



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS DE MOSTAGANEM
FACULTE DES SCIENCES EXACTE ET DE L'INFORMATIQUE
Département de Chimie

N° D'ORDRE : D...../2018

Thèse pour l'obtention du
DIPLÔME DE DOCTORAT EN SCIENCES
SPECIALITE : CHIMIE

Présentée par

M^{me}. DERAMCHIA Nawel

**ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DE L'HUILE
ESSENTIELLE ET EXTRAITS BRUTES DE
*THYMELAEA HIRSUTA***

Date de soutenance :/...../2018

Devant le Jury :

Président	Mr. BENDERDOUCHE Nouredine	Pr.	Université de Mostaganem
Examineur	Mr. ABOUNI Bouziane	Pr.	Université de sidi bel abbés
Examineur	Mr. BEKADA Ahmed Mohammed Ali	Pr.	CU de Tissemsilet
Examinatrice	M ^{elle} BOUFADI Mokhtaria Yasmina	M.C.A	Université de Mostaganem
Encadreur	Mr. BELHAKEM Mustapha	Pr.	Université de Mostaganem

ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2017 /2018

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Glossaire	
Résumé	
Introduction.....	1
Synthèse bibliographique	
Chapitre I : Thymelaea Hirsuta	3
I-1- Généralité.....	3
I-2- Description botanique.....	4
I-3- Biologie et Ecologie.....	6
I-4- Classification.....	6
I-4-1- Classification botanique.....	7
I-4-2- Classification phylogénétique.....	7
I-5- Composition chimique et utilisation.....	7
Chapitre II : plantes en Médecine	
II- Les plantes en Médecine	
II-1- Définition d'une plante médicinale	10
II-2- Intérêt de l'étude des plantes médicinales	10
II-3- La phytothérapie	10
II-4- Métabolites des plantes	11
II-4-1- Les métabolites primaires	12
II-4-2- Les métabolites secondaires.....	12
II-4-2-1- Les alcaloïdes	14
II-4-2-2- Composés phénoliques.....	15
II-4-2-3- Flavonoïdes.....	15
II-4-2-4- Tanins.....	16
II-4-2-5- Acides phénoliques.....	16
II-4-2-6- Coumarines.....	16
II-4-2-7- Quinones.....	16
II-4-2-8- Composés terpéniques.....	17
II-4-2-8-1- Stéroïdes, Stérols et Terpénoides.....	17
II-4-2-8-2- Saponosides.....	17
II-4-2-8-3- Huiles essentielles.....	17
Chapitre III : Microorganismes Pathogènes	
III-1 Les bactéries.....	19
III-1-1- La classification des bactéries.....	19
III-1-2- Staphylococcus aureus.....	20
III-1-2-1- Caractères généraux des staphylocoques.....	20
III-1-2-2- Caractères bactériologiques.....	20
III-1-2-3- Caractères biochimiques.....	21
III-1-2-4- Les divers types d'infections	21
a-Les infections cutanées	21
b-Les infections généralisées.....	21
III-1-3- Pseudomonas aeruginosa.....	22
III -1-3-1- Caractères bactériologiques.....	22
III -1-3-2- Culture.....	22
III -1-3-3- Les Infections de la peau.....	22

III-2- Les dermatophytes.....	24
III-2-1- Définition.....	24
III-2-2- Classifications des dermatophytes.....	24
III-2-2-1-Morphologie.....	24
III-2- 2-1-1- En vie parasitaire.....	24
- Type ecotothrix.....	25
- Type endothrix.....	25
III-2-2-1-2- En culture.....	25
Aspect macroscopique.....	25
Aspects microscopiques.....	25
III-2-3- Trichophyton rubrum.....	25
III-2-3-1- Caractères cultureux.....	26
III-2-3-2- Morphologie microscopique.....	26
III-2-4- Microsprum gypseum.....	26
III-2-4-1-Caractères cultureux.....	26
III-2-4-2-Morphologie microscopique.....	27
III-2-5-Microsporium audouinii.....	27
III-2-5-1- Caractères cultureux.....	27
III-2-5-1-2- Morphologie microscopique.....	27
Etude expérimentale	
Chapitre I : Matériels et méthodes.....	29
I-1- Matériels.....	29
I-1-1- Site et conditions d'échantillonnage.....	29
I-1-1-1 Drogue végétale.....	29
I-2- Méthodes.....	30
I-2-1- Préparation des extraits.....	30
I-2-1-1 Les solvants.....	30
I-2-1-2 Technique d'hydrodistillation.....	31
I-2-2- Compositions chimiques.....	31
I-2-2-1- Screening phytochimique.....	31
I-2-2-1-1- Alcaloïdes.....	31
I-2-2-1-2- Dérivés anthracéniques.....	31
-Mise en évidence des anthraquinones libres par le test de Bornsträger.....	32
-Mise en évidence des anthraquinones combinées.....	32
- Les O-hétérosides.....	32
- Les C-hétérosides.....	33
I-2-2-1-3- Tannins.....	33
I-2-2-1-4- Saponosides.....	33
I-2-2-1-5- Flavonoïdes.....	33
-Mise en évidence de la réaction à la cyanidine.....	34
-Mise en évidence des Leucoanthocyanes.....	34
-Mise en évidence des flavanes.....	34
I-2-2-1-6- Stérols et triterpènes.....	34
I-2-2-1-7- Anthocyanes.....	34
I-2-2-1-8- Quinones.....	35
I-2-2-1-9- Mucilages.....	35
I-2-2-1-10- Protéines.....	35
I-2-3-Etude microbiologique.....	35
I-2-3-1-Les microorganismes utilisés.....	35
I-2-3-2- Préparation des solutions.....	36

I-2-3-3- Préparation des dilutions.....	36
1-2-3-4- Préparation des cultures.....	36
I-2-3-5- Traitements.....	36
I-2-3-5-1 Technique de diffusion en milieu gélosé.....	36
a- Mise en évidence.....	37
b- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	37
I-2-3-5-2- Technique de contact.....	37
I-2-3-6- Estimation de la croissance bactérienne.....	38
I-2-3-7- Estimation du taux d'inhibition de la croissance bactérienne.....	38
I-2-4 Analyses des champignons.....	38
I-2-4-1- Examen direct (identification directe).....	38
L'état frais.....	38
I-2-4-1-1 Examen indirect.....	39
Mise en culture.....	39
Les milieux utilisés.....	39
a. Examen macroscopique des cultures.....	40
b. Examen microscopique des cultures.....	40
I-2-4-2 Traitements.....	40
I-2-4-2-1 Préparation des dilutions.....	40
I-2-4-2-2 Technique du contact.....	41
I-2-4-2-3 Estimation de la croissance mycélienne.....	41
I-2-4-2-4 Estimation des taux d'inhibition de la croissance.....	41
I-3- Analyse statistique des données biologiques	42
I-3-1- Principe de l'analyse de la variance (ANOVA)	42
I-3-2- Principe du test de Newman-Keuls	42
I-3-3- Choix du dispositif expérimental d'analyse	42
Chapitre II: Résultats et discussion.....	43
II-1- Extraction de l'huile essentielle.....	43
II-2- Screening phytochimique.....	44
II-2-1- Résultats.....	44
II-2-2- Discussion.....	48
II-3- Activité antibactérienne.....	50
II-3-1- Méthode de diffusion sur gélose.....	50
II-3-1-1- <i>Staphylococcus aureus</i>	50
II-3-1-1-1-Effet de l'extrait d'éther de pétrole(E1).....	50
II-3-1-1-2- Effet de l'extrait dichlorométhane (E2).....	50
II-3-1-1-3- Effet de l'extrait méthanol (E3).....	50
II-3-1-1-4-Effet de l'extrait éthanol (E4).....	50
II-3-1-1-5- Effet de l'extrait aqueux (E5).....	51
II-3-1-1-6-Effet de l'huile essentielle (E6).....	51
II-3-1-2- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	54
II-3-1-2-1-Effet de l'extrait d'éther de pétrole(E1).....	54
II-3-1-2-2- Effet de l'extrait dichlorométhane (E2).....	54
II-3-1-2-3- Effet de l'extrait méthanol (E3).....	54
II-3-1-2-4-Effet de l'extrait éthanol (E4).....	54
II-3-1-2-5- Effet de l'extrait aqueux (E5).....	54
II-3-1-2-6-Effet de l'huile essentielle (E6).....	54

II-3-2- Méthode de contact (mesure de la viabilité).....	59
II-3-2-1-Effet sur <i>Staphylococcus aureus</i>	59
II-3-2-2- Effet sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
II-4- Activité antifongique.....	64
II-4-1- identification des souches fongiques.....	64
II-4-1-1- Etude morphologique.....	64
- <i>Trichophyton</i>	64
<i>Rubrum</i>	64
- <i>Microsporum gypseum</i>	64
- <i>Microsporumaudouinii</i>	66
II-4-2- Les résultats.....	66
II-4-2-1- Taux d'inhibition.....	66
II-4-2-1-1- <i>Trichophyton Rubrum</i>	66
II-4-2-1-1-1- Huile essentielle (HE).....	66
II-4-2-1-1-2- Extrait d'éther de pétrole.....	66
II-4-2-1-1-3- Extrait Dichlorométhane.....	68
II-4-2-1-1- 4- Extrait méthanolique.....	68
II-4-2-1-1- 5- Extrait éthanolique.....	68
II-4-2-1-1- 6- Extrait aqueux.....	70
II-4-2-1-2- <i>Microsporum gypseum</i>	70
II-4-2-1-2-1- Huile essentielle (HE).....	70
II-4-2-1-2-2- Extrait d'éther de pétrole.....	70
II-4-2-1-2-3- Extrait Dichlorométhane.....	72
II-4-2-1-2-4- Extrait Méthanolique.....	72
II-4-2-1-2-5- Extrait éthanolique.....	72
II-4-2-1-2-6- Extrait aqueux.....	74
II-4-2-1-3- <i>Microsporum audouinii</i>	74
II-4-2-1-3-1- L'huile essentielle (HE).....	74
II-4-2-1-3-2- Extrait d'éther de pétrole.....	74
II-4-2-1-3-3- Extrait Dichlorométhane.....	76
II-4-2-1-3-4- Extrait Méthanolique.....	76
II-4-2-1-3-5- Extrait Ethanolique.....	76
II-4-2-1-3-6- Extrait aqueux.....	78
II-4-2-2- La croissance mycélienne.....	78
II-4-2-2-1- <i>Trichophyton Rubrum</i>	78
II-4-2-2-1-1- Huile essentielle (HE).....	78
II-4-2-2-1-2- Extrait d'éther de pétrole.....	81
II-4-2-2-1-3- Extrait Dichlorométhane.....	82
II-4-2-2-1-4- Extrait méthanolique.....	84
II-4-2-2-1-5- Extrait éthanolique.....	84
II-4-2-2-1-6- Extrait aqueux.....	87
II-4-2-2-2- <i>Microsporum gypseum</i>	87
II-4-2-2-2-1- Huile essentielle (HE).....	88
II-4-2-2-2-2- Extrait d'éther de pétrole.....	90
II-4-2-2-2-3- Extrait Dichlorométhane.....	91
II-4-2-2-2-4- Extrait Méthanolique.....	93
II-4-2-2-2-5- Extrait éthanolique.....	93
II-4-2-2-2-6- Extrait aqueux.....	96
II-4-2-2-3- <i>Microsporumaudouinii</i>	96
II-4-2-2-3-1- L'huile essentielle (HE).....	96

II-4-2-2-3-2- Extrait d'éther de pétrole.....	99
II-4-2-2-3-3- Extrait Dichlorométhane.....	100
II-4-2-2-3-4- Extrait Méthanolique.....	102
II-4-2-2-3-5- Extrait Ethanolique.....	102
II-4-2-2-3-6- Extrait aqueux.....	105
II-4-2-3 Concentrations inhibitrices 50 et 90.....	106
Conclusion et perspective.....	109
Références bibliographique	
Annexes	

RESUME

Thymelaea hirsuta, plante vivace, utilisée dans la pharmacopée traditionnelle algérienne pour le traitement de diverses maladies. Le présent travail a porté sur l'étude phytochimique des extraits naturels et l'huile essentielle issus du mélange feuille/fleurs et l'évaluation, *in vitro*, de leurs activité antibactérienne et antifongique, vis-à-vis de deux bactéries : *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* et trois dermatophytes : *Trichophyton rubrum*, *Micosporum gypseum* et *Microsporum audouinii*.

Les résultats phytochimiques montrent que le mélange feuilles/fleurs constitue une source privilégiée de molécules biologiquement actives telles que les polyphénols, les lipides, les tanins, les flavonoïdes et les coumarines. L'étude bactériologique *in vitro* en présence de l'extrait à 10 µg/ml, différentes zones d'inhibition ont été obtenues sur *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Les CMI déterminées sont : 500 µg/ml pour *S. aureus* et 1000 µg/ml pour *P. aeruginosa*.

Tant dis que l'activité antifongiques dépendant des concentrations appliquées avaient pour conséquence un retard dans l'initiation de la division mitotique, un raccourcissement de la durée d'activité du champignon ainsi qu'un achèvement précoce et une absence totale des spores .

Cette étude confirme, l'usage traditionnel de cette plante et révèle son intérêt dans le cadre d'une exploitation industrielle pharmaceutique.

Mots clés : *Thymelaea hirsuta* – Phytochimie –Extrait naturel– L'huile essentielle –Activité antibactérienne – Activité anti-dermatophytes

Abstract

Thymelaea hirsuta, perennial, used in the Algerian traditional pharmacopoeia for the treatment of various disease, the present work deals with the phyto-chemical study of natural extracts and essential oil resulting from the mixture leaves ,flowers and the evaluation, in vitro, of their antibacterial antifungal activity, with regard to two bacteria : *staphylococcus aureus* and *pseudomonas aeruginosa* and three dermatophytes : *Trichophyton rubrum*, *Micosporum gypseum* and *Microsporium audouinii*.

The phyto-chemical results show that the mixture leaves, flowers constitute a preferred source of biologically active molecules such as the polyphenols, lepics, tannins, flavonoids and coumarins. The bacterial study in vitro in presence of extracts at 10 µg/ml, different areas of inhibitions have been obtained on *S.aureus* and *P.aeruginosa* . the determined CMI are: 500µg/ml for *S.aureus* and 1000 µg/ml for *P.aeruginosa* .since the antifungal activity depends of the applied concentrations has in consequence a delay in initiation of mitotic division ,a shortening of the activity duration of the mushroom as well as an early completion and complete absence of spores ,this confirm the traditional use of this plant and show its interest as part of the pharmaceutical industrial exploitation.

Keys words : *Thymelaea hirsuta* – Phytochemistry – natural extract –essential oil – antibacterial activity –anti dermatophytes activity.

ملخص

المتنان نبات معمر يستعمل في دستور الصيدلة الجزائرية لعلاج أمراض مختلفة ان البحث الحالي يسلط الضوء على الدراسة النباتية المستخلصات الطبيعية و الزيوت الأساسية المستخرجة من الخليط أوراق أزهار و التقييم المخبري لنشاطها البكتيري و المضاد , خصوصا لنوعين من البكتيريا: ستافيلوكوكوس أوريوس و بسيودوموناس أيروجينوسا و ثلاث أنواع من الفطريات: الشعروية روبروم, ميكروسبورم جيبسيوم و ميكروسبورم جيبسيوم.

نتائج التحليل النباتية أظهرت أن الخليط أوراق أزهار يمثل مصدر متالي للجزيئات النشطة بيولوجيا مثل: الدهون التاتين, الفلافونويد والكومارين. ان الدراسة البكتيرية المخبرية باستعمال المستخلص 10ميكروغرام/مل أنتجت عدة مناطق للكنت في : ستافيلوكوكوس أوريوس و بسيودوموناس أيروجينوسا , س م ا المستعملة هي: 500 ميكروغرام/مل لافيلوكوكوس 1000أوريوس و ميكروغرام/مل لبيسيدوموناس أيروجينوسا.

بما أن النشاط الحيوي المضاد متعلق بالتراكيز المستعملة فقد نتج تأخير في بداية الانقسام الميوتيكي, تقليص مدة نشاط الفطر و كذا اكتمال مسبق و غياب كلي للجراثيم , وهذا يؤكد الاستعمال التقليدي لهذه النبتة و يبرر مدى أهميتها في اطار استعمالها في الصناعة الصيدلانية.

