15	1
Méthanol 100%	18	18	19	18,333333	0,5773503
Méthanol 70%	16	15	15	15,333333	0,5773503
Méthanol 50%	15	14	15	14,666667	0,5773503
Acétone 100%	0	0	0	0	0
Acétone 70%	0	0	0	0	0
Acétone 50%	0	0	0	0	0

Tableau XIX : Résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *P.aeruginosa*.

	Zone d'inhibition de <i>P. aeruginosa</i> (mm)				
Solvant	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	Ecart type
Ethanol 100%	20	19	20	19,666667	0,5773503
Ethanol 70%	18	16	18	17,333333	1,1547005
Ethanol 50%	14	14	14	14	0
Méthanol 100%	17	16	16	16,333333	0,5773503
Méthanol 70%	14	14	16	14,666667	1,1547005
Méthanol 50%	12	12	12	12	0
Acétone 100%	0	0	0	0	0
Acétone 70%	0	0	0	0	0
Acétone 50%	0	0	0	0	0

Tableau XX : Résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *S.aureus*.

	Zone d'inhibition de <i>S. aureus</i> (mm)				
Solvant	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	Ecart type
Ethanol 100%	19	19	21	19,666667	1,1547005
Ethanol 70%	17	17	17	17	0
Ethanol 50%	16	16	16	16	0
Méthanol 100%	17	17	17	17	0
Méthanol 70%	15	15	16	15,333333	0,5773503
Méthanol 50%	12	13	12	12,333333	0,5773503
Acétone 100%	15	16	15	15,333333	0,5773503
Acétone 70%	14	15	14	14,333333	0,5773503
Acétone 50%	9	11	9	9,666667	1,1547005

Annexe II

Résultats bruts

Tableau XXI : Résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *L.innocua*.

	Zone d'inhibition de <i>L. innocua</i> (mm)				
Solvant	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	Ecart type
Ethanol 100%	20	21	20	20,333333	0,5773503
Ethanol 70%	18	19	18	18,333333	0,5773503
Ethanol 50%	16	17	16	16,333333	0,5773503
Méthanol 100%	16	17	17	16,666667	0,5773503
Méthanol 70%	14	15	14	14,333333	0,5773503
Méthanol 50%	12	12	12	12	0
Acétone 100%	18	16	19	17,666667	1,5275252
Acétone 70%	18	16	16	16,666667	1,1547005
Acétone 50%	11	13	13	12,333333	1,1547005

Tableau XXII : Résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *A.flavus*.

	Zone d'inhibition de <i>A. flavus</i> (mm)				
Solvant	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	Ecart type
Ethanol 100%	17	17	16	16,666667	0,5773503
Ethanol 70%	16	15	15	15,333333	0,5773503
Ethanol 50%	14	13	13	13,333333	0,5773503
Méthanol 100%	14	13	12	13	1
Méthanol 70%	9	10	10	9,666667	0,5773503
Méthanol 50%	9	8	8	8,333333	0,5773503
Acétone 100%	12	11	12	11,666667	0,5773503
Acétone 70%	11	10	11	10,666667	0,5773503
Acétone 50%	9	8	8	8,333333	0,5773503

Tableau XXIII : Résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *A.niger*.

	Zone d'inhibition de <i>A.niger</i> (mm)				
Solvant	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	Ecart type
Ethanol 100%	20	21	20	20,333333	0,5773503
Ethanol 70%	17	18	17	17,333333	0,5773503
Ethanol 50%	15	14	14	14,333333	0,5773503
Méthanol 100%	15	15	16	15,333333	0,5773503
Méthanol 70%	11	12	12	11,666667	0,5773503
Méthanol 50%	10	11	10	10,333333	0,5773503
Acétone 100%	13	14	13	13,333333	0,5773503
Acétone 70%	12	12	11	11,666667	0,5773503
Acétone 50%	10	10	9	9,666667	0,5773503

Annexe II

Résultats bruts

Tableau XXIV : Résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de *T.reesei*.

	Zone d'inhibition de <i>Trichoderma</i> (mm)				
Solvant	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	Ecart type
Ethanol 100%	14	15	14	14,333333	0,5773503
Ethanol 70%	12	11	11	11,333333	0,5773503
Ethanol 50%	10	11	10	10,333333	0,5773503
Méthanol 100%	10	11	11	10,666667	0,5773503
Méthanol 70%	0	0	0	0	0
Méthanol 50%	0	0	0	0	0
Acétone 100%	0	0	0	0	0
Acétone 70%	0	0	0	0	0
Acétone 50%	0	0	0	0	0

Annexe III

Courbes d'étalonnage

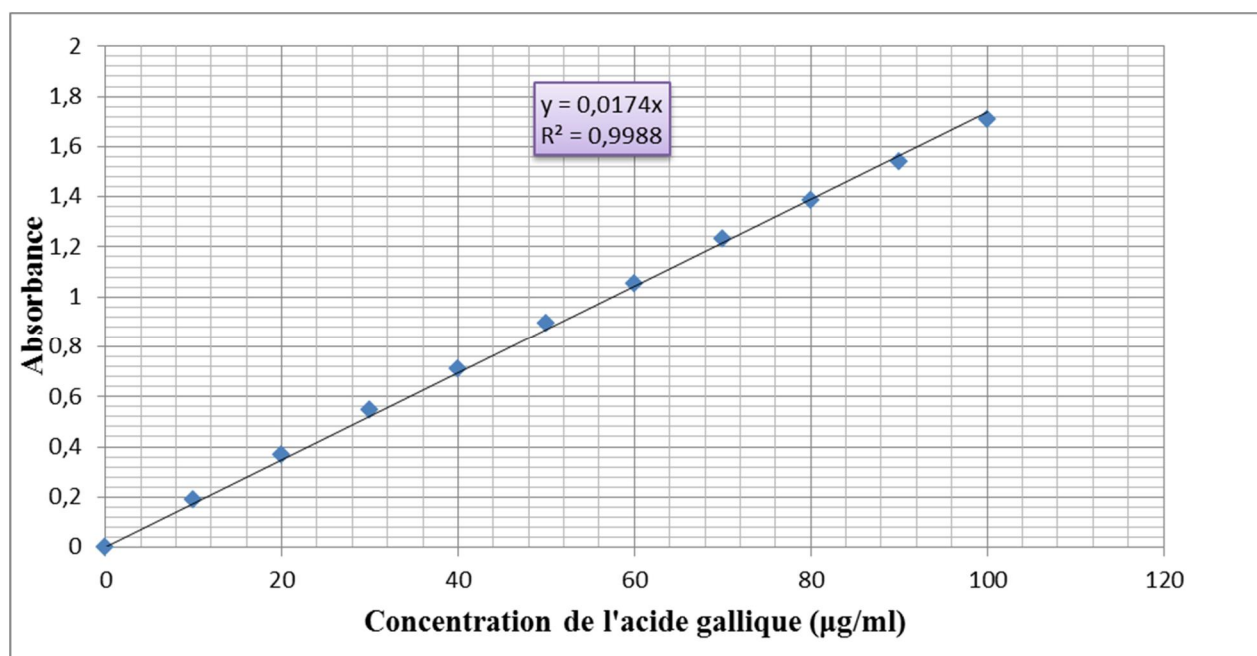


Figure 29 : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux.

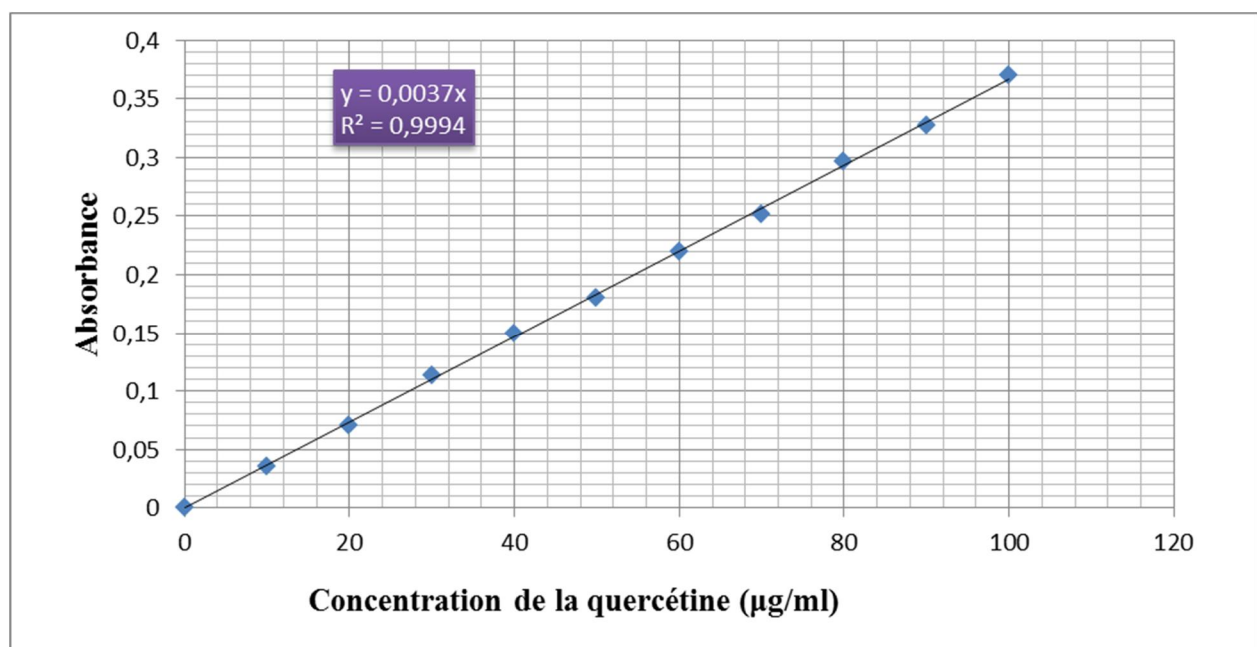


Figure 30 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.

Annexe IV

Analyses statistiques

Dosage des polyphénols totaux

ANOVA

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	8	23439,898	2929,987	235,406	< 0,0001
Résidus	18	224,037	12,447		
Total	26	23663,935			

TESTS DE COMPARAISON MULTIPLE

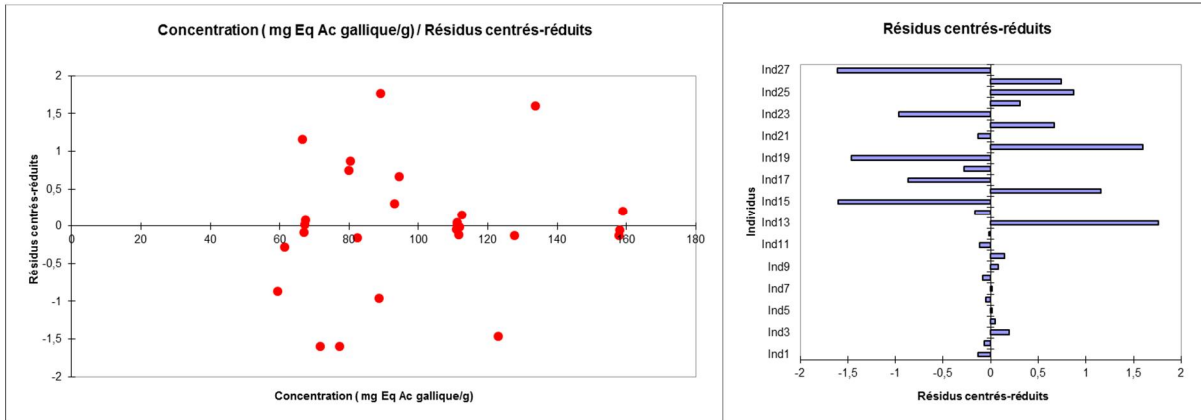
Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les groupes avec un intervalle de confiance à 95,00 % :					
Modalités	Différence	différence réduite	valeur critique	Pr. > Diff	Significatif
Ethanol 100% ~ Méthanol 50%	95,900	33,292	3,504	0,000	Oui
Ethanol 100% ~ Ethanol 50%	91,073	31,616	3,504	0,000	Oui
Ethanol 100% ~ Acétone 50%	81,000	28,119	3,504	0,000	Oui
Ethanol 100% ~ Méthanol 70%	75,403	26,177	3,504	0,000	Oui
Ethanol 100% ~ Acétone 70%	66,247	22,998	3,504	0,000	Oui
Ethanol 100% ~ Ethanol 70%	47,167	16,374	3,504	0,000	Oui
Ethanol 100% ~ Méthanol 100%	46,247	16,055	3,504	0,000	Oui
Ethanol 100% ~ Acétone 100%	30,117	10,455	3,504	0,000	Oui
Acétone 100% ~ Méthanol 50%	65,783	22,837	3,504	0,000	Oui
Acétone 100% ~ Ethanol 50%	60,957	21,161	3,504	0,000	Oui
Acétone 100% ~ Acétone 50%	50,883	17,664	3,504	0,000	Oui
Acétone 100% ~ Méthanol 70%	45,287	15,721	3,504	0,000	Oui
Acétone 100% ~ Acétone 70%	36,130	12,543	3,504	0,000	Oui
Acétone 100% ~ Ethanol 70%	17,050	5,919	3,504	0,000	Oui
Acétone 100% ~ Méthanol 100%	16,130	5,600	3,504	0,001	Oui
Méthanol 100% ~ Méthanol 50%	49,653	17,237	3,504	0,000	Oui
Méthanol 100% ~ Ethanol 50%	44,827	15,562	3,504	0,000	Oui
Méthanol 100% ~ Acétone 50%	34,753	12,065	3,504	0,000	Oui
Méthanol 100% ~ Méthanol 70%	29,157	10,122	3,504	0,000	Oui
Méthanol 100% ~ Acétone 70%	20,000	6,943	3,504	0,000	Oui
Méthanol 100% ~ Ethanol 70%	0,920	0,319	3,504	1,000	Non
Ethanol 70% ~ Méthanol 50%	48,733	16,918	3,504	0,000	Oui
Ethanol 70% ~ Ethanol 50%	43,907	15,242	3,504	0,000	Oui
Ethanol 70% ~ Acétone 50%	33,833	11,745	3,504	0,000	Oui
Ethanol 70% ~ Méthanol 70%	28,237	9,802	3,504	0,000	Oui
Ethanol 70% ~ Acétone 70%	19,080	6,624	3,504	0,000	Oui
Acétone 70% ~ Méthanol 50%	29,653	10,294	3,504	0,000	Oui
Acétone 70% ~ Ethanol 50%	24,827	8,619	3,504	0,000	Oui
Acétone 70% ~ Acétone 50%	14,753	5,122	3,504	0,002	Oui
Acétone 70% ~ Méthanol 70%	9,157	3,179	3,504	0,093	Non
Méthanol 70% ~ Méthanol 50%	20,497	7,115	3,504	0,000	Oui
Méthanol 70% ~ Ethanol 50%	15,670	5,440	3,504	0,001	Oui
Méthanol 70% ~ Acétone 50%	5,597	1,943	3,504	0,596	Non
Acétone 50% ~ Méthanol 50%	14,900	5,173	3,504	0,002	Oui
Acétone 50% ~ Ethanol 50%	10,073	3,497	3,504	0,051	Non
Ethanol 50% ~ Méthanol 50%	4,827	1,676	3,504	0,753	Non

Annexe IV

Analyses statistiques

Classement et regroupements des groupes non significativement différents :

Modalités	Moyenne	Regroupements					
Ethanol 100%	158,387	A					
Acétone 100%	128,270		B				
Méthanol 100%	112,140			C			
Ethanol 70%	111,220			C			
Acétone 70%	92,140				D		
Méthanol 70%	82,983				D	E	
Acétone 50%	77,387					E	F
Ethanol 50%	67,313						F
Méthanol 50%	62,487						G



Dosage des flavonoïdes

ANOVA

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	8	818,902	102,363	57,584	< 0,0001
Résidus	18	31,997	1,778		
Total	26	850,899			

Annexe IV

Analyses statistiques

TESTS DE COMPARAISON MULTIPLE

Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les groupes avec un intervalle de confiance à 95,00 % :						
Modalités	Différence	Différence réduite	Valeur critique	Pr. > Diff	Significatif	
Ethanol 100% ~ Methanol 50%	17,840	16,388	3,504	0,000	Oui	
Ethanol 100% ~ Acetone 50%	17,480	16,057	3,504	0,000	Oui	
Ethanol 100% ~ Ethanol 50%	16,400	15,065	3,504	0,000	Oui	
Ethanol 100% ~ Ethanol 70%	14,773	13,571	3,504	0,000	Oui	
Ethanol 100% ~ Methanol 70%	13,150	12,080	3,504	0,000	Oui	
Ethanol 100% ~ Acetone 70%	12,973	11,917	3,504	0,000	Oui	
Ethanol 100% ~ Acetone 100%	9,730	8,938	3,504	0,000	Oui	
Ethanol 100% ~ Methanol 100%	6,483	5,956	3,504	0,000	Oui	
Methanol 100% ~ Methanol 50%	11,357	10,432	3,504	0,000	Oui	
Methanol 100% ~ Acetone 50%	10,997	10,102	3,504	0,000	Oui	
Methanol 100% ~ Ethanol 50%	9,917	9,109	3,504	0,000	Oui	
Methanol 100% ~ Ethanol 70%	8,290	7,615	3,504	0,002	Oui	
Methanol 100% ~ Methanol 70%	6,667	6,124	3,504	0,000	Oui	
Methanol 100% ~ Acetone 70%	6,490	5,962	3,504	0,000	Oui	
Methanol 100% ~ Acetone 100%	3,247	2,982	3,504	0,133	Non	
Acetone 100% ~ Methanol 50%	8,110	7,450	3,504	0,001	Oui	
Acetone 100% ~ Acetone 50%	7,750	7,119	3,504	0,000	Oui	
Acetone 100% ~ Ethanol 50%	6,670	6,127	3,504	0,000	Oui	
Acetone 100% ~ Ethanol 70%	5,043	4,633	3,504	0,005	Oui	
Acetone 100% ~ Methanol 70%	3,420	3,142	3,504	0,100	Non	
Acetone 100% ~ Acetone 70%	3,243	2,979	3,504	0,134	Non	
Acetone 70% ~ Methanol 50%	4,867	4,471	3,504	0,007	Oui	
Acetone 70% ~ Acetone 50%	4,507	4,140	3,504	0,014	Oui	
Acetone 70% ~ Ethanol 50%	3,427	3,148	3,504	0,098	Non	
Acetone 70% ~ Ethanol 70%	1,800	1,653	3,504	0,765	Non	
Acetone 70% ~ Methanol 70%	0,177	0,162	3,504	1,000	Non	
Methanol 70% ~ Methanol 50%	4,690	4,308	3,504	0,010	Oui	
Methanol 70% ~ Acetone 50%	4,330	3,978	3,504	0,019	Oui	
Methanol 70% ~ Ethanol 50%	3,250	2,985	3,504	0,132	Non	
Methanol 70% ~ Ethanol 70%	1,623	1,491	3,504	0,846	Non	
Ethanol 70% ~ Methanol 50%	3,067	2,817	3,504	0,177	Non	
Ethanol 70% ~ Acetone 50%	2,707	2,486	3,504	0,300	Non	
Ethanol 70% ~ Ethanol 50%	1,627	1,494	3,504	0,844	Non	
Ethanol 50% ~ Methanol 50%	1,440	1,323	3,504	0,911	Non	
Ethanol 50% ~ Acetone 50%	1,080	0,992	3,504	0,982	Non	
Acetone 50% ~ Methanol 50%	0,360	0,331	3,504	1,000	Non	
Valeur critique du d de Tukey : 4,955						
Modalités	Moyenne	Regroupements				
Ethanol 100%	23,960	A				
Methanol 100%	17,477		B			
Acetone 100%	14,230		B	C		
Acetone 70%	10,987			C	D	
Methanol 70%	10,810			C	D	
Ethanol 70%	9,187				D	E
Ethanol 50%	7,560				D	E
Acetone 50%	6,480					E
Methanol 50%	6,120					E

Détermination de l'extrait le plus actif vis-à-vis des souches testées

ANOVA

Annexe IV

Analyses statistiques

Modèle	8	3280,646	410,081	18,127	< 0,0001
Résidus	180	4072,095	22,623		
Total	188	7352,741			

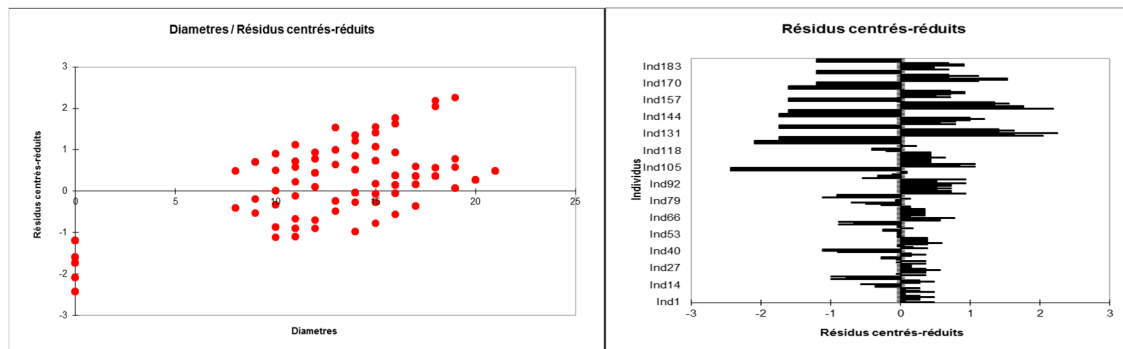
TESTS DE COMPARAISON MULTIPLE

Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les groupes avec un intervalle de confiance à 95,00 % :					
Modalités	Différence	Différence réduite	Valeur critique	Pr. > Diff	Significatif
Ethanol 100% ~ Acetone 50%	13,000	8,857	3,140	< 0,0001	Oui
Ethanol 100% ~ Acetone 70%	11,095	7,559	3,140	< 0,0001	Oui
Ethanol 100% ~ Acetone 100%	10,429	7,105	3,140	< 0,0001	Oui
Ethanol 100% ~ Methanol 50%	8,762	5,969	3,140	< 0,0001	Oui
Ethanol 100% ~ Methanol 70%	7,143	4,866	3,140	< 0,0001	Oui
Ethanol 100% ~ Ethanol 50%	4,524	3,082	3,140	0,059	Non
Ethanol 100% ~ Methanol 100%	3,381	2,303	3,140	0,346	Non
Ethanol 100% ~ Ethanol 70%	2,429	1,655	3,140	0,773	Non
Ethanol 70% ~ Acetone 50%	10,571	7,202	3,140	< 0,0001	Oui
Ethanol 70% ~ Acetone 70%	8,667	5,904	3,140	< 0,0001	Oui
Ethanol 70% ~ Acetone 100%	8,000	5,450	3,140	< 0,0001	Oui
Ethanol 70% ~ Methanol 50%	6,333	4,315	3,140	0,001	Oui
Ethanol 70% ~ Methanol 70%	4,714	3,212	3,140	0,041	Oui
Ethanol 70% ~ Ethanol 50%	2,095	1,427	3,140	0,886	Non
Ethanol 70% ~ Methanol 100%	0,952	0,649	3,140	0,999	Non
Methanol 100% ~ Acetone 50%	9,619	6,553	3,140	< 0,0001	Oui
Methanol 100% ~ Acetone 70%	7,714	5,256	3,140	< 0,0001	Oui
Methanol 100% ~ Acetone 100%	7,048	4,801	3,140	0,000	Oui
Methanol 100% ~ Methanol 50%	5,381	3,666	3,140	0,010	Oui
Methanol 100% ~ Methanol 70%	3,762	2,563	3,140	0,210	Non
Methanol 100% ~ Ethanol 50%	1,143	0,779	3,140	0,997	Non
Ethanol 50% ~ Acetone 50%	8,476	5,775	3,140	< 0,0001	Oui
Ethanol 50% ~ Acetone 70%	6,571	4,477	3,140	0,000	Oui
Ethanol 50% ~ Acetone 100%	5,905	4,023	3,140	0,003	Oui
Ethanol 50% ~ Methanol 50%	4,238	2,887	3,140	0,099	Non
Ethanol 50% ~ Methanol 70%	2,619	1,784	3,140	0,692	Non
Methanol 70% ~ Acetone 50%	5,857	3,990	3,140	0,003	Oui
Methanol 70% ~ Acetone 70%	3,952	2,693	3,140	0,158	Non
Methanol 70% ~ Acetone 100%	3,286	2,238	3,140	0,386	Non
Methanol 70% ~ Methanol 50%	1,619	1,103	3,140	0,973	Non
Methanol 50% ~ Acetone 50%	4,238	2,887	3,140	0,099	Non
Methanol 50% ~ Acetone 70%	2,333	1,590	3,140	0,809	Non
Methanol 50% ~ Acetone 100%	1,667	1,135	3,140	0,968	Non
Acetone 100% ~ Acetone 50%	2,571	1,752	3,140	0,713	Non
Acetone 100% ~ Acetone 70%	0,667	0,454	3,140	1,000	Non
Acetone 70% ~ Acetone 50%	1,905	1,298	3,140	0,931	Non
Valeur critique du d de Tukey : 4,441					

Modalités	Moyenne	Regroupements				
Ethanol 100%	18,714	A				
Ethanol 70%	16,286	A				
Methanol 100%	15,333	A	B			
Ethanol 50%	14,190	A	B	C		
Methanol 70%	11,571		B	C	D	
Methanol 50%	9,952			C	D	E
Acetone 100%	8,286				D	E
Acetone 70%	7,619				D	E
Acetone 50%	5,714					E

Annexe IV

Analyses statistiques



Détermination de l'ordre de sensibilité des souches testées en utilisant les diamètres des zones d'inhibition

ANOVA

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	6	96,286	16,048	28,083	< 0,0001
Résidus	14	8,000	0,571		
Total	20	104,286			

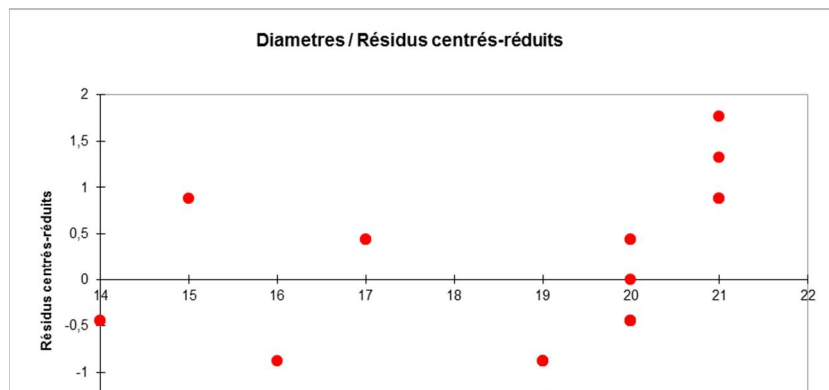
TESTS DE COMPARAISON MULTIPLE

Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les groupes avec un intervalle de confiance à 95,00 % :					
Modalités	Différence	Différence réduite	Valeur critique	Pr. > Diff	Significatif
<i>L. innocua</i> ~ <i>Trichoderma</i>	6,000	9,721	3,415	0,000	Oui
<i>L. innocua</i> ~ <i>A. flavus</i>	3,667	5,941	3,415	0,001	Oui
<i>L. innocua</i> ~ <i>S. aureus</i>	0,667	1,080	3,415	0,924	Non
<i>L. innocua</i> ~ <i>P. aeruginosa</i>	0,667	1,080	3,415	0,924	Non
<i>L. innocua</i> ~ <i>E.coli</i>	0,333	0,540	3,415	0,998	Non
<i>L. innocua</i> ~ <i>A.niger</i>	0,000	0,000	3,415	1,000	Non
<i>A.niger</i> ~ <i>Trichoderma</i>	6,000	9,721	3,415	0,000	Oui
<i>A.niger</i> ~ <i>A. flavus</i>	3,667	5,941	3,415	0,001	Oui
<i>A.niger</i> ~ <i>S. aureus</i>	0,667	1,080	3,415	0,924	Non
<i>A.niger</i> ~ <i>P. aeruginosa</i>	0,667	1,080	3,415	0,924	Non
<i>A.niger</i> ~ <i>E.coli</i>	0,333	0,540	3,415	0,998	Non
<i>E.coli</i> ~ <i>Trichoderma</i>	5,667	9,181	3,415	0,000	Oui
<i>E.coli</i> ~ <i>A. flavus</i>	3,333	5,401	3,415	0,001	Oui
<i>E.coli</i> ~ <i>S. aureus</i>	0,333	0,540	3,415	0,998	Non
<i>E.coli</i> ~ <i>P. aeruginosa</i>	0,333	0,540	3,415	0,998	Non
<i>P. aeruginosa</i> ~ <i>Trichoderma</i>	5,333	8,641	3,415	0,000	Oui
<i>P. aeruginosa</i> ~ <i>A. flavus</i>	3,000	4,861	3,415	0,004	Oui
<i>P. aeruginosa</i> ~ <i>S. aureus</i>	0,000	0,000	3,415	1,000	Non
<i>S. aureus</i> ~ <i>Trichoderma</i>	5,333	8,641	3,415	0,000	Oui
<i>S. aureus</i> ~ <i>A. flavus</i>	3,000	4,861	3,415	0,004	Oui
<i>A. flavus</i> ~ <i>Trichoderma</i>	2,333	3,780	3,415	0,026	Oui
Valeur critique du d de Tukey : 4,829					

Annexe IV

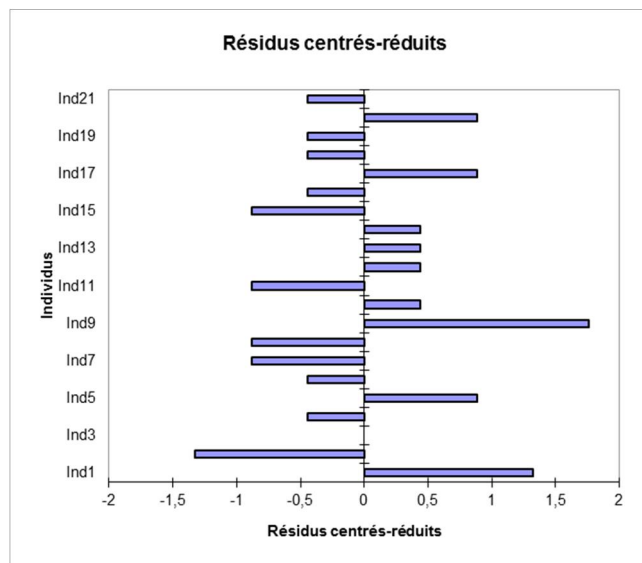
Analyses statistiques

Modalités	Moyenne	Regroupements		
L. innocua	20,333	A		
A.niger	20,333	A		
E.coli	20,000	A		
P. aeruginosa	19,667	A		
S. aureus	19,667	A		
A. flavus	16,667		B	
Trichoderma	14,333			C



Annexe IV

Analyses statistiques



Détermination de la différence de sensibilité entre les Gram positif et négatif

ANOVA

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	1	0,083	0,083	0,122	0,734
Résidus	10	6,833	0,683		
Total	11	6,917			

Annexe IV

Analyses statistiques

TESTS DE COMPARAISON MULTIPLE

Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les groupes avec un intervalle de confiance à 95,00 % :					
Modalités	Différence	Différence réduite	Valeur critique	Pr. > Diff	Significatif
Gram positif ~ Gram négatif	0,167	0,349	2,228	0,734	Non
Valeur critique du d de Tukey : 3,151					

Classement et regroupements des groupes non significativement différents :

Modalités	Moyenne	Regroupements
Gram positif	20,000	A
Gram négatif	19,833	A

Détermination de la différence de sensibilité entre les souches bactériennes et fongiques

ANOVA

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	1	40,480	40,480	12,054	0,003

Annexe IV

Analyses statistiques

TESTS DE COMPARAISON MULTIPLE

Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les groupes avec un intervalle de confiance à 95,00 % :					
Modalités	Différence	Différence réduite	Valeur critique	Pr. > Diff	Significatif
Bactérie ~ Champignon	2,806	3,472	2,093	0,003	Oui

Classement et regroupements des groupes non significativement différents :

Modalités	Moyenne	Regroupements
Bactérie	19,917	A
Champignon	17,111	B

Annexe IV

Analyses statistiques

Détermination de l'ordre de sensibilité des souches testées en utilisant les

CMV

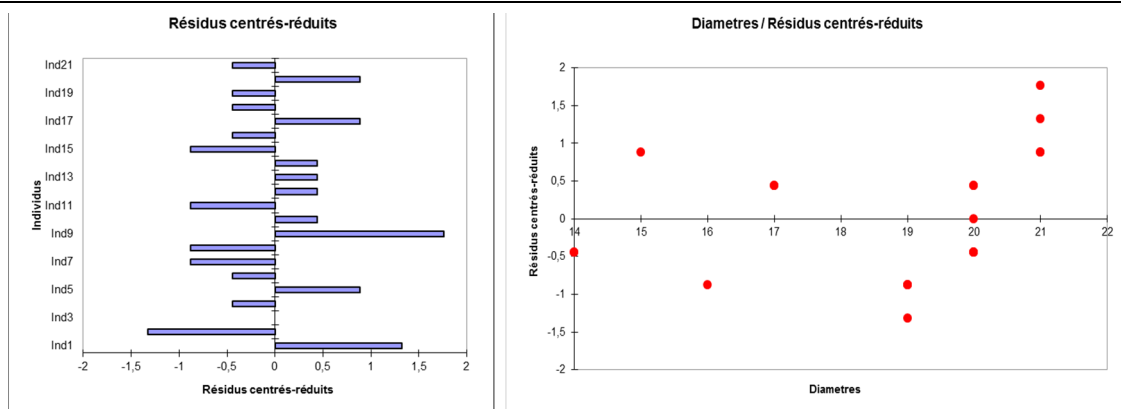
TESTS DE COMPARAISON MULTIPLE

Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les groupes avec un intervalle de confiance à 95,00 % :					
Modalités	Différence	Différence réduite	Valeur critique	Pr. > Diff	Significatif
<i>L. innocua</i> ~ <i>Trichoderma</i>	6,000	9,721	3,415	0,000	Oui
<i>L. innocua</i> ~ <i>A. flavus</i>	3,667	5,941	3,415	0,001	Oui
<i>L. innocua</i> ~ <i>S. aureus</i>	0,667	1,080	3,415	0,924	Non
<i>L. innocua</i> ~ <i>P. aeruginosa</i>	0,667	1,080	3,415	0,924	Non
<i>L. innocua</i> ~ <i>E.coli</i>	0,333	0,540	3,415	0,998	Non
<i>L. innocua</i> ~ <i>A.niger</i>	0,000	0,000	3,415	1,000	Non
<i>A.niger</i> ~ <i>Trichoderma</i>	6,000	9,721	3,415	0,000	Oui
<i>A.niger</i> ~ <i>A. flavus</i>	3,667	5,941	3,415	0,001	Oui
<i>A.niger</i> ~ <i>S. aureus</i>	0,667	1,080	3,415	0,924	Non
<i>A.niger</i> ~ <i>P. aeruginosa</i>	0,667	1,080	3,415	0,924	Non
<i>A.niger</i> ~ <i>E.coli</i>	0,333	0,540	3,415	0,998	Non
<i>E.coli</i> ~ <i>Trichoderma</i>	5,667	9,181	3,415	0,000	Oui
<i>E.coli</i> ~ <i>A. flavus</i>	3,333	5,401	3,415	0,001	Oui
<i>E.coli</i> ~ <i>S. aureus</i>	0,333	0,540	3,415	0,998	Non
<i>E.coli</i> ~ <i>P. aeruginosa</i>	0,333	0,540	3,415	0,998	Non
<i>P. aeruginosa</i> ~ <i>Trichoderma</i>	5,333	8,641	3,415	0,000	Oui
<i>P. aeruginosa</i> ~ <i>A. flavus</i>	3,000	4,861	3,415	0,004	Oui
<i>P. aeruginosa</i> ~ <i>S. aureus</i>	0,000	0,000	3,415	1,000	Non
<i>S. aureus</i> ~ <i>Trichoderma</i>	5,333	8,641	3,415	0,000	Oui
<i>S. aureus</i> ~ <i>A. flavus</i>	3,000	4,861	3,415	0,004	Oui
<i>A. flavus</i> ~ <i>Trichoderma</i>	2,333	3,780	3,415	0,026	Oui
Valeur critique du d de Tukey : 4,829					

Classement et regroupements des groupes non significativement différents :			
Modalités	Moyenne	Regroupements	
<i>L. innocua</i>	20,333	A	
<i>A.niger</i>	20,333	A	
<i>E.coli</i>	20,000	A	
<i>P. aeruginosa</i>	19,667	A	

Annexe IV

Analyses statistiques



Annexe IV

Analyses statistiques

**Détermination du meilleur système de séparation des composés phénoliques
de *Pulicaria odora* par CCM**

ANOVA

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	9	120,621	13,402	7,788	0,0001
Résidus	16	27,533	1,721		
Total	25	148,154			

TESTS DE COMPARAISON MULTIPLE

Classement et regroupements des groupes non significativement différents :			
Modalités	Moyenne	Regroupements	
C	9,000	A	
F	4,000		B
I	3,500		B
J	3,000		B
D	3,000		B
B	2,667		B
E	2,500		B
A	2,400		B
G	2,000		B
H	1,333		B

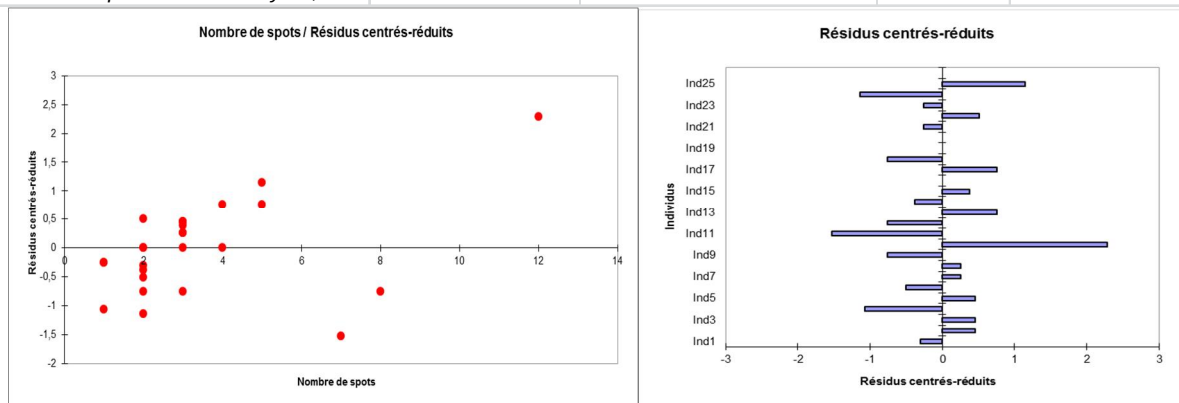
Annexe IV

Analyses statistiques

Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les groupes avec un intervalle de confiance à 95,00 % :

Modalités	Différence	Différence réduite	Valeur critique	Pr. > Diff	Significatif
C ~ H	7,667	7,158	3,641	0,001	Oui
C ~ G	7,000	5,845	3,641	0,001	Oui
C ~ A	6,600	6,889	3,641	0,000	Oui
C ~ E	6,500	5,428	3,641	0,002	Oui
C ~ B	6,333	5,913	3,641	0,001	Oui
C ~ D	6,000	5,010	3,641	0,004	Oui
C ~ J	6,000	3,961	3,641	0,027	Oui
C ~ I	5,500	4,593	3,641	0,008	Oui
C ~ F	5,000	4,668	3,641	0,007	Oui
F ~ H	2,667	2,490	3,641	0,341	Non
F ~ G	2,000	1,670	3,641	0,796	Non
F ~ A	1,600	1,670	3,641	0,796	Non
F ~ E	1,500	1,253	3,641	0,951	Non
F ~ B	1,333	1,245	3,641	0,953	Non
F ~ D	1,000	0,835	3,641	0,997	Non
F ~ J	1,000	0,660	3,641	0,999	Non
F ~ I	0,500	0,418	3,641	1,000	Non
I ~ H	2,167	1,809	3,641	0,722	Non
I ~ G	1,500	1,143	3,641	0,972	Non
I ~ A	1,100	1,002	3,641	0,988	Non
I ~ E	1,000	0,762	3,641	0,998	Non
I ~ B	0,833	0,696	3,641	0,999	Non
I ~ D	0,500	0,381	3,641	1,000	Non
I ~ J	0,500	0,311	3,641	1,000	Non
J ~ H	1,667	1,100	3,641	0,978	Non
J ~ G	1,000	0,622	3,641	1,000	Non
J ~ A	0,600	0,418	3,641	1,000	Non
J ~ E	0,500	0,311	3,641	1,000	Non
J ~ B	0,333	0,220	3,641	1,000	Non
J ~ D	0,000	0,000	3,641	1,000	Non
D ~ H	1,667	1,392	3,641	0,913	Non
D ~ G	1,000	0,762	3,641	0,998	Non
D ~ A	0,600	0,547	3,641	1,000	Non
D ~ E	0,500	0,381	3,641	1,000	Non
D ~ B	0,333	0,278	3,641	1,000	Non
B ~ H	1,333	1,245	3,641	0,953	Non
B ~ G	0,667	0,557	3,641	1,000	Non
B ~ A	0,267	0,278	3,641	1,000	Non
B ~ E	0,167	0,139	3,641	1,000	Non
E ~ H	1,167	0,974	3,641	0,990	Non
E ~ G	0,500	0,381	3,641	1,000	Non
E ~ A	0,100	0,091	3,641	1,000	Non
A ~ H	1,067	1,113	3,641	0,976	Non
A ~ G	0,400	0,364	3,641	1,000	Non
G ~ H	0,667	0,557	3,641	1,000	Non

Valeur critique du d de Tukey : 5,150



Résumé : Le but de cette étude est d'estimer la teneur en composés phénoliques d'une plante médicinale locale *Pulicaria odora*, ainsi que d'évaluer son activité antimicrobienne, et la séparation de leurs composés phénoliques par chromatographie sous vide sur colonne sèche. Le dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes a montré la richesse de notre plante en ces derniers avec des valeurs allant jusqu'à $158,38 \pm 0,60$ mg EQ Ac gallique/g et $23,96 \pm 1,55$ mg Eq Quercétine/g respectivement. Les tests d'activité antimicrobienne ont révélé une forte activité de *Pulicaria odora* vis-à-vis de toutes les souches testées. La séparation par chromatographie sur colonne sèche a permis de récupérer 35 fractions dont seulement quatre sont actives. L'analyse des fractions actives par RP-HPLC a relevé une bonne efficacité de la séparation sous vide sur colonne sèche, avec des taux de purification allant jusqu'à 71,94%.

Mots clés : *Pulicaria odora*, activité antimicrobienne, Chromatographie sous vide sur colonne sèche.

المخلص: الهدف من هذه الدراسة هو تقدير محتوى نبتة طبية محلية من المركبات الفينولية, وتحديد نشاطها ضد الجرثومي وكذلك فصل مركباتها الفينولية باستعمال كروماتوغرافيا العمود الجاف ذات الضغط المنخفض. تقدير متعددات الفينول و الفلافونويدات اظهر غنى هذه النبتة مع قيم حتى 158,38 مغ مك حمض الغاليك و 23,69 مغ مك كارسيتين على التوالي. اختبارات النشاط ضد الجرثومي اظهرت نشاط قوي للنبتة ضد كل العشائر المختبرة. الفصل بواسطة كروماتوغرافيا العمود الجاف, مكن من الحصول على 35 جزء حيث اربعة منها فقط ذات نشاط ضد جرثومي. تحليل الاجزاء النشطة باستعمال كروماتوغرافيا الطور السائل فائقة الاداء ذات الطور المقلوب اظهر فعالية كروماتوغرافيا العمود الجاف في فصل المركبات الفينولية مع درجة تنقية تصل الى 71,94 %.

الكلمات المفتاحية: *Pulicaria odora*, كروماتوغرافيا العمود الجاف ذات الضغط المنخفض, النشاط ضد الجرثومي

Abstract: The aim of this study is to estimate phenolic compounds content of an edible medicinal plant *Pulicaria odora*, and evaluate its antimicrobial activity, with a separation of its phenolic compounds using Dry Column Vacuum Chromatography (DCVC). Results showed the worth of our plant in both polyphenols and flavonoids with values up to 158.38 ± 0.60 mg EQ Gallic Ac /g and 23.96 ± 1.55 mg Eq Quercetin /g. Antimicrobial tests revealed a strong activity of *Pulicaria odora* against all tested strains. Separation of polyphenols by dry column vacuum chromatography allowed recovering 35 fractions, which only four among them are active. Analysis of active fractions by RP-HPLC revealed good separation efficacy by DCVC with purification yield up to 71.94%.

Key words: *Pulicaria odora*, antimicrobial activity, Dry Column Vacuum Chromatography.

الحمد لله رب العالمين