

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 des Sciences Alimentaires
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Sciences Alimentaires
Option : Bioprocédé, technologie, Alimentaire



Réf:.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Association des composés
phénoliques de quelque plantes
médicinales**

Présenté par :

MOUSSAOUI Sakina & TALIT Nadia

Soutenu le : **12 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

| | | |
|----------------------------------|------------|------------------|
| M^{me}: BOUALI N | MAA | Président |
| M^{me}: OUKIL N | MCB | Encadreur |
| M^{me}: HAMITRI F | MAA | Examineur |

Année universitaire : 2015 / 2016



REMERCIEMENTS

Nous remercions le « Bon Dieu » le tout puissant de nous avoir donné la force, la patience, la santé et la puissance qui nous ont permis de mener à terme ce modeste travail

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos vifs remerciements
A M^{me} OUKIL N notre promotrice pour avoir accepté de nous encadrer, pour ses conseils avisés, sa compréhension, sa patience et beaucoup d'intérêt afin de réaliser des conditions favorables pour le bon déroulement de ce travail.*

*Aux membres de jury pour avoir accepté de sacrifier une partie de leur temps afin
d'évaluer le présent travail :*

A M^{me} BOUALI pour l'honneur qu'il nous fait de présider ce jury.

*A M^{me} HAMTIRI pour son aide et les marques d'estimes et de sympathie témoignées à
notre égard, et pour avoir accepté également d'examiner notre travail.*

*A M^{lle} BOUREBABA pour ses conseils avisés, sa compréhension, sa patience et son
aide précieux*

*Mes remerciements vont également à tous, ceux qui nous a aidées et soutenues, de près ou
de loin.*

Que Dieu vous accorde, son aide, dans tous nos projets et activités.

Nadia & Sakina

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail tout d'abord à la mémoire de mon cher père LOUNAS
et mon cher frère HAKIM.*

A ma très chère MAMAN (fatma)

A mes très chers frères : Ahmed, Karim, Brahim, Kamel.

*A mes très chères sœurs : Zahra, Malika, Zahia, Dalila, Djamila, Kahina,
Nacera.*

*A mes belles sœurs et mes neveux et nièces et toute la famille : TALIT et
AMRANE*

*A tout mes amis et amies et tout spécialement à : Dalila, Kamilia, Nabila, Dilia,
Dalila, Wissam, Samira, Nabila, Samia, Linda, Kahina*

A ma binôme Sakina

A toute l'équipe de l'athlétisme depuis 2012 à 2016 sans exception

A toute la promotion Biotechnologie 2015-2016.

Et à ceux qui sont chers à mes yeux.

Nadia

Dédicace



Je dédie ce travail à :

*A mes très chers parents que j'aime et qui m'ont soutenu tout au long
De mes années d'études.*

A toute ma famille :

*A mon grand frère ALI et sa femme SABRINA et leurs enfants : ANIS et
RANIA.*

*A ma chère sœur RAHIMA et son mari ABD ALAH et leurs enfants :
DJAMEL, HOCINE, et YASSMINE.*

*A ma chère sœur RAZIKA et son mari ABD ARZAK et leurs
adorables filles : MILLISSA et ILHAM.*

A mes chères frères : ZAHIR, HALIM et MOUSSA.

A toute la famille MOUSSAOUI

A tous mes amis sans exception.

A ma binôme NADIA et toute sa famille

Ces dédicaces vont également à la promotion de Biotechnologie 2015/2016.



Liste des abréviations

ATCC: *American type culture collection*

BMH : bouillon Mueller Hinton

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMFc : concentration minimale fongicide

CMFs : concentration minimale fongistatique

CP : composé phénolique

EAG : équivalent d'acide gallique

FIC : concentration inhibitrice fractionnaire

FIC50 : concentration inhibitrice fractionnaire 50%

FIC₅₀I: FIC50 index

FICI: FIC index

I%: pourcentage d'inhibition

IC50 : concentration donnant 50% d'inhibition

L : Linné

NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

Nm : nanomètre

PAM : plantes aromatiques médicinales

PP : poly phénols

Ppm : particule par million

R² : Régression

UFC : unité formant colonie

Liste des figures

| Figure | Titre | Page |
|---------------|--|-------------|
| 1 | fleurs et feuilles d' <i>Origanum vulgare</i> L | 5 |
| 2 | Fleurs d' <i>Origanum vulgare</i> L | 5 |
| 3 | Les différentes parties de <i>Hyoscyamus albus</i> | 7 |
| 4 | Représentation schématique et photo de <i>Mentha aquatica</i> | 10 |
| 5 | photos des trois plantes : <i>Hyoscyamus albus</i> , <i>Mentha aquatica</i> et <i>Origanum vulgare</i> | 12 |
| 6 | Protocole d'extraction des composés phénoliques | 14 |
| 7 | Protocole de dosage des poly phénols totaux | 15 |
| 8 | Schéma d'une microplaque de 96 puits | 17 |
| 9 | Isobologramme des extraits de <i>Mentha</i> combinés avec les extraits de <i>Hyoscyamus</i> testés avec (effet fongistatique) sur : A : <i>Aspergillus ochraceus</i> et B : <i>Botrytis cinerea</i> , C : <i>Mucor rammanianus</i> et D : <i>A. flavus</i> | 23 |
| 10 | Isobologramme des extrait de <i>Mentha</i> combinés avec les extraits de <i>l'origan</i> testés avec (effet fongistatique) sur : B : <i>Botrytis cinerea</i> , et D : <i>A. flavus</i> | 24 |
| 11 | Isobologramme des extrait de <i>Mentha</i> combinés avec les extraits de <i>Hyoscyamus</i> testés avec (effet fongistatique) sur : A : <i>A. Ochraceus</i> et B : <i>Botrytis cinerea</i> , et C : <i>Mucor rammanianus</i> | 24- 25 |
| 12 | Isobologramme des extraits de <i>Mentha</i> combinés avec le phénol testés avec (effet fongistatique) sur : A : <i>Aspergillus. Ochraceus</i> | 25 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 13 | Isobologramme des extraits de <i>Mentha</i> combinés avec les extraits de <i>l'Origanum</i> testés avec (effet fongistatique) sur : <i>D: Aspergillus flavus et C : Mucor rammanianus</i> | 26 |
| 14 | Isobologramme des extraits de <i>Mentha</i> combinés avec l' α -pinène testés sur : <i>A:Aspergillus ochraceus et B: Botrytis cinerea</i> | 26 |
| 15 | Isobologrammes des extraits d' <i>Hyoscyamus</i> combiné avec l' α -pinène testé avec (effet fongistatique) sur <i>A : Aspergillus ochraceus et B : Botrytis cinerea et D : Aspergillus flavus</i> | 27 |
| 16 | Isobologramme des extraits d' <i>Hyoscyamus</i> combiné avec l'eugénol testé avec (effet fongistatique) sur <i>C : Mucor rammanianus</i> | 28 |
| 17 | Isobologrammes des extraits d' <i>Hyoscyamus</i> combiné avec le phénol testé avec (effet fongistatique) sur : <i>A : Aspergillus occhraceus et B : Botrytis cinerea et C : Mucor rammanianus</i> | 28 |
| 18 | Isobologramme des extraits de <i>l'Origanum</i> combiné avec le phénol testé avec (effet fongistatique) sur : <i>B : Botrytis cineria</i> | 29 |
| 19 | Isobologramme des extraits de <i>l'origan</i> combiné avec α -pinène testé avec (effet fongistatique) sur : <i>A : Aspergillus ochraceus et B : Botrytis cinerea</i> | 29 |
| 20 | Isobologrammes des extraits de <i>mentha</i> combiné avec le phénol testé avec (effet fongicide) sur : <i>B : Botrytis cinerea et C : Mucor rammannianus</i> | 30 |
| 21 | Isobologramme des extraits de <i>Mentha</i> combiné avec le phénol testé avec (effet fongicide) sur : <i>D : Aspergilus flavus</i> | 30 |
| 22 | Isobologramme des extraits de <i>l'Origanum</i> combiné avec l'eugénol testé avec (effet fongicide) sur : <i>C : Mucor rammanianus</i> | 31 |

Liste des tableaux

| Tableau | Titre | Page |
|---------|--|------|
| I | Classification de l'espèce <i>Origanum vulgare</i> | 6 |
| II | classification d' <i>Hyoscyamus albus</i> L | 8 |
| III | classification classique de l'espèce <i>Mentha aquatica</i> | 9 |
| IV | les composés chimiques utilisés | 11 |
| V | les souches fongiques testées | 13 |
| VI | Activité antifongique des différents échantillons seuls (fongistatiques) | 21 |
| VII | Activité antifongique des différents composés majoritaires d'HE seuls (fongistatiques) | 22 |
| VIII | Association de <i>Mentha aquatica</i> avec les composées majoritaires d'HE (fongistatiques) | 32 |
| IX | Association d' <i>origanum vulgare</i> avec les composées majoritaires d'HE (fongistatiques) | 33 |
| X | Association de <i>Hyoscyamus albus</i> avec les composées majoritaires d'HE (fongistatiques) | 34 |
| XI | Activité antifongique des composées phénoliques seules (fongistatiques) | 35 |
| XII | Activité antifongique des différents échantillons seuls : (fongicide) | 35 |
| XIII | Association de <i>Mentha aquatica</i> avec les composées majoritaires d'HE (fongicide) | 36 |

| | | |
|------|--|----|
| | | |
| XIV | Association d' <i>origanum vulgare</i> avec les composées majoritaires d'HE (fongicides) | 37 |
| XVI | Association d' <i>Hyoscyamus albus</i> avec les composées majoritaires d'HE (Fongicides) | 38 |
| XVII | Activité antifongique des différents composés majoritaires d'HE seuls :(fongicide) | 39 |

Sommaire

Liste des abréviations.

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Introduction 1-2

Synthèse bibliographique

I-Généralités **3**

□ La famille des solanacées : 3

□ La famille des lamiacées..... 3

□ Les métabolites secondaires 4

□ L'activité antifongique des composés phénoliques 4

I-1 « *Origanum vulgare L.* » **4**

I-1-1 Description botanique et classification..... 4

I-1-2 Constituants biochimiques de l'origan: 6

I-1-3 La répartition géographique d'origanum vulgare : 7

I-2 « *Hyoscyamus albus L.* » **7**

I-2-1-1 description de *Hyoscyamusalbus L.*..... 7

I-2-2 La classification botanique..... 8

I-2-3 La répartition géographique : 8

I-2-4 Composition chimique: 8

I-3 « *Mentha aquatica* » **8**

I-3-1 Présentation du genre *Mentha* : 8

I-3-2 Classification de *Menthaaquatica* : 9

I-3-3 Description botanique de la menthe: 9

I-3-4 La composition chimique: 10

| | |
|--|-----------|
| I-3-5 La répartition géographique | 10 |
| <i>Partie pratique</i> | |
| II-Matériel et méthodes | |
| II.1. Matériel | 11 |
| II.1.1 Matériel non biologique et équipements | 11 |
| II.1.2 Composés chimiques Etalons | 11 |
| II-1-2 Matériel biologique | 12 |
| II-1-2-1 Matériel végétal | 12 |
| ➤ Séchage..... | 12 |
| II-1-2-2- Souches fongiques..... | 13 |
| II-2-Méthodes | 13 |
| II-2-1-Extraction des composés phénoliques | 13 |
| ➤ Extraction des composés phénoliques totaux..... | 14 |
| ➤ Calcul du rendement d'extraction..... | 14 |
| II-2-2 Dosage des composés phénoliques | 15 |
| ➤ Dosage des poly phénols totaux..... | 15 |
| ➤ Principe | 15 |
| II-3- Evaluation de l'activité antifongique des composés phénoliques seuls ou en association (thymol, eugénol, α-pinène, phénol)..... | 16 |
| II-3-1 Test antifongique | 16 |
| II-3-1-1-Standardisation des inocula fongiques | 16 |
| II-3-1-2-Préparation des dilutions | 17 |
| II-4- Technique de l'échiquier..... | 17 |
| II-5- Evaluation de l'activité antifongique des échantillons en associations..... | 18 |
| II-5-1 Le protocole | 19 |
| III: Résultat et discussion | |
| III-1-Extraction | 20 |
| III-2-Dosage des polyphénols totaux | 20 |
| III-2-1-Expression des résultats | 20 |
| III-3-Rendement des extractions : | 21 |

| | |
|--|----|
| III-4-Activité antifongique | 21 |
| III-4-1-Activité antifongique des différents échantillons seuls..... | 21 |
| III-5-2 Activité antifongique des composées phénoliques en association avec les composés majoritaires : | 32 |

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

INTRODUCTION

Depuis toujours les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire, une exclusivité du monde végétal. Parmi les milliers de molécules produites par ce métabolisme, l'homme sélectionne celles qui lui permettent de se défendre contre les agressions d'autres organismes vivants pathogènes (champignons, bactéries, virus...) et de corriger ses troubles métaboliques. Le 21^{ème} siècle s'ouvre et de nombreuses maladies à fort taux de mortalité restent encore sans traitement. La recherche de nouvelles molécules, plus actives, moins coûteuse avec moins d'effets secondaires, est une urgence pour l'homme. Ces produits naturels jouent un rôle significatif dans la découverte des médicaments (**Newman et al., 2003**).

Il est rapporté qu'au minimum 119 composés, dérivés de 90 espèces de plantes peuvent être considérés comme médicaments importants (**Farnsworth et al., 1985**).

L'intérêt porté aux plantes n'a cessé de montrer au cours de ces années, aujourd'hui les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des antibiotiques et antifongiques est appréhendée par des scientifiques à cause des résistances accrues des bactéries et moisissures dont la conséquence est l'échec thérapeutique.

La découverte de nouveaux agents antifongiques et antibactériens est devenue plus qu'indispensable pour être innovants et contourner les mécanismes de résistance, les antifongiques de demain, devront viser de nouvelles cibles d'action chez les moisissures.

A cet effet et dans le cadre de valorisation de la flore algérienne on s'est intéressé à trois espèces : *Origanum vulgare*, *Mentha aquatica* et *Hyoscyamus albus*.

L'objectif visé est de déterminer l'effet *in vitro* des associations des composés phénoliques totaux ou des composés majoritaires d'huiles essentielles, testées sur des souches fongiques à savoir *Aspergillus flavus*, *Aspergillus Ochraceus*, *Mucor rammanianus* et *Botrytis cinerea*.

En fonction des concentrations inhibitrices fractionnaires (FIC index), l'effet généré peut être synergique, additif, antagoniste ou indifférent. Ces résultats pourraient être une solution alternative pour la mise en évidence des souches bioactives dans le traitement des maladies infectieuses.

L'objectif du présent travail est d'une part l'évaluation de l'activité antifongique des CPs obtenues à partir des parties aériennes de ces plantes, *Origanum vulgare*, *Mentha aquatica* et *Hyoscyamus albus*, seul et d'une autre part, en association avec certains composés majoritaire (thymol, eugénol, phénol et α -pinène).

Introduction

Ce manuscrit comporte deux parties, la première est un recueil concernant les trois plantes étudiées à partir de la bibliographie. La deuxième partie présente les travaux expérimentaux comportant deux chapitres. Le premier rassemble le matériel et les méthodes utilisés pour l'appréciation de l'activité antifongique des CPs seul et en association avec les composés majoritaires en utilisant la technique de l'échiquier pour l'estimation de cette activité que ce soit pour les CPs seules ou en association. Le second chapitre est une présentation des résultats obtenus ainsi que leur discussion.

I-Généralités:

Des chercheurs ont estimé qu'il existe environ 400 000 espèces de plantes dans le monde, dont environ le quart ou le tiers ont été utilisées à des fins médicinales. (**Benayad, 2008**)

La plante, organisme vivant, marque son identité par des spécificités morphologiques, à l'origine de la classification botanique, mais aussi biochimiques, liées à des voies de biosynthèses inédites, représentant l'intérêt de l'usage des plantes médicinales (**Bruneton., 1987**).

D'après la X^{ème} édition de la Pharmacopée française, les plantes médicinales "sont des drogues végétales au sens de la Pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses". Ces plantes médicinales peuvent également avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques (**Debuigne., 1974**).

En d'autres termes nous pouvons dire qu'une plante médicinale regroupe l'ensemble des plantes dont un ou plusieurs de leurs organes sont utilisés pour leurs vertus thérapeutiques. Il peut s'agir de la tige, des feuilles, de l'écorce ou encore des racines qui sont employées à des fins curatives. Parmi les principales plantes médicinales les plus connues figurent, entre autres, l'absinthe qui facilite la digestion, le cacao qui régule l'humeur ou encore l'eucalyptus très apprécié pour lutter contre la toux (**Horde ., 2014**).

❖ La famille des solanacées :

La famille des solanacées est l'une des grandes familles du monde végétale, du fait du grand nombre qu'elle comporte (environ 2300) et des nombreux usages que l'homme en fait (alimentaire condiment et pharmaceutique.....etc). (**kaurtl et al ; 2002**)

Les plantes de cette famille sont bien connues en tant que source naturelle des alcaloïdes tropaniques comprenant : l'hyoscyamine, la scopolamine et l'atropine et sont cultivées pour leur importance médicinale (**Etminan et al ; 2012**)

❖ La famille des lamiacées

La famille des Lamiaceae (labiales) du Latin (Labia) lèvre signifiant que les fleurs ont une forme caractéristique à deux lèvres (**Couplan., 2000;Naghibiet al.,2005**), comprend environ 6970 espèces réparties en 240 genres (**Meyeret al., 2004**). Cette famille est l'une des premières à être distinguées par les botanistes (**Pistrick, 2002**) et ceci par la particularité de ses caractères. Ce sont généralement des plantes herbacées odorantes, à tiges quadrangulaires, feuilles en général, opposées sans stipules.

❖ Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires végétaux constituent une classe extrêmement large de substance naturelle qui intervient de façon déterminante dans l'adaptation des plantes à leur environnement. Outre leurs implications dans le fonctionnement des végétaux, ces molécules représentent une source importante de substances intéressantes pour l'Homme tel que les huiles essentielles, les terpénoïdes, les composés phénoliques et les flavonoïdes. Leurs applications concernent des domaines aussi variés tels que les principes actifs pharmaceutiques, les produits cosmétiques et les additifs alimentaires (Croteauet *al.*, 2000).

❖ L'activité antifongique des composés phénoliques

Les moisissures sont des contaminants de nombreux substrats végétaux et de certains produits d'origine animale (Richard., 2007). Leur présence peut améliorer les qualités organoleptiques d'un produit ou, au contraire, l'altérer et conduire à l'accumulation de métabolites secondaires toxiques ; les mycotoxines. Les aflatoxines sont les plus recherchées parmi les groupes des mycotoxines existants (Rawal., 2010). Grâce aux connaissances acquises sur les voies de biosynthèse des mycotoxines, certaines molécules présentes dans les végétaux s'avèrent, de par leur structure et leurs propriétés, être de bons candidats susceptibles d'interférer avec la production de toxines (Reddy., 2009). Dans ce contexte une tentative de valoriser les poly-phénols (PP) pourraient être utilisés comme substances naturelles antifongiques.

I-1 « Origanum vulgare L. »

I-1-1 Description botanique et classification :

L'origan est un Sous-arbrisseau vivace, de la classe des dicotylédones qui mesure de 30 à 80 cm de haut, au feuillage et aux fleurs odorantes quand on les froisse. Elle est ainsi reconnaissable à son odeur et à sa saveur phénolée, épicée et chaude. (Teuscher et al., 2004 ; Rameau et al., 2009 ; Arvy et Gallouin, 2003)

C'est une plante souvent un peu rougeâtre violacée et qui est couverte de poils, faisant partie de la famille des *lamiaceae*, elle possède donc de nombreuses tiges dressées à la section carrée et ramifiée. Ces tiges peuvent persister l'hiver à l'état sec. (Rameau et al., 2009)

En ce qui concerne ses feuilles, elles sont opposées-décussées, courtement pétiolées. D'une largeur de 1 à 2 cm et de 5 cm de longueur, elles sont ovales et finement denticulées.

Le limbe est vert foncé, et on peut observer la présence de nombreux poils sécréteurs, notamment sur l'épiderme inférieur. (Teuscheret *al.*, 2004 ; Rameau et al., 2009)



Figure N° 1 : Fleurs et feuilles d'*Origanum vulgare* L. **Figure N°2** : fleurs d'O.vulgare (fleurentin, 2007)
(fleurentin, 2007)

Les fleurs sont regroupées en inflorescences de type panicule, fixées au sommet des rameaux ; les bractées elliptiques ont 4 à 5 mm de long et leur couleur souvent rouge foncé varie selon les espèces ; la corolle gamopétale est rouge violet ou rose pale, exceptionnellement blanche, de 4 à 7 mm de long ; le calice persistant et gamosépales et pourvu de 5 dents égales ; les étamines sont en nombre de 4 ; l'ovaire est supère, bicarpellaire et divisé en 2 loges comportant chacune 2 ovules. Le fruit est un tétrakène lisse, brun, de 1mm de long, chaque akène qui le compose restant longtemps soudé au fond du calice. La floraison a lieu de juillet à septembre (Teuscheret *al.*, 2005).

Classification :

Le genre *origanum* inclut 39 espèces, dont plus de 75% sont concentrés dans les régions méditerranéennes (Sahinet *al.*, 2003 ; Kintzios, 2002). La systématique de l'espèce *origanum vulgare* L. est décrite comme suit (tableau I) :

Tableau I : classification de l'espèce *Origanum vulgare*. D'après Deysson 1967

| Rang taxonomique | Nomenclature |
|----------------------|------------------------------|
| Embranchement : | Spermaphytes |
| Sous-embranchement : | Angiospermes |
| Classe | Dicotylédones |
| Sous-classe | Gamopétales |
| Série : | Superovariées tétracycliques |
| Super ordre : | Tubiflorales |
| Ordre : | Lamiales |
| Famille : | Lamiaceae |
| Sous-famille : | Népétoïdées |
| Genre : | <i>Origanum</i> |

I-1-2 Constituants biochimiques de l'origan:

Des études réalisées par différents chercheurs montrent que l'origan est une source riche en plusieurs éléments importants, ayant des effets positifs sur la santé de l'homme

Origanum vulgare. L présente une grande variété dans sa composition en huiles essentielles suite à l'existence de différentes sous espèces, mais aussi à de nombreux paramètres comme les conditions climatiques et la période de récolte (**Sahin et al., 2004**).

En Espagne, Viuda-martos et al., (2007) ont identifié dans l'origan 32 composés (HE) sachant que les plus abondant son le carvacrol (61.21%) et le p-cymène (15.12%)

D'après Raduoiene et al (2005) les huiles essentielles les plus dominantes de l'origan de lituanie sont le β -caryophyllène, les cis- et trans- β -ocimène, le sabinène et le germacrène représentant 49.8 à 76.8% dans les fleurs et 41.9 à 71.4% dans les feuilles. Tandis qu'en Turquie, c'est le caryophyllène (14.4%) et le spathulenol (11.6%) qui sont les plus dominants selon **Sahin et al(2004)**.

Peu d'études ont été réalisées sur les composés phénoliques de l'origan. L'acide protocatéchique, l'acide caféique, l'acide rosmarinique, le glycoside phénylique, l'acide propionique, les flavonoïdes sont les principaux composés phénoliques caractérisés dans l'origan. Les trois composés acide caféique, acide rosmarinique et carvacrol élèvent, en moyenne, de 55% la teneur en composés phénoliques (**kulisicetal., 2004 ; Skergetetal., 2005**).

I-1-3 La répartition géographique d'*origanum vulgare* :

Le genre *Origanum* a été particulièrement étudié par Ietswaart en 1980. Il reconnaît 3 groupes, 10 sections, 38 espèces, 6 sous-espèces, 3 variétés et 16 hybrides. Le genre *Origanum* est largement présent des îles Canaries et des Açores, à l'Europe du Nord et jusqu'à l'est de l'Asie. On peut le rencontrer aussi en culture à Cuba ou dans l'île la Réunion, mais la région méditerranéenne représente son aire de distribution la plus importante.

I-2 « *Hyoscyamus albus* L »

I-2-1 Etude botanique de *Hyoscyamus albus* L

La jusquiame (*Hyoscyamus albus*), appartient à la famille des solanacées, et au genre *Hyoscyamus*. Elle est localement connue sous le nom de «Sikrane». Elle est très employée contre diverses maladies, méditerranéenne et en Algérie (Jouzier, 2005)

I-2-1-1 description de *Hyoscyamus albus* L

- caractères morphologique de la plante :

La jusquiame blanche est une variété annuelle ou bisannuelle (figure n° 3), qui mesure de 30 à 90 cm de hauteur, à port dressé, a des feuilles plus petites que la jusquiame noire (5 à 10 cm de long), elle sont large, ovales, collantes et de couleur vert clair. (Goullé et al. ; 2004)

La floraison se fait de Mai à Juin, les fleurs sont d'un blanc teinté de jaune verdâtre, chaque fleur se situe à l'aisselle d'une feuille, du même côté que cette dernière par rapport à l'axe de la tige. (Figure 3) (Sabat., 1957).

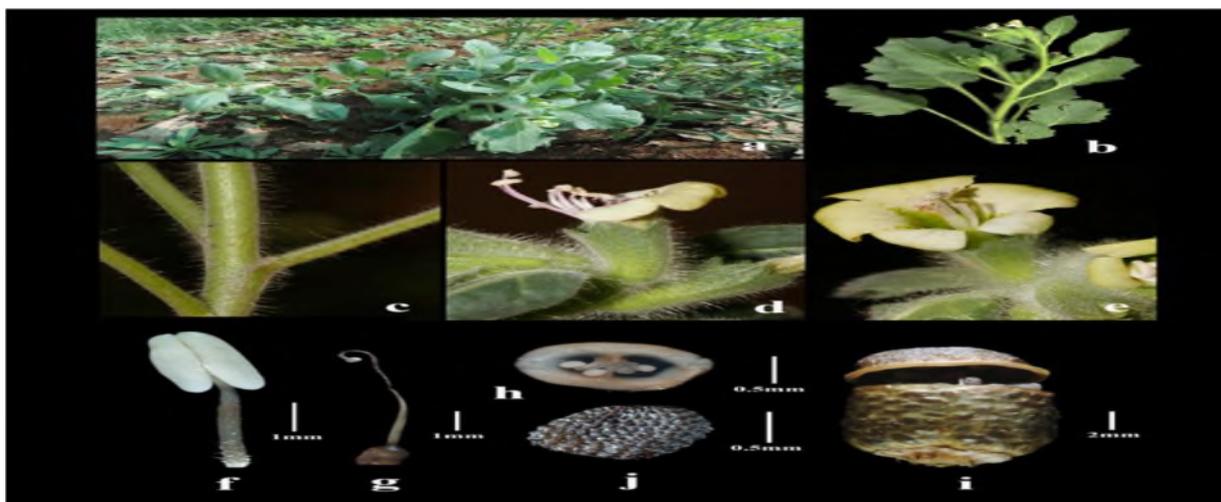


Figure N°3 : Les différentes parties de *Hyoscyamus albus* L

I-2-2 La classification botanique

La classification de la plante *Hyoscyamus albus*. L. est représentée dans le (tableau II)

Tableau II : classification d'*Hyoscyamus albus* L. (Cronquist, 1988)

| Rang taxonomique | Nomenclature |
|------------------|----------------------------|
| Règne | Plantae |
| Division | Magnoliophyta |
| Classe | Magnoliopsida |
| Ordre | Asteridae |
| Famille | Solanaceae |
| Genre | <i>hyoscyamus</i> |
| Espèce | <i>Hyoscyamus albus</i> L. |

I-2-3 La répartition géographique :

Le genre *Hyoscyamus albus* comporte une vingtaine d'espèces surtout représentées dans le bassin méditerranéen, l'Afrique du Nord et l'Asie occidentale. (**Jouzier 2005**) Dont trois sont Représentés dans la flore algérienne *Hyoscyamus muticus*, *Hyoscyamus niger* et *Hyoscyamus albus*. (**Quezel et santa 1963**)

I-2-4 Composition biochimique:

La teneur en alcaloïdes totaux est faible, elle est de l'ordre de 0.04 à 0.15%, celle de la feuille est de 0.05 à 0.015%. Celle de la graine peut atteindre 0.3%. (**Goullé et al 2004**), dont la scopolamine représente plus de la moitié des alcaloïdes totaux, le pourcentage des alcaloïdes tropiques est de 0.05 – 0.15%, et le pourcentage de scopolamine est variable : 25 à 50% (**Kone, 2009**).

Les feuilles de jusquiame est particulièrement riche en matière minérale qui atteint 20%, les flavonoïdes sont importants, le scopolétole n'est présent qu'à l'état de trace (**Paris et Moïse, 1981**).

I-3 « *Mentha aquatica* »

I-3-1 Présentation du genre *Mentha* :

Les Menthes, du nom latin *Mentha*, font partie des plantes vivaces, herbacées indigènes et très odorantes appartenant à la famille des *Lamiacées* ou *Labiacées*, formée de près de 3500

espèces réparties sur 8 sous-familles (**Bruneton J., 1993**). Près de la moitié (47 %) des *Lamiaceae* sont regroupées dans la sous-famille des *Nepetoideae*. Au sein de la sous-famille des *Nepetoideae*, le genre *Mentha* est représenté par 18 espèces et environ 11 hybrides. L'hybridation intra spécifique est relativement aisée et rend la taxonomie particulièrement délicate (**Tucker, 2007**). Les Menthes conservent depuis l'antiquité une infinie diversité d'emplois et occupent une large place dans les utilisations thérapeutiques. Elles fortifient tout le système des nerfs, stimulant diffusible et aussi un sédatif diffusible (**Edrissi ;1982**).

On en connaît environ 20 espèces, dont les plus répandues sont la menthe aquatique, qui a pour nom scientifique *Mentha aquatica*, la menthe poivrée, *Mentha piperita*, et la menthe verte, *Mentha spicata*. (**Nisrin ; 2008**)

I-3-2 Classification de *Mentha aquatica* :

La classification de genre *Mentha aquatica* est présentée dans le tableau III.

Tableau III : classification classique de l'espèce *Mentha aquatica* (**Nisrin ; 2008**)

| Rang taxonomique | Nomenclature |
|------------------|------------------------|
| Règne | Plantae |
| Division | Magnoliophyta |
| Classe | Magnoliopsida |
| Ordre | Lamiales |
| Famille | Lamiaceae |
| Genre | Mentha |
| Espèce | <i>Mentha aquatica</i> |

I-3-3 Description botanique de la menthe:

Mentha aquatica L., plus connue sous le nom menthe aquatique est une Plante vivace de 30-80 cm, verte ou rougeâtre, velue-hérissée ou presque glabre, à odeur forte mais agréable ; tiges dressées ou ascendantes. (**Tucker, 2007**). Ses feuilles mesurent de 4 à 10 cm de long, elles sont ovales, opposées, courtement pétiolées, lancéolées, aiguës, dentées, sont d'un très beau vert et se teignent de nuances rougeâtres au soleil et de rouge cuivré à l'ombre, elles sont recouvertes de gros poils sécréteurs arrondis dans lesquels s'accumulent les substances volatiles odorantes. (**Edrissi ; 1982, Benayad ; 2008**)

Les fleurs, violacées, forment des épinestrès courtes, à l'extrémité des rameaux. Le fruit, divisé en quatre parties, est entouré d'un calice persistant. Son odeur est puissante, sa saveur piquant et rafraichissante (Jahandiez ;et al.,1934;Nisrin.,2008)



Figure N° 4 : photo de *Mentha aquatica*

I-3-4 La composition biochimique:

L'huile essentielle de la menthe riche surtout en -L-carvon (teneur entre 40a80%), L'acétate de dihydrocuminyne (10a12%, ces deux constituants majeurs étant responsables de l'odeur de la plante) et le limonène (5a15%); ils sont accompagnés de dihydrocarvone, dédihydrocavol d'acétate de carvyle et de a-caryophyllée. Dans d'autres races chimiques, la carvone est accompagnée de 1,8cineol (jusqu'à 2%) depulégone (jusqu'a50%) ou de terpineol-4(jusqu'a18%). (Sidallu, 2010)

I-3-5 La répartition géographique

La plupart des menthes sont originaires de l'Europe, de l'Asie et de l'Afrique du Nord. Cependant, en suivant les flux de migration, les menthes sont présentes sur la quasi-totalité des continents. (Tucker, 2007).

II-Matériel et Méthodes

Le présent travail a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie du département des sciences alimentaires à l'Université de Bejaia. Nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet *in vitro* des composés phénoliques seuls et en association avec des composés d'huiles essentielles (thymol, eugénol, α -pinène et le phénol), sur les souches fongiques, il s'agit de *Mucor rammanianus*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochraceus*.

II.1. Matériel

II.1.1 Matériel non biologique et équipements

Pour réaliser cette étude, on a utilisé un ensemble d'équipements, de verreries, d'appareillages et de produits chimiques (**Annexe 02**). Par ailleurs, plusieurs milieux de culture ont été utilisés. Leur composition est citée en annexe (**Annexe 03**).

II.1.2 Composés chimiques Etalons

Les composés chimiques utilisés pour l'étude de l'activité antifongiques sont présentés dans le tableau IV

Tableau IV : les composés chimiques utilisés

| Les composés chimiques | Formules chimiques | Références |
|------------------------|--------------------|---|
| Thymol | $C_{10}H_{14}O$ | Reidel-de Haën®, Sigma-Aldrich laborchemikalien GmbH, Allemagne |
| α -pinène 99% | $C_{10}H_{16}$ | Alfa Aesar. GmbH 8 CoKG Zeppelinstra Be 7.76185 Karlsruhe Germany. |
| Eugénol pur | $C_{10}H_{12}O_2$ | Laboratory Reagent. Biochem chemopharma new office : 315 place youville- suite 343 Montreal – Quebec H2y014 |
| Phénol | C_6H_6O | Reidel-de Haën®, Sigma-Aldrich laborchemikalien GmbH, Allemagne |

II-1-2 Matériel biologique

II-1-2-1 Matériel végétal

Cette étude est portée sur les composés phénoliques, extraits de la partie aérienne de trois plantes médicinales «*Hyoscyamus albus* L., *Origanum vulgare* et *Mentha aquatica*» récoltées dans différentes régions de la willaya de Béjaïa à savoir :

- L'origan (*Origanum vulgare*), a été récolté de la région de Tighzarth, ait adjissa, benimaouche en juin 2015. C'est une plante de la famille des *lamiaceae*.
- La jusquiame (*Hyoscyamus albus* L), a été cueillie 2014 à Toudja dans la région de Béjaïa. une plante de la famille des solanacées.
- La menthe aquatique (*Mentha aquatica*), a été achetée chez l'herboriste de la willaya de Béjaïa. c'est une plante de la famille des *lamiaceae*.

Les feuilles ont été séchées au laboratoire pendant quelque jours à température ambiante, ensuite broyées à l'aide d'un broyeur mécanique et tamisées par un tamiseur de diamètre 125µm.



A: *Hyoscyamus albus*

B: *Origanum vulgare*

C: *Mentha aquatica*

Figure n°5 : photos des trois plantes étudiées

➤ Séchage

Le séchage a une importance majeure pour l'extraction des polyphénols, car les cellules végétales contiennent différents types d'enzymes, susceptibles de provoquer des modifications des composés phénoliques contenus dans le matériel végétal, en particulier des polyphénols-oxydases et des glycosidases.

Un taux élevé d'eau, a une grande importance pour l'extraction des polyphénols, car sa présence est un élément gênant du rendement de l'extraction.

Cet inconvénient peut être éliminé par un séchage rapide du matériel végétal, aussitôt après sa récolte (**Ribéreau-Gayon, 1968**). Le matériel végétal séché peut être conservé pendant un certain temps sans modifications importantes (**Owen et Johns, 1999**).

II-1-2-2- Souches fongiques

Afin d'étudier l'activité antifongique des composés phénoliques, quatre souches ; *Aspergillus flavus*, *Mucor rammanianus*, *Botrytis cinerea* et *Aspergillus ochraceus* ont été choisies pour leurs pouvoir pathogène pour l'Homme (**tableau V**).

Tableau V : les souches fongiques testées

| Les souches fongiques | Classification | Référence |
|------------------------------|----------------|------------|
| <i>Aspérgillus flavus</i> | Ascomycètes | ATCC 16704 |
| <i>Mucor rammanianus</i> | Zygomycètes | ATCC 16700 |
| <i>Botrytis cinerea</i> | Ascomycètes | ATCC 16668 |
| <i>Aspérgillus ochraceus</i> | Ascomycètes | ATCC 16690 |

II-2-Méthodes

II-2-1-Extraction des poly phénols totaux

L'extraction des poly phénols totaux à partir de la matière végétale dépend de leur structure chimique, de la méthode d'extraction, de la granulométrie et du temps de macération (**LEVIZOU et al., 2004**). Elle dépend aussi de la température, car la chaleur rend les parois cellulaires perméables, comme elle dépend de la nature du solvant (**ESCRIBANO-BAILONO et SANTOS-BUEGLA, 2003 ; PINELO et al., 2005**).

Nous avons utilisé le éthanol 96% comme solvant d'extraction, car il donne un meilleur rendement, Les extraits phénoliques des plantes sont généralement des mélanges des différentes classes de composés phénoliques qui sont solubles dans le solvant utilisé. La solubilité de ces derniers est tributaire de type de solvant utilisé (polarité) (**NACZK et SHAHIDI, 2004**).

Dans la présente étude, la méthode utilisée est celle de l'extraction par macération, en utilisant un solvant polaires afin d'obtenir des extraits enrichis en molécules d'intérêt (composés phénoliques). (**VENTURINI, 2010**)

➤ Extraction des poly phénols totaux

L'extrait éthanoïque des feuilles de *Hyoscyamus albus* L, *Origanum vulgare* et *Mentha aquatica* sont préparées selon la méthode de Romani et al 2006.

Une quantité de 30 g de poudre végétale à été introduite dans un erlenmeyer contenant 200 ml de solvant (éthanol 96%). L'ensemble a subi une agitation pendant 24 h à température ambiante et a l'abri de la lumière puis laissé précipiter pendant 2h. L'extrait est donc récupéré par une filtration a l'aide d'un papier filtre (papier wathman) (la macération est répété 3 fois en renouvelant le solvant chaque 24H) cette méthode est appelé la méthode de l'épuisement. **Figure 6**

Mode opératoire

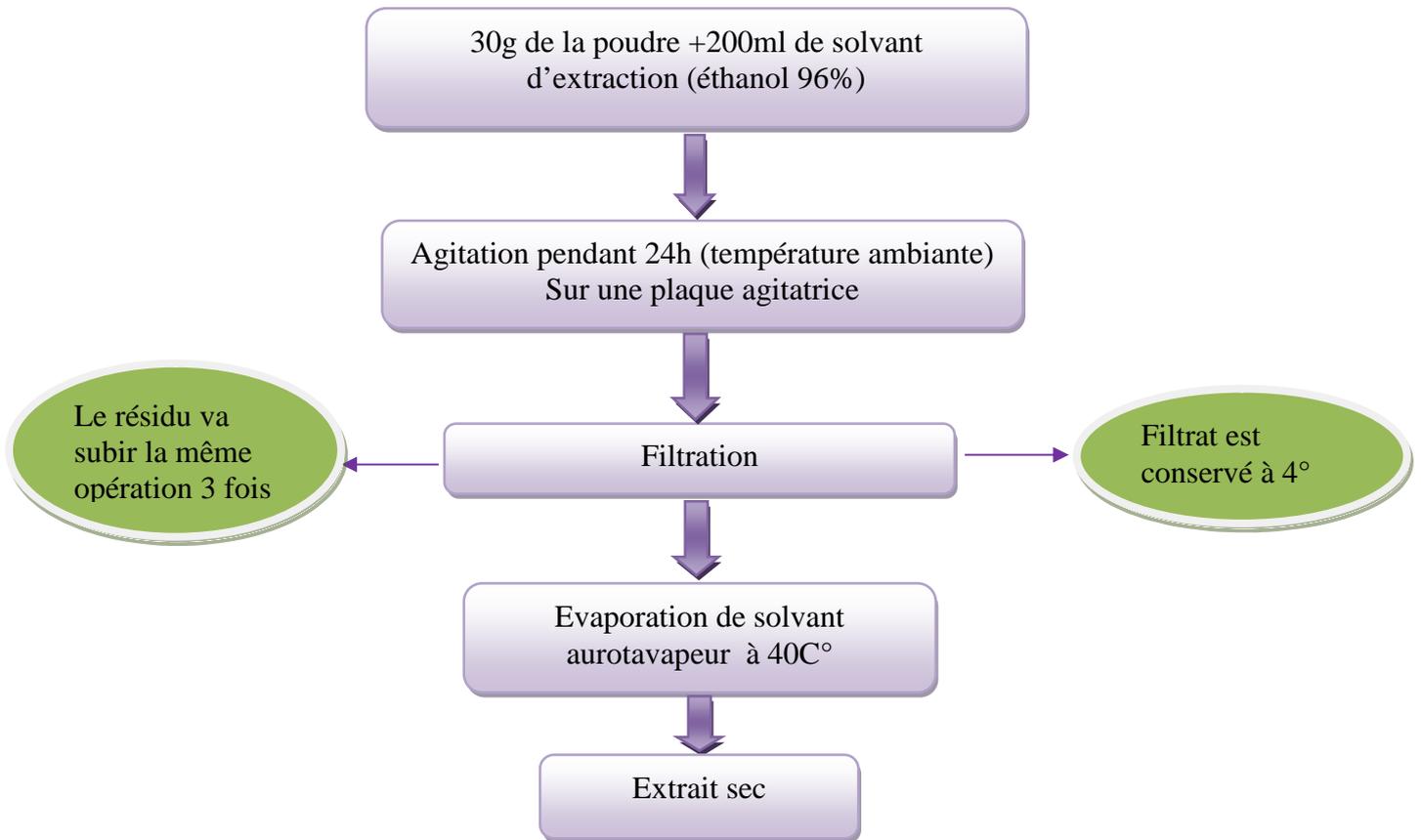


Figure N°6 : Protocole d'extraction des poly phénols totaux (Romani et al., 2006)

➤ Calcul du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait obtenu et la masse du matériel végétal à traiter. Annexe II

Le rendement a été calculé comme suit :

$$R (\%) = \frac{m(E)}{m(S)} \times 100$$

R : Rendement en extrait sec en g/ 30g de la matière sèche

m(E) : Quantité d'extrait récupérée exprimée en g

m(S) : Quantité de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction exprimée en g

II-2-2 Dosage des composés phénoliques

➤ Dosage des poly phénols totaux

➤ Principe

Le dosage des polyphénols totaux solubles est effectué par la méthode au Folin-Ciocalteu (**Figure N°7**) décrite par Singleton & Rossi, 1965.

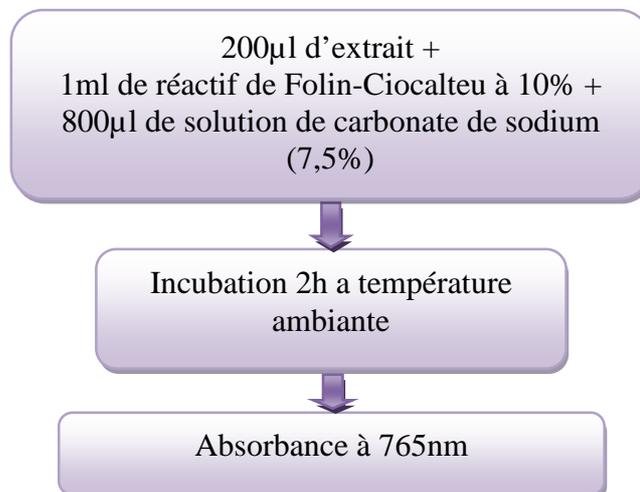


Figure N°7 : Protocole de dosage des phénols totaux (Singleton & Rossi, 1965)

Le réactif de Folin-Ciocalteu, mélange de l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$), est réduit en présence de poly phénols totaux en un mélange d'oxydes bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite est proportionnelle au taux des poly phénols totaux présents dans le milieu réactionnel (**Ribéreau-Gayon, 1968; Lapornik et al, 2005**).

➤ Le mode opératoire

Le contenu en poly phénols totaux des extraits d'*hyoscyamus albus*, *origanum vulgare* et *mentha aquatica*, est estimé par la méthode décrite par singleton & Rossi, 1965 in Wong et al, 2006.

Un volume de 200µl d'extrait est ajouté à un 1000µl de réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 1/10. Par la suite on ajoute 800µl de carbonate de sodium (7.5%) au mélange. Après une incubation de 2h à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 765nm.

II-3- Evaluation de l'activité antifongique des composés phénoliques seuls ou en association (thymol, eugénol, α -pinène, phénol)

II-3-1 Test antifongique

Le test antifongique a pour but de rechercher l'activité biologique de chaque extrait sur les souches fongiques à tester. Les extraits actifs pourraient ainsi justifier l'usage en médecine traditionnelle des plantes (**Ammana, 2007**)

La technique utilisée pour mettre en évidence l'activité antifongique des composés phénoliques et l'effet de leurs associations chimique en utilisant les composés majoritaires était celle de la microdilution en milieu Bouillon Mueller Hinton (BMH), appelée la méthode de l'échiquier (**Vaubourdolle, 2007**). Toutes les étapes effectuées pour cette technique étaient conformes aux directives du protocole M7A7 de *CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006)*, anciennement appelé *NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standards*). Les associations ont été testées sur quatre souches. Il s'agit de *A.flavus*, *A. occharacus*, *M. rammanianus* et *B. cinerea*.

II-3-1-1-Standardisation des inocula fongiques

A partir des colonies jeunes et bien isolées l'inoculum à tester est préparé et standardisé. Ce dernier doit avoir une charge microbienne standard, exigée par *CLSI* pour les tests en milieu liquide (macro et micro dilution), cette solution doit avoir une densité optique (DO) de 0,04 à 630 nm. Les inocula sont comparés à cette solution, ils doivent aussi avoir cet intervalle de DO, ce qui correspond à une charge de 10^7 UFC/ml. Cette solution est ramenée à 10^7 UFC/ml après dilution dans de l'eau physiologique.

II-3-1-2-Préparation des dilutions

En raison de la non miscibilité des composés phénoliques dans l'eau (et donc dans le milieu de culture et la solution fongique), ces derniers ont été émulsionnés dans de l'agar à 0,2% (Remmal et *al.*, 1993, b).

100 µl de chaque CP est mélangée avec 900 µl d'agar à 0,2% : c'est une solution « solution mère » qui contient 10% de l'CP (dilution de 10^{-1}) à partir de laquelle une série de dilutions de $\frac{1}{2}$ est préparée avec le même émulsifiant. **Annexe VI**

II-4- Technique de l'échiquier

La méthode de l'échiquier est décrite par **Eliopoulos et al. (2005)**, les volumes utilisés ainsi que le temps d'incubation sont ceux exigés par le *CLSI* (2006) pour la technique de dilution en milieu liquide (micro dilution).

La figure 8 représente un schéma d'une microplaque de 96 puits qui a été utilisée dans ce protocole.

| | | | | | | | | | | | | |
|----------|---------------|--------------|--------------|------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|-----------|-----------|
| A | CMI/16 | | | | | | | | | | | |
| B | CMI/8 | | | | | | | | | | | |
| C | CMI/4 | | | | | | | | | | | |
| D | CMI/2 | | | | | | | | | | | |
| E | CMI | | | | | | | | | | | |
| F | 2.CMI | | | | | | | | | | | |
| G | 4.CMI | | | | | | | | | | | |
| H | | 4.CMI | 2.CMI | CMI | CMI/2 | CMI/4 | CMI/8 | CMI/16 | CMI/32 | CMI/64 | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |

Figure N° 8: Schéma d'une microplaque de 96 puits

On procède comme suit :

- Le puits H1 (en rouge, sur la figure 10) contient 100 µl du BMH, 5 µl de l'inoculum fongique, et 50 µl de l'agar à 0,2% (témoin de croissance).
- À l'exception du puits H1, chaque puits de la ligne H (en abscisses) contient 100 µl du BMH, 5 µl de l'inoculum, et **50 µl** d'une dilution de l'agent antifongique X (de la plus concentrée à la plus diluée), en commençant par une concentration 4 fois la CMFs (la CMFs de chaque agent antifongique est préalablement déterminée par cette même technique).
- À l'exception du puits H1, chaque puits de la colonne n° 1 (en ordonnées) contient 100 µl du BMH, 5 µl de l'inoculum, et **50 µl** d'une dilution de l'agent antifongique Y (de la plus concentrée à la plus diluée, en commençant par une concentration 4 fois la CMFs).
- Chaque puits du reste de la microplaque (en violet) contient les mêmes quantités du BMH, de l'inoculum, et **25 µl** de chaque agent antimicrobien (combinaison des différentes dilutions qui

correspondent à celle des deux axes ; de telle sorte que chaque puits sera unique en ses combinaisons de doses).

- Après 17 à 20 h d'incubation à 30°C, les microplaques sont lues. Les puits là où il n'y a pas de croissance (puits clairs) contiendraient des concentrations inhibitrices. des repiquages ont été effectués à partir de ces puits sur une gélose nutritive, cette dernière est incubée à 30°C pendant 24 h. Les concentrations minimales fongicides correspondraient à celles dont les puits n'ont donné aucune croissance après repiquage, et les concentrations minimales fongistatiques correspondraient à celle qui présent des croissances après repiquage sur la gélose nutritive.

II-5- Evaluation de l'activité antifongique des échantillons en associations

Quinze (15) différentes combinaisons ont été réalisées :

- Composés phénoliques d'origan / Composés phénoliques de la menthe aquatique
- Composés phénoliques d'origan / Composés phénoliques de la jusquiame
- Composés phénoliques de la menthe aquatique / Composés phénoliques de la jusquiame
- Composés phénoliques d'origan / thymol
- Composés phénoliques d'origan / Eugénol
- Composés phénoliques d'origan / phénol
- Composés phénoliques d'origan / α - pinène
- Composés phénoliques de la menthe aquatique / thymol
- Composés phénoliques de la menthe aquatique / Eugénol
- Composés phénoliques de la menthe aquatique / phénol
- Composés phénoliques de la menthe aquatique / α - pinène
- Composés phénoliques de la jusquiame / thymol
- Composés phénoliques de la jusquiame / Eugénol
- Composés phénoliques de la jusquiame / phénol
- Composés phénoliques de la jusquiame / α - pinène

La méthode utilisée pour évaluer l'interaction entre les différents échantillon était celle de l'isobogramme qui a été décrite par Tallarida (2001) un isobogramme est un graphique qui présente des paires de concentrations (une combinaison de deux échantillon) qui donnent la même efficacité qu'un échantillon seul, d'où leurs nom « isoboles » par exemple, l'efficacité 50% d'un maximum est prise comme effet (l'IC50 dans notre cas) **l'annexe VII**

représente un exemple type d'un isobogramme dont la concentration de l'échantillon A seul donnant l'effet recherché égale à 20 (unité) et celle de B égale à 100 (unité).

La ligne droite qui relie ces deux points doit théoriquement représenter toutes les combinaisons de concentration des deux échantillons donnant le même effet dans le cas d'une indifférence.

Cette droite est tracée dans chaque isobogramme, elle est la référence pour détecter s'il y a une synergie (le point Q) ou un antagonisme (le point R). Le point Z est probablement un effet indifférent. Plusieurs points (plusieurs combinaisons de dose) plus une analyse statistique appropriée sont nécessaires pour conclure sur le type d'interaction.

II-5-1 Le protocole

Le protocole est le même que pour les échantillons seuls (décrit par wu et ng, 2008) sauf que l'échantillon à analyser se compose d'une des combinaisons précédentes. Pour confirmer la conclusion portant sur l'effet des différentes combinaisons tirée à partir des isobogrammes, des résultats chiffrés sont exprimés en calculant les FIC50 index (FIC50I) :

$$\mathbf{FIC50I = FIC50 (A) + FIC50 (B)}$$

$$FIC50I (A) = \frac{IC50(A \text{ en présence de B})}{IC50 (A \text{ seule})} \quad \text{et} \quad FIC50I (A) = \frac{IC50(B \text{ en présence de A})}{IC50 (B \text{ seule})}$$

L'effet antifongique est appréciée comme suit soit pour les FIC_s index ou bien pour les FBC_s index (Vaubourdolle M., 2007) :

- ✓ La synergie est définie par un $FIC_{Index} \leq 0,75$.
- ✓ L'addition correspond a un $FIC_{Index} = 1$.
- ✓ L'indifférence est définie par un FIC_{Index} compris entre 1 et 2.
- ✓ L'antagonisme est défini par $FIC_{Index} \geq 2$.

III- Résultats et discussions

III-1-Extraction

La matière végétale, qui est un mélange hétérogène, est soumise au contact avec un solvant. Notre protocole est basé sur l'utilisation de l'éthanol 96% comme solvant d'extraction, celui-ci permet d'extraire le maximum de différentes classes de composés phénoliques (Cowan, 1999).

Les extraits éthanoliques récupérés après évaporation ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant.

D'après les résultats obtenus, le taux des extraits secs des poudres de différentes plantes peut être dû à la taille des particules, utilisées pour l'extraction. En effet, selon **Naczk et Shahidi (2004) et Levizou et ses collaborateurs (2004)**, une meilleure extraction est obtenue avec le plus petit calibre. D'ailleurs, **Silva et al., (2007)**, ont montré que le meilleur rendement en polyphénols totaux est obtenu lors d'utilisation des particules plus fines ce qui est probablement due à l'augmentation de la surfaces de contact avec le solvant.

III-2-Dosage des polyphénols totaux

Après l'addition de la solution de carbonate de sodium et du réactif de Folin-Ciocalteu, une couleur bleue est obtenue, dont l'intensité varie en fonction de la concentration en acide gallique (le standard) ou de la concentration en composés phénoliques des extraits des plantes

Une couleur bleue est observée après l'ajout du réactif de Folin- Ciocalteu dont l'intensité varié en fonction de la concentration de l'extrait des plantes. Ce qui confirme la présence des poly phénols .Le complexe Folin- Ciocalteu- poly phénols est stabilisé par le mono carbonate de sodium (**Ribéreau-Gayon, 1968 ; Ribéreau-Gayon, 1982**).

III-2-1-Expression des résultats

La concentration des poly phénols totaux est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue, en utilisant l'acide gallique à 10% comme standard et l'équation de la droite de régression est comme suit : $DO = 0,018 \text{ concentration} + 0,153$ avec ($R^2 = 0,986$) (**Annexe III**). La densité optique augmente linéairement avec la concentration du complexe (acide gallique / réactifs). Les résultats sont exprimés en mg EAG/g d'extrait sec.

III-3-Rendement des extractions :

Le rendement en composés phénoliques extraite à partir d'*Hyoscyamus albus* est de 8.56%, celui de *Mentha aquatica* est de 8.43% et celui d'*Origanum vulgare* est de 6.67%.

Ces différences dans le rendement varié d'une espèce végétale à une autre et en fonction des solvants. Cette variation peut-être attribuée d'une part aux facteurs extrinsèques de la plante et d'autre part à l'espèce végétale et/ou à l'organe considérée. En effet, **Svoboda et Hampson (1999)** et **Smallfield (2001)** rapportent que les conditions environnementales, la période de récolte et l'âge du matériel végétal peuvent influencer sur les rendements d'extraction. De plus, les espèces végétales n'ont pas toutes le même potentiel; certaines familles botaniques offrant des rendements plus élevés que d'autres (**Valnet, 1980**).

III-4-Activité antifongique

III-4-1-Activité antifongique des différents échantillons seuls

Les Activités antifongiques (fongistatiques) des différents échantillons seuls sont présentés dans le Tableau VI, nous constatons que d'après les résultats obtenus, les valeurs d'IC50 d'*origanum vulgare* sont considérés comme ayant la meilleure activité par rapport à celles obtenues avec l'espèce végétale *mentha aquatica* et *Hyoscyamus albus* respectivement

Tableau VI : Activité antifongique des différents échantillons seuls : (fongistatiques)

| Les échantillons | Les souches fongiques | IC50(CMFs) mg /ml |
|-------------------------|------------------------------|-------------------|
| <i>Mentha aquatica</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | 1.25 |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | 1.25 |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | 1.25 |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | 1.25 |
| <i>Hyoscyamus albus</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | 2.5 |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | 2.5 |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | 5 |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | 5 |
| <i>Origanum vulgare</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | 0.7 |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | 0.7 |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | 1.25 |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | 1.25 |

Concernant les Activités antifongiques (fongistatiques) des différents composés majoritaires seuls, ils sont présentés dans le Tableau VII, nous constatons aussi que les concentrations de thymol ont donné des valeurs de IC50 intéressantes avec une meilleure activité fongistatique par rapport aux autres composés majoritaires (α -pinène, eugénol et le phénol respectivement).

Tableau VII : Activité antifongique des différents composés majoritaires seuls (fongistatiques)

| Les échantillons | Les souches fongiques | IC50(CMFs) mg /ml |
|------------------|------------------------------|-------------------|
| Phénol | <i>Aspergillus flavus</i> | - |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | 36.37 |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | 36.37 |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | 72.75 |
| Eugénol | <i>Aspergillus flavus</i> | 12.75 |
| | <i>Mucorrammanianus</i> | 6.37 |
| | <i>Botrytiscinerea</i> | - |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | - |
| Thymol | <i>Aspergillus flavus</i> | - |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | - |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | 0.001 |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | 0.001 |
| α -Pinène | <i>Aspergillus flavus</i> | 4.5 |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | 4.5 |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | 2.25 |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | 2.25 |

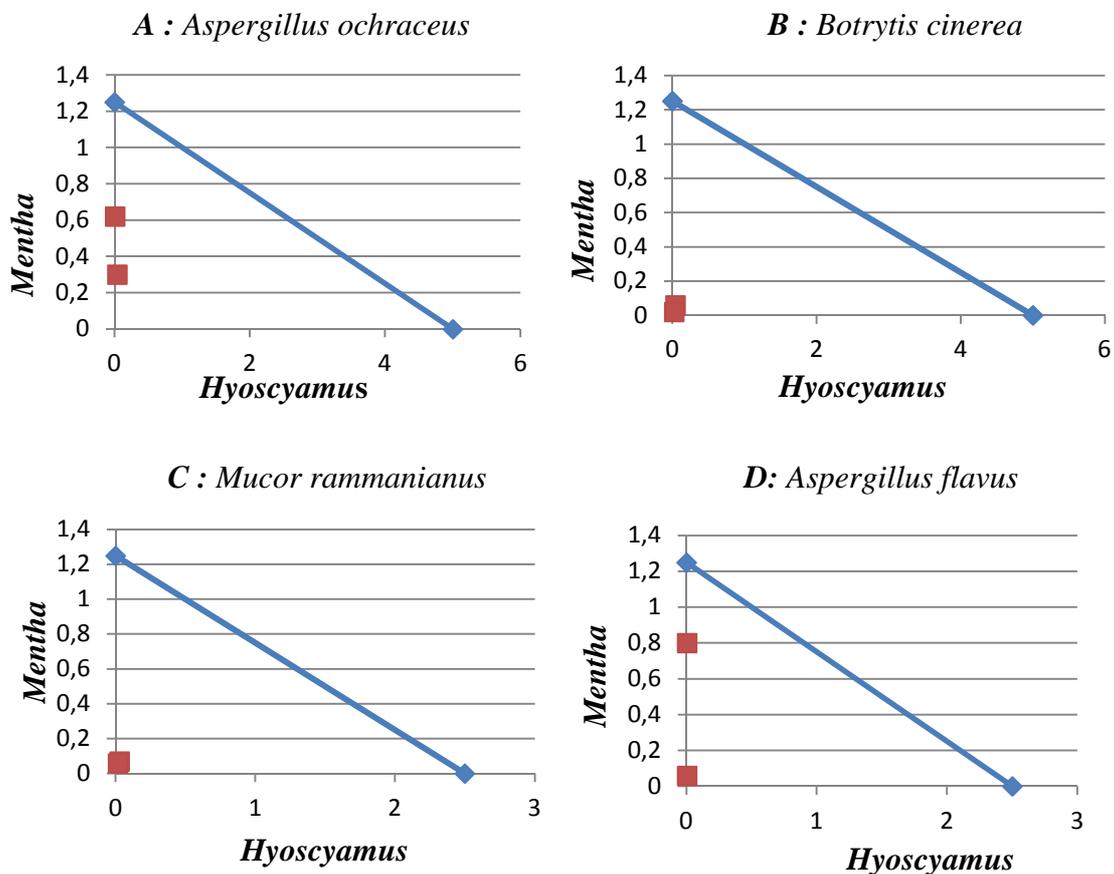
Cependant, outre les composés phénol, eugénol, thymol et α -Pinène, **Hitokotoet al., (1980)** ont démontré que le linalool qui est un composant majeure de l'huile essentielle de coriandre, a un pouvoir puissant sur *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus* et *A. versicolor*. De plus, en étudiant l'effet de cinq constituants purs des huiles essentielles (cineole, citral, geraniol, linalool et menthol), **Pattnaik et al., (1997)** ont prouvé que le linalool est le constituant le plus actif en inhibant la croissance de dix-sept souches de champignons parmi les dix-huit testées. Ces mêmes auteurs ont indiqué aussi que le linalool est doté d'un pouvoir fongistatique vis-à-vis des champignons étudiés.

Par ailleurs, le profil de l'isobologramme sera différent selon que l'effet est synergique ou antagoniste. Si le FIC est inférieur à 0,75, l'association est synergique, elle est additive s'il est équivalent à 1, indifférente s'il est compris entre 1 et 2 et antagoniste s'il est supérieur à 2.

Les figures (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 et 22) représentent les isobologrammes des différentes combinaisons :

1. Composés phénoliques *Hyoscyamus* / Composés phénoliques de *mentha*

D'après la figure 9, nous remarquons que les points obtenus sont tous au-dessous de la droite pour l'association des extraits de *mentha/hyoscyamus* testée sur les quatre souches fongiques utilisées dans cette présente étude, on en déduit donc que c'est un effet synergique.

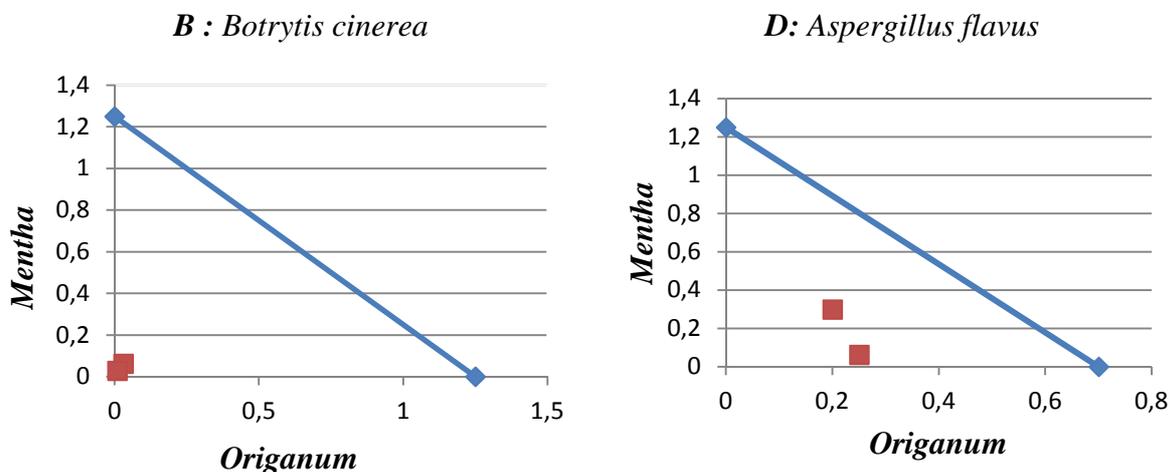


Figures N°9: Isobologramme des extraits de *Mentha* combinés avec les extraits de *Hyoscyamus* testés avec (effet fongistatique) sur :

A : *Aspergillus ochraceus* et B : *Botrytis cinerea*, C : *Mucor rammanianus* et D : *A. flavus*

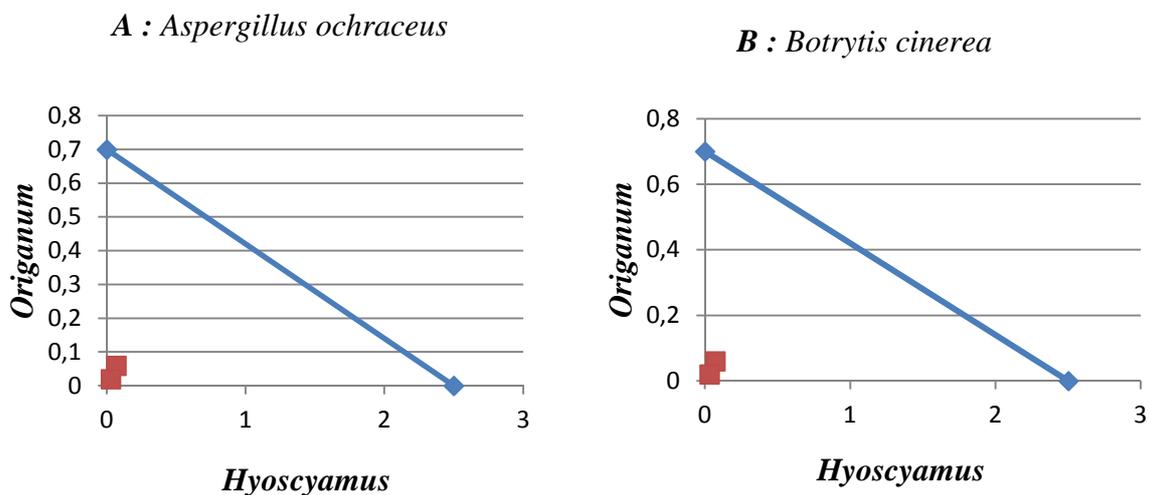
2. Composés phénoliques de *Mentha* / Composés phénoliques d'*Origanum*

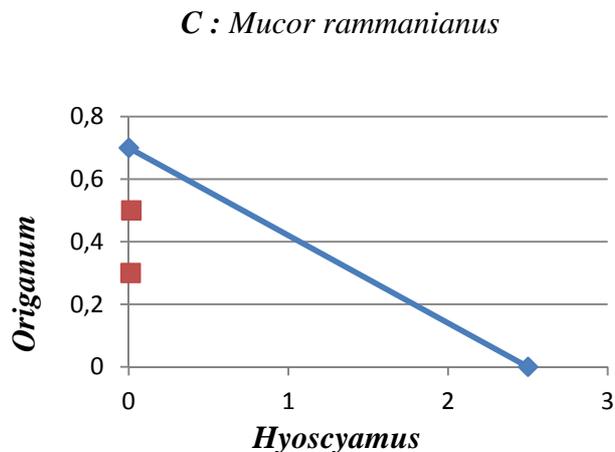
D'après la figure 10, nous remarquons que les points obtenus sont tous au-dessous de la droite pour l'association des extraits de *mentha/origan* testée sur les deux souches fongiques utilisées dans cette présente étude, on en déduit donc que c'est un effet synergique.



Figures N°10: Isobogramme des extraits de *Mentha* combinés avec les extraits d'*Origanum* testés avec (effet fongistatique) sur : *B: Botrytis cinerea*, et *D: A. flavus*

3. Composés phénoliques d'*Hyoscyamus* / Composés phénoliques d'*Origanum*



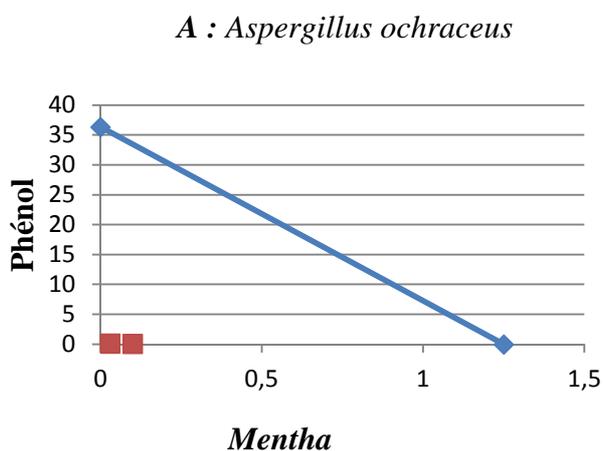


Figures N°11 : Isobologramme des extraits de *Mentha* combinés avec les extraits de *Hyoscyamus* testés avec (effet fongistatique) sur :

A : A. Ochraceus et B : Botrytis cinerea, et C : Mucor rammanianus

Les deux points sont au-dessous de la droite, donc il s'agit d'un effet synergique pour les trois souches (Botrytis, Aspocch et Mucor).

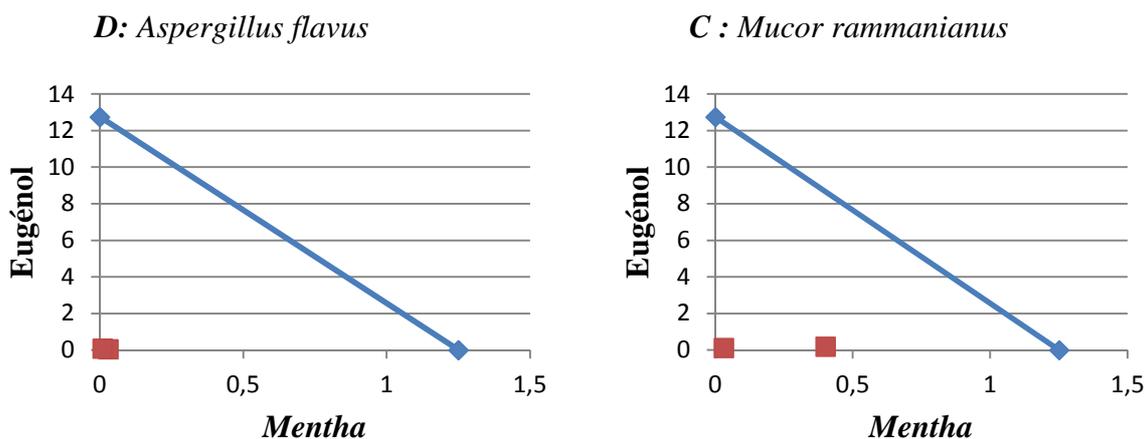
4. Composés phénoliques *Mentha* / Phénol



Figures N°12 : Isobologramme des extraits de *Mentha* combinés avec le phénol testés avec (effet fongistatique) sur : *A : Aspergillus. Ochraceus*

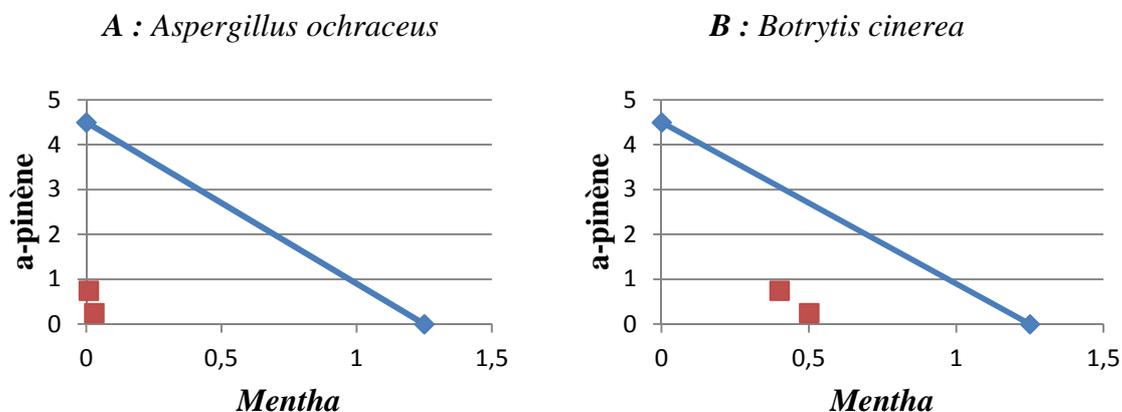
Les deux points sont au-dessous de la droite donc il s'agit d'un effet synergique

5. Composés phénoliques *Mentha* / Eugénol



Figures N°13: Isobologramme des extrait de *Mentha* combinés avec l'eugénol testés avec (effet fongistatique) sur : *D:Aspergillus flavus* et *C : Mucor rammanianus*
 Pour la figure 13 les deux points sont au-dessous de la droite, donc c'est un effet synergique.

6. Les composés phénoliques de *Mentha*/ α -pinène

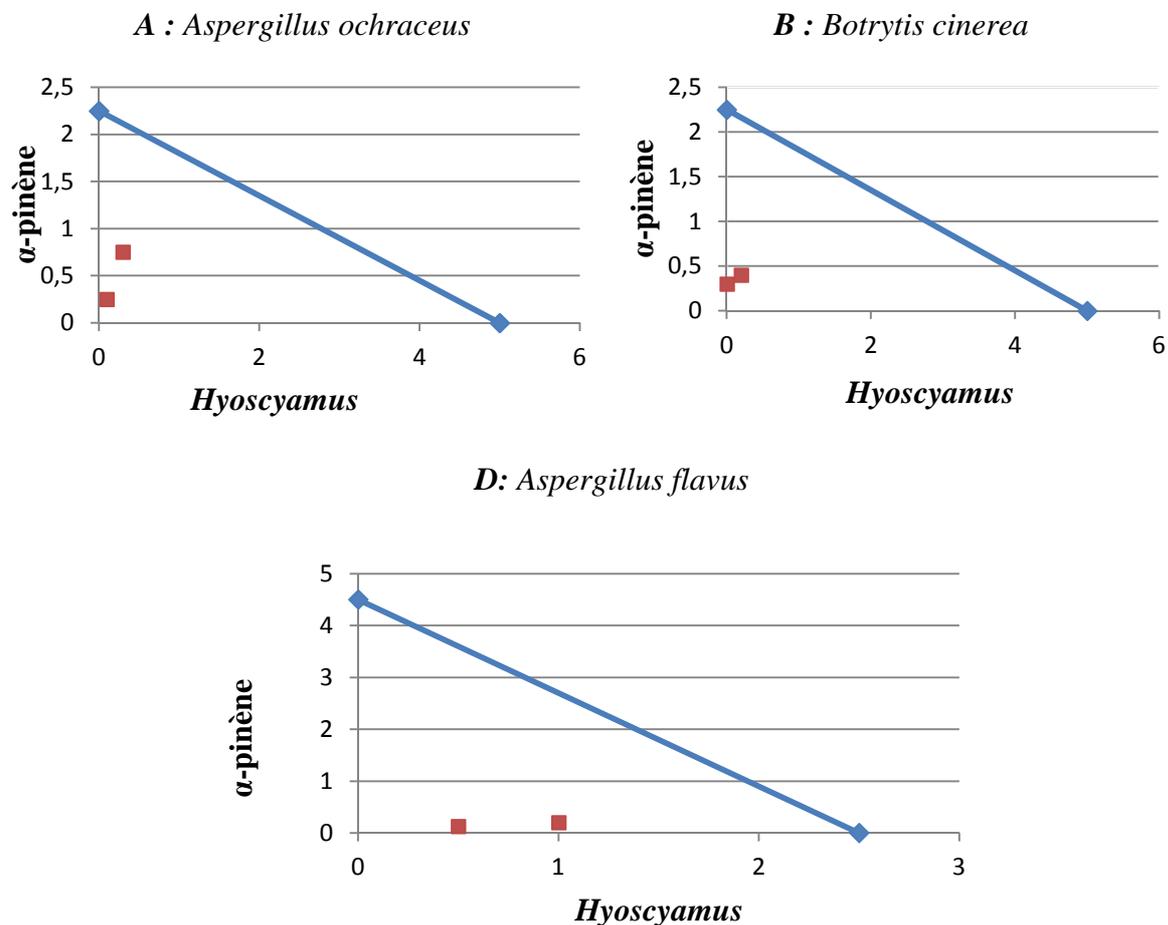


Figures N°14 : Isobologramme des extrait de *Mentha* combinés avec l' α -pinène testés sur :
A: Aspergillus ochraceus et *B : Botrytis cinerea*

Pour les figures 14 les deux points sont au-dessous de la droite, c'est effet synergique.

Les composés phénoliques d'*Hyoscyamus* combiné avec les composés majoritaires d'HE (effet fongistatique)

7. Composés phénoliques d'*Hyoscyamus* / α -pinène



Figures N°15: Isobologrammes des extraits d'*hyoscyamus* combiné avec l' α -pinène testé avec (effet fongistatique) sur *A : Aspergillus ochraceus* et *B : Botrytis cinerea* et *D : Aspergillus flavus*

Pour la figure 15 les deux points sont au-dessous de la droite, donc c'est effet synergique.

8. Composés phénoliques d'*Hyoscyamus* / eugéno

C : *Mucor rammanianus*

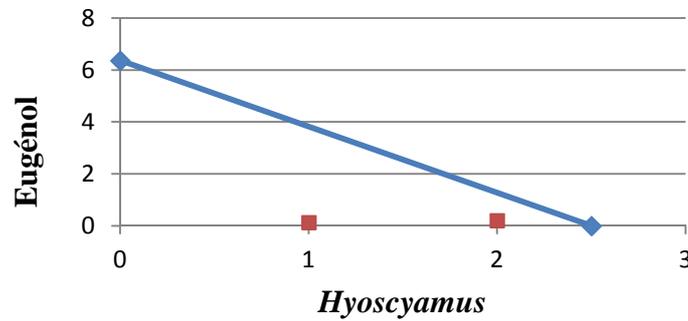
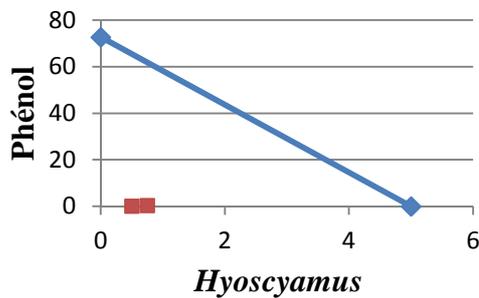


Figure N°16 : Isobogramme des extraits d'*Hyoscyamus* combiné avec l'eugéno testé avec (effet fongistatique) sur C : *Mucor rammanianus*

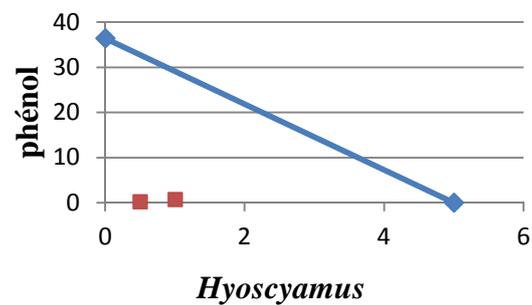
Pour la figure 16 les deux points sont au-dessous de la droite, c'est effet synergique.

9. Composés phénoliques d'*Hyoscyamus*/ le phéno

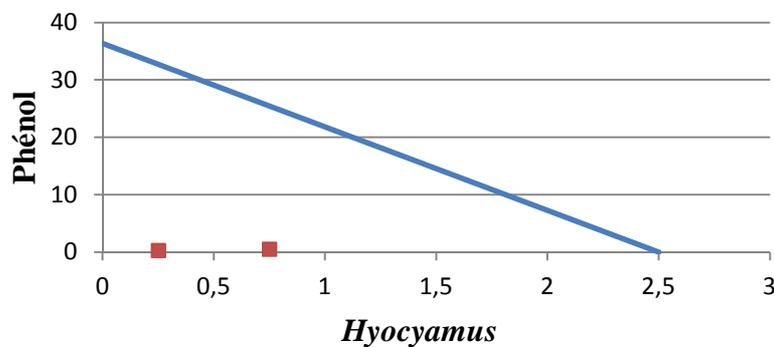
A : *Aspergillus ochraceus*



B : *Botrytis cinerea*



C : *Mucor rammanianus*



Figures N°17: Isobogrammes des extraits d' *Hyoscyamus* combiné avec le phéno testé avec (effet fongistatique) sur : A : *Aspergillus ochraceus* et B : *Botrytis cinerea* et C : *Mucor rammanianus*

La figure 17 les deux points sont au-dessous de la droite, c'est un effet synergique

10. Composés phénoliques d'*Origan* / phénol

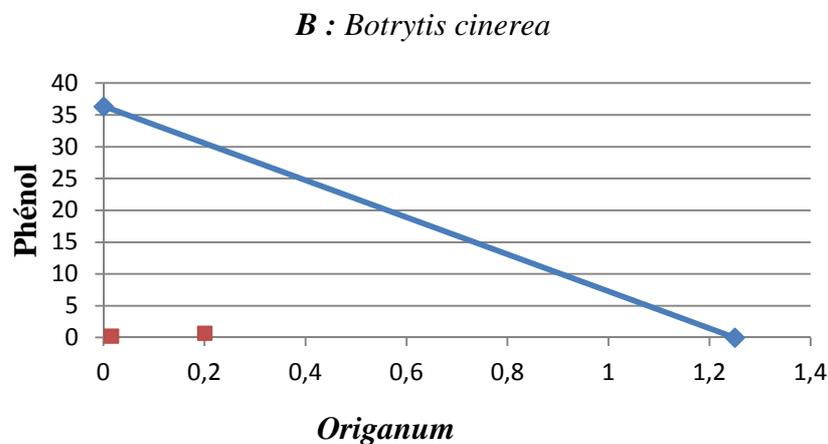


Figure N°18: Isobologramme des extraits d'*Origanum* combiné avec le phénol testé avec (effet fongistatique) sur : *B : Botrytis cineria*

Les deux points sont au-dessous de la droite, c'est un effet synergique.

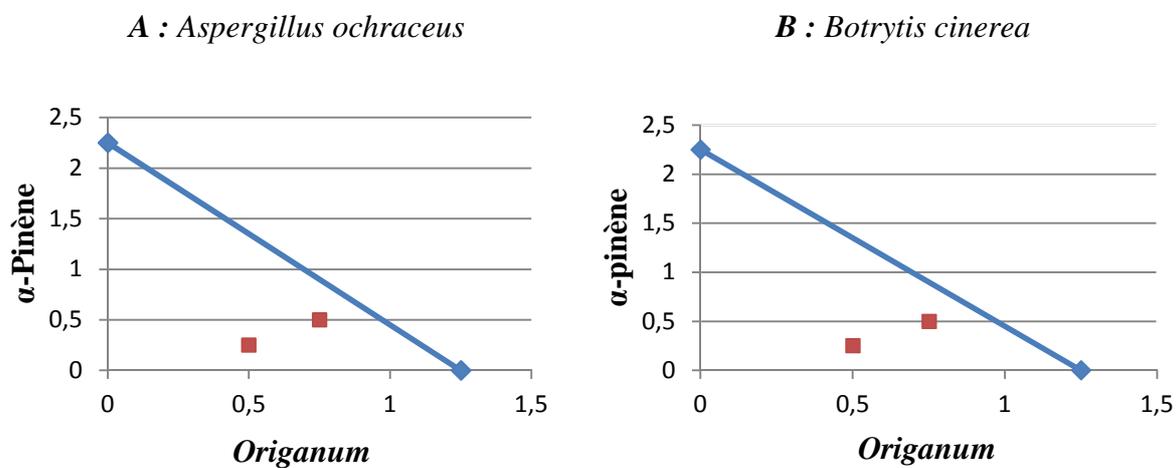


Figure N°19 : Isobologramme des extraits d'*Origanum* combiné avec α -pinène testé avec (effet fongistatique) sur : *A : Aspergillus ochraceus* et *B : Botrytis cineria*

Pour les deux figures les deux points sont au-dessous de la droite donc ils'agit d'un effet synergique.

Combinaison des composés phénoliques avec les composés majoritaires d'HE effet fongicide

11. Composés phénoliques de *Mentha* / phénol

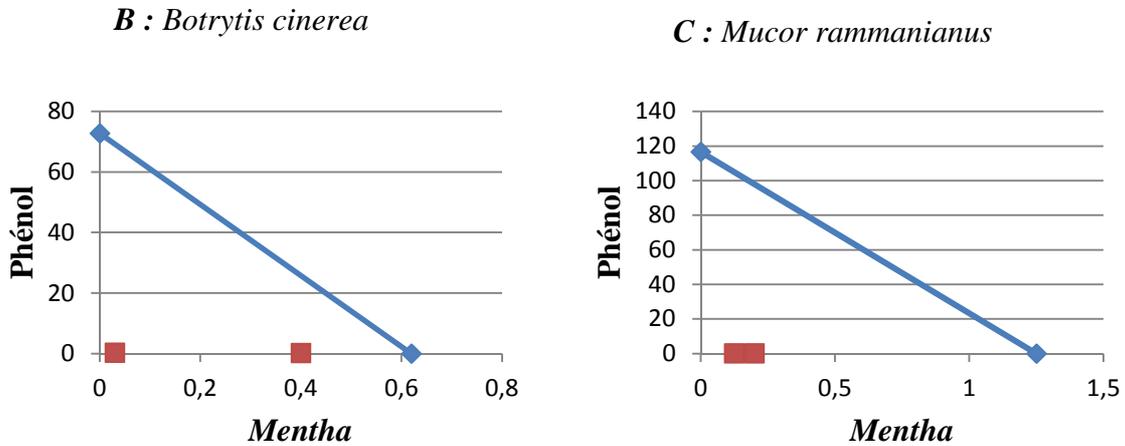


Figure N°20: Isobologrammes des extraits de *mentha* combiné avec le phénol testé avec (effet fongicide) sur : *B : Botrytis cinerea* et *C : Mucor rammannianus*

Pour les deux figures les deux points sont au-dessous de la droite, donc il s'agit d'une synergie.

12. Composés phénoliques de *Mentha*/ phénol

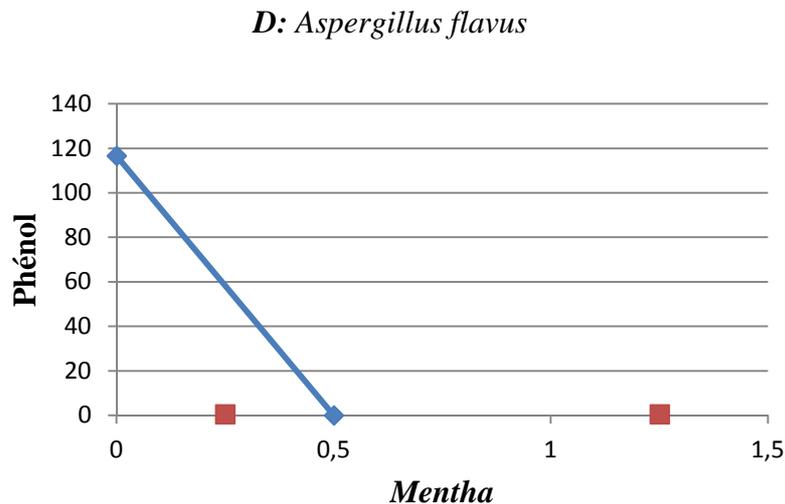


Figure N°21: Isobogramme des extraits de *Mentha* combiné avec le phénol testé avec (effet fongicide) sur : *D : Aspergillus flavus*

Pour cette figure l'une des deux points est à droite et autre à gauche dont ils sont très loin, c'est un effet d'addition.

13. Composés phénoliques d'*Origanum* / eugéno

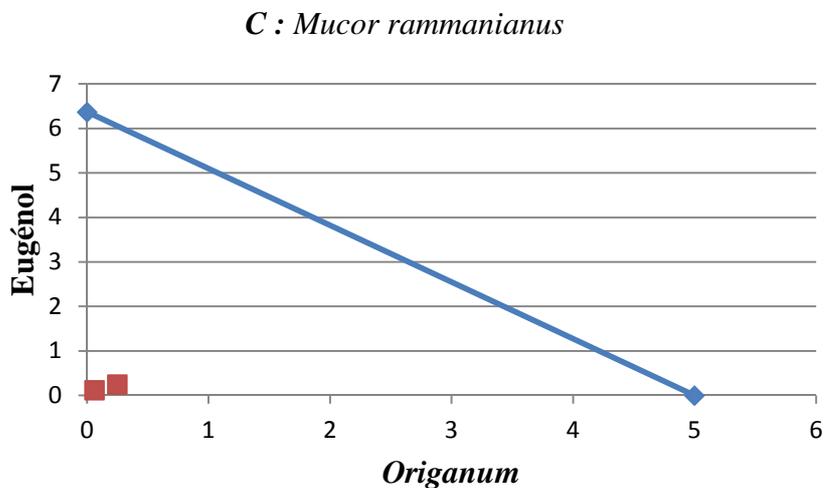


Figure N°22 : Isobologramme des extraits d'*Origanum* combiné avec l'eugéno testé avec (effet fongicide) sur : *C : Mucorrammanianus*

Les deux points sont au-dessous de la droite, il s'agit d'un effet synergique.

III-5-2 Activité antifongique des composées phénoliques en association avec les composés majoritaires :

Tableau VIII1 : Association de *Mentha aquatica* avec les composées majoritaires (fongostatiques)

| Les combinaisons | Les combinaisons | IC50 | IC50 | FIC50 | FIC50 | Effet | |
|------------------|---------------------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------------|-------------|
| Mentha | <i>Aspergillus flavus</i> | / | / | / | / | - | |
| | Phénol | <i>Mucor rammanianus</i> | 2 | 0.5 | 2.5 | 4.9 | antagoniste |
| | | <i>Botrytis cinerea</i> | 2 | 0.25 | 2.25 | 4.9 | antagoniste |
| | | <i>Aspergillus ochraceus</i> | 0.03 | 0.125 | 0.155 | 0.25 | synergique |
| Mentha | <i>Aspergillus flavus</i> | 0.03 | 0.06 | 0.09 | 0.018 | Synergique | |
| | Eugénol | <i>Mucor rammanianus</i> | 0.03 | 0.125 | 0.155 | 0.3 | Synergique |
| | | <i>Botrytis cinerea</i> | / | / | / | / | - |
| | | <i>Aspergillus ochraceus</i> | / | / | / | / | - |
| Mentha | <i>Aspergillus flavus</i> | / | / | / | / | - | |
| | Thymol | <i>Mucor rammanianus</i> | / | / | / | / | - |
| | | <i>Botrytis cinerea</i> | 0.5 | 0.78 | 1.28 | 2.4 | indifférent |
| | | <i>Aspergillus ochraceus</i> | 0.5 | 0.78 | 1.28 | 4.6 | indifférent |
| Mentha | <i>Aspergillus flavus</i> | 1 | 0.125 | 1.125 | 2.25 | Indifférent | |
| | α-pinène | <i>Mucor rammanianus</i> | 2 | 0.125 | 2.125 | 4.2 | antagoniste |
| | | <i>Botrytis cinerea</i> | 0.5 | 0.25 | 0.75 | 1.25 | Synergique |
| | | <i>Aspergillus ochraceus</i> | 0.03 | 0.25 | 0.28 | 0.4 | Synergique |

(-) = pas d'activité

Tableau IX : Association d'*origanum vulgare* avec les composées majoritaires (FICs)

| Les combinaisons | Les combinaisons | IC50 | IC50 | FIC50c | FIC50 | Effet |
|-------------------------|------------------------------|-------|-------|--------|-------|-------------|
| <i>Origanum vulgare</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | / | / | / | / | - |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | / | / | / | / | - |
| Phenol | <i>Botrytis cinerea</i> | 0.015 | 0.25 | 0.26 | 0.4 | Synergique |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | 1 | 0.125 | 1.125 | 2.2 | Indifférent |
| <i>Origanum vulgare</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | 0.5 | 0.5 | 1 | 2 | L'addition |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | 0.5 | 1 | 1.5 | 3 | indifférent |
| Eugenol | <i>Botrytis cinerea</i> | / | / | / | / | - |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | / | / | / | / | - |
| <i>Origanum vulgare</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | / | / | / | / | - |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | / | / | / | / | - |
| Thymol | <i>Botrytis cinerea</i> | 0.5 | 1.56 | 2 | 4 | indifférent |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | 0.5 | 0.7 | 1.2 | 2 | indifférent |
| <i>Origanum vulgare</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | 32.05 | 0.125 | 32.125 | 64 | Indifférent |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | 16.02 | 0.125 | 16.145 | 31 | antagoniste |
| α -pinène | <i>Botrytis cinerea</i> | 0.5 | 0.25 | 0.75 | 0.80 | Synergique |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | 0.5 | 0.25 | 0.75 | 1 | Synergique |

(-) = pas d'activité

Tableau X : Association de *Hyoscyamus albus* avec les composé majoritaire (fongostatiques)

| Les combinaisons | Les combinaisons | IC50 | FIC50 | FIC50c | Effet |
|-------------------------|------------------------------|-------|-------|--------|-------------|
| <i>Hyoscyamus albus</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | / | / | / | - |
| Phénol | <i>Mucor rammanianus</i> | 0.25 | 0.25 | 0.5 | Synergique |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | 0.5 | 0.25 | 0.75 | Synergique |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | 0.5 | 0.125 | 0.625 | Synergique |
| <i>Hyoscyamus albus</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | 0.015 | 0.4 | 0.415 | Synergique |
| Eugenol | <i>Mucor rammanianus</i> | 0.2 | 0.125 | 0.32 | Synergique |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | / | / | / | - |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | / | / | / | - |
| <i>Hyoscyamus albus</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | / | / | / | - |
| Thymol | <i>Mucor rammanianus</i> | / | / | / | - |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | 0.003 | 0.7 | 0.78 | indifférent |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | 0.03 | 0.7 | 0.81 | indifférent |
| <i>Hyoscyamus albus</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | 0.5 | 0.125 | 0.625 | Synergique |
| α -pinène | <i>Mucor rammanianus</i> | 1 | 0.125 | 1.125 | indifférent |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | 0.003 | 0.03 | 0.06 | Synergique |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | 0.1 | 0.25 | 0.35 | Synergique |

(-) = pas d'activité

Tableau XI: Activité antifongique des composées phénoliques seuls (effet fongistatiques)

| Les combinaisons | Les combinaisons | IC50 | IC50 | FIC50 | Effet |
|-------------------------|------------------------------|-------|--------|-------|---------------|
| <i>Hyocyamus albus</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | 0.007 | 0.06 | 0.13 | Synergie |
| <i>Mentha aquatica</i> | <i>Mucor rammanianus</i> | 0.03 | 0.07 | 0.037 | Synergie |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | 0.04 | 0.06 | 0.01 | Synergie |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | 0.007 | 0.062 | 0.07 | Synergie |
| <i>Hyocyamus albus</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | 0.015 | 1 | 1.015 | L'antagonisme |
| <i>Origanum vulgare</i> | <i>Mucor rammanianus</i> | 0.015 | 0.5 | 0.515 | Synergie |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | 0.007 | 0.0625 | 0.132 | Synergie |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | 0.007 | 0.0625 | 0.132 | Synergie |
| <i>Origanum vulgare</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | 0.250 | 0.0625 | 0.312 | Synergie |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | 8.01 | 0.0625 | 8.072 | L'antagonisme |
| <i>Mentha aquatica</i> | <i>Botrytis cinerea</i> | 0.031 | 0.0625 | 0.093 | Synergie |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | 2 | 0.06 | 2.062 | L'antagonisme |

Activité antifongique des composées phénoliques en association avec les composées majoritaires :

Tableau XII : Activité antifongique des différents échantillons seuls : (effet fongicide)

| Les échantillons | Les souches fongiques | IC50(CMFC) mg/ml |
|-------------------------|-------------------------------|------------------|
| <i>Mentha aquatica</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | 5 |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | 1.25 |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | 0.62 |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | - |
| <i>Hyocyamus albus</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | 10 |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | - |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | 0.04 |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | - |
| <i>Origanum vulgare</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | 0.62 |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | 5 |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | - |
| | <i>Aspergillus occharacus</i> | - |

(-) = pas d'activité

Tableau XIII: Association de *Mentha aquatica* avec les composées (effet fongicide)

| Les combinaisons | Les combinaisons | IC50 | IC50 | FIC50 | FIC50 | Effet |
|------------------|------------------------------|-------|------|-------|-------|------------|
| <i>Mentha</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | 0.25 | 1.25 | 1.5 | 2.99 | L'addition |
| Phenol | <i>Mucor rammanianus</i> | 0.125 | 0.07 | 0.2 | 0.35 | Synergie |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | 0.03 | 0.25 | 0.28 | 0.57 | Synergie |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | / | / | / | / | - |
| <i>Mentha</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | | | | | |
| Eugenol | <i>Mucor rammanianus</i> | / | / | / | | - |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | | | | | |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | | | | | |
| <i>Mentha</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | / | / | / | | - |
| Thymol | <i>Mucor rammanianus</i> | | | | | |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | | | | | |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | | | | | |
| <i>Mentha</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | / | / | / | | - |
| α -pénène | <i>Mucor rammanianus</i> | | | | | |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | | | | | |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | | | | | |

(-) = pas d'activité

Tableau XIV : Association d'*Origanum vulgare* avec les composées majoritaires (fongicides)

| Les combinaisons | Les combinaisons | IC50 | IC50 | FIC50 | FIC50 | Effet |
|-------------------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|----------------|
| <i>Origanum vulgare</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | 1.008 | 0.31 | 1.31 | 2.62 | L'indifférence |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | 5 | 10 | 15 | 30 | L'antagonisme |
| Phenol | <i>Botrytis cinerea</i> | / | / | / | / | L'indifférence |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | / | / | / | / | - |
| <i>Origanum vulgare</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | 1.008 | 0.5 | 1.5 | 3 | L'indifférence |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | 0.06 | 0.125 | 0.187 | 0.5 | Synergie |
| Eugenol | <i>Botrytis cinerea</i> | / | / | / | / | - |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | | | | | - |
| <i>Origanum vulgare</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | / | / | / | / | - |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | / | / | / | / | - |
| Thymol | <i>Botrytis cinerea</i> | / | / | / | / | - |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | / | / | / | / | - |
| <i>Origanum vulgare</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | / | / | / | / | - |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | / | / | / | / | - |
| α -pénène | <i>Botrytis cinerea</i> | / | / | / | / | - |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | | | | | - |

(-) = pas d'activité

Tableau XV : Association d'*Hyoscyamus albus* avec les composées majoritaires

(Effet Fongicides)

| Les combinaisons | Les combinaisons | IC50 | IC50 | FIC50 | FIC50 | Effet |
|-------------------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|----------------|
| <i>Hyoscyamus albus</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | 0.001 | 1.25 | 1.251 | 2.5 | L'indifférence |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | / | / | / | / | - |
| Phenol | <i>Botrytis cinerea</i> | 0.48 | 1 | 1.48 | 2.8 | L'indifférence |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | / | / | / | / | - |
| <i>Hyoscyamus albus</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | 0.001 | 1 | 1.001 | 2 | L'indifférence |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | / | / | / | / | - |
| Eugenol | <i>Botrytis cinerea</i> | 0.48 | 0.125 | 0.6 | 0.12 | Synergie |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | / | / | / | / | - |
| <i>Hyoscyamus albus</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | / | / | / | / | - |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | / | / | / | / | - |
| Thymol | <i>Botrytis cinerea</i> | 0.48 | 1.04 | 1.52 | 2.99 | L'indifférence |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | / | / | / | / | - |
| <i>Hyoscyamus albus</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | / | / | / | / | - |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | / | / | / | / | - |
| α -pinène | <i>Botrytis cinerea</i> | / | / | / | / | - |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | / | / | / | / | - |

Tableau XVI : Activité antifongique des différents composés majoritaires seuls : (effet fongicide)

| Les échantillons | Les souches fongiques | IC50(cmfc) mg/ml |
|------------------|------------------------------|------------------|
| Phénol | <i>Aspergillus flavus</i> | 116.6 |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | 116.6 |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | 72.75 |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | 72.75 |
| Eugénol | <i>Aspergillus flavus</i> | 1.59 |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | 6.37 |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | 51 |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | 25.5 |
| Thymol | <i>Aspergillus flavus</i> | - |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | - |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | 0.006 |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | - |
| A-Pinène | <i>Aspergillus flavus</i> | - |
| | <i>Mucor rammanianus</i> | - |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | 116.6 |
| | <i>Aspergillus ochraceus</i> | - |

(-) = pas d'activité

Face aux problèmes de la résistance aux antifongiques et aux antibiotiques synthétiques, Beaucoup de travaux ont été menés sur le pouvoir antifongique des produits naturels tels que les extraits de certaines plantes. Lors de cette étude, le pouvoir antifongique des composés phénoliques de trois espèces végétales (*M. aquatica*, *O. vulgare* et *H. albus*) seuls et en association avec les composés majoritaires (phénol, eugénol, thymol et α -pinène) ont été étudié vis-à-vis de quatre souches fongiques (*Asp ochraceus*, *Asp flavus*, *mucor* et *botrytis*). Ce pouvoir a été évalué avec la détermination de la CMFs (tableau VII et VIII) et la CMFc (Tableau XIII et XIV).

Les résultats obtenus ont montré que la plupart des associations étudiées ont donné des effets synergiques sur les souches testées mais aussi des effets antagonistes, indifférents et

un effet d'addition à été observé avec l'association : *Mentha aquatica* avec le phénol testé sur *Aspergillus flavus*.

Cette variabilité des résultats de l'activité biologique des extraits végétaux peut dépendre du contenu en composés poly phénoliques. Comme montré par plusieurs auteurs (**Mahmoud et coll., 2011**) ainsi plusieurs études ont mis en évidence les activités antimicrobiennes des extraits de plantes provenant de divers organes comme les feuilles, les graines et les fleurs (**Karou et coll., 2005, Falleh et coll., 2008**). Il a été indiqué que les activités antimicrobiennes des extraits de plantes dépendent de la nature et de la structure des composés phénolique. (**Zongo et coll. 2011**)

Ceci est interprété par le fait que les plantes produisent une grande variété de petites molécules antibiotiques ayant un large spectre de structures telles que les terpénoïdes, les glycostéroïdes, les flavonoïdes et les polyphénols (**Seidel, 2005**). Et que La littérature a montré aussi qu'une variation de la composition chimique est en fonction de l'origine géographique des espèces (**Kovacevicet al., 2001; Boulilaet al., 2008 ; Bakkaliet al., 2008**)

En effet, (**Lhoste et al.1993**), (**Pamo et al. 2003**) et (**Ling et al.2003**) ont rapporté que les extraits végétaux d'un certain nombre de plantes contiennent des composés tels que les tanins, les flavonoïdes et les alcaloïdes qui sont dotés de propriétés fongicides, ainsi que l'efficacité des composés phénoliques dépend de leurs hétérogénéité structurale (**Bruneton, 2009**). Les différentes concentrations d'extraits ont influencé de façon significative la croissance radicale du champignon, les concentrations élevées étant plus inhibitrices. Des résultats semblables sur l'activité antifongique de certains de ces extraits avaient été rapportés par (**Djeugapet al. 2011**)

L'association des composés phénoliques des trois plantes seuls a donné seulement une activité fongistatique (effet inhibitrice). Et des activités fongicides et fongistatiques en association avec les composés majoritaire.

Les composés majoritaires de l'HE d'origan, sont le carvacrol et le thymol ; néanmoins la concentration des composés actifs et l'activité antifongique dépendent de la variété de la plante, l'origine, la période de récolte, ainsi que la méthode d'extraction et les conditions de conservation (**Erturk et al., 2006 ; Hamza et al., 2006**). Par exemple la variété d'origan (*O. vulgare*), récolté au nord de la grèce est riche en thymol (30.3% à42.8%) et contient de faible teneurs en carvacrol (1.7% à 2.5%), alors que dans la rigion sud, est riche en carvacrol (57.4% à 69.6%) mais avec des teneurs de 0.2% à 4.1% en thymol (**Erturk et al., 2006**).

L'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques (**Voukoumet al, 1988**). Les auteurs concluent que les phénols (eugénol, chavicol 4-allyl-2-6- diméthoxyphénol) sont plus antifongiques.

Selon **Chami, 2004** Les phénols possèdent une action anti-infectieuse puissante à large spectre d'action avec en particulier une activité antibactérienne, antifongique, antivirale, et antiparasitaire. Ainsi Il y a de nombreux composés phénoliques dans les huiles essentielles. Les principaux sont le thymol, le carvacrol et l'eugénol. Dont Le carvacrol et l'eugénol pourraient être considérés comme de puissants agents antifongiques.

Les mécanismes d'action des composés naturels sont expliqués de différente manière selon les auteurs. Selon **Chabot et al, (1992)**, l'activité antimicrobienne est liée à la polarité des substances bioactives. Les composés les moins polaires comme les flavonoïdes n'ayant pas de groupement hydroxyle OH sur leur cycle B sont plus actifs vis-à-vis des agents microbiens que ceux portant le groupement hydroxyle.

Moreria et al. 2005 montrent que la double couche phospholipidique des cellules membranaires, sont sensibles aux composés phénoliques des huiles essentielles. Ces derniers augmentent la perméabilité et la fuite des constituants intracellulaires, ou la détérioration des systèmes enzymatiques des bactéries. Il a été suggéré donc que les dérivés phénoliques peuvent avoir une activité destructrice des membranes (**Ipek et al, 2005**).

Botrytis cinerea, un autre champignon responsable de la pourriture des pommes, ainsi que d'autres espèces fongiques (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusariumculmorum*, *Fusariumoxysporum* et *Trichodermasp.*) sont tous sensibles à l'activité antifongique de l'huile essentielle de la menthe pouliot. (**Hajlaoui h., et al, 2009, Chebli et al., 2003**)

Ainsi que selon **Bouchra et al, 2004** *Botrytis cinerea*, est très sensible aux carvacrol et thymol, avec une IC50 de 18.6 ppm et 18.9 ppm respectivement.

Conclusion et perspectives :

Les plantes médicinales sont considérées depuis des siècles comme une source majeure des produits utilisés en thérapeutique. Parmi ces produits, on trouve les polyphénols qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêts en raison du bénéfice qu'ils pourraient apporter en termes de prévention des maladies.

L'apparition des souches fongiques résistantes aux traitements chimiques à base de fongicides synthétiques pousse à la recherche d'alternatives plus efficaces et plus sûres. Dans ce cadre, notre travail a été consacré à l'étude de l'activité antifongique de 3 extraits provenant de 3 PAM sur différentes espèces fongiques du genre *Aspergillus*, *Mucor* et *Botrytis* les plus incriminées en pathologie humaine.

L'activité antifongique *in vitro* des composés phénolique a fait l'objet de nombreuses études utilisant différentes CP et différentes familles de champignons. Les quelques travaux cités dans la littérature se sont consacrés à la mise en évidence *in vivo* de l'activité des CP entières.

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antifongique de plusieurs associations de composés naturels et synthétiques.

Les composées phénoliques des trois plantes étudiées : à savoir (*Mentha aquatica*, *Origanum vulgare* et *Hyoscyamus albus*) ont montré des résultats surtout pour l'activité fongistatiques sur les souches testés, avec des CMFs très basses. *A-flavus* et *M-rammanianus* ont été les plus sensibles à l'égard des CPs de l'origan. Le mécanisme d'action des CPs sur les souches fongiques est considéré un critère de cette étude (à cause de la complexité de leur composition et les effets simultanés sur plusieurs cibles dans la cellule fongiques).

La plupart des associations étudiées ont donné des effets synergiques sur les souches testées mais aussi des effets antagonistes, indifférents et un seul effet d'addition été observé avec l'association : *Mentha aquatica* avec le phénol testé sur *Aspergillus flavus*.

En général l'effet recherché au cours d'une association est la synergie, Dans notre cas des effets synergiques ont été obtenu soit dans l'association des extraits phénoliques seuls soit en association avec les composées majoritaires. Ce qui confirme la richesse de nos extraits en composées phénoliques et l'effet actif des composées majoritaires sur les souches testés.

Conclusion et perspectives

Ces résultats sont très encourageants et indiquent que ces plantes devraient être étudiées plus largement afin d'explorer leur potentiel dans le traitement des maladies infectieuses ainsi que dans la conservation des aliments.

Pour une meilleure utilisation de ces composés phénoliques, il serait intéressant de :

- déterminer les fractions les plus actives et éventuellement de caractériser les molécules responsables de ces activités
- rechercher les mécanismes d'action de ces composés phénoliques sur les microorganismes.
- Déterminer les molécules responsables des activités biologiques, et d'approfondir l'étude phytochimique en utilisant des techniques plus performantes pour la détermination de la structure chimique de ces composés après leur purification
- Pour une étude beaucoup plus approfondie, on pourra envisager d'autres investigations telles que l'application de ces CP comme agents de phytomédecation et de conservation des aliments.
- Etude de faisabilité de la commercialisation des produits antifongiques à base des Composés phénoliques, Cette étude nécessite un suivi *in vivo* de l'effet antifongique à grand échelle
- Elargir l'étude du spectre de l'activité biologique des deux plantes (contre d'autres champignons, contre les insectes, contre les bactéries ...)

Références bibliographiques

A

- ❖ Ammana, E.K., (2007). Thèse de doctorat « les anacardiaceae du Togo : étude botanique, écologique et propriété antifongique ». Université de Lomé.

B

- ❖ Baba aïssa, F., (1991). Origan. In « Les plantes médicinales en Algérie ». *Ed Bouchène et Diwan, Alger*: 121
- ❖ Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food Chemical Toxicol.* 46:446–475.
- ❖ Bruneton, J., (1987). *Éléments de phytochimie et de pharmacognosie*, Ed. Tec&Doc Lavoisier.
- ❖ Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales*, 4e éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc – Éditions médicales internationales. 1288p.
- ❖ Bouchra, C., Achouri, M., Idrissi Hassani, L.M., et Hmamouchi, M., (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers : *Fr. journal of Ethnopharmacology*, 89, 165-169
- ❖ Boulila A, Bejaoui A, Messaoud C, Boussaid M (2008). Variation of volatiles in Tunisian populations of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Chem. Biodivers.* 5:1389-1400

C

- ❖ Chabot S., Bel-Rhlid R., Chênevert R., Piché Y., (1992). Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂-enriched conditions. *New Phytologist.* 122: 461-467.
- ❖ Chami, N., Chami, F., Bennis, S., Trouillas, J., Remmal, A., (2004). Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats *Brazilian Journal of Infectious Disease*, vol. 8 n° 3, Salvador June.
- ❖ Chatzopoulou P.S., (2005). Effect of dietary dried oregano leaves supplementation on performance and carcass characteristics of growing lambs. *Animal Feed Science and Technology.* 121: 285–295
- ❖ Cowan, M.M., (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), P564–582.
- ❖ Couplan F., (2000). *Dictionnaire étymologie de botanique*. Nestlé (Ed). Luisane. Paris,

Références bibliographiques

- ❖ Cronquist, A. (1988). *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. Second Edition. Bronx, NY: The New York Botanical Garden
- ❖ Croteau .R. Kutchan ;T .M and Norman .G. L., (2000).Natural products (seconderymetabolits).American society of plant physiologists 24 :1250 -1318.
- ❖ Chebli B., Achouri M., IdrissiHassani L.M., and Hmamouchim., (2003). Chemical composition and antifungalactivity of essential oils of sevenMoroccanLabiataeagainst Botrytis cinereaPers :Fr J. Ethnopharmacol: 89, 165-169.
- ❖ Chun S., Vatter D.A., Lin Y., Shetty K.,(2004). Phenolic antioxidants from clonal oreano (*Origanumvulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*. 40: 809–816
- ❖ Chi-Chun Wong, Hua-Bin Li, Ka-Wing Cheng, Feng Chen .,(2005). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay Department of Botany, The University of Hong Kong, Pokfulam Road, Hong Kong, China. P3.

D

- ❖ Debuigne, G.,(1974).Larousse des plantes qui guérissent, Ed. Larousse.
- ❖ Debuigne,G., (1972).*Dictionnaire des plantes qui guérissent*, Paris, Larousse. 256p.
- ❖ Derbel S et Ghedira K. (2005). Les phytonutriments et leurs impacts sur la santé .Journal de Phytothérapie, 1. P1-34.
- ❖ Djeugap J.F., Fontem D.A. &Taponjdjou A.L., (2011). Efficacité in vitro et in vivo des extraits de plantes contre le mildiou (*Phytophthora infestans*) de la morelle noire. *Int. J. Biol.Chem. Sci.* 5(6): 2205-2213.

E

- ❖ Eliopoulos G. M., Pillai S. K., & R. C. Moellering J. R., (2005).Antimicrobial combinations. *In*:V. Lorian V. (5th ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*. The Williams & Wilkins Co. Philadelphia, USA. pp.365-424.
- ❖ Erturk, O., Ozbucak, T.B., etBayrak, A., (2006). Antimicrobial activity of some medicinal essential oils. *Kervapolinica*, 52, 57-66.
- ❖ Etminan M, Forooghian F, Brophy JM et al.(2012) *Oral fluoroquinolones and the risk of retinaldetachment*. *JAMA*;307: 1414–9.

Références bibliographiques

F

- ❖ Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C., (2008). Phenolic composition of *Cynaracardunculus*L. organs and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 372-379.
- ❖ Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z., (1985). Medicinal plants in therapy. *Bull. World Health Organ.* 63(6): 965–981.

G

- ❖ Gilles, figuredo., (2007). Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne p 47-50
- ❖ Gregoire, (2009). Entre alimentation, hygiène et médecine : le vocabulaire de l'administration des simples dans le livre IX des *Recherches sur les plantes* de Théophraste .p.16-19
- ❖ Goullé J.P, Pépin G., Toulet V. D., Lacroix C. 2004. Botanique, chimie et toxicologie des solanacées hallucinogènes: belladone, datura, jusquiame, mandragore. *Annales de Toxicologie Analytique*, vol. 16, n° 1.

H

- ❖ Hajlaoui H., et al., (2009). Biological activities of the essential oils and méthanol extract of two cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 2227-2238.
- ❖ Hamza, O.J.M., Van den bout-van den Beukel, C.J.P., Matee, M.I.N., Moshi, M.J., Mikx, F.H.M., Selemani, HO, et al., (2006). Antifungal activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of infections, *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 124-132.
- ❖ Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, T. et al. (1980). Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxicogenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 818–822
- ❖ Hordé, P., (2014). *Plantes médicinales*. p1.

I

- ❖ Ietswaart, J.H.A., (1980). Taxonomic Revision of the genus *Origanum* (Labiatae), Leiden Botanical Series, Vol 4, Leiden University Press, The Hague, Netherlands.

Références bibliographiques

- ❖ Ipek, K., Zeynoğlu, H., Okay, S., Tuylu, B. A., Kurkeuoğlu, M., Husnu Can Baser, K. (2005). Genotoxicity and antigenotoxicity of organum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/ microsomal test. *Food chemistry*, 93, 547-550.

J

- ❖ Jouzier, E., (2005). Solanacées médicinales et philatélie *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2005, 144, 311-332.

K

- ❖ Kana J R., (2003). Effet des huiles essentielles des feuilles et des extrémités fleuries de *Cupressus lusitanica* sur la tique (*Rhipicephalus lunulatus*) à l'Ouest-Cameroun. *Revue de l'Académie des Sciences du Cameroun*, 3(3): 169-175.
- ❖ Khaled, el mansouri., (2013). Recherche et évaluation de l'activité antifongique des extraits de plantes médicinales thèse.
- ❖ Katalinic V., Milos M., Kulisic T. et Jukic M. (2004). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94, P550-557.
- ❖ Kaurt, C., Kapoor, H. C. (2002). Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 37:153-161.
- ❖ Kone D. (2009). Enquête Ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes- extraction, identification d'alcaloïdes-caractérisation quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydant. Thèse de docteur en chimie organique, Université Paul Verlaine de Metz. 178p
- ❖ Kovacevic NN, Lakusic BS, Ristic MS., (2001). Composition of the essential oils of seven *Teucrium* species from Serbia and Montenegro. *J. Essent. Oil Res.* 13:163–165.

L

- ❖ Lapornik, B., prosek, M., et Wondra A.G., (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering*. 71: 214-222.

Références bibliographiques

- ❖ Levizou E., Petroupoulou Y. et Manetas Y., (2004). Total carotenoid amount in crude twig extracts may be overestimated due to interference by high contents of coextracted phenolics. *Photosynthetica*, 42 (2), P295 - 297.
- ❖ Lhoste P, Dolle V, Rousseau J et Soltner D., (1993). Manuel de Zootechnie des régions chaudes. Les systèmes d'élevage. Collection précis d'élevage. Ministère de la Coopération, Paris. 288p
- ❖ Ling B, Zhang M, Kong C, Pang X and Liang G., (2003). Chemical composition of volatile oil from *Chromolaena odorata* and its effect on plant, fungi and insect growth. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, 14(5): 744-6.

M

- ❖ Marchoux, G., Gognalons, P. & Sélassié, K. G., (2008). Virus solanacées. De génome viral à la protection des cultures. Paris, France: Quae.
- ❖ Mahmoud M., Salam A.H., Al-Ameri, Abbas S., (2011). Extraction, Identification and Anticicrobial Activity of Some Phenolic Acids as Antioxidants in *Teucrium polium* Plant. *Journal of Pharmaceutical Science*, 2, 197-188.
- ❖ Meyer S., Reeb C., Bosdeveix R. (2004). Botanique Biologie et Physiologie Végétales. Editions Maloine, Paris
- ❖ Mohammadi, Z., (2006). Etude du pouvoir antibactérien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen, thèse de magister.
- ❖ Moriera, M.R., Ponce, A.G., Valle, C.E., et Roura, L., (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT*, 38, 565-570

N

- ❖ Naczek M. et Shahidi F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* .1054, P 95-111.
- ❖ Naghibi F., Mosaddegh M., Mohammadi Motamed S & Ghorbani A. (2005). Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology, Iran, *J. Pharm. Res.* 2, 63-79.
- ❖ Newmann DJ, Cragg GM, Hyde KD. (2003) Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66(7): 1022-1037

O

- ❖ Owen, P.L., Johns T., (1999). Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern north American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology* . 64: 149-160

Références bibliographiques

P

- ❖ Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Bapaji, M., Kole, C.R., 1997. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios* 89, 39–46.
- ❖ Pamo, T.E., Tapondjou, L., Tendonkeng, F., Nzogang, J. F., Djoukeng, J., Ngandeu, F and Pistrick, K., (2002). Notes on neglected and underutilized crops Current taxonomical overview of cultivated plants in the family's Umbelliferae and Labiatae, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49: 211-225.
- ❖ Paris M., Hurabielle M. 1981. Abrégé de matière médicale (pharmacognosie). Tome 1. *Masson*, Paris, pp256-284.

Q

- ❖ Quezel P. et Santa S., (1962-1963). Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, vol. 1-2. C.N.R.S., Paris, 1170 p.

R

- ❖ Raduoiene, J., Judpintiene, A., Peeiulyte, D., Janulis, V., (2005). Chemical composition of assentiel oil and antimicrobial activity of *origanumvulgarebiologi* JA. 4: 53-58.
- ❖ Remmal A., Bouchikhi T., Rhayour K., & Ettayebi M., 1993b. Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *Journal of Essential Oil Research*. 5: 179-184.
- ❖ RawalSumit., jieunKim., RogerCoulombe JR.(2010). Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Research in Veterinary Science*. Article in press.
- ❖ Reddy, k.R.N., Reddy.C.S.,Muralidharan. K. (2009). Efficacy of certain agrochemicals on *Aspergillus* spp. and subsequent aflatoxin production in rice. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93, 53–57.
- ❖ Ribereau-Gayon. (1968). Notions générales sur les composés phénoliques. In « Les composés phénoliques des végétaux ». *Ed Dunod*: 1-27.
- ❖ Ribereau-Gayon J., Peynaud E., Sudraud P., Ribereau–Gayon P. 1982. Composés phénoliques «Traité d'œnologie, sciences et techniques du vin». *Ed Dunod*: 477-499.
- ❖ Richard. John L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses. An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 3-10.

Références bibliographiques

- ❖ Romani, A., Pineli, C., Cantini, A., Cimato, and D., Heimler., (2006). Characterization of violetto di Toscana, typical Italian variety of artichoke (*Cynarascolymus L.*). *J.FoodChem.* Vol. 95.pp: 221_225.

S

- ❖ Sabat G. (1957). Contribution à l'étude des l'intoxication criminelles par les jusquiames. Thèse de Doctorat en Médecine. Université d'Alger. 120p
- ❖ Sahin F., Güllüce M., Daferera D., Sökmen A., Sökmen M., Polissiou M., Agar G., Özer H., (2003). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare ssp. vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control.* 15: 549–557
- ❖ Seidel, V., (2005). Initial and Bulk Extraction. Natural products isolation. Humana Press (Totowa). pp: 27-37.
- ❖ Sahin F., Güllüce M., Daferera D., Sökmen A., Sökmen M., Polissiou M., Agar G., Özer H., (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare ssp. vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control.* 15: 549–557
- ❖ Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolydic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–153.
- ❖ Silva E.M., Rogez H. et Larondelle Y. (2007). Optimization of extraction of phenolics-From *mingaedulis* leaves using response surface methodology. *Séparation and purification Technology*, 55, P381-387.
- ❖ Smallfield, B. (2001). Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research* (45): 1-4.
- ❖ Svoboda, K.P. & Hampson J.B., (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK.

T

- ❖ Tallarida, R.J., (2001). Durgsynergis : Its detectin and application. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 298: 865-872.
- ❖ Teucher, E., Anton, R., Lobstein A., (2005). Origan. In « Plantes aromatiques : Epices, aromates, condiments et huiles essentielles ». *Ed Tec & Doc, Lavoisier, Paris:* 361-364

Références bibliographiques

- ❖ Tucker, Naczi. (2007). *Mentha*: Un Aperçu De La Classification Et Les Relations. En 16-17: Laurent, BM, Ed, Monnaie. Du Genre *Mentha*. 16-17.

V

- ❖ Valne, T. J., (1980). Aromathérapie : Traitement des Maladies par les Essences des Plantes. 9e Ed. Maloine. 510 p.
- ❖ Vaubourdolle, M., (2007). Infectiologie. 3^e édition. Wolters Kluwer SA. France. 1037 pages
- ❖ Venturini. N.; ChrKF .; Desjobert; J.M.; Karp; D.; Paolini, J.; (2010). Chemotaxonomic investigations of peel and petit grain essential oils from 17 citronncultivrs; chemistry and biodiversity: 736-751.
- ❖ Viuda-Martos, M., Ruiz- Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., Pérez-Alvarez., J.A., (2007). chemical composition of the essential iols obtained from some spices wildely used in méditerranean region. Actachim. Slov. 71: 79-83.

W

- ❖ Wu, S. J. & Ng, L. T., (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordicacharantalinn*. Var. abbreviate Ser) in Taiwan. *Swiss society of food science and Technology*. 41: 323-330.

Z

- ❖ Zongo, C., Savadogo, A., Somda, K.M., Koudou J., Traore A.S., (2011). In vitro evaluation of the antimicrobial and antioxidant properties of extracts from whole plant of *Alternantherapungens* H.B. & K. and leaves of *Combretumsericeum* G. Don. *International Journal of Phytomedecine*, 3, 182-191.

Annexes

Annexe I : la composition des milieux de culture utilisés

| | |
|---|--|
| <p>Gélose nutritive</p> <p>La gélose nutritive (GN) utilisée (Institut Pasteur d'Algérie) est constituée de :</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Extrait de viande :3 g/l ➤ Tryptone de viande :5 g/l ➤ Chlorure de sodium :5 g/l ➤ Agar :20 g/l | <p>Bouillon nutritif</p> <p>LeBN utilisé (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Espagne) est constitué de :</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Peptone :.....15 g/l ➤ Extrait de levure :3 g/l ➤ Chlorure de sodium :6 g/l <p>D (+)-Glucose : 1 g/l</p> |
| <p>Mueller-Hinton (g/litre d'eau distillée)</p> <p>Le BMH utilisé (<i>Scharlab SL</i>, Barcelone, Espagne) est constitué de :</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Peptone :...17,5 g/l ➤ Amidon :...1,5 g/l ➤ Matière solide de l'infusion de viande :...2,0 g/l | <p>Eau physiologique</p> <p>Eau distillée..... .1L</p> <p>Chlorure de sodium..... 9g</p> |

Annexe II : Rendement d'extraction pour les partie aerienne des trois espèces *Hyoscyamus albus*, *Mentha aquatica* et *Origanum vulgare*.

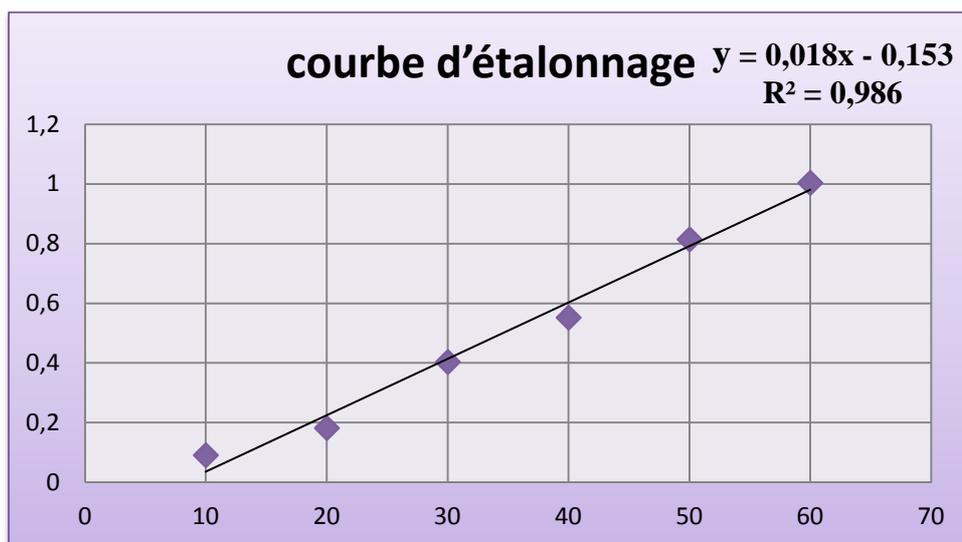
| | Taux d'extraction (%) |
|-------------------------|-----------------------|
| | Ethanol 96% |
| <i>Hyoscyamus albus</i> | 8.56% |
| <i>Mentha aquatica</i> | 8.43% |
| <i>Origanum vulgare</i> | 6.67% |

Annexes

Annexe II: Matériels et réactifs utilisés

| 1- Appareils utilisés | 2-Réactifs utilisés |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Balance analytique (Ohaus).• Broyeur mécanique (moulin à café)• Erlen meyer en verre 100,250, 500, 1000mL.• Etuve (BINDER).• Micropipettes de 100, 200, 500, 1000 μL.• Pipettes en verre de 1, 2, 5,10mL.• Réfrigérateur (Condor).• Spectrophotomètre UV– Visible en utilisant une cuve en verre de 1cm d'épaisseur• Tamiseur (RETCS AS 2000).• Tubes à essai en verre de 25mL.• Vortex Genie 2. | <ul style="list-style-type: none">• Méthanol (PROLABO).• Monocarbonate de sodium(NaCO_3)• Réactif du Folin- Ciocalteu 1N.• Standards polyphénols (Sigma) : acide gallique.• Ethanol 96% |

Annexe III: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.



Annexes

Annexe IV : Résultats du dosage des polyphénols totaux des extraits de *Mentha aquatica*, *Origanum vulgare* et *Hyoscyamus albus*.

| | Absorbance a 756nm | | Poids de chaque extrait | Quantité en polyphénols dans chaque extraits mg EAG/ g d'extraits | Moyenne ± l'ecart type |
|-------------------------|--------------------|-----------|-------------------------|---|------------------------|
| | abs | Abs-blanc | | | |
| <i>Hyoscyamus albus</i> | 0.300 | 0.224 | 2.57 g | 1.995 | 2.0370 ± 0.073 |
| | 0.324 | 0.248 | | 2.121 | |
| | 0.300 | 0.224 | | 1.995 | |
| <i>Mentha aquatica</i> | 0.811 | 0.735 | 2.53 g | 9.396 | 9.128 ± 0.636 |
| | 0.829 | 0.753 | | 9.586 | |
| | 0.717 | 0.641 | | 8.402 | |
| <i>Origanum vulgare</i> | 0.626 | 0.550 | 2 g | 14.876 | 14.989 ± 2.332 |
| | 0.524 | 0.448 | | 12.716 | |
| | 0.744 | 0.668 | | 17.375 | |
| Blanc | 0.084 0.068 | ∑ = 0.076 | | | |

NB : Absorbance de l'acide Gallique est de : 0.250

Annexe V : les isobogrammes des différentes associations

➤ **Composés phénoliques de *Mentha* / composés phénolique d'*Origanum***

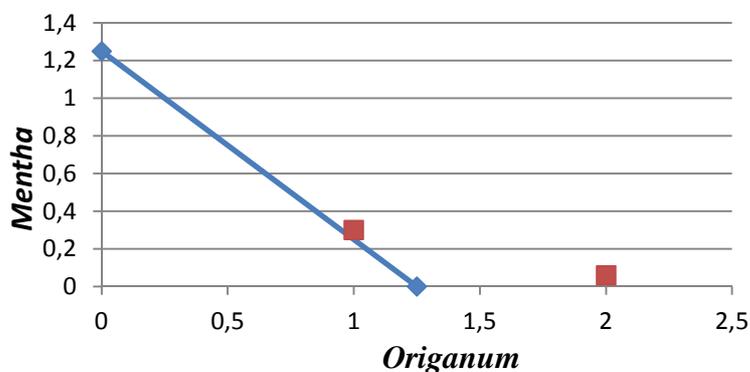


Figure N°23 : Isobogramme des extraits de *Mentha* combiné avec l'origan testé avec (effet fongistatique) sur : *Aspergillus ochraceus*

Annexes

L'un des deux points touche la droite d'où la nécessité des résultats de l'étude statistique pour trancher entre une indifférence et un antagonisme, selon le test de conformité il s'agit d'un effet antagoniste.

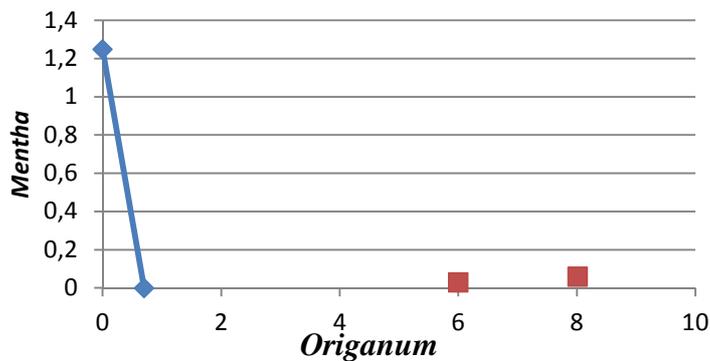


Figure N°24 : Isobologramme des extraits de *Mentha* combiné avec les extraits d'*Origanum* testé avec (effet fongistatique) sur : *Mucor rammanianus*

Les deux points sont loin et au-dessus de la droite il s'agit d'un effet antagoniste

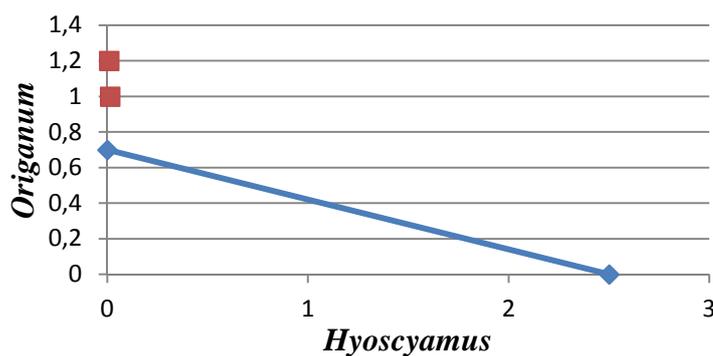


Figure N°25: Isobologramme des extraits d'*Origanum* combiné avec les extraits d'*Hyoscyamus* testé avec (effet fongistatique) sur : *Aspergillus flavus*

Les deux points sont en haut de la droite, mais ils sont proches, c'est effet antagoniste.

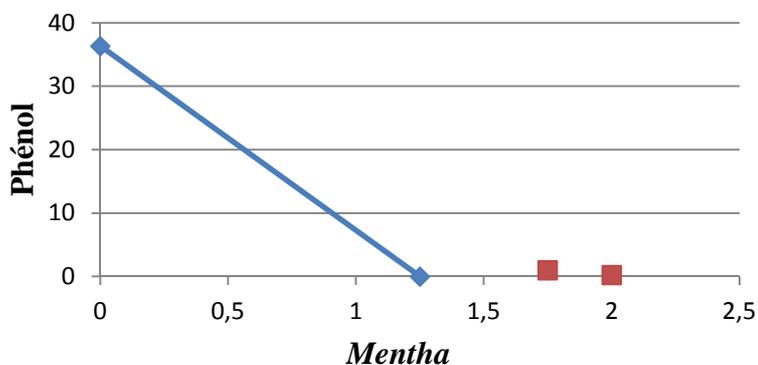


Figure N°26 : Isobologramme des extraits de *Mentha* combiné avec le phénol testé avec (effet fongistatique) sur : *Botrytis cinerea*

Annexes

Les deux points sont au-dessus de la droite, donc il s'agit d'un effet antagoniste.

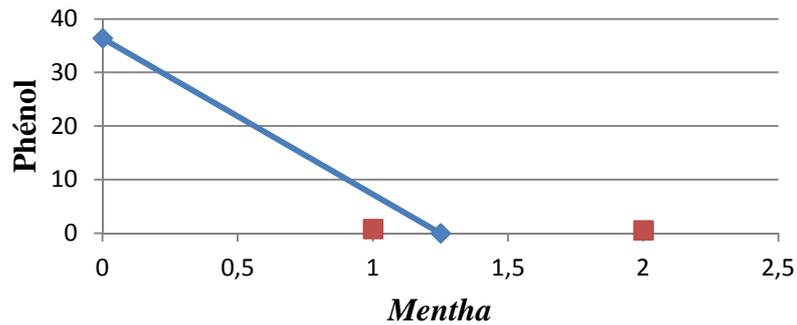


Figure N°27 : Isobologramme des extraits de *Mentha* combiné avec le phénol testé avec (effet fongistatique) sur : *Mucor rammanianus*

Pour cette figure ; un point sur la droite et l'autre sur la gauche dont ils sont proche, il s'agit d'un effet antagoniste.

➤ Composés phénolique de *Mentha* / thymol

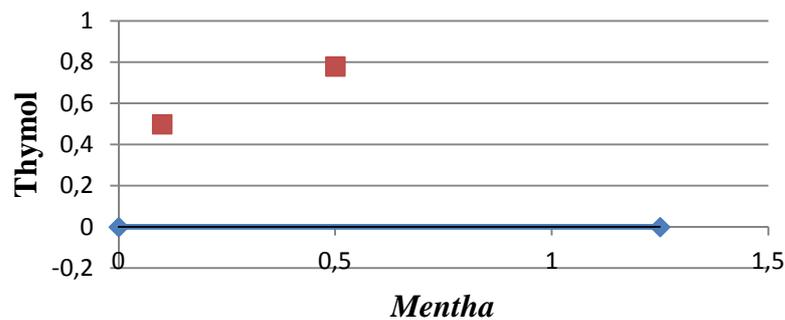


Figure N°28 : Isobologramme des extraits de *Mentha* combiné avec le thymol testé avec (effet fongistatique) sur : *Aspergillus ochraceus*

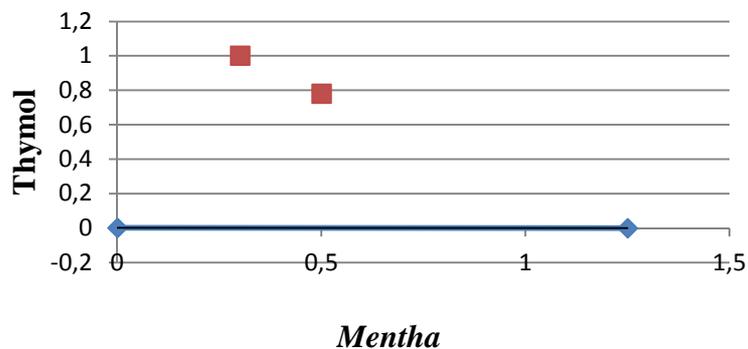


Figure N°29 : Isobologramme des extraits de *Mentha* combiné avec le thymol testé avec (effet fongistatique) sur : *Botrytis cinerea*

Annexes

Pour les figures les deux points sont au haut de la droite, mais ils sont loin, c'est effet indifférent

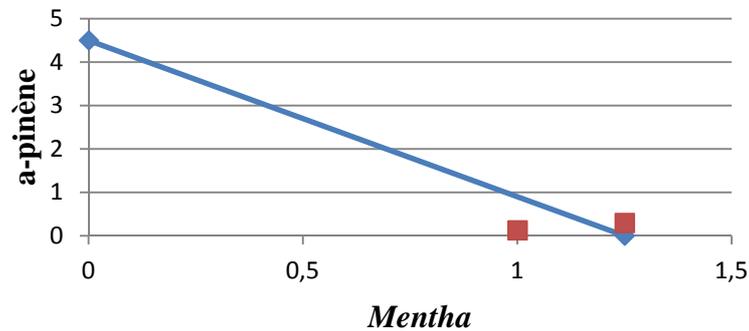


Figure N°30 : Isobogramme des extraits de *Mentha* combiné avec l'α-pinène testé avec (effet fongistatique) sur : *Mucor rammanianus*

Pour cette figure un point sur la droite et l'autre sur la gauche dont ils sont loin, c'est effet indifférent.

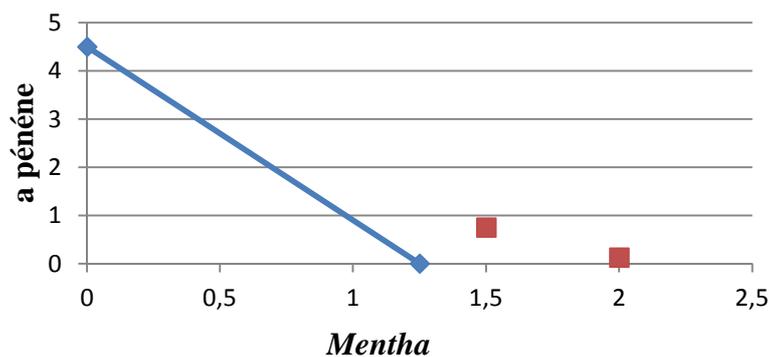


Figure N°31 : Isobogramme des extraits de *mentha* combiné avec l'α-pinène testé avec (effet fongistatique) sur : *Aspergillus flavus*

Les deux points sont au-dessus de la droite, c'est effet indifférent.

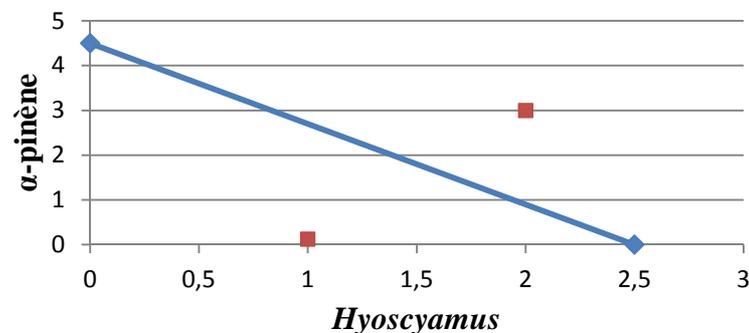


Figure N°32 : Isobogramme des extraits d' hyoscyamus combiné avec l'α-pinène testé avec (effet fongistatique) sur : *Mucor rammanianus*

Annexes

Un point est sur la gauche et l'autre est sur la droite, dont ils sont très loin, c'est effet indifférent.

➤ Composés phénoliques d'*Hyoscyamus* /thymol

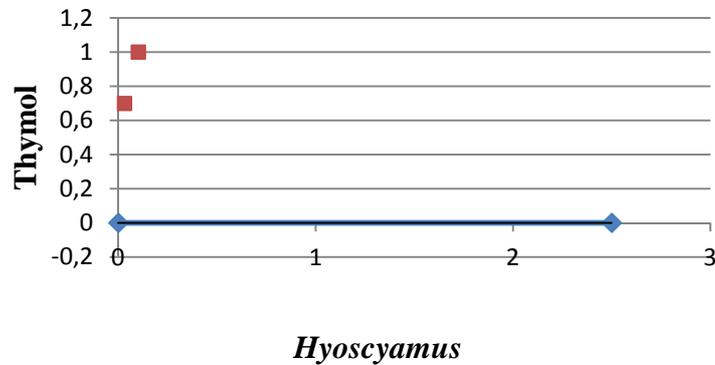


Figure N°33: Isobologramme des extraits d' hyoscyamus combiné avec le thymol testé sur : avec (effet fongistatique) *Aspergillus ochraceus*

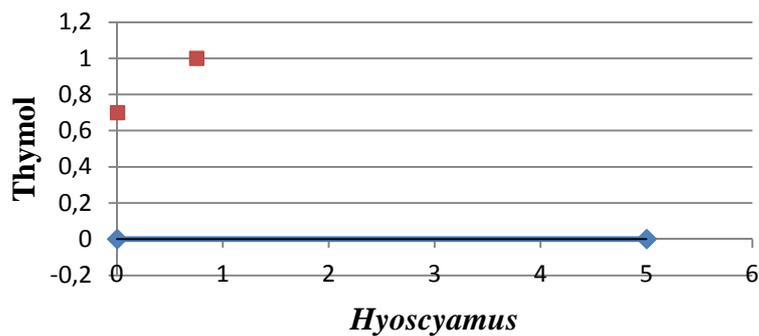


Figure N°34: Isobologramme des extraits d'*Hyoscyamus* combiné avec le thymol testé avec (effet fongistatique) sur : *Botrytis cinerea*

Pour les figures les deux points sont au-dessus de la droite, c'est un effet indifférent.

Annexes

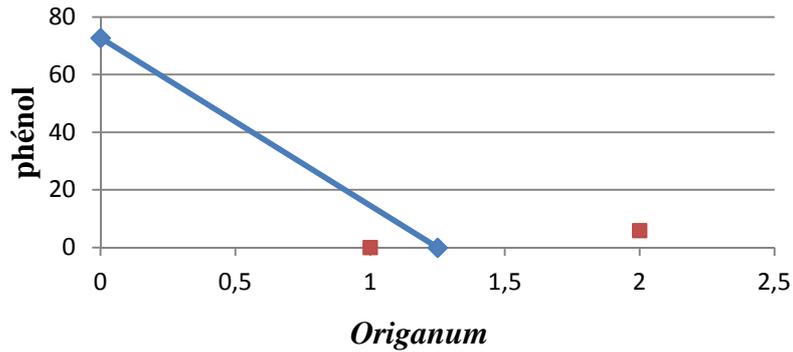


Figure N°35 : Isobologramme des extraits de l'*Origanum* combiné avec le phénol testé (effet fongistatique) sur : avec *Aspergillus ochraceus*

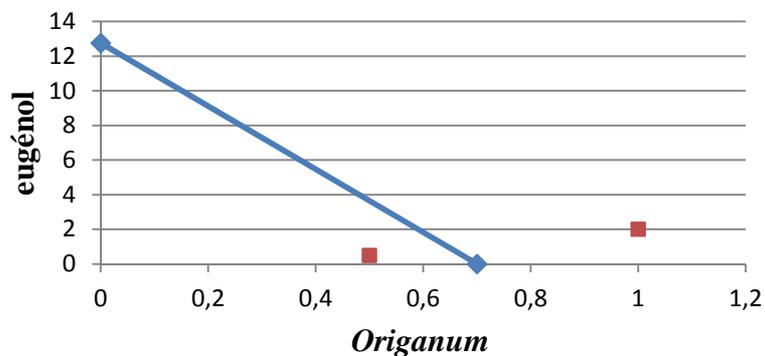


Figure N°36 : Isobologramme des extraits de l'*Origanum* combiné avec l'eugénol testé avec (effet fongistatique) sur : *Aspergillus flavus*

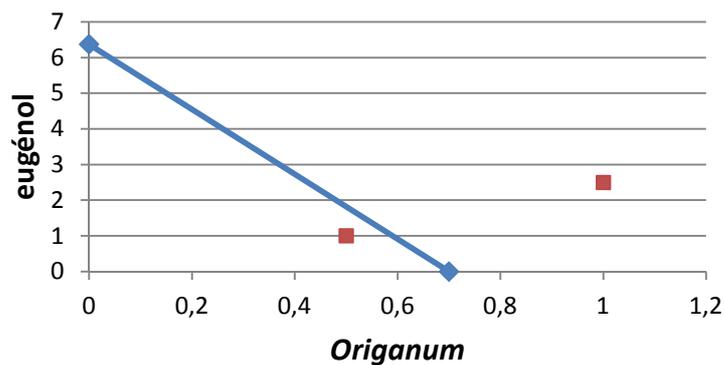


Figure N°37: Isobologramme des extraits de l'*Origanum* combiné avec l'eugénol testé avec (effet fongistatique) sur : *Mucor rammanianus*

Pour les trois figures, l'une des points est à gauche et l'autre à droite, mais très loin, c'est un effet indifférent.

Annexes

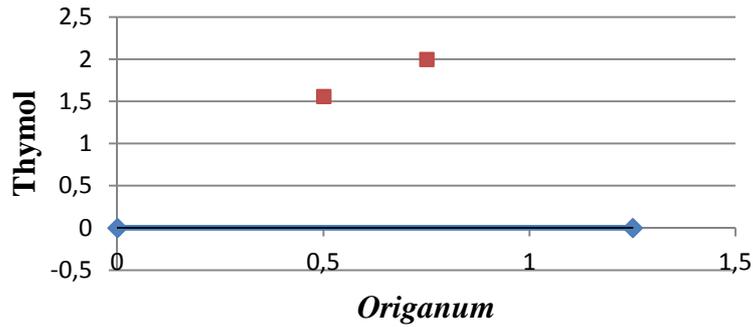


Figure N°38 : Isobologramme des extraits de l'*Origanum* combiné avec thymol testé avec (effet fongistatique) sur : *Botrytis cinerea*

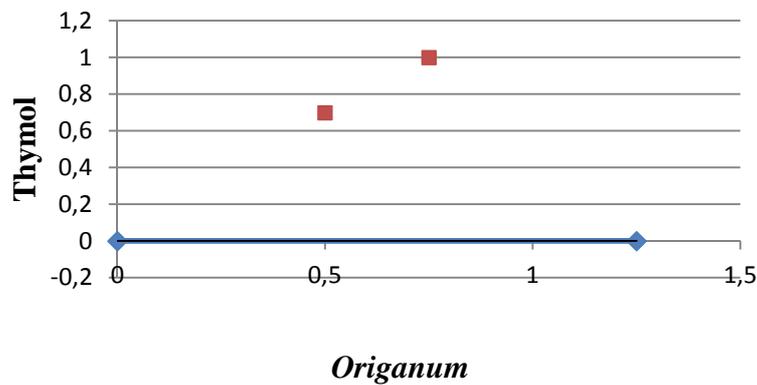


Figure N°39 : Isobologramme des extraits de l'*Origanum* combiné avec thymol testé avec (effet fongistatique) sur : *Aspergillus ochraceus*

Pour les deux figures les deux points sont au-dessus de la droite, c'est effet indifférent.

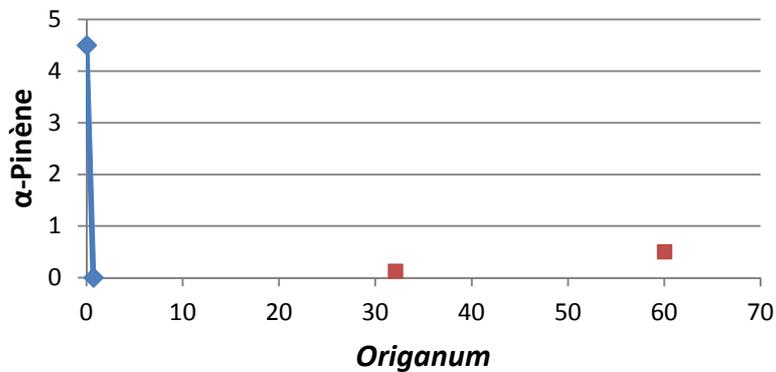


Figure N°40 : Isobologramme des extraits de l'*Origanum* combiné avec α -pinène testé avec (effet fongistatique) sur : *Aspergillus flavus*

Annexes

Pour cette figure les deux points sont au-dessus de la droite dont ils sont très loin, il s'agit d'une indifférence.

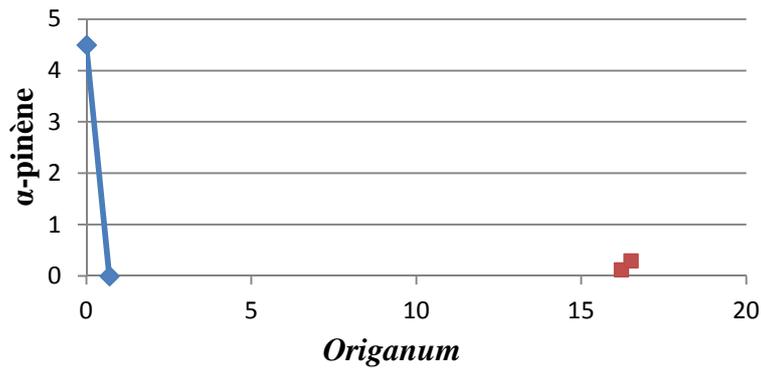


Figure N°41 : Isobologramme des extraits de l'*Origanum* combiné avec α -pinène testé avec (effet fongistatique) sur : *Mucor rammanianus*

Pour cette figure les deux points sont au-dessus de la droite, dont ils sont très proche il s'agit d'un effet antagoniste.

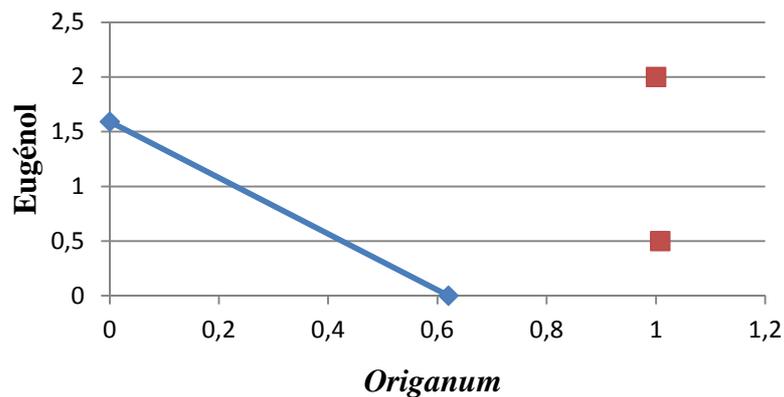


Figure N°42: Isobologramme des extraits de l'*Origanum* combiné avec l'eugénol testé avec (effet fongicide) sur : *Aspegillus flavus*

Les deux points sont au-dessus de la droite dont elles sont très loin, il s'agit d'un effet indifférent

Annexes

➤ Composés phénoliques d'*Origanum* / phénol

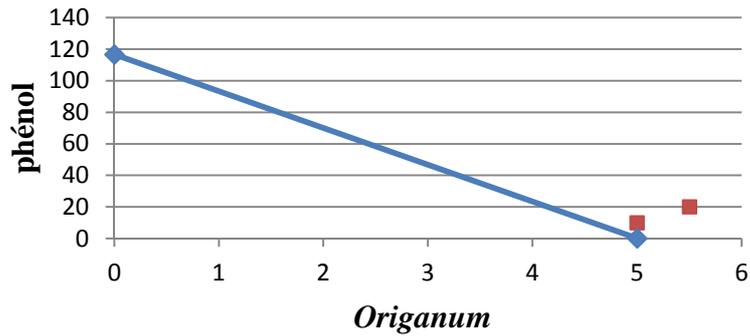


Figure N°43 : Isobologramme des extraits de l'*Origanum* combiné avec le phénol testé avec (effet fongistatique) sur : *Mucor rammanianus*

Les deux points sont au-dessus de la droite mais elles sont très proches il s'agit d'un effet antagoniste.

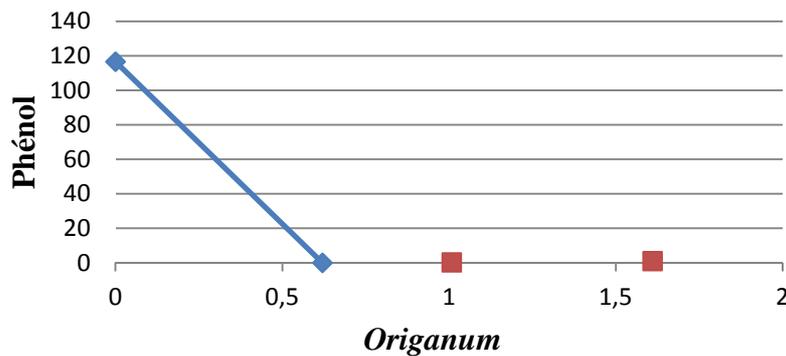


Figure N°44 : Isobologramme des extraits d'*Origanum* combiné avec le phénol testé avec (effet fongicide) sur : *Aspergillus flavus*

Les deux points sont au-dessus de la droite dont elles sont très loin il s'agit d'une indifférence.

Annexes

➤ Composés phénoliques d'*Hyoscyamus* / thymol

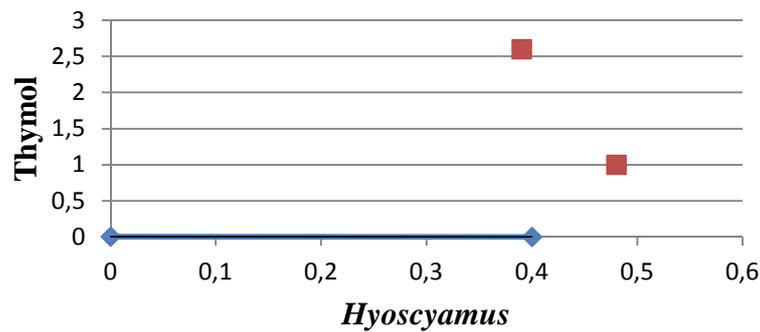


Figure N°45 : Isobologramme des extraits d'*Hyoscyamus* combiné avec le thymol testé avec (effet fongicide) sur : *Botrytis cinerea*

Les deux points sont au-dessus de la droite, dont elles sont très loin il s'agit d'un effet indifférent.

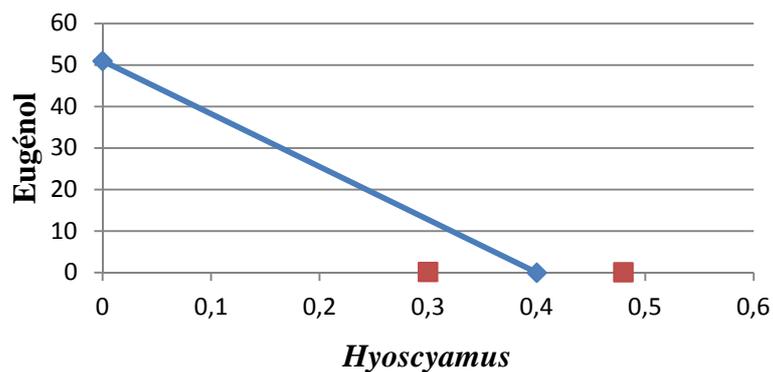


Figure N°46 : Isobologramme des extraits d'*Hyoscyamus* combiné avec l'eugénol testé avec (effet fongicide) sur : *Botrytis cinerea*

Un point sur la droite et un autre sur la gauche dont elles sont très loin, c'est un effet indifférent.

Annexes

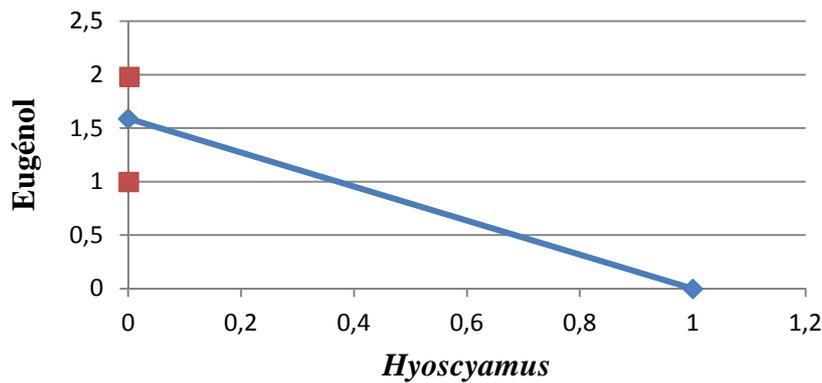


Figure N°47 : Isobologramme des extraits d'*Hyoscyamus* combiné avec l'eugénol testé avec (effet fongicide) sur : *Aspergillus flavus*

Pour cette figure un point sur la droite et un autre sur la gauche dont ils sont loin il s'agit d'une indifférence.

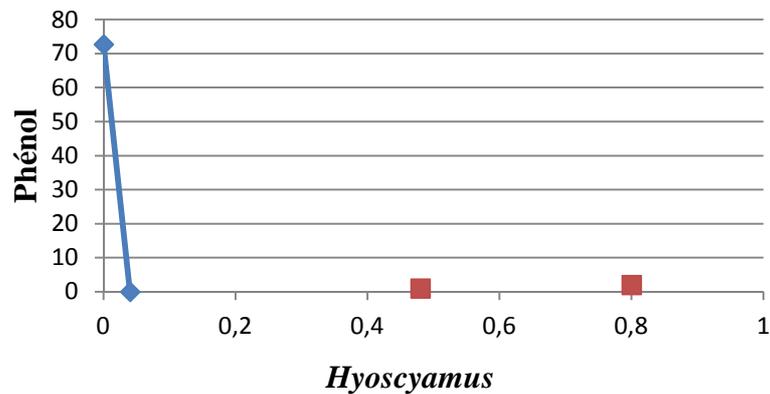


Figure N°48 : Isobologramme des extraits d'*Hyoscyamus* combiné avec le phénol testé avec (effet fongicide) sur : *Botrytis cinerea*

Les deux points sont au-dessus de la droite dont ils sont très loin, il s'agit d'un effet indifférent.

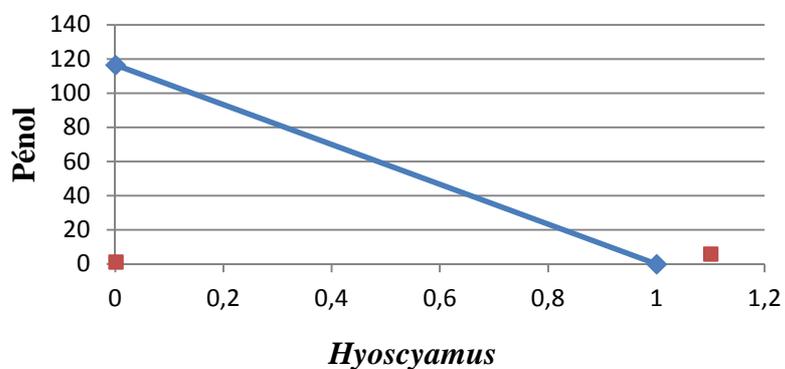


Figure N°49 : Isobologramme des extraits d'*Hyoscyamus* combiné avec le phénol testé avec (effet fongistatique) sur : *Aspergillus flavus*

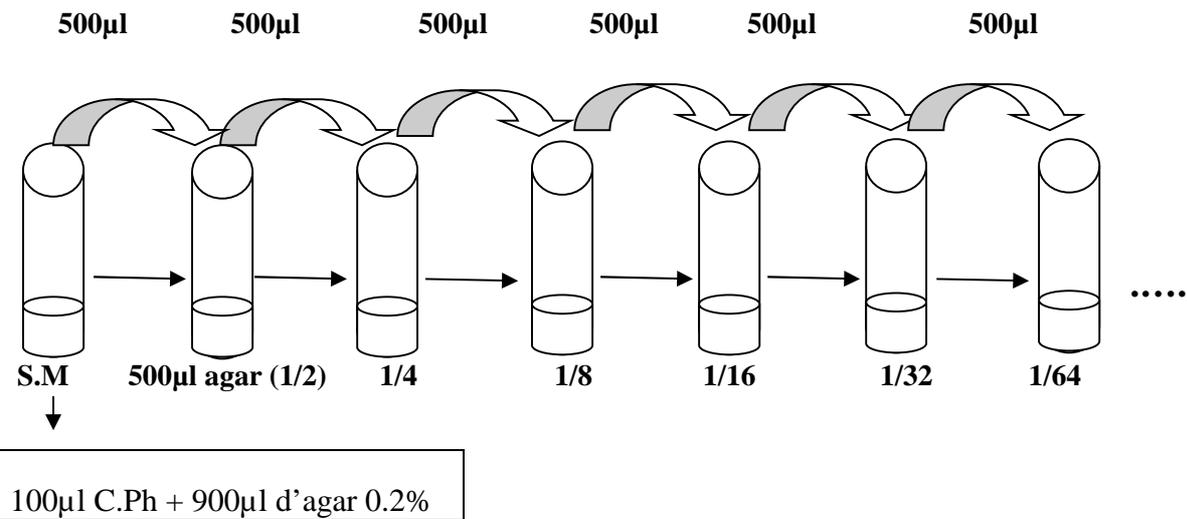
Annexes

Pour cette figure un point sur la droite et un point sur la gauche dont ils sont très loin, c'est un effet indifférent.

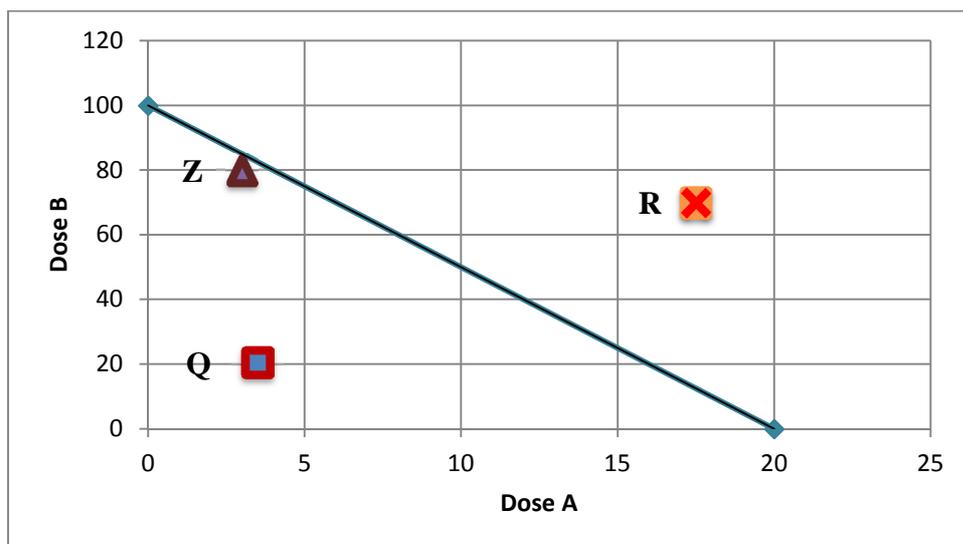
Annexe VI : préparation des dilutions

Solution mère \implies 100 μ l de la substance antifongique (CP) + 900 μ l d'agar a 0.2%

Les dilutions



Annexe VII : illustration d'un isobologramme typique (Tallarida, 2001)



Evaluation in vitro de l'activité antifongique des composés phénoliques de quelque plante en association.

Résumé

Notre travail porte sur l'étude de l'activité antifongique des composés phénoliques des plantes *Mentha aquatica*, *Origanum vulgare* et *Hyoscyamus albus* L. en association avec les composés majoritaires (thymol, phénol, eugénol, α -pinène) sur les souches de *Mucor rammanianus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* et *Botrytis cinerea*. L'extraction des polyphénols (PP) de la partie aérienne des plantes étudiées a été réalisée par l'extraction solide/liquide en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction. Le test est réalisé par la méthode de contact direct sur les souches fongiques étudiées appelée la technique de l'échiquier (méthode de microdilution en milieu BMH), suivie par des repiquages sur gélose nutritive pour déterminer les CMFs et CMFc. Les résultats montrent que les composés phénoliques des trois plantes associées avec les composés majoritaires possèdent une importante activité antifongique sur ces souches étudiées, des effets synergiques ont été obtenus pour la majorité des associations effectuées. Avec un seul effet d'addition pour l'association *Mentha* / phénol testé sur *Aspergillus flavus*'

Mots clés: *Mentha aquatica*, *Origanum vulgare* et *Hyoscyamus albus* L., composés phénoliques, phénol, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Mucor rammanianus* et *Botrytis cinerea*, activité antifongique et la méthode de l'échiquier.

In vitro evaluation of the antifungal activity of the phenolic compounds of some plant in association

Abstract

Our work focuses on the study of the antifungal activity of the phenolic compounds of the plants *Mentha aquatica*, *Origanum vulgare* and *Hyoscyamus albus* L. in association with the compounds majority (thymol, phenol, eugenol - pinène) on the stumps of *Mucor rammanianus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* and *Botrytis cinerea*. The extraction polyphenols (PP) of the part aérienne of the plants studied, has been obtained by the extraction solide/liquide while using the ethanol like solvent of extraction. The test was realized with direct contact methods on the fungal stumps studies named the technique of the checkerboard (method of microdilution in BMH middle), consistent by recordings on nutrient agar to determine the CMFs and CMFc. The results show that the phenolic compounds of the three plant partner to the majority compounds possess an important antifungal activity on these stumps studied, some effects synergiques has been gotten for the majority of the associations does. With only one effect of addition for the *Mentha* association / phenol tested on *Aspergillus flavus*.

Key words: *Mentha aquatica*, *Origanum vulgare* and *Hyoscyamus L albus*, phenolic compounds, phenol, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Mucor rammanianus* and *Botrytis cinerea*, antifungal activity and the method of the checkerboard.