مفاتيح الكلمات: المتنان- كيمياء العقاقير- المستخلص الطبيعي- زيت الأساسية- النشاط المضاد للبكتيريا- نشاط مضاد للبكتيريا

-----*Liste des tableaux*-----

Tableau 1 : Composition chimique de <i>Thymelaea hirsuta</i>	9
Tableau 2 : Quelques métabolites secondaires détectés dans le mélange feuilles/fleurs de <i>Thymelaea hirsuta</i>	43
Tableau 3 : Diamètre d'inhibition en mm après traitement avec les solutions mères (10mg/ml).....	51
Tableau 4 : Diamètre d'inhibition en mm après traitement avec les solutions mères (10mg/ml).....	55

Liste des figures

Figure 1 : Carte de répartition géographique des Thymelaeaceae (Heywood, 1996).....	03
Figure 2 : <i>Thymelaea hirsuta</i> (Linné) Endlicher (Photos originales). A- feuilles cotonneuses. B- fleurs mâles. C- fleurs femelles.....	05 23
Figure 3 : <i>Staphylococcus aureus</i> : Coloration de Gram ; les cocci à Gram positif et les polynucléaires altérés colorés en rose (Gram, x1000) (D'après Hart T. et Shears P., 1997).....	23 28
Figure 4 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Coloration de Gram (D'après Hart T. et Shears P 1997).	28
Figure 5 : A - <i>Trichophyton rubrum</i> sur Sabouraud. Aspect macroscopique (recto) (Chabasse et al., 2004).,B- <i>Trichophyton rubrum</i> sur Sabouraud. Aspect macroscopique(verso).....	28 28
Figure 6 : A - <i>Microsprum gypseum</i> sur Sabouraud. Aspect macroscopique (recto) (Chabasse et al., 2004)., B - <i>Microsprum gypseum</i> sur Sabouraud. Aspect macroscopique(verso).....	29 45
Figure 7 : A - <i>Microsporum audouinii</i> sur Sabouraud. Aspect.(Fromage et al., 2010). macroscopique (recto), B - <i>Microsporum audouinii</i> sur Sabouraud. Aspect macroscopique(verso)	45 46
Figure 8 : zone de prélèvement de <i>Thymelaea hirsuta</i>	46
Figure 9 : Recherche des tanins dans le mélange feuilles/fleurs (F/F); un virage du Vert (témoin) vers le bleu noir (résultat)	47 47
Figure 10 : Recherche des Quinones libres dans le mélange feuilles/fleurs (F/F); un virage du Vert (témoin) vers le rouge (résultat)	47 52 52
Figure 11 : Recherche des Antraquinones combinés dans le mélange feuilles/fleurs (F/F); virage du vert (témoin) vers le rouge (résultat), cas des C- hétérosides.....	52 53 53
Figure 12 : Recherche des alcaloïdes dans le mélange feuilles/fleurs (F/F); présence d'un louche net (résultat)	53 56

Liste des figures

.....	56
Figure 13: Recherche des stérols et terpènes dans le mélange feuilles/fleurs (F/F) ; changement de couleur vers le vert (résultat)	56 57
.....	57
Figure 14: L'apparition d'une fluorescence bleue (Echantillon) ainsi que les révélateurs (flavone et flavanone).....	57 58
.....	
Figure 15 : Effet de l'extrait E1 sur la croissance de <i>S. aureus</i>	58
.....	
Figure 16 : Effet de l'extrait E2 sur la croissance de <i>S. aureus</i>	60
.....	
Figure 17 : Effet de l'extrait E3 sur la croissance de <i>S.</i> <i>aureus</i>	60
Figure 18 : Effet de l'extrait E4 sur la croissance de <i>S. aureus</i>	60
.....	65
Figure 19 : Effet de l'extrait E5 sur la croissance de <i>S. aureus</i>	65
.....	
Figure 20: Effet de l'extrait E6 sur la croissance de <i>S. aureus</i>	
.....	
Figure 21 : Effet de l'extrait E1 sur la croissance de <i>P. aeruginosa</i>	
.....	
Figure 22: Effet de l'extrait E2 sur la croissance de <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	
Figure 23 : Effet de l'extrait E3 sur la croissance de <i>P. aeruginosa</i>	
.....	
Figure 24 : Effet de l'extrait E4 sur la croissance de <i>P. aeruginosa</i>	
.....	
Figure 25: Effet de l'extrait E5 sur la croissance de <i>P. aeruginosa</i>	
.....	
Figure 26 : Effet de l'extrait E6 sur la croissance de <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	
Figure 27 : Mise en évidence de l'activité des extraits de <i>Thymelaea</i> <i>hirsuta</i> sur <i>S. aureus</i>	

Liste des figures

Figure 28 : Mise en évidence de l'activité des extraits de <i>Thymelaea hirsuta</i> sur <i>P. aeruginosa</i>	
.....	
Figure 29 : Taux d'inhibition des deux souches <i>S. aureus</i> et <i>P. aeruginosa</i> par les différents extraits de <i>Thymelaea hirsuta</i> (concentration 500µg/ml)	
.....	
Figure 30 : Taux d'inhibition des deux souches <i>S. aureus</i> et <i>P. aeruginosa</i> par les différents extraits de <i>Thymelaea hirsuta</i> (concentration 1000µg/ml)	
.....	
Figure 31 : Taux d'inhibition des deux souches <i>S. aureus</i> et <i>P. aeruginosa</i> par les différents extraits de <i>Thymelaea hirsuta</i> (concentration 5000µg/ml)	
.....	
Figure 32 : Aspect microscopique de <i>Trichophyton Rubrum</i> (X40)	
.....	
Figure 33 : Aspect microscopique de <i>Microsporium gypseum</i> (X40)	
.....	
Figure 34 : Aspect microscopique de <i>Microsporium audouinii</i> (X40).....	65
.....	
Figure 35 : Taux d'inhibition de <i>Trichophyton Rubrum</i> traité par l'HE du mélange feuille/fleur de <i>Thymelaea hirsuta</i>	67
Figure 36 : Taux d'inhibition de <i>Trichophyton Rubrum</i> traité à l'extrait éther de pétrole du mélange feuille/fleur de <i>Thymelaea hirsuta</i>	67
.....	
Figure 37 : Taux d'inhibition de <i>Trichophyton Rubrum</i> traité à l'extrait Dichlorométhane du mélange feuille/fleur de <i>Thymelaea hirsuta</i>	67
.....	
Figure 38 : Taux d'inhibition de <i>Trichophyton Rubrum</i> traité à l'extrait Méthanol du mélange feuille/fleur de <i>Thymelaea hirsuta</i>	69
Figure 39 : Taux d'inhibition de <i>Trichophyton Rubrum</i> traité à l'extrait éthanolique du mélange feuille/fleur de <i>Thymelaea hirsuta</i>	69
Figure 40 : Taux d'inhibition de <i>Trichophyton Rubrum</i> traité à l'extrait aqueux du mélange feuille/fleur de <i>Thymelaea</i>	69

Liste des figures

<i>hirsuta</i>	
Figure 41 : Taux d'inhibition de <i>Microsporium gypseum</i> traité par l'HE du mélange feuille/fleur de <i>Thymelaea</i>	71
<i>hirsuta</i>	
Figure 42 : Taux d'inhibition de <i>Microsporium gypseum</i> traité à l'extrait éther de pétrole du mélange feuille/fleur de <i>Thymelaea</i>	71
<i>hirsuta</i>	
Figure 43 : Taux d'inhibition de <i>Microsporium gypseum</i> traité à Dichlorométhane du mélange feuille/fleur de <i>Thymelaea</i>	71
<i>hirsuta</i>	
Figure 44 : Taux d'inhibition de <i>Microsporium gypseum</i> traité à l'extrait Méthanolique du mélange feuille/fleur de <i>Thymelaea</i>	73
<i>hirsuta</i>	
Figure 45 : Taux d'inhibition de <i>Microsporium gypseum</i> traité à l'extrait éthanolique du mélange feuille/fleur de <i>Thymelaea hirsuta</i>	73
.....	
Figure 46 : Taux d'inhibition de <i>Microsporium gypseum</i> traité à l'extrait aqueux du mélange feuille/fleur de <i>Thymelaea</i>	73
<i>hirsuta</i>	
Figure 47 : Taux d'inhibition de <i>Microsporium audouinii</i> traité par l'HE.....	75
Figure 48 : Taux d'inhibition de <i>Microsporium audouinii</i> traité à l'extrait d'éther de pétrole....	75
Figure 49 : Taux d'inhibition de <i>Microsporium audouinii</i> traité à l'extrait dichlorométhane.....	75
Figure 50 : Taux d'inhibition de <i>Microsporium audouinii</i> traité à l'extrait méthanolique.....	77
Figure 51 : Taux d'inhibition de <i>Microsporium audouinii</i> traité à l'extrait éthanolique.....	77
Figure 52 : Taux d'inhibition de <i>Microsporium audouinii</i> traité à l'extrait aqueux.....	77
Figure 53 : Cinétique de croissance mycélienne de <i>Trichophyton Rubrum</i> traité à l'HE.....	80
Figure 54 : Cinétique de croissance mycélienne de <i>Trichophyton Rubrum</i> traité à l'extrait d'éther de pétrole.....	80
Figure 55 : Cinétique de croissance mycélienne de <i>Trichophyton Rubrum</i> traité à l'extrait de Dichlorométhane	83

Liste des figures

.....
Figure 56 : Cinétique de croissance mycélienne de *Trichophyton Rubrum*
traité à l'extrait 83
méthanolique.....

.....
Figure 57: Cinétique de croissance mycélienne de *Trichophyton Rubrum*
traité à l'extrait Ethanolique 86

.....
Figure 58 : cinétique de croissance mycélienne de *Trichophyton Rubrum*
traité à l'extrait aqueux 86

.....
Figure 59 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporum*
gypseum traité à l'HE..... 89
Figure 60 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporum*
gypseum traité à l'extrait Ether de pétrole 89

.....
Figure 61 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporum*
gypseum traité à l'extrait 92
Dichlorométhane.....

.....
Figure 62 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporum*
gypseum traité à l'extrait Méthanolique 92

.....
Figure 63 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporum*
gypseum traité à l'extrait Ethanolique 95

.....
Figure 64 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporum*
gypseum traité à 95
l'extrait aqueux.....

.....
Figure 65 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporum*
audouinii traité par HE..... 98
Figure 66 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporum*
audouinii traité à l'extrait d'éther de 98
pétrole.....

Figure 67 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporumaudouinii*
traité à l'extrait de 101

Liste des figures

Dichlorométhane.....

.....

Figure 68 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporum audouinii* traité à l'extrait méthanolique..... 101

.....

Figure 69 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporum audouinii* traité à l'extrait Ethanolique..... 104

.....

Figure 70 : cinétique de croissance mycélienne de *Microsporum audouinii* traité à l'extrait aqueux..... 104

.

Liste des abréviations

-----Liste des abréviations-----

ADN :	Acide désoxyribonucléique.
ARN :	Acide ribonucléique.
BHIB :	Bouillon d'insufusion de cerveau de cœur.
°C :	Degré Celsius
E :	Est
g :	Gramme
IC :	Concentration inhibitrice
N :	Nord
O.M.S :	Organisation mondiale de la santé
U.V :	Ultra- violet
T° :	Température
E₁ :	Extrait éther de pétrole.
E₂ :	Extrait dichlorométhane
E₃ :	Extrait méthanolique.
E₄ :	Extrait éthanolique.
E₅ :	Extrait aqueux.
E₆ :	Huile essentielle.
HE:	Huile essentielle
µg :	Microgramme
µl :	Microlitre
L :	Litre
mg :	Milligramme
mL :	Millilitre
% :	Pourcentage
AlCl₃ :	Chlorure d'aluminium
AQ :	Anthraquinone
FeCl₃ :	Chlorure de fer
nm :	nanomètre
N :	Normalité
KOH :	Potasse
g :	Gramme

Liste des abréviations

H₂O :	Eau distillée
H₂O₂ :	Le peroxyde d'hydrogène
NH₄OH :	Ammoniaque
O₂ :	Oxygène moléculaire
OH :	Hydroxyle
UV :	Ultra-violet
F/F :	Feuille/fleur
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
CMF :	Concentration minimale fongicide
HCl :	Acide chloridrique
Min :	minute
% :	Pourcentage
H₂SO₄ :	Acide sulfurique
%I :	Pourcentage d'inhibition
pH :	Potentiel hydrogène.
SCE :	Somme des carrés des écarts.
T₀ :	Temps 0 heures.
T₄ :	Temps 4 heures.
V/v :	Volume/volume.
UFC/ml :	Unité formant colonie par millilitre.

Glossaire

Alterne : feuilles alternes, insérées isolément sur chaque noeud de la tige et à des hauteurs différentes.

Ascomycète : champignon à thalle levuriforme ou septé dont la reproduction sexuée est de manière endogène par production d'ascospores à l'intérieur d'un asque.

Ascospore : spore sexuée produite de manière endogène à l'intérieur d'un asque et caractéristique des ascomycètes.

Conidie : spore assurant la multiplication asexuée des champignons et non capable de mobilité autonome.

Décoction : méthode d'extraction des principes actifs d'une préparation généralement végétale par dissolution dans l'eau bouillante.

Dicotylédone: plante issue de la germination d'une graine disposant de deux cotylédons.

Dioïque : plante possédant des fleurs mâles, à étamines et des fleurs femelles, à carpelles, sur des pieds différents.

Eczéma : maladie chronique allergique ou infectieuse de la peau, caractérisée par des lésions consistant en squames couvertes de boutons séreux provoquant des démangeaisons.

Endospore : spore interne, produite à l'intérieur d'une structure fermée.

Filamenteux : qualificatif courant en mycologie pour désigner les champignons qui produisent des filaments par rapport aux levures ou thalle unicellulaire.

Fongicide: matière active ou produit formulé ayant la propriété de tuer les champignons.

Fongistatique : qui inhibe la croissance du champignon sans détruire celui-ci.

Hyphe : (filament mycélien) structure élémentaire du thalle des champignons filamenteux, d'aspect tubulaire septé ou non.

Inflammation : réaction de défense immunitaire stéréotypée du corps à un organisme.

Kératine : scléroprotéine complexe, soufrée, de consistance dure, imperméable très répandue dans le monde animal et parfois présent dans la paroi de certains champignons. Chez l'homme, la kératine est abondante dans l'épiderme et les phanères.

Lyophilisation : dessiccation, déshydratation par sublimation opérée à très basse température et sous vide.

Métabolites secondaires : ce sont des substances qui n'interviennent pas directement dans les grandes fonctions des végétaux, mais plutôt interviennent dans le développement des plantes par les stress biotiques, abiotiques ou améliorent l'efficacité de reproduction.

Mycélium : ensemble des hyphes constitutifs de l'appareil végétatif des champignons.

Glossaire

Mycose: maladie causée par un champignon.

Phytochimie : (chimie des végétaux) ; science qui étudie la structure, le métabolisme et la fonction ainsi que les méthodes d'analyse, de purification et d'extraction des substances naturelles issues des plantes.

Principe actif : molécule qui dans un médicament possède un effet thérapeutique.

Simples : plantes médicinales.

Spore : élément issu de la reproduction sexuée ou asexuée des champignons et destinés à assurer la survie du champignon et sa propagation.

Sporulation : (fructification) aptitude d'un champignon à produire des spores.

Thalle : ensemble de l'appareil végétatif et reproducteur d'un champignon. Il peut être unicellulaire ou filamenteux.

Vivace : se dit d'une plante qui survit plusieurs années et fleurit chaque année, même si les parties aériennes meurent tous les ans.

INTRODUCTION

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité. Bien qu'une grande partie du XX^{ème} siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs via le screening de sources naturelles a conduit à la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines (Gurib-Fakim et 2006).

L'utilisation des plantes médicinales comme source de remède pour se soigner ou prévenir des maladies est originaires des millénaires jusqu'à la récente civilisation chinoise, Indienne et du Proche-Orient. Elle est devenue certainement un art (Hamburger, 1991).

L'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents (Hostettmann et *al.*, 1998). Selon l'organisation mondiale de la santé (O.M.S); la médecine traditionnelle se définit comme l'ensemble de toutes les connaissances pratiques explicables ou non pour diagnostiquer ou éliminer un déséquilibre physique, mental en s'appuyant exclusivement sur l'expérience vécue et l'observation, transmises de génération en génération (oralement ou par écrit) (Adjanohoun et *al.*, 1979).

La découverte de nouveaux médicaments d'origine naturelle à action microbienne constitue un axe important de recherche au niveau mondial. En Algérie, les maladies infectieuses d'origine fongique constituent l'une des pathologies, les plus répandues selon des statistiques des maladies.

La flore algérienne regorge de plusieurs espèces de plantes encore peu ou pas étudiées, mais dotées de réelles propriétés pharmacologiques (Graham et *al.*, 2000 ; Bnouham et *al.*, 2002 ; Gonzalez-Tejero et *al.*, 2008). Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeable (15%) d'espèces endémiques (Ozenda, 1977). *Thymelaea hirsuta*,

plante faisant partie de ces dernières, est utilisée traditionnellement dans les régions paysannes dans le traitement des infections cutanées et dans de nombreuses régions du monde comme antiglycémiant (Bnouham et al., 2007), purgatif dans le traitement des rhumes des brebis en médecine vétérinaire, l'hypertension et comme antiseptique (Kwano et al., 2007).

Une étude bibliographique, réalisée sur cette espèce, a montré que l'on ne dispose que de peu d'informations de nature chimique et biologique. Pour pallier ce manque d'informations, l'étude s'est focalisée sur les analyses qualitative et quantitative, les évaluations l'activité antimicrobienne des extraits préparés à partir des différents organes de la partie aérienne de la plante : *Thymelaea hirsuta* (fleurs et feuilles).

Les principales parties de ce travail se résument comme suit :

* La première a été essentiellement consacrée aux données bibliographiques, dont le premier chapitre aborde les études antérieures incluant la présentation botanique de la famille des Thymelaeaceae et l'espèce *Thymelaea hirsuta*, ses principaux métabolites secondaires, ses usages traditionnels et ses activités biologiques. Le second présente un rappel sur la plante en médecine. Enfin, le troisième, porte sur les quelque microorganismes pathogènes d'origine dermique.

* La deuxième partie traite de la section expérimentale selon différentes techniques (matériels, méthodes, matériels biologiques.....).

* La troisième a été consacrée à la présentation des résultats phytochimiques et biologiques obtenus à partir des fleurs et feuilles de *T. hirsuta* et leurs interprétations, suivie de discussion.

Ce travail a été complété par une conclusion donnant une synthèse des résultats obtenus, suivie des perspectives devant faire l'objet de travaux programmés.

Synthèse bibliographique **Thymelaea hirsuta**

I-1- Généralité

Les Thymelaeaceae sont une petite famille de dicotylédones composée de quelque 1200 espèces réparties en 67 genres, bien que certains auteurs n'en répertorient qu'une cinquantaine (Ferrari, 2002). Elle constitue l'une des principales familles parmi les neuf formant l'ordre des Malvales (Judd *et al.*, 2002).

En étymologie, les thymélées doivent leur nom générique à une espèce dont les feuilles ressemblent à celles du thym et le fruit à une petite « olive », du grec « elaia » (Beniston, 1984).

Les Thymelaeaceae sont représentées par une dizaine d'espèces appartenant aux genres *Thymelaea* et *Daphne* (Bruneton, 1999). Les membres de cette famille sont répandus dans les zones tropicales et tempérées de la planète, particulièrement en Afrique, mais sont absents dans les régions aux climats les plus froids (Borris *et al.*, 1988 ; Herbada, 2006 ; Vernon *et al.*, 2007) (Fig.1).



Figure 1 : Carte de répartition géographique des Thymelaeaceae (Heywood, 1996).

I-2- Description botanique

Selon [Batanoumy\(2005\)](#), *Thymelaea hirsuta* est une plante vivace ne mesurant pas plus d'un mètre de hauteur (Fig. 2A). Sa souche est ligneuse, forte et porte de nombreux rameaux tombants ([Pausas et al., 2006](#)) garnis de nombreuses petites feuilles de 6mm environ, ovales presque imbriquées, épaisses, luisantes au-dessus et cotonneuses en dessous ([Jeanmonod et Gamisans, 2007](#)).

Dans les conditions climatiques favorables, la floraison débute à partir du mois d'octobre et s'étale jusqu'en avril ([Jeanmonod et Gamisans, 2007](#)). La plante porte sur des pieds différents, soit des fleurs unisexuées, soit des fleurs hermaphrodites ([Jeanmonod et Gamisans, 2007](#) ; [Shaltout et El keblawy, 1992](#) ; [Dommée et al., 1995, 1990](#) ; [Renner, 2001](#)).

Selon [Dommée et al. \(1984\)](#), les pieds bisexués sont d'abord mâles, deviennent femelles ultérieurement. L'abondance de cette catégorie pourrait indiquer l'importance de la monoecie d'une espèce considérée jusqu'à présent comme essentiellement dioïque. Les fleurs de cette plante sont groupées entre 2 et 5 périanthes jaunâtres à l'intérieure, blanches, soyeuses et pubescentes à l'extérieur ([Beniston, 1984](#) ; [Somon, 1987](#)).

Les petites fleurs de 5mm polygames et sans bractées se trouvent sur les rameaux ou sur les ramifications naissantes, sub-sessiles et insérées les unes à côté des autres par l'intermédiaire d'un court pédicelle sur l'extrémité renflée de l'axe de l'inflorescence ; le pédicelle avec ses longs poils recouvrent la base de la fleur. Le calice pétaloïde, poilu à l'extérieur, glabre à l'intérieure, se divise à la partie supérieure en quatre sépales étalées et huit étamines soudées (Cuvier, 1825). Le style filiforme et latéral ([Villars, 1807](#)) est terminé par un stigmate légèrement velu ([Cuvier, 1825](#)).

Deux types de fleurs peuvent être distingués, mâles et femelles. Les fleurs mâles verdâtres ont un calice cylindrique (Fig. 2 B), alors que celles femelles sont jaunâtres à calice renflé (Fig .2 C).

Synthèse bibliographique
Thymelaea hirsuta



Figure 2 : *Thymelaea hirsuta* (Linné) Endlicher (Photos originales). **A-** feuilles cotonneuses.
B- fleurs mâles. **C-** fleurs femelles.

I-3- Biologie et Ecologie

Synthèse bibliographique

Thymelaea hirsuta

Thymelaea hirsuta est un végétal autotrophe par photosynthèse chlorophyllienne et entomogame dont la dispersion du pollen est assurée par les insectes. C'est une espèce vicariante et chaméphyte frutescente.

Elle vit dans les régions méditerranéennes et saharo-arabique, où se trouve un climat semi-désertique (les terres arides), dans les lieux rocaillieux et sablonneux ou les rochers siliceux maritimes (Cornara et al., 2005). Selon Shenbrot (2004), *Thymelaea hirsuta* est présente dans la partie méridionale des montagnes centrales du Néguev où les précipitations annuelles sont de l'ordre de 180 à 300mm.

Les éléments nutritifs de *Thymelaea hirsuta* au printemps sont sensiblement plus élevés que ceux présents en été. Ce constat est lié à la différence des éléments nutritifs disponibles dans le sol, la salinité des sols et la quantité de roches exposées. Ces facteurs semblent être les plus importants, influençant à la fois la phytomasse et la teneur minérale de la plante (Shaltout, 1992). Il semble que la salinité du sol, sa faible teneur en humidité et ses températures extrêmes favorisent les activités phénologiques de *Thymelaea hirsuta* (Shaltout, 1987).

La survie de *Thymelaea hirsuta* est assurée par la reproduction sexuelle qui s'est avérée être le seul moyen de régénérer naturellement les populations, par contre la reproduction végétative est difficile à mettre en œuvre (Minuto et al., 2004).

I-4- Classification

I-4-1- Classification botanique

Règne :	Végétale
Sous règne :	Tracheobionta
Embranchement :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida ou Dicotylédones
Sous classe :	Rosidae
Ordre :	Malvales
Famille :	Thymelaeaceae
Genre :	<i>Thymelaea</i>
Espèce :	<i>T. hirsuta</i> (L.) Endl., 1847

L'étude de la morphologie florale des Thymelaeaceae a mis en évidence la confusion régnant dans les relations taxonomiques au sein de cette famille (Heining, 1951).

Synthèse bibliographique

Thymelaea hirsuta

Il a été affirmé que les Thymelaeaceae peuvent être apparentées aux Tiliaceae ou aux Flacourtiaceae. Alors que les caractéristiques de morphologie pollinique ont amené à justifier que les Thymelaeaceae peuvent être très fortement apparentées aux membres crotonoïdes des Euphorbiaceae et aux Buxaceae, mais pas aux familles des Celastraceae, Combretaceae, Dichapetalaceae, Elaeagnaceae, Flacourtiaceae, Penaeaceae, Proteaceae et Tiliaceae (Erdtman,1952).

I-4-2- Classification phylogénétique

La dernière décennie a vu se développer la cladistique moderne, ou systématique moléculaire, basée sur l'analyse des séquences de gène ou d'ADN (Van der bank *et al.*, 2002 ; Herbada, 2006) dont le principe fondamental est que la preuve d'une parenté phylogénétique entre différents taxons n'est fournie que s'ils partagent les mêmes caractères dérivés (synapomorphies).

Ainsi, la délimitation de l'ordre des Malvales par Alverson *et al.* (1998), reprise par l'APG (1998) (Angiosperm Phylogeny Group), où s'y trouve les Thymelaeaceae, qui étaient jusque-là souvent associées aux Myrtales.

La classification des Thymelaeaceae dans l'ordre des Malvales « étendu » est d'ailleurs confortée par d'autres caractères, comme par exemple la présence d'acides gras cyclopropaniques (Vickery, 1980 ; 1981), de cellules mucilagineuses et d'écorces fibreuses robustes dans cette famille (Dahlgren et Thorne, 1984).

Classification phylogénétique des Thymelaeaceae (Anonyme, 2005) :

Classe :	Rosopsida
S/Classe :	Rosidae
Ordre :	Malvales
Famille :	Thymelaeaceae

I-5- Composition chimique et utilisation

Les thymelaeaceae ont fait l'objet de nombreuses études phytochimiques (Borris *et al.*, 1988 ; Baba *et al.*, 1987 ; Yanz *et al.*, 1987). Les esters diterpéniques de type tiglane, daphnane sont la classe de composés les plus caractéristiques des thymelaeaceae. Ces métabolites peuvent se retrouver dans toutes les parties de la plante (racines, tiges, feuilles, fruits et graines) (Ferrari, 2002). Ce sont des purgatifs violents qui déclenchent par

Synthèse bibliographique

Thymelaea hirsuta

contact avec la peau ou les muqueuses une réaction inflammatoire intense (Brooks *et al.*, 1990) et des effets neurotrophiques (He *et al.*, 2002 ; Moosavi *et al.*, 2005) et anticancéreux (Abou-karam *et al.*, 1998).

Selon Brooks *et al.* (1990) et Miyamae *et al.* (2009), des diterpènes daphnanes ont été isolés à partir des feuilles et des rameaux de *Thymelaea hirsuta*.

En outre, les coumarines constituent une autre classe de métabolites secondaires des Thymelaeaceae, intéressante du point de vue taxonomique. Dans cette famille, ils se trouvent sous forme de coumarines simples, de di- et trimères de coumarines avec liaison C-C ou éther ou à structure dibenzofurannique, ou de coumarinolignanes (Ferrari, 2002). L'étude de *Thymelaea hirsuta* Endl., par Rizk *et al.* (1975) a permis de mettre en évidence des coumarines très répandues chez les végétaux supérieurs : l'esculétine, la scopolétine et l'ombelliférone (Tab. 1).

Leur présence dans la famille des Thymelaeaceae en a fait donc un marqueur chimiotaxonomique de valeur (Ferrari, 2002). Tandon et Rastogi (1977) ont été les premiers à isoler une tricoumarine chez les Thymelaeaceae, la wikstrosine tirée de *Wikstroemia viridiflora* Meissn., dont la structure n'a jamais été entièrement élucidée. Tandis que Rizk *et al.* (1984) signalent la présence de deux dérivés aromatiques isolés à partir des feuilles et des brindilles de *Thymelaea hirsuta* (Tab. 1).

La caractéristique frappante des Thymelaeaceae réside dans la diversité de leur métabolisme flavonoïdique, produit naturel antioxydant et anti-tumoraux (Trigui *et al.*, 2013 ; Akrouf *et al.*, 2011), ceci peut expliquer le fait qu'elle possède différentes propriétés pharmacologiques, surtout pour leurs parties aériennes (Dohou *et al.*, 2003). Les stérols sont courants chez les Thymelaeaceae, principalement représentés par le β sitostérol, qui est ubiquitaire dans le règne végétale (Borris *et al.*, 1988).

Levin (1976) a observé la présence des alcaloïdes chez 36% des espèces de thymelaeacées, alors que Touati (1985) a signalé que *Thymelaea hirsuta* n'en contient pas. Quant aux tannins, ils semblent être peu courants dans la famille des thymelaeaceae. Lorsqu'ils apparaissent, il s'agit généralement de dérivés du leucocyanidol (Hegnauer, 1973). Alors que les feuilles de *Thymelaea hirsuta* contiennent des tannins de type gallique (El Beiheiry, 2000). Ferrari (2002) affirme que les thymelaeaceae ne sont pas une famille à saponines.

Tableau 1 : Composition chimique de *Thymelaea hirsuta*.

Synthèse bibliographique
Thymelaea hirsuta

Organes étudiés	Molécules extraites	Références
Feuilles	Thyméol ((C ₃ H ₂ O) _n) Stigmastérol, β-sitosterol, Alcool aliphatique C ₁₂ H ₂₂ O, Lactone C ₁₉ H ₁₈ O ₆ Daphnortine, β-sitosterol- β-D- Glucoside Alcanes en C27 à 31, alcanols à C22, 24, 26 et 28, Sitosterol et campe stérol Daphnorine, Daphnorétine, Daphnine, Daphnétine, Daphnétine-glucoside, ombelliférone, scopolétine et Esculétine (coumarines) 2- vicénine (C-flavone) Tiliroside (3-ρ- Coumarolyglucosylkaempférol) (flavanol) tanins Lupéol, β-sitosterol, phytol, β- Amyrine, bétuline, erythrodiol, Cholestérol et lanostérol	Saleh et al. , 1965 Gharbo et al. , 1970 Rizk et Rimpler, 1972 Rizk et al, 1974 Rizk et al, 1975 Nawwar et al. , 1977 Ismail, 1978 El-Beheiry, 2000 Garcia-Granados et Saenz De Buruaga, 1980a
Feuilles Brindilles	Lupéol, β-sitosterol, phytol, β- Amyrine, bétuline, erythrodiol, Cholestérol et lanostérol Et 5, 12- dihydroxy-6,7-époxy- résiniféronol protéine et gnidicine, gniditrine, genkwadaphnine, 12- <i>O</i> heptadécenoyl-5-hydroxy-6,7- époxy-résiniféronol-9, 13, 14 orthobenzoete (diterpènes daphnane)	Rizk et al, 1984 Brooks et al. , 1990
Racines	Daphnorétine (éther de dicoumaryl	Abou-Karam et al. , 1998

Synthèse bibliographique **les plantes en médecine**

II- Les plantes en Médecine

II-1- Définition d'une plante médicinale

Une plante médicinale est définie par la pharmacopée française comme une « drogue végétale au sens de la pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses ». Une « drogue végétale » est une plante ou une partie de plante, utilisée, soit le plus souvent sous la forme desséchée, soit à l'état frais (Sofowora, 2010).

L'expression drogue végétale ou, plus couramment, drogue, désigne donc une matière première naturelle servant à la fabrication des médicaments.

II-2- Intérêt de l'étude des plantes médicinales

La plupart des espèces végétales contiennent des substances qui peuvent agir, à un niveau ou un autre, sur l'organisme humain et animal. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie. Elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus (Iserin, 2001).

La raison fondamentale est que les principes actifs végétaux proviennent de processus biotiques répandus dans tout le monde vivant, alors que l'essentiel des médicaments de synthèse sont des xénobiotiques aux effets secondaires très mal maîtrisés (Bruneton, 2009).

Les plantes médicinales sont donc importantes pour la recherche pharmaceutique et l'élaboration des médicaments, directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matière première pour la synthèse des médicaments ou comme modèle pour les composés pharmaceutiquement actifs (Decaux, 2002).

II-3- La phytothérapie

La phytothérapie est l'utilisation des plantes (de l'ensemble des éléments de la plante) à des fins thérapeutiques. Ce terme vient du grec : « phytos » la plante et « therapiea » la thérapie.

Il s'agit d'une des sciences médicales les plus anciennes, elle est parfois connue aujourd'hui sous le nom de « remède de bonne femme », étymologiquement : Bona fama = grande renommée. Une citation de Galien dit : « la meilleure médecine, c'est la nature car elle guérit les trois quart de toutes les maladies ».

Aujourd'hui, 60 % des spécialités médicamenteuses employées en médecine courante sont issues, directement ou par héli-synthèse, du règne végétal (Grosmond, 2001).

Synthèse bibliographique **les plantes en médecine**

Toutefois, malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps, à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria.

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît.

La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, est souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en Occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme (Iserin, 2001). L'exploitation des ressources naturelles, et notamment du monde végétal, est encore capitale à l'heure actuelle. Elle est réalisée par :

- Etude chimiotaxonomique qui consiste à rechercher des catégories de molécules dans les plantes en fonction de leur appartenance botanique. Ainsi les Apocynaceae, les Rutaceae, les Rubiaceae renferment souvent des alcaloïdes et c'est parmi ces familles que l'on recherche d'abord les alcaloïdes.

- Etude ethnopharmacologique qui consiste à recueillir des renseignements sur l'utilisation des plantes auprès des populations vivant encore près de la nature en Amérique du Sud, dans les îles du Pacifique, en Afrique ou dans le Sud- Est Asiatique.

- Etude pharmacologique qui est caractérisée par l'observation du comportement des plantes dans leur environnement naturel. Les interactions plantes-plantes (allélopathie), plantes-microorganismes, plantes-insectes, plantes-animaux sont associées à des signaux chimiques (Barnes *et al*, 2007).

II-4- Métabolites des plantes

Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes. Elles renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme. Les métabolites sont les molécules issues du métabolisme des végétaux ou d'animaux.

Synthèse bibliographique **les plantes en médecine**

On distingue deux classes de métabolites : métabolites primaires et métabolites secondaires (Hartmann, 2007).

II-4-1- Les métabolites primaires

Les métabolites primaires sont caractérisés par leur caractère nécessaire et vital à la survie de la cellule ou de l'organisme (Diallo D., 2000).

- Les glucides représentent une source d'énergie surtout au niveau des parois cellulaires (cellulose).
- Les lipides constituent aussi une source d'énergie présente dans les membranes cellulaires.
- Les amino-acides représentent une source primaire de construction des protéines.

II-4-2- Les métabolites secondaires

Sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante.

Les produits du métabolisme secondaire qui sont émis en très faible quantité, sont d'une grande variété structurale (plus de 200000 structures définies). Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique.

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, ils ont un intérêt multiple, ils sont mis à profit aussi bien dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique.

Ils sont largement utilisés en thérapie comme vasculo-protecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles ou des matières premières pour la hémisynthèse de composés actifs.

On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. L'isolement de principes actifs au XIXème siècle, a contribué à l'amélioration des connaissances des structures, ce qui a permis de passer progressivement d'une phytothérapie traditionnelle souvent empirique, acceptée parfois avec une certaine méfiance à une thérapie moderne, acceptée scientifiquement.

Au début du XXème siècle, des synthèses de composés analogues (métabolites secondaires) ont commencé à naître ; et afin d'augmenter leurs efficacités pharmacologiques,

Synthèse bibliographique **les plantes en médecine**

des études des structures et des activités biologiques issues des dérivés prénylés de ces métabolites ont été réalisés. La prénylation consistait à la fixation d'une chaîne latérale (pentényle, géranyle et farnésyle) sur une molécule acceptante.

Les métabolites secondaires constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour leurs propriétés antioxydantes, anti microbiennes, anti-inflammatoires et anti carcinogènes ou mutagènes (Epifano et al.2007).

Ce sont des composés très hétérogènes tant par leur composition que par leur structure. Pendant longtemps, ces composés ont été considérés comme secondaires et métaboliquement inactifs, ils ne suscitaient donc que peu d'intérêt.

A l'heure actuelle, cette opinion a changé, du fait de nombreuses recherches qui ont largement montrées que ces composés ne sont pas inertes et contribuent efficacement dans la biosynthèse de divers métabolites de l'organisme.

Chez les végétaux, ils sont soumis à d'importantes variations quantitatives et qualitatives, ce qui témoigne d'une dynamique biochimique incontestable (Brzozowska et al.1976). Ils interviennent dans des processus vitaux les plus divers. D'où l'importance croissante des études consacrés à ces composés. Leurs mode d'action et leurs signification physiologique ne sont pas encore suffisamment claires, d'où la place de plus en plus large qui revient aux études de ces composés et de leurs fonctions.

On trouve des métabolites secondaires dans toutes les parties de plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre. Parmi les principales familles de métabolites secondaires trouvées chez les plantes on distingue :

- Les composés phénoliques qui interviennent dans les interactions plante-plante (allélopathie, inhibition de la germination et de la croissance). Parmi ces composés, on citera les polyphénols, les lignines, les stilbènes, les flavonoïdes, les phénylpropanoïdes, les anthocyanes et les tannins.

- Les alcaloïdes, renferme un atome d'azote dans la structure. Parmi ces derniers, certains relèguent de l'acide cyanhydrique quand les plantes sont abîmées. Ils sont synthétisés à partir d'acides aminés. On citera la nicotine, l'atropine, la codéine, la lupinine.

- Les mucilages : Ces sont des polymères complexes de fructose, d'acide glucorinique et d'acide manuronique. Les mucilages sont des mélanges colloïdaux qui gonflent avec l'eau (agar agar).

Synthèse bibliographique **les plantes en médecine**

- Les gommés et les résines : Ces sont des substances produites par la plante à la suite d'une blessure.

- Les huiles essentielles : Ces sont des liquides concentrés et hydrophobes des composés aromatiques (odoriférants) volatils d'une plante, ces essences sont très volatiles et non miscibles à l'eau.

- Les latex : Ces sont des substances sécrétées ou fabriquées par des cellules laticifères (vraies ou anastomosées) et qui ont la particularité de se solidifier au contact de l'air.

Les principaux groupes de métabolites secondaires rencontrés dans les plantes et qui possèdent généralement une activité antimicrobienne sont : les composés phénoliques, les alcaloïdes, les terpénoïdes et stéroïdes.

II-4-2-1- Les alcaloïdes

Les composés azotés se divisent en deux groupes : les acides aminés et les alcaloïdes. Les acides aminés (qui n'appartiennent pas aux métabolites secondaires), sont à la base de la constitution des protéines et des autres peptides, même s'ils n'en sont pas toujours les mêmes uniques constituants, c'est le cas de l'hème, qui est un groupement prosthétique de l'hémoglobine. La structure générale des acides aminés et de quelques acides aminés porteurs du groupement fonctionnel guanidinium sont représentés ci-dessous. La plupart des composés de ces deux groupes sont très hydrosolubles.

Les alcaloïdes sont des substances organiques d'origine végétale, azotée et à caractère alcalin. Bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques (comme la strychnine ou l'aconitine), certains sont employés dans la médecine pour leurs propriétés analgésiques (comme la morphine, la codéine), dans le cadre de protocoles de sédation (anesthésie, atropine) souvent accompagnés des hypnotiques, ou comme agents antipaludéens (quinine, chloroquinine) ou agents anticancéreux (taxol, vinblastine, vincristine). La morphine a été le premier alcaloïde isolé dans l'opium (vers 1805). Puis on découvrit la strychnine (1818).

Les autres alcaloïdes plus connus sont : la colchicine, l'atropine, le tubocurarine, la théine, la cocaïne, la mescaline, l'acide lysergique et l'aconitine.

Les pyrazoles forment un groupe d'alcaloïdes contenant deux atomes d'azote dans le noyau aromatique, ceux-ci ne sont pas d'origine naturelle (Bruneton, 1999 ; Zenk et Juenger, 2007). Les alcaloïdes sont des composés organiques naturels hétérocycliques avec un atome d'azote comme hétéroatome.

Synthèse bibliographique **les plantes en médecine**

Leurs structures moléculaires sont complexes, plus ou moins basiques et douées des propriétés physiologiques prononcées même à faible dose (Zenk *et al.* 2007).

Ils constituent un des groupes de métabolites secondaires contenant plus de 10000 à 12000 différentes structures (Stöckigt *et al.*, 2002).

Les alcaloïdes sont des composés organiques azotés de faibles poids moléculaires. Ils possèdent des structures hétérocycliques et se retrouvent dans environ 20% de toutes les espèces de plantes (Zhang et Björn, 2009). Les alcaloïdes sont connus comme doués de propriétés antimicrobiennes (Faizi *et al.* 2003). Le mécanisme d'action des alcaloïdes est attribué à leur capacité à s'intercaler avec l'ADN.

II-4-2-2- Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires, d'un poids moléculaire élevé. Ils sont largement distribués dans le règne végétal (Haslam, 1993). La structure de base qui les caractérise est la présence d'un ou plusieurs noyaux aromatiques auquel sont directement liés un ou plusieurs groupements hydroxyle libres ou engagés dans une autre fonction (éther, ester) (Harborne, 1994).

II-4-2-3- Flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus (Edenharder et Grünhage, 2003) et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbone, qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2 benzopyrane, ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane (Yao *et al.*, 2004).

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, du degré d'hydroxylation, de méthylation, du degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C (Yao *et al.*, 2004 ; Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006). En se basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines, flavonoles, isoflavonoles, flavones, isoflavones, flavanes, isoflavanes, flavanols, isoflavanols, flavanones, isoflavanones et aurones (Havsteen, 2002 ; Edenharder et Grünhage, 2003).

II-4-2-4- Tanins

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 daltons qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les protéines (Haslam, 1996 ; Cowan, 1999).

Les tanins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (Scalbert, 1991). On distingue deux groupes de tanins différents par leurs structures et par leurs origines biogénétiques :

- ***Tanins hydrolysables*** qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotanins soit l'acide ellagique dans le cas des tanins classiquement dénommés ellagitannins (Bruneton, 1993 ; Cowan, 1999).

- ***Tanins condensés ou tanins catechiques ou proanthocyanidols*** qui se diffèrent fondamentalement des tannins hydrolysables, car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule, et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone (Bruneton, 1999).

II-4-2-5- Acides phénoliques

Petites molécules constituées d'un noyau benzénique et au moins d'un groupe hydroxyle, elles peuvent être également estérifiées, étherifiées et liées à des sucres sous forme d'hétérosides.

Leur biosynthèse dérive de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique (Garnero, 2000).

II-4-2-6- Coumarines

Les coumarines sont des composés phénoliques constitués d'un benzène et des noyaux à pyrènes. Elles sont substituées en C-7 par un hydroxyle. Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres (Cowan, 1999).

II-4-2-7- Quinones

Les quinones sont des molécules très réactives, à noyaux aromatiques, avec deux substitutions cétoniques (Cowan, 1999). Elles sont des composés qui régénèrent des radicaux libres, et par conséquent se complexent irréversiblement aux acides aminés nucléophiles des protéines (Stern et al., 1996). Elles sont ubiquitaires dans la nature, principalement dans le règne végétal et sont fortement réactifs (Cowan, 1999).

II-4-2-8- Composés terpéniques

II-4-2-8-1- Stéroïdes, Stérols et Terpénoides

Les stéroïdes, les stérols et les terpénoides constituent sans doute le plus vaste ensemble connu de métabolites secondaires des végétaux, ils regroupent plusieurs sous familles.

Les stérols jouent un rôle important dans la qualité des graisses et des huiles (Bruneton, 1993). Ils se présentent sous forme d'alcool libre (Sitostérol), ou sous forme des esters associés par le glucose (Glucoside stérols) (Gaignautl et al., 1997).

Parmi les stérols ou phytostérols les plus fréquemment rencontrés chez les végétaux on cite :

Le stigmastérol et le β -sitostérol. Ils représentent 80% des stérols biosynthétisés à la surface du globe terrestre (Gaignautl et al., 1997).

Les stéroïdes et les triterpènes peuvent être considérés comme formés par l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta carbonées ramifiées dérivées du 2- méthyl butadiène. Chaque groupe de terpènes est issu de la condensation tête à queue d'un nombre variable d'unités isoprènes (Paris et Moyse 1965).

II-4-2-8-2- Saponosides

Les saponosides sont des hétérosides de poids moléculaire élevé, appartenant aux stérols ou triterpènes. Ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes, ils sont caractérisés par leur action tensioactive (Bruneton, 1999). Ils sont composés de deux parties :

- Une partie hydrophile, formée d'un ou de plusieurs sucres, eux-mêmes de nature variée ;
- Une partie aglycone et lipophile (dite sapogénine), qui est soit un résidu de triterpène, soit un résidu de stéroïde (Dacosta, 2003).

II-4-2-8-3- Huiles essentielles

Les huiles volatiles, ou essences aromatiques végétales nommées huiles essentielles car elles renferment la "Quinta essentia", la fragrance de la plante (Lamarti *et al.*, 1994), sont des substances odorantes, volatiles, huileuses donc de nature hydrophobe, totalement solubles dans les alcools, l'éther et dans les huiles végétales et minérales. Lorsqu'elles sont pures et naturelles, elles ne contiennent aucun corps gras : elles sont uniquement constituées de molécules aromatiques volatiles (Coraline *et al.*, 2006).

Les plantes aromatiques synthétisent naturellement les huiles sous forme de métabolites secondaires par des cellules sécrétrices qui contiennent de la chlorophylle, elles sont ensuite transportées lors de la croissance de la plante dans d'autres parties; le bois, les fruits, les écorces, les graines et les racines et sont conservées dans les cellules sécrétrices, les cavités, les canaux, les cellules épidermiques ou dans les trichomes glandulaires (Bakkali *et al.*, 2008). Cependant la quantité d'huile produite est très variable selon les espèces et elles sont souvent colorées (Coraline *et al.*, 2006).

III-1 Les bactéries

Une bactérie est un microbe formé d'une seule cellule, visible au microscope, appartenant à une zone de transition entre le règne animal et le règne végétal.

Comme toute cellule, les bactéries sont constituées d'un noyau, isolé ou diffus, un protoplasme contenant des granulations et des vacuoles, une paroi parfois d'une capsule.

Certaines bactéries sont mobiles grâce à des cils vibratiles. Selon leur mode de nutrition et leur comportement vis-à-vis de l'oxygène, les bactéries sont classées en aérobies et en anaérobies.

Les bactéries se reproduisent selon deux modes :

- la division simple ou scissiparité.
- la sporulation, la spore représentant la forme de résistance et de dissémination du germe.

Pour croître, les bactéries doivent trouver dans le milieu extérieur des conditions physicochimiques favorables qui leur sont nécessaires et les aliments couvrant leurs besoins énergétiques élémentaires et spécifiques. Sur le plan pratique, ces besoins sont satisfaits dans des milieux élaborés par l'homme en vue d'étudier les bactéries et sont appelés de ce fait, milieux de culture (Leclerc *et al.* 1995 ; Madigan *et al.* 1997 ; Marc *et al.* 2001).

III-1-1- La classification des bactéries

Il existe différents types de classifications des bactéries. La classification de Linné permet de distinguer différents niveaux : le règne, l'embranchement, la famille, le genre et l'espèce (Flandrois, 2000). Chaque espèce se distingue par des caractéristiques métaboliques et morphologiques : les cocci seront plutôt courts et sphériques, les bacilles en forme de bâtonnet, d'autres peuvent être incurvés ou spiralés... (Flandrois, 2000 ; Heart *et al.*, 2006). En ce qui concerne les noms, le premier mot (en italique et commençant par une majuscule) correspond au genre, le deuxième (en minuscule et aussi en italique) correspond à l'espèce : *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*... (Flandrois, 2000).

Une autre classification, fréquemment utilisée, correspond à leur réaction au contact de la coloration de Gram. Il s'agit d'une méthode permettant de différencier les bactéries en

fonction de leur capacité de coloration variant selon la composition de leur paroi (Flandrois, 2000). Ainsi, les bactéries colorées en bleu-violet seront dites à Gram positif et celles en rose à Gram négatif (Heart et al., 2006).

Enfin, elles peuvent être classées en fonction de leur besoin d'oxygène pour survivre en bactéries aérobies ou en bactéries anaérobies (Flandrois, 2000).

Lorsque l'environnement leur est favorable, en termes de nutriments, température, pH, oxygène... les bactéries pourront alors survivre et se multiplier. Dans certaines circonstances, les bactéries peuvent avoir un pouvoir pathogène important et être responsables de maladies bénignes ou graves (Flandrois, 2000).

III-1-2- *Staphylococcus aureus*

Le réservoir essentiel de *S. aureus* est l'homme lui-même, de 30 à 50 % des sujets sains hébergent *S. aureus* au niveau de leurs fosses nasales mais aussi de la peau, de la gorge et de l'intestin (Ferron, 1988). Le *S. aureus* est responsable d'infections sévères, particulièrement au niveau de la peau, l'os et des tissus mous. Les infections à *S. aureus* sont graves, parce qu'une fois la première couche cellulaire rompue, le *S. aureus* est capable de sécréter de nombreuses enzymes hydrolysantes et coagulantes qui vont être responsables d'une virulence élevée.

III-1-2-1- Caractères généraux des staphylocoques

Connus depuis l'aube de la bactériologie, les staphylocoques avaient fait l'objet des deux premières communications par Pasteur à l'académie des sciences en 1876 et 1880, où il révéla l'existence de « Vibron phylogénique » qu'il avait isolé à la fois dans le pus de l'anthrax et l'ostéomyélite. En 1884 Rosenbach était capable d'isoler ces bactéries et de produire une culture pure. Il décrivait *S. aureus* à cause de l'apparence jaune orangée des colonies et montrait que *S. aureus* était responsable de furoncles et d'infections des plaies alors que *S. epidermidis* colonisait la peau.

La même année, Gram mettait au point une méthode de coloration des bactéries à partir du violet de gentiane : les staphylocoques étaient classés parmi les cocci à Gram positif ; après cette première description morphologique approximative, le nom de « Staphylocoque » fut donné à ce microorganisme par le chirurgien anglais Ogston, par analogie avec la forme d'une grappe de raisin (Dupont, 2000).

III-1-2-2- Caractères bactériologiques

Staphylococcus Aureus coques gram positif arrondis d'environ 0.8 à 1µm de diamètre, dépourvus de spores et de capsules, immobiles (Boisson et larpent, 1989) (fig. 3). Cette espèce rencontrée tous les jours au laboratoire de bactériologie médicale donne des colonies ayant en général un pigment doré et attaque le mannitol sur milieu hypersalé de chapman. Ce milieu contient aussi une forte concentration de NaCl qui inhibe la plupart des autres germes.

D'autres substances enzymatiques ou toxiques, qui sont des facteurs de virulence sont produites par *S. aureus* DNase phosphatase, fibrinolysine hyaluronidase, hémolysine, exfoliatine et leucocine (Holt et al., 1994).

III-1-2-3- Caractères biochimiques

Caractères biochimiques des *Staphylococcus* permettent non seulement d'identifier le genre *Staphylococcus* mais aussi les souches pathogènes présentent une catalase active, absence d'oxydase, existence de cytochromes **d** et **e**, de coagulase d'une bêta lactamase et une lipase.

D'autres caractères biochimiques se rapportent à ce genre nitrate réductase positif, présence d'une gélatinase, en général plusieurs sucres positifs sans production de gaz, comme le galactose, le glucose, glycérol, lactose, le mannose, le mannitol et le saccharose, sauf exceptions et aussi un pouvoir protéolytique élevé (Holt et al., 1994).

III-1-2-4- Les divers types d'infections :

a- Les infections cutanées :

L'infection cutanée la plus typique est représentée par la folliculite, lésion inflammatoire suppurée et douloureuse centrée sur un follicule pileux, pouvant prendre une allure extensive en profondeur (furoncle, anthrax) ou en superficie. Le caractère éventuellement tenace et récurrent de ces lésions peut poser des problèmes thérapeutiques difficiles et doit faire suspecter un désordre immunitaire sous-jacent ou une maladie favorisante (diabète) (Berche et al., 1989).

b- Les infections généralisées

Si un patient n'est pas traité suffisamment tôt et dans la plupart des cas est immunodéprimé il peut se produire une septicémie, c'est-à-dire une entrée de la bactérie dans la circulation sanguine. Dans ce cas, l'individu doit être traité dans les plus brefs délais à de fortes doses d'antibiotiques en milieu hospitalier sous la surveillance continue de professionnels de la santé. La septicémie est une infection grave qui peut être mortelle (Berche et al., 1989).

III-1-3- *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa (ou bacille pyocyanique) est une bactérie à Gram négatif, aérobic stricte, dépourvue de capsule. Comme la plupart des espèces appartenant au genre *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* n'exige aucun facteur de croissance. C'est une bactérie hautement versatile dotée d'une grande adaptabilité nutritionnelle et métabolique. Par conséquent, elle peut être isolée en culture sur des milieux ordinaires ou sur des milieux rendus sélectifs par addition d'inhibiteur, tel que le cétrimide.

Elle est strictement aérobic et sa température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C. Les cultures de *P. aeruginosa* dégagent une odeur caractéristique, et produisent le plus souvent des pigments de pyocyanine et de pyoverdine (Wolfgang, Kulasekara et al., 2003).

III 131 Caractères bactériologiques

Pseudomonas aeruginosa est un bacille (Bâtonnets) à gram négatif (Fig. 4), fin, de 1.5 à 3 µm de long et de 0.5 à 0.8 µm de large, très mobile, à ciliature polaire, dépourvus de spores et de capsules (Larpen, 2000).

III-1-3-2 Culture

P. aeruginosa est une bactérie aérobie stricte, et se développe très facilement sur des milieux ordinaires, oxydase positive, sur gélose nutritive, les colonies apparaissent souvent dissociées : colonies de grande taille (1-3mm), à bords irréguliers et sont capables de pousser à des températures entre 4 et 42°C en ralentissant leur métabolisme. Leur croissance n'est donc pas totalement entravée par les locaux réfrigérés et les incubateurs (Singelton et Sainsbury, 1984).

III 133 Les Infections de la peau

L'implantation de *P.aeruginosa* sur le revêtement cutané est favorisée par l'humidité et par l'existence de lésions sous-jacentes (eczéma, dermatites, traumatismes, brûlures). Il s'agit alors de pyodermites invasives accompagnées de nécrose tissulaire avec tendance hémorragique et production d'un exsudat purulent parfois bleu-vert. De telles infections cutanées sont souvent à l'origine de septicémies par dissémination hémotogène des bactéries. (Berche , Gaillard et Simonet, 1989).

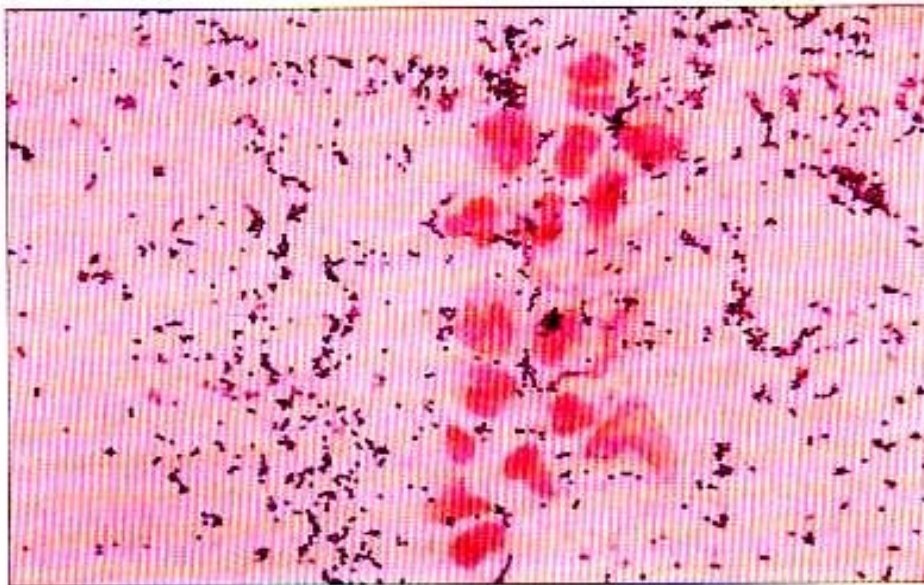


Figure 3 : *Staphylococcus aureus* : Coloration de Gram ; les cocci à Gram positif et les polynucléaires altérés colorés en rose (Gram, x1000) (D'après Hart T. et Shears P., 1997).

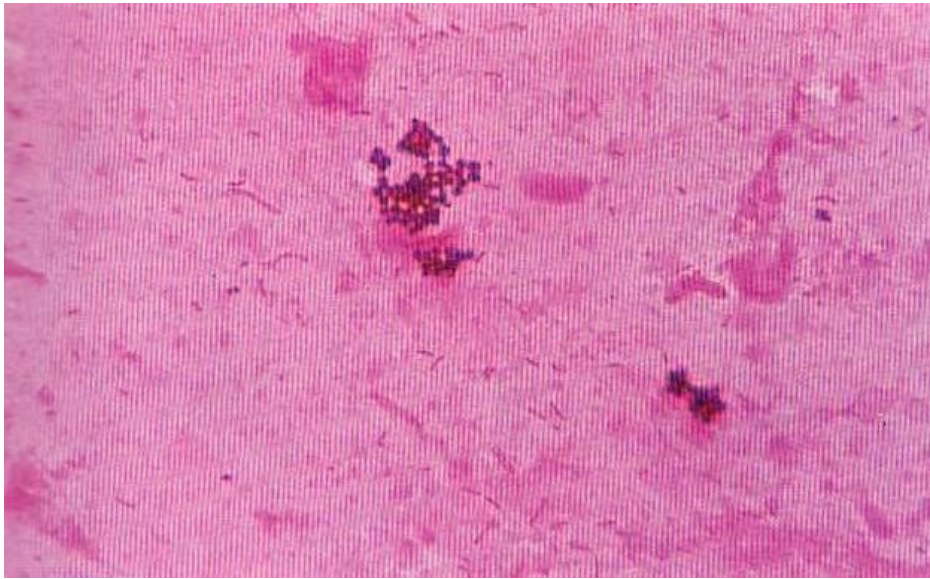


Figure 4 : *Pseudomonas aeruginosa*. Coloration de Gram (D'après Hart T. et Shears P., 1997).

III-2- Les dermatophytes

III-2-1- Définition

Les dermatophytes sont des champignons filamenteux à mycélium cloisonné. Ils sont kératinolytiques et kératinophiles, ils peuvent donc vivre en parasites des poils ou d'autres structures kératinisées. Certains dermatophytes vivent en en saprobiose dans le sol. Ils sont capables de survivre très longtemps dans le milieu extérieur (Euzeby, 1992).

Ce sont des champignons microscopiques au thalle septé se multipliant sur le mode sexué, produisant des ascospores (Chabasse et al., 2004). La reproduction asexuée s'effectue, pour les dermatophytes, sur le mode thalique solitaire et conduit à la production de deux types de spores ou conidies (également appelées aleuries) : des spores unicellulaires appelées microconidies ou microaleuries et des spores pluricellulaires, à base tronquée et cloisonnée transversalement comme les macroconidies ou macroaleuries (Chabasse et al., 2004).

III-2-2- Classifications des dermatophytes

La classification des dermatophytes a évolué au cours du XXe siècle. Sabouraud en 1910, retient l'existence de quatre genres en se basant sur la morphologie des parasites dans les poils et les squames infectés. Il distingue alors : Microsporum, Trichophyton, Achorion et Epidermophyton (Bussieras et al., 1993). Langeron et Milochevitch En 1930, proposent à leur tour une classification basée sur l'aspect microscopique des cultures, retenant différents genres : Epidermophyton, Sabouraudites, Ctenomyces et Trichophyton. En 1950,

VanBreuseghem ajoute deux nouveaux genres à cette classification : Langeronia et Keratinomyces (Euzeby, 1992).

Les classifications d'Emmons (1934) et de Rivalier (1966) reposent sur l'aspect des dermatophytes en vie parasitaire et en culture. Cette dernière retient l'existence de trois genres : Microsporum, Trichophyton et Epidermophyton. C'est cette classification que nous utilisons aujourd'hui (Moulinier, 2002).

III-2-2-1-Morphologie

III-2- 2-1-1- En vie parasitaire

Les filaments sont mycéliens cloisonnés de 2 à 4µm, plus ou moins ramifiés, ainsi que des arthroconidies provenant de leur fragmentation, de taille variable (2 à 12µm de diamètre). La disposition des filaments et des arthroconidies au sein des poils parasités permet de distinguer deux types d'infection pileaire :

- *Type ecotothrix* : les filaments sont à l'intérieur du poil et les arthroconidies étant à l'extérieur ;

- *Type endothrix* : les filaments et les arthroconidies sont à l'intérieur du poil, une variante de ce type, le type favique est caractérisé par un petit nombre de filaments qui se fragmentent pour former des « targes faviques » qui sont des amas plus ou moins polygonaux d'arthroconidies (Guillet, 2002).

III-2-2-1-2- En culture

Les dermatophytes étant classés selon l'aspect microscopique et macroscopique des colonies obtenues (Aboulmakarim et al., 2010 ; Chabasse et al., 2004).

- *Aspect macroscopique*

L'aspect macroscopique des cultures sur milieu de Sabouraud peut être glabre ou au contraire duveteux, voir cotonneux, ou bien encore poudreux. La couleur du pigment visible au recto de la culture varie selon le dermatophyte en cause. Elle est en générale blanchâtre, jaunâtre ou rosée. Le verso est quant à lui jaune, orange pourpre ou brun (Guillet, 2002).

- *Aspects microscopiques*

- Le genre *Epidermophyton* (Sabouraud, 1907) est caractérisé par l'absence de microconidies et par la présence de macroconidies à paroi mince en forme de massue.

- Le genre *Microsporium* (Gruby. 1843) est caractérisé par des macroconidies rondes ou piriformes, mais souvent rondes.

- Le genre *Trichophyton* (Mamstem. 1845) est défini par la présence des macroconidies plus petites, à parois lisses et minces et des microconidies, rondes ou piriformes selon les espèces (Chabasse et al., 2004).

III-2-3- *Trichophyton rubrum*

C'est un champignon filamenteux microscopique¹ rattaché aux *Ascomycota*, sans forme sexuée connue et ayant une affinité particulière pour la kératine (protéine de l'épiderme, des ongles, poils, et cheveux). Ce dermatophyteanthrophile est le responsable principal des dermatophytoses des pieds (ou pieds d'athlète, tinea pedis) et des ongles (onychomycose, onyxis, tinea unguium).

C'est actuellement le dermatophyte le plus fréquemment isolé dans les laboratoires à partir des mycoses des pieds en Europe et en Amérique du Nord. Dans certaines régions, comme l'Afrique, il est principalement responsable de la mycose de la peau glabre (herpès circiné, tinea corporis) et des cheveux (teigne, tinea capitis). C'est un parasiteobligatoire de l'homme qui est difficilement transmissible aux animaux. Peut-être originaire d'Afrique, il s'est ensuite répandu dans le monde entier au XX^e siècle (Gräser, 2007).

III-2-3-1- Caractères culturaux

La croissance est rapide : les colonies apparaissent en 10jours. Elles sont habituellement granuleuses (Fig.4) de couleurs claire ou beige avec un pigment rouge marron fonce au centre (Yazdanparast, 2006).

III-2-3-2- Morphologie microscopique

On observe de nombreuses macroconidies à paroi lisse et mince avec plusieurs cloisons (1 à 10), isolées ou en bouquets et de forme variable, la taille est 10 à 85 µm sur 4 à 15 µm. Microconidies unicellulaires, piriformes en acladium ou rondes. Les microconidies sont l'agent causal primaire des infections de la peau et des ongles (Yazdanparast, 2006).

III-2-4- *Microsprum gypseum*

C'est un dermatopyyte casmopolite tellurique la contamination s'effectue à partir du sol (plaie souillée de terre) ou par le biais d'un petit mammifère sauvage (rat mulot) ou domestique (chien et chat).

Il détermine des épidermophyte circinées des parties découvertes très inflammatoires et des folliculites on voit également des sycosis chez l'homme et des kérions chez l'enfant il n'y a pas d'atteinte de l'ongle. Il n'y a pas fluorescence des cheveux ou des poils à l'examen sous lampe Wood (Boucher et al., 2001).

III-2-4-1-Caractères cultureux

La croissance est rapide : les colonies apparaissent en 4 à 5 jours et sont caractéristiques en une semaine Elle sont planes habituellement poudreuses ou granuleuses (Fig. 5) (en "éclaboussure de plâtre") mais parfois plus duveteuses le recto est chamois clair ou beige ("café au lait clair") et le verso brun chamois ou beige sans pigment diffusible (Boucher et al., 2001).

III-2-4-2-Morphologie microscopique

Le mycélium est rare en primoculture dans les souches poudreuses on observe de nombreuses macroconides elliptiques (en cocon) à paroi mince et échinulée elles comportent au maximum 6 logettes et mesurent de 40 à 60 mm de long sur 12 à 15 mm de large des microconidies piriformes sont plus rarement observées. La recherche d'organes perforateurs in vitro est positive (Boucher et al., 2001).

III-2-5-Microsporium audouinii

Dermatophyte authrophile originaire d'Afrique Noire, *M. audouinii* est l'une des espèces isolées de teignes du cuire chevelu en France. Il est à l'origine de teignes tondantes microscopique chez l'enfant et la femme, mais aussi d'épidermophyties circinées peu inflammatoires (Desbois et all, 2003).

III-2-5-1- Caractères cultureux

La croissance est modérément rapide. Les colonies, finement duveteuses ou parfois légèrement poudreuses, s'étalent en surface de la gélose (Fig. 6). Blanchâtres ou grisâtres au

recto, elles sont beige à saumon au verso. En vieillissant, elles acquièrent une texture plus épaisse et présentent des plis radiaux secondaires (Desbois et al., 2003).

III-2-5-1-2- Morphologie microscopique

Les filaments mycéliens, cloisonnés, sont assez épais et présentent parfois des dilatations (mycélium en raquette), des chlamydospores intercalaire ou terminales, et des organes pectinés. Certaines souches produisent des microconidies piriformes souvent nombreuses et parfois des macroconidies comparables à celles de *M.canis*, mais déformées (aspect en bissac avec étranglement au centre) (Desbois et al., 2003).

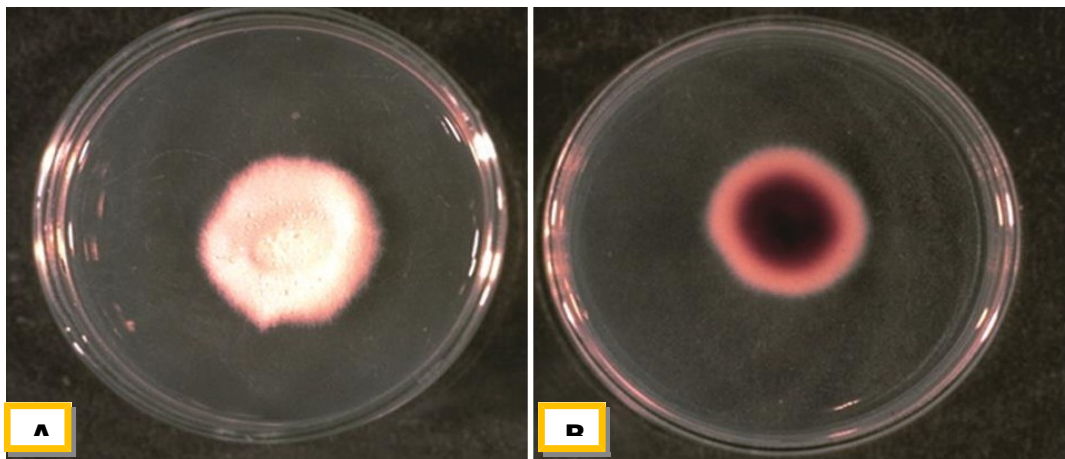


Figure 5 : (Chabasse et al., 2004). **A** - *Trichophyton rubrum* sur Sabouraud. Aspect macroscopique (recto), **B** - *Trichophyton rubrum* sur Sabouraud. Aspect macroscopique (verso)

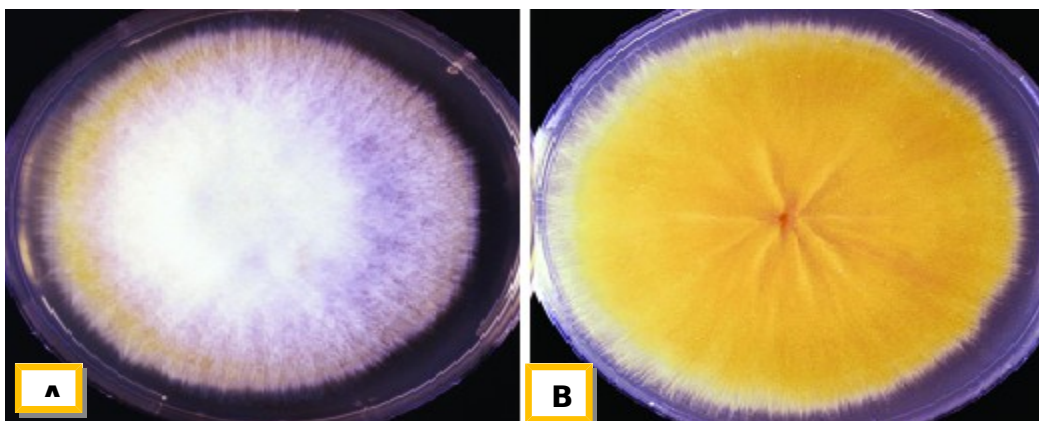


Figure 6 : (Chabasse et al., 2004). **A** - *Microsprum gypseum* sur Sabouraud. Aspect macroscopique (recto), **B** - *Microsprum gypseum* sur Sabouraud. Aspect macroscopique (verso)

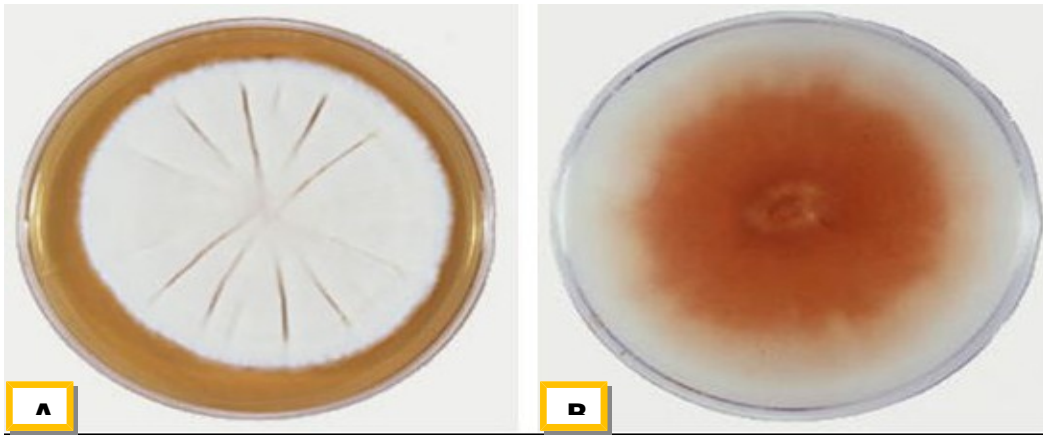


Figure 7 : (Fromage et al., 2010). **A** - *Microsporium audouinii* sur Sabouraud. Aspect macroscopique (recto), **B** - *Microsporium audouinii* sur Sabouraud. Aspect macroscopique (verso).

Partie expérimentale **Matériels et Méthodes**

I- Matériels et méthodes

I-1- Matériels

I-1-1- Site et conditions d'échantillonnage

Le matériel végétal utilisé est composé de feuilles et fleurs de *Thymelaea hirsuta*.

Ces différents organes ont été cueillis en mars 2013 ; au cours de la saison de floraison, dans une zone localisée dans la région de Sidi M'barek à 15 Km de la wilaya de Bordj Bouareridj (Algérie). Cette dernière est située à 966 m d'altitude, 35°55'33"N de l'attitude et 36°16'14" de latitude Nord et 4°54'43" de longitude Est (Fig. 8).

Les prélèvements, réalisés d'une manière aléatoires, ont été transportés dans des sacs en plastique noir jusqu'au laboratoire.

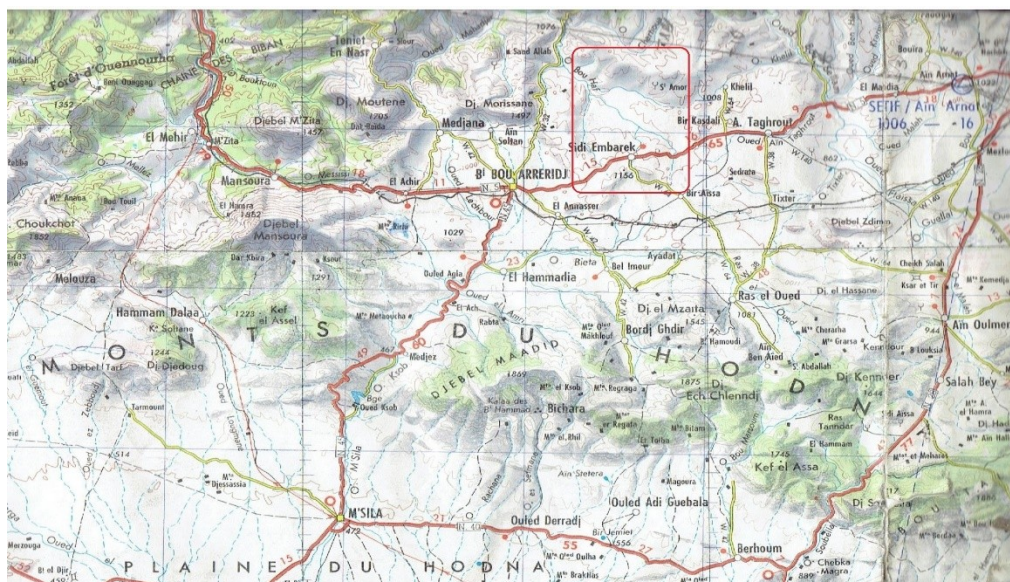


Figure 8 : zone de prélèvement de *Thymelaea hirsuta* ()

I-1-1-1 Drogue végétale

Au laboratoire, les rameaux frais ont été étalés et laissés sécher à l'air libre, à l'abri de la lumière et à la température ambiante pendant un mois. L'impossibilité de séparer les fleurs des feuilles a plaidé pour un mélange des deux, et séché à l'étuve (30°C) afin d'obtenir un poids constant.

Après séchage, le mélange a été broyé en poudre fine (drogue) à l'aide d'un mortier en porcelaine. Ce broyage a permis de rompre les membranes cellulaires et la matrice extracellulaire et de libérer en même temps les organites et les molécules contenues dans la cellule (Lafont et Duval, 2001). Sous cette forme, la drogue présente une plus grande surface

Partie expérimentale

Matériels et Méthodes

de contact avec le solvant extracteur et permet ainsi d'améliorer le rendement des extractions (Bonnaillie et al., 2012).

Pour son utilisation ultérieure et afin d'empêcher sa photo-oxydation, la drogue a été conservée à l'obscurité dans des bocaux hermétiquement fermés. Les précautions prises visent à réduire les divers mécanismes de dégradation relatifs aux caractères organiques de ses matières premières (Ferrari, 2002), à savoir la dénaturation des métabolites secondaires tels que les huiles étherées (évaporation au-delà de 40° C)..... (Kümkele et Lobmeyer, 2007).

I-2- Méthodes

I-2-1- Préparation des extraits

Deux méthodes ont été retenues pour la préparation des extraits :

I-2-1-1 Les solvants

Les quatre premiers extraits ont été préparés par des solvants volatiles à polarité croissante (éther de pétrole, dichlorométhane, méthanol et éthanol 80%), tandis que le cinquième est extrait avec l'eau distillée (Diallo et al., 2004).

Ces solvants ont été choisis non seulement pour leur pouvoir de pénétration et de stabilisation très élevée vis-à-vis des molécules cibles, mais aussi pour leur action non destructrice de la matière végétale (Haya et Amour, 1992).

Le premier extrait a été préparé après agitation continue de 250g de poudre végétale (Feuilles/Fleurs) dans 3 X 500 mL d'éther de pétrole pendant 3 X 24 heures. Après filtration du mélange sur papier filtre en microfibre de verre de Wattman N° 4, le volume du filtrat a été réduit par évaporation du solvant sous vide à 40°C (afin d'éviter les dégradations thermiques) à l'aide d'un évaporateur de type Buchi. Enfin, la patte (**E1**) ainsi obtenue après séchage de la solution concentrée à l'air libre pendant 24h a été conservée à 4°C dans un flacon sombre.

Le marc de la première extraction a été repris ensuite en agitation mécanique avec 3 X 500mL de Dichlorométhane pendant 3 X 24h. Le second extrait (**E2**) a subi une filtration, évaporation du solvant, concentration, séchage à l'air libre et conservation à 4°C dans un flacon sombre comme précédemment.

Le mac de l'extraction précédente a été mélangé avec 1500ml de Méthanol (**E3**) pendant trois jours puis repris ensuite avec 3 X 500mL d'Ethanol 80% (**E4**) et laissé sous agitation pendant 3 X 24h. A la fin de chacune de ces deux extractions, les solutions ont été filtrées sous vide à l'aide de filtres en microfibres de verre de Wattman N° 4. Par contre, le marc qui a été isolé puis séché sous abri et à l'air libre pendant 24h, a été ensuite porté à

Partie expérimentale

Matériels et Méthodes

50°C, puis à 100°C avec 1500mL d'eau distillée, à chaque fois pendant trois heures (E5), enfin une filtration a permis de séparer l'extrait aqueux.

Les extraits méthanolique et aqueux ont été de mêmes concentrés sous vide à 40°C au Rotavapor puis lyophilisés sauf l'éthanol qui a été concentré sous vide à plus de 60°C (Virtis, Benchtop 3L).

1-2-1-2 Technique d'hydrodistillation :

L'utilisation des plantes médicinales contenant une substance chimique bénéfique pour des vertus thérapeutiques ou alimentaires varies suivant la substance est extraite des feuilles ou bien des fleurs en utilisant généralement l'hydro distillation. Le procédé le simple et souvent utilisé, consiste a employer un liquide et de la chaleur.

Les huiles essentielles sont des substances extrêmement puissantes, pouvant concentrer jusqu'à 100 fois certain principes actifs de la plante fraiche. L'huile essentielle (E6) de *T. hirsuta* a été préparé à partir d'un mélange de feuille/ fleurs séchées à l'air (300 g) par hydrodistillation dans un Appareil de type Clevenger selon la méthode préconisée dans la pharmacopée européenne (2004) en utilisant 1,5 L d'eau distillée pour 3 h. Le sulfate de sodium anhydre était utilisé pour éliminer l'eau après l'extraction. Après filtration l'huile a été conservée à 4° C jusqu'à L'utilisation.

Le rendement en huile essentielle de la partie aérienne de *Thymelaea hirsuta* est calculé à partir du poids de l'huile essentielle par rapport au poids sec de la masse végétale utilisé dans l'hydrodistillation, (Carré, 1953 ; In Mohammedi, 2006) :

$$\text{Rdt} = \text{Mhe} / \text{Mvg} \times 100$$

Rdt : rendement en HE (en %)

Mhe : masse de l'huile essentielle

Mvg : masse végétale sec

I-2-2- Compositions chimiques

I-2-2-1- Screening phytochimique

Un criblage classique a été réalisé en vue de déterminer les grands groupes de composés chimiques présents dans les différentes parties de *Thymelaea hirsuta* (feuilles / fleurs).

Il est fondé sur des réactions de coloration ou de précipitation à l'aide de réactifs appropriés et a permis de suggérer la présence de certaines classes de phyto-constituants.

Partie expérimentale

Matériels et Méthodes

Les résultats sont classés selon l'apparition en :

- Réaction positive : +
- Réaction négative : -

I-2-2-1-1- Alcaloïdes

La mise en évidence des alcaloïdes a été réalisée grâce aux réactifs généraux de caractérisation des alcaloïdes. Le réactif de Dragendorff (Annexe I) (réactif à l'iodomercurate de potassium) et le réactif de Mayer (réactif à l'iodomercurate de potassium) ont été utilisés. Une Solution à analyser a été préparée avec 10g de poudre végétale séchée et 50mL d'acide sulfurique (H₂SO₄) 10%. Après agitation, le mélange a été macéré pendant 24 heures à la température du laboratoire puis filtré sur papier filtre et rincé à l'eau distillée de manière à obtenir 50mL de filtrat. Ensuite, une caractérisation par précipitation a été effectuée. Dans trois tubes à essai, 1mL de filtrat a été introduit et 5 gouttes de réactif de Mayer (Annexe I) dans le premier tube, 5 gouttes de réactif de Dragendorff dans le second et en se servant d'un troisième tube sans réactif comme témoin. Après 15 minutes, la présence des alcaloïdes a été indiquée par la formation d'un précipité : blanc-jaunâtre dans le premier tube, orange dans le deuxième tube et orange abondant dans le tube témoin (Harborne, 2005).

I-2-2-1-2- Dérivés anthracéniques

-Mise en évidence des anthraquinones libres par le test de Bornsträger

Un gramme de poudre placé dans un tube avec 10ml de chloroforme. Le mélange a été chauffé pendant 3mn au bain-marie puis filtré à chaud et complété à 10mL. Ensuite, à 1ml de l'extrait chloroformique obtenu, 1mL d'Ammoniaque (NH₄OH) dilué a été additionné et agité. La présence d'anthraquinones libres a été indiquée par la coloration plus ou moins rouge.

-Mise en évidence des anthraquinones combinées

- Les O-hétérosides

A partir du résidu de la drogue épuisée par le chloroforme, un hydrolysate a été préparé auquel a été ajouté 10mL d'eau et 1mL d'acide chlorhydrique (HCl) concentré. Dans un tube à essai, l'ensemble a été ensuite maintenu au bain-marie bouillant pendant 15min. 5mL de l'hydrolysate ont été agités avec 5mL de chloroforme. Après décantation, la phase organique a été soutirée et mise dans un tube à essai. Celle-ci a été agitée avec 1mL d'Ammoniaque

Partie expérimentale

Matériels et Méthodes

(NH₄OH) dilué au demi. La présence d'anthraquinone a été révélée par la coloration rouge plus ou moins intense qui indique la présence de génines *O*hétérosides.

Si la réaction est négative ou faiblement positive, la recherche des *O*-hétérosides à génine réduite est nécessaire.

- Les *C*-hétérosides

La phase aqueuse, qui a été conservée au cours de la caractérisation des *O*-hétérosides, a été reprise par 10mL d'eau distillée et 1mL de chlorure de fer(III) (FeCl₃) 10%. Puis, le tube à essai a été maintenu dans un bain-marie bouillant (après ébullition) pendant 30 min. Après refroidissement sous courant d'eau, la solution a été agitée avec 5mL de chloroforme. La phase chloroformique soutirée a été secouée avec 1mL de NH₄OH dilué. L'existence des *C*-hétérosides est confirmée par la coloration plus ou moins rouge après agitation qui indique la présence de génines *C* hétérosides (Diallo, 2005).

I-2-2-1-3- Tannins

1,5g de matière végétale sèche et broyée (feuilles+fleurs) a été placé dans un tube à essai contenant 10mL de méthanol 80%. Après 15mn d'agitation, l'extrait filtré a été partagé dans deux tubes à essai ; le premier constitue le témoin. L'ajout de quelques gouttes de FeCl₃ 1% entraîne un changement de couleur vers le bleu noir en présence des tanins galliques et en brun verdâtre indiquant la présence des tanins catéchiques (Rizk, 1982).

I-2-2-1-4- Saponosides

Deux grammes de poudre feuilles/fleurs ont été mélangés avec 100mL d'eau distillée pour préparer un décocté et porter ensuite à ébullition pendant 30mn. Après refroidissement et filtration, le volume a été réajusté à 100mL pour obtenir une solution mère. Celle-ci a été répartie par la suite dans 10 tubes à essai en 1, 2, 3.....10ml et réajusté avec de l'eau distillée pour obtenir un volume final de 10mL. Les tubes ont été agités dans le sens de la longueur pendant 15 seconde puis laissés reposer pendant 15 minute. La présence des saponosides est indiquée par un indice supérieur à 100 (Harborne, 2005). Le tube dans lequel la hauteur de la mousse est de l'ordre d'un cm permet de calculer l'indice de mousse.

$$\text{Indice de mousse (Idm)} = 10 / n \times 10^{-2}$$

Où : **n** : numéro du tube dans lequel la hauteur de la mousse est égale à 1cm.

Partie expérimentale

Matériels et Méthodes

I-2-2-1-5- Flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été mis en évidence par la réaction à la cyanidine. A l'infusé à 5% (5mL), ont été ajoutés un acide (5mL de H₂SO₄ à 10%) puis une base (5mL de NH₄OH).

Si la coloration s'accroît par acidification, puis vire au bleu-violacée en milieu basique, cela confirme la présence d'anthocyanes.

- Mise en évidence de la réaction à la cyanidine

Après avoir introduit dans un tube à essai 5mL d'infusé et 5ml d'alcool chlorhydrique (éthanol 95%, eau distillée et HCl concentré à volumes égales), quelques copeaux de magnésium et 1mL d'alcool iso-amylque ont été ajoutés. L'apparition d'une coloration rose orangée (flavones) ou rose violacée (flavonones) ou rouge (flavonols) rassemblée dans la couche surnageante d'alcool isoamylique indique la présence d'un flavonoïde libre (génines). Les colorations sont moins intenses avec les hétérosides flavoniques. La réaction est négative avec les chalcones, les dihydrochalcones, les aurones, les catéchines et les iso-flavones.

- Mise en évidence des Leucoanthocyanes

Une réaction à la cyanidine a été effectuée sans ajouter les copeaux de magnésium et chauffée au bain-marie pendant 15min. La présence de leucoanthocyanes a été indiquée par le développement d'une coloration rouge cerise ou violacée. Les catéchols donnent une teinte brunrouge.

- Mise en évidence des flavanes

Deux millilitres d'infusé à 10% ont été mélangés à l'acide chlorhydrique concentré renfermant de la vanilline (2%). La réaction positive a été révélée par l'apparition d'une coloration rouge ([Harborne, 2005](#)).

I-2-2-1-6- Stérols et triterpènes

Deux grammes (2g) de poudre végétale ont été mis dans 40mL d'éther. Après une macération de 24 heures, le mélange a été filtré et complété à 20ml (extrait éthérique). Ensuite, 10mL de l'extrait ont été évaporés à sec au bain-marie et le résidu a été repris et dissout avec 1ml d'anhydride acétique, puis 1ml de chloroforme (CHCl₃). Cette solution a été partagée entre deux tubes à essai, l'un servant de témoin, alors que dans le second 2ml de H₂SO₄ concentré ont été coulés. La présence des stérols et des triterpènes a été révélée par la formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides, et la couche surnageante devenant verte ou violette, comme rapporté par [Harborne \(2005\)](#).

Partie expérimentale

Matériels et Méthodes

I-2-2-1-7- Anthocyanes

Deux millilitres d'infusé (5%) ont été additionnés à 2ml d'acide chlorhydrique 2N. La présence d'anthocyanes a été montrée par l'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacée par addition d'ammoniac (Senhaji et al., 2005).

I-2-2-1-8- Quinones

1g de poudre végétale a été introduit dans un erlenmeyer de 250mL, puis humidifié avec H₂SO₄ dilué à 10%. Ensuite, 20mL d'un mélange à volume égal d'éther et de chloroforme ont été ajoutés et laissé réagir pendant 24 heures. Après filtration, 5mL du filtrat a été placé dans une capsule et évaporé à sec, puis le résidu a été repris par quelques gouttes d'alcool 95°. Une solution d'acétate de Nickel 5% a été ajoutée. Selon la nature de la quinone, il est apparu :

Une coloration bleue et précipité : Benzoquinones ;

Une coloration violette et précipité : Naphtoquinones ;

Une coloration rouge sans précipité : Anthraquinones (Harborne, 2005).

I-2-2-1-9- Mucilages

Après avoir introduit 1mL de décocté (10%) dans un tube à essai, 5mL d'éthanol absolu ont été ajouté, suivi d'une agitation. Le mélange a été reposé pendant une dizaine de minutes et la présence de mucilage dans la drogue a été indiquée par l'obtention de précipité floconneux (Amadou, 2005).

I-2-2-1-10- Protéines

1mL d'extrait végétal été additionné a 5ml de solution A (98ml de Carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 2% dans Hydroxyde de sodium (NaOH) 0,1N, 1mL de sulfate de cuivre à 1% et 1mL de tartrate double de potassium sodium). Après avoir agité et laissé au repos pendant 10 minutes, 0,5mL de réactif de Folin ont été ajoutés. Ensuite, le mélange a été agité énergiquement puis laissé reposer pendant 30 minutes. La présence de protéines a été indiquée par l'apparition d'une coloration bleue (kone, 1998).

1-2-3-Etude microbiologique

1-2-3-1-Les microorganismes utilisés

Deux bactéries pathogènes ont été testées ils s'agissent de : *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* ; Les bactéries ont été récupéré dans le laboratoire de microbiologie au centre hospitalo-universitaire (CHU) Saadna Abdenour de Sétif (Algérie).

Partie expérimentale

Matériels et Méthodes

Trois champignons sont utilisés dans cette étude : *Trichophyton Rubrum*, *Microsporium audouini* et *Microsporium Gypseum* et issues à partir des prélèvements des malades (la peau) au centre hospitalo-universitaire (CHU) Bendadis de Constantine (Algérie).

I-2-3-2- Préparation des solutions

La réalisation des tests antibactériens exige la préparation des solutions neutres à Ph7 et une pression osmotique cellulaire. De ce fait, les extraits ont été dilués dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). Ce dernier constitue le meilleur solvant utilisé (Bisignano et al., 2000).

■ Solutions mères

Pour chacun des différents extraits, une solution mère homogène a été préparée à raison de 10mg/mL avec le DMSO.

I-2-3-3- Préparation des dilutions

Les dilutions ont été préparées à partir des différentes solutions mères. Il s'agit des concentrations suivantes ; 0,5, 1 et 5mg/mL

1-2-3-4- Préparation des cultures

Les bactéries étudiées (*Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*) ont été revivifiées et repiquées dans la gélose nutritive, puis incubées à des températures optimales de développements (37C°) pendant 18 heures pour l'obtention d'une culture jeune. Par la suite, des suspensions troubles de ces souches seront réalisées en prélevant 3 à 5 colonies bien isolées et identiques. On les dépose dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9% puis on agite au vortex. Les concentrations bactériennes de l'inoculum sont évaluées par turbidité et sont exprimées par la mesure de la densité optique (DO à 600 nm) sur un spectrophotomètre. Une DO de 0.08 à 0.1 correspond à une concentration de 10⁸ UFC/ml (ATHAMENA et al., 2010 ; KARATAS et al., 2010 ; SARAC et al., 2007; YEN TAN et al., 2006 ; RAHAL et al.,2005).

I-2-3-5- Les tests antimicrobiens

Afin de vérifier l'activité antibactérienne de chacun des extraits employés, deux méthodes de traitement ont été effectuées. La première consiste à entraîner des disques en papier imprégnés par les différentes solutions préparées au préalable dans des cultures microbiennes des espèces cibles dont l'efficacité développe des zones d'inhibitions

Partie expérimentale

Matériels et Méthodes

bactériennes. La seconde à mesurer la croissance bactérienne par contact direct avec les extraits de *Thymeleae hirsuta*.

I-2-3-5-1 Technique de diffusion en milieu gélosé

La technique de diffusion en milieu gélosé a été réalisée sur le milieu standard de Muller-Hinton (Fauchère, 1997) et l'ensemencement par étalement à l'aide d'un écouvillon à partir de l'inoculum préparé.

La mise en évidence de l'efficacité des extraits a été révélée par un test réalisé à l'aide des solutions mères (10 mg/ml), par contre la CMI a été déterminée par les dilutions des différents extraits ayant montrés leurs effets sur les bactéries cibles.

a- Mise en évidence

Les souches bactériennes sont mises en pré culture dans un bouillon B.H.I.B. à 37°C pendant 24h. A partir de ce pré culture de 24h les bactéries sont ensemencées dans un nouveau milieu B.H.I.B et incubées à 37°C et ce de telle sorte à prendre les cultures en phase exponentielle dans le but de tester l'effet inhibiteur des solutions préalablement préparées sur la croissance des souches étudiées.

Les bactéries sont ensuite étalées à la surface du milieu Mueller Hinton préalablement coulé dans des boîtes de Pétri.

Des disques non imprégnés de diamètre de 5mm sont trempés dans les solutions mères de chaque extrait et déposés sur la surface du milieu gélosé .Dans les mêmes conditions expérimentales, un témoin a été préparé par trempage d'un disque dans le DMSO. Les extraits ont été laissés ensuite se diffuser sur gélose à 4°C pendant 3 heures, puis incubés à 37°C pendant 24 heures. Cette expérience est répétée trois fois

b- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Pour chacun des extraits, de nouveaux disques ont été imprégnés de solutions diluées (0,5, 1 et 5mg/mL) tout en suivant la méthode décrite précédemment (mise en évidence).

Les essais ont été effectués en trois répétitions et mis à incuber pendant 24h à 37°C après diffusion des solutions sur la gélose.

I-2-3-5-2- Technique de contact

Cette technique consiste à dénombrer les bactéries cibles qui ont été mises en contact direct avec les extraits naturels de *Thymeleae hirsuta*, c'est une technique de mesure de la viabilité des bactéries traitées.

Partie expérimentale

Matériels et Méthodes

Deux sortes d'inoculum bactérien ont été préparées à raison de 1×10^6 pour chacune des bactéries en présence des extraits (5mg/mL), puis incubées à 37°C pendant 12h.

Après incubation, 100µL de chaque inoculum ont étéensemencés dans des boîtes de Pétri coulées en milieu Chapman pour les *S. Aureus* et en milieu sélectif pour dénombrement aux *P. aeruginosa*, puis ré-incubés à 37°C pendant 24h.

I-2-3-6- Estimation de la croissance bactérienne

La croissance bactérienne est estimée en log (N) sachant que N représente le nombre d'unités formant les colonies par mL (UFC/mL). Son calcul se fait par le dénombrement des boitesensemencées après traitement par les extraits. Le log (N) estimé après traitement est comparé à celui du départ (témoin) afin d'évaluer l'activité inhibitrice des extraits.

I-2-3-7- Estimation du taux d'inhibition de la croissance bactérienne

Les résultats obtenus à partir des estimations de la croissance bactérienne sont aussi exprimés en pourcentage (%) par rapport à la croissance bactérienne du témoin selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = [\log (N_{T0}) - \log (N_{T4}) / \log (N_{T0})] \times 100$$

Log (N_{T0}) : croissance bactérienne au temps T₀ (témoin).

Log (N_{T4}) : croissance bactérienne au temps T₄ après traitement.

I-2-4 Analyses des champignons

I-2-4-1- Examen direct (identification directe)

➤ L'état frais

La technique varie en fonction du prélèvement : Squames, cheveux, ongles étant opaques, il est nécessaire de les rendre transparents pour pouvoir les examiner au microscope. Cet éclaircissement peut se faire au moyen de diverses solutions : Potasse à 30%, Chlorallactophénol d'Amman (mélange d'hydrate de chloral, d'acide lactique et de phénol en parties égales) afin de digérer la kératine et faciliter la visualisation des éléments fongiques.

On dispose sur une lame propre, une partie du matériel prélevé, on le dilacère à l'aide d'une pointe de bistouri, puis on le recouvre d'une ou deux gouttes de la solution éclaircissante choisie, puis d'une lamelle.

Une bonne dissociation prend de cinq à vingt minutes, suivant l'épaisseur et la nature du matériel à examiner. Les ongles étant les plus lents à devenir transparents. S'il s'agit d'un liquide pathologique, on y dispose une goutte sur la lame à l'aide d'une pipette Pasteur, on y ajoute une

Partie expérimentale

Matériels et Méthodes

ou deux gouttes de solution éclaircissante et en recouvre d'une lamelle (Quentin, 1984), puis on, passe à l'observation microscopique au grossissement (400X). Cet examen permet de mettre en évidence la présence de germes pathogènes (Lansac et lecomte, 1984).

L'examen microscopique doit se faire d'abord à un grossissement faible pour repérer les éléments fongiques, puis à un grossissement fort pour obtenir une image plus détaillée, permettant par exemple de distinguer les filaments vrais des pseudo-filaments.

Tout examen négatif doit être répété, à partir du même prélèvement. Il arrive que des champignons ne soient mis en évidence qu'après plusieurs examens pratiqués avec persévérance et minutie.

NB : le manipulateur doit respecter les conditions d'asepsie rigoureuses afin d'éviter toute contamination.

I-2-4-1-1 Examen indirect

➤ Mise en culture

- **Les milieux utilisés**

Le laboratoire a recours à différents milieux de culture, organiques ou synthétiques le plus fréquemment utilisé est le milieu *SABOURAUD* avec ou sans antibiotiques (chloramphénicol ou gentamicine).

Le milieu de *SABOURAUD* avec antibiotique (chloramphénicol) et Cycloheximide (Actidione) est plus sélectif. L'Actidione est un antifongique sélectif inhibant les contaminants les moisissures et la plupart des levures.

Ce milieu est particulièrement utilisé pour les prélèvements d'origine cutanée ou unguéale.

La présence de l'Actidione dans le milieu de culture est un critère d'orientation dans l'identification :

- **Développement des colonies**
- **Ensemencement et purification**

L'ensemencement est effectué avec une anse métallique, à partir des squames, de cuir chevelu ou d'ongles devant la flamme du bec bunsen (zone stérilisée pour éviter toute contamination), L'échantillon est introduit dans le tube à essai ou disposé sur la boîte de pétri.

L'ensemencement est fait par étalement en surface ou par des stries sur la gélose.

Après l'isolement, les géloses ensemencées sont portées à la température ambiante (ce qui correspond à la température de la peau), des repiquages successifs ont été effectués jusqu'à l'obtention de cultures pures.

Partie expérimentale

Matériels et Méthodes

L'identification des souches étudiées repose sur un ensemble de critères, notamment la vitesse de croissance, mais surtout sur les aspects macroscopique et microscopique des colonies sur la primoculture.

a. Examen macroscopique des cultures

Il comporte l'analyse de la couleur des colonies, de leur forme (ronde, étoilées,...), de leur relief (plates, plissées,...), des caractéristiques de leur surface (duveteuse, poudreuse, granuleuse, glabre,...), de leur consistance (molle, élastique, cartonnée,...) et de leur taille (réduite ou au contraire étendue).

b. Examen microscopique des cultures

La culture en boîte de pétri permet d'observer au microscope par transparence (objectif 10) les filaments mycéliens et de rechercher certains aspects particuliers.

Un montage entre lame et lamelle sera ensuite réalisé dans du bleu lactique, à l'aide de cellophane adhésive transparente (ou scotch), ou par dissociation d'un fragment de colonies au vaccinostyle. On étudiera :

- L'aspect des filaments mycéliens.
- La présence de chlamydospores parfois disposées en chaînettes, ou au contraire isolées et terminales.
- L'abondance et la morphologie des microconidies.

I-2-4-2 Traitements

Dont le but de vérifier l'activité antifongiques de chacun des extraits employés, le traitement a été réalisé selon la méthode décrite par [Jong-Gyu et al \(1976\)](#), qui consiste à mesurer la croissance mycélienne des champignons par contact direct avec les extraits de *Thymeleae hirsuta*.

I-2-4-2-1 Préparation des dilutions

Les dilutions ont été préparées à partir des différentes solutions mères. Il s'agit des concentrations suivantes ; 0.4, 0.45, 0.5, 0.65, 0.85 et 1 µg/mL.

I-2-4-2-2 Technique du contact

Cette technique consiste à mesurer la croissance mycélienne des champignons au contact avec les extraits de *Thymelaea hirsuta*.

Partie expérimentale

Matériels et Méthodes

Les dermatophytes, ont été cultivés à 25° C pendant 7 jours sur milieu Sabouraud dextrose agar (SDA) additionné de chloramphénicol (Annexe II) et de cycloheximide (Actidione 0,5g/l)

pour éviter une éventuelle contamination par les champignons du genre *Aspergillus*.

Après stérilisation et répartition des milieux dans des boîtes de pétri à raison de 15 ml par boîte. Une quantité de 1ml de chaque concentration sont rajoutées à chaque boîte de Pétri contenant le milieu de culture en surfusion. Après solidification du milieu l'ensemencement se réalise avec des explants de 5 mm de diamètre prélevés d'une culture âgée de 7 jours, à l'aide d'un emporte-pièce stérile. Ces explants sont déposés dans un puits creusé préalablement avec une pipete pasteur stérile au centre de la boîte de pétrie contenant des doses croissantes de l'huile essentielle. Trois répétitions sont retenues pour chaque concentration.

Remarque : Trois répétitions sont retenues pour chaque concentration et pour chaque souche.

I-2-4-2-3 Estimation de la croissance mycélienne

Pour l'estimation de la croissance mycélienne, la technique utilisée est celle décrite par [BREWER \(1960\)](#) et [LEACH \(1962\)](#) qui consiste à mesurer la croissance linéaire et diamétrale des colonies en utilisant la formule :

$$L = D - d/2$$

L : croissance mycélienne.

D : diamètre de la colonie.

d : diamètre de l'explant.

I-2-4-2-4 Estimation des taux d'inhibition de la croissance

L'action des extraits exercés sur la croissance mycélienne est exprimée en pourcentage (%) par rapport à la croissance mycélienne du témoin (concentration nulle en extraits) selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = (1 - L/L) \times 100$$

L : croissance mycélienne du témoin.

I : croissance mycélienne du champignon subissant le traitement.

I-3- Analyse statistique:

Partie expérimentale

Matériels et Méthodes

Le traitement des données a été réalisé par l'utilisation de Microsoft Office Excel 2003 pour le classement des données brutes et pour l'élaboration des graphes et par l'utilisation de Stat box version 6.0 pour l'analyse de l'ANOVA et le test de Newman-Keuls.

I-3-1- Principe de l'analyse de la variance (ANOVA) :

L'analyse de la variance (terme souvent abrégé par le terme anglais ANOVA : *Analyse of Variance*) est une technique statistique permettant de comparer les moyennes de plus de deux populations.

Le principe consiste à chercher le rapport entre la variance entre les groupes (variance intergroupes) et la variance à l'intérieur des groupes (variance intragroupes). La valeur de ce rapport appelé F est comparée à celle d'une table de f de Snedecor, table à double entrée avec pour numérateur le nombre d'échantillons (k) moins un soit (k-1) et pour dénominateur le nombre total de mesures moins k soit ($k_n - k$) (Degrade, 1993).

- Si $F(\text{calculé}) > F(\text{théorique})$ l'hypothèse d'égalité des moyennes est rejetée donc il y a différence significative.
- Si $F(\text{calculé}) < F(\text{théorique})$ l'hypothèse nulle d'égalité des moyennes est acceptée.

Dans le cas où $F(\text{calculé}) > F(\text{théorique})$ l'ANOVA est suivi d'une comparaison des moyennes des groupes deux par deux et appelée test de Newman-Keuls.

I-3-2- Principe du test de Newman-Keuls :

C'est une procédure de comparaison multiple qui permet de comparer toutes les paires de moyennes en contrôlant le risque alpha global, à un niveau défini. C'est une démarche par étape, reposant sur une distribution de rangs de Student (*Studentized range distribution*). Bien qu'il ne fournisse pas d'estimation de l'intervalle de différence entre chaque paire de moyennes, il indique quelles moyennes sont significativement différentes des autres (Vessereau, 1992).

I-3-3- Choix du dispositif expérimental d'analyse :

Le dispositif d'analyse a été établi selon deux critères de classification (bifactoriel en randomisation avec répétition) pour les variables zone d'inhibition et croissance microbienne pour chaque espèce testée.

II-RESULTATS ET DISCUSSION

II-1- Extraction de l'huile essentielle

L'huile essentielle de *Thymelaea hirsuta* obtenue par hydrodistillation est de couleur verdâtre.

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

$$\text{Rdt} = \text{Mhe} / \text{Mvg} \times 100$$

Le rendement en l'huile essentielle de la partie aérienne de *T. hirsuta* est de l'ordre de 3,3%. Ce rendement peut être considéré comme le plus faible comparativement aux espèces de même genre.

Une étude réalisée dans la région sud de la Tunisie a montré que le rendement en huile essentielle varie selon l'origine de la plante. Les valeurs obtenues en fonction de la région de récolte : (Gabès, Médenine et Benguerdane 0.36%, 0.60% et 0.30%, respectivement). Le 2ème paramètre considéré était le mois de la récolte, les valeurs observées sont de 0.32%, 0.42% et 0.15% respectivement pour les mois d'août, Novembre et Avril) (NEFFATI *et al.*, 2009).

Le rendement d'huile essentielle de *Pituranthos tortueux* de l'Egypte a été estimé à 0.56% par AL- GABY *et ALLAM*, (2000). Des études avaient montré, d'une part, l'influence de la technique d'extraction et, d'autre part, l'influence du cycle végétatif sur le rendement et la qualité de l'huile essentielle. Le temps de séchage de la plante influe également sur le rendement en huile essentielle (DEMARNE, 1985 ; BOUKHATEM *et al.*, 2010 ; MICHEL, 2011; ABDALLAH *et EZZAT*, 2011).

Pour cela la technique d'extraction joue, également un rôle important dans le taux de rendement en HE. Ainsi une extraction au carbone supercritique a donné un rendement de *C. copticum* allant jusqu'à 5,8% (w/w) et celui par hydrodistillation 2,8% (v/w) (Khajeh *et al.*, 2004), ajoutent que le temps d'extraction influence également le rendement .

Il semble, en fait que la teneur maximale en huile est obtenue quand toute les fleurs ont atteint leur pleine maturité, parce que les celices contiennent le plus grand nombre de glandes sécrétrices par unité de surface (Rahman *et al.*, 1999).

Selon Bakkali *et al.*, (2008), afin d'obtenir des HE de composition constante, elles doivent être extraites dans les même conditions à partir du même organe de la plante qui a été de plus en plus sur le même sol, sous le même climat et a été récolté dans la même saison.

Partie expérimentale
Résultats et discussion

II-2- Screening phytochimique

Les tests phytochimiques ont été réalisés tout en utilisant les réactifs de révélation spécifiques.

Le screening phytochimique a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de *T. hirsuta*. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation, de turbidité et d'observation visuelle d'un changement de couleur spécifique.

Les résultats illustrés dans les figures 9-10-11-12 - 13 et regroupés dans le tableau 2

Tableau 2 : Quelques métabolites secondaires détectés dans le mélange feuilles/fleurs de *Thymelaea hirsuta*

Les composés recherchés	Le mélange feuilles et fleurs
1-Tanins	
Catéchiques	(-)
Galliques	Coloration bleu noir (+)
2-Quinones libres	L'apparition de la couleur rouge (+)
3- Anthraquinones	Virage de couleur en rouge (+)
4- Anthraquinones combinés	
O-hétérosides	(-)
C-hétérosides	Virage de couleur vers le rouge (+)
5- Tèrènes et Stérols	Un virage de couleur vers le vert (+)
6- Saponosides	Des mousses persistantes dans tous les tubes à des hauteurs très faibles en quelques mm
7- Flavonoïde	Apparition d'une fluorescence bleue (+)
8-Alcaloïdes	Présence d'un louche net sans précipité (+)
Test de confirmation	(+)Un précipité très faible en rouge orange indique la présence des traces d'alcaloïdes.

Présence (+), Absence (-)

Partie expérimentale
Résultats et discussion

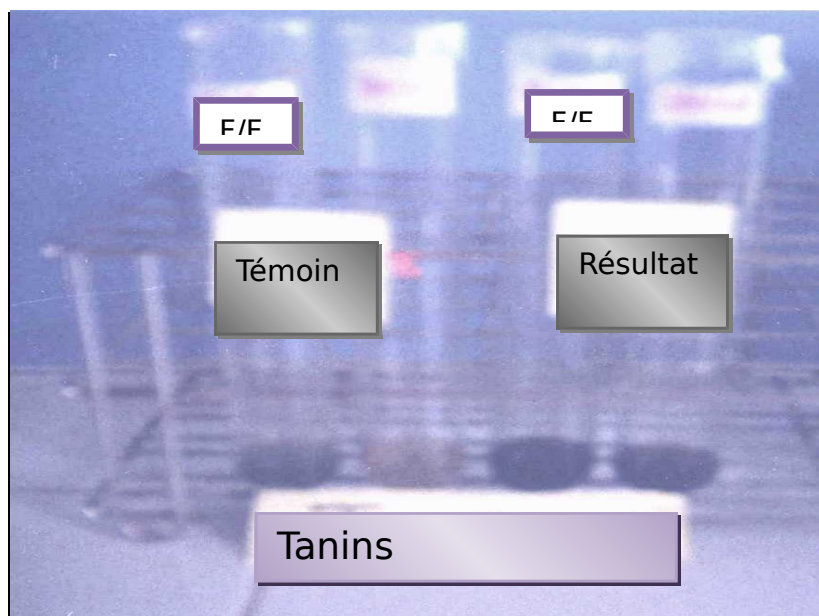


Figure 9: Recherche des tanins dans le mélange feuilles/flowers (F/F); un virage du Vert (témoin) vers le bleu noir (résultat).

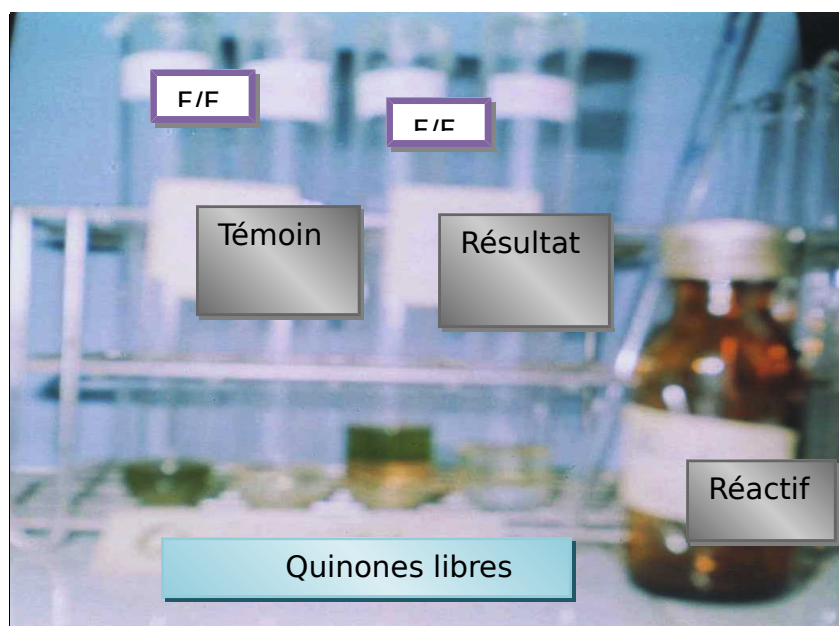


Figure 10 : Recherche des Quinones libres dans le mélange feuilles/flowers (F/F); un virage du vert (témoin) vers le rouge (résultat).

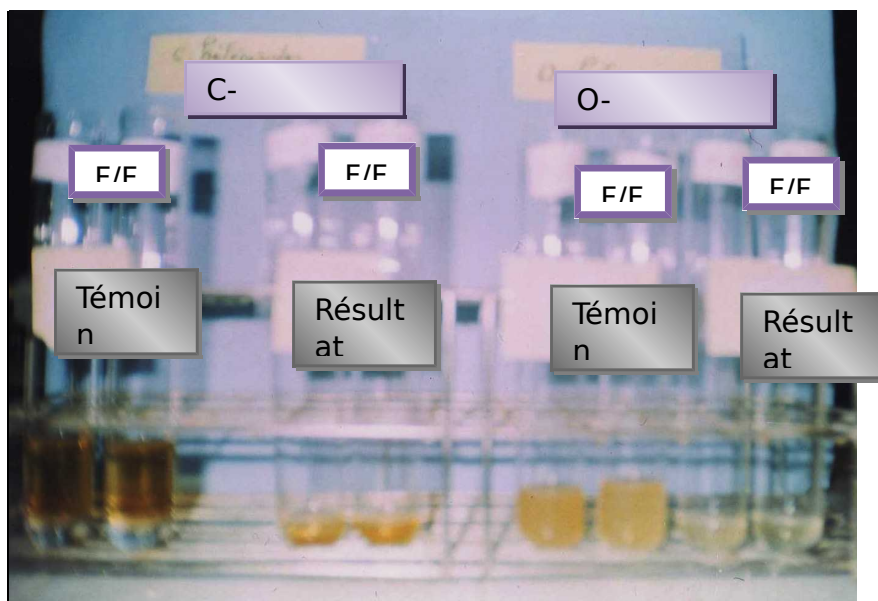


Figure 11: Recherche des Antraquinones combinés dans le mélange feuilles/leurs (F/F); virage du vert (témoin) vers le rouge (résultat), cas des C- hétérosides.

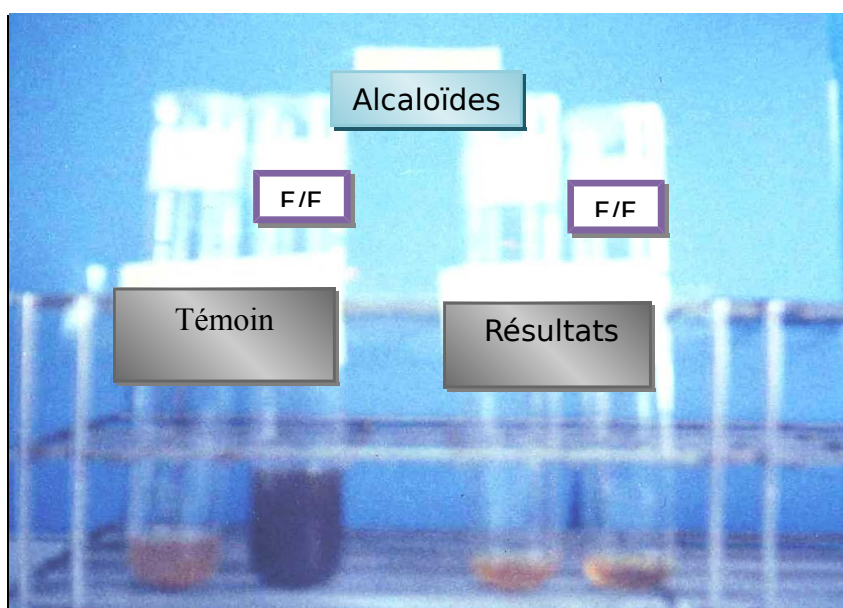


Figure 12 : Recherche des alcaloïdes dans le mélange feuilles/leurs (F/F); présence d'un louche net (résultat).

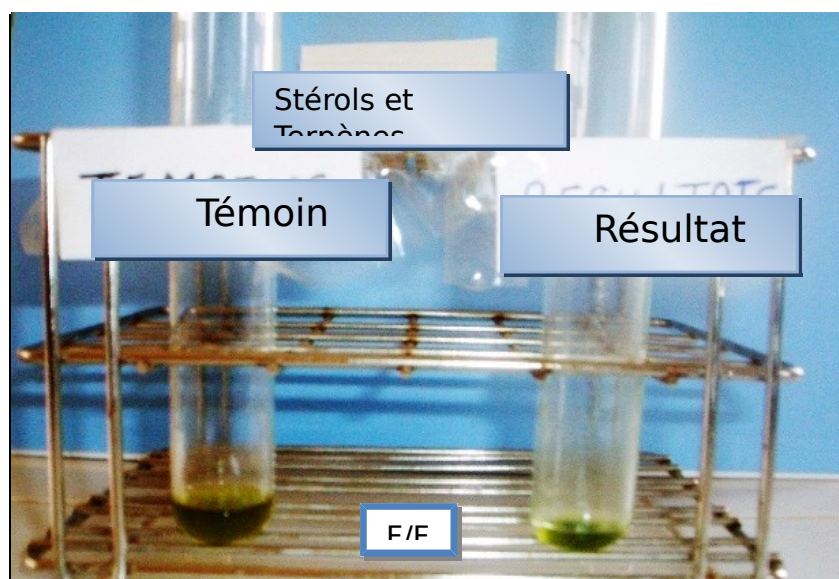


Figure 13: Recherches des stérols et terpènes dans le mélange feuilles/leurs (F/F) ; changement de couleur vers le vert (résultat).

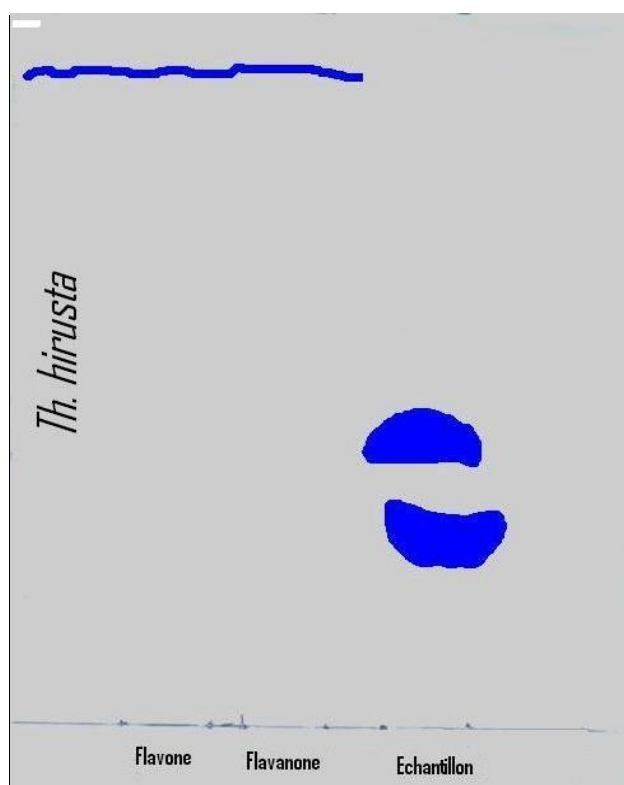


Figure 14: L'apparition d'une fluorescence bleue (Echantillon) ainsi que les révélateurs (flavone et flavanone).

Les essais phytochimiques effectués sur les extraits de *Thymelaea hirsuta* ont permis de déceler la présence de divers composés tels que les flavonoïdes (flavone, flavane), les tanins, les quinones (anthraquinones), les alcaloïdes et les leucoanthocyanes.

Partie expérimentale

Résultats et discussion

Ce Screening phytochimique corrobore celui effectué par [Azza et al. \(2012\)](#) ; la partie aérienne de *T. hirsuta*, récoltée au Maroc, a été également riche en flavonoïdes, stéroïdes et tanins et dépourvue d'anthraquinones libres. Ces données ont été, également, signalées par [Djeridane et al., \(2005\)](#); [Dohou et al., \(2004\)](#) ; [El Beheiry et al., \(2000\)](#) ; [Garcia-Granados et Sáenz de Buruaga \(1980\)](#). [Rizk et ses collaborateurs \(1975\)](#) mentionnent, chez *Thymelaea hirsuta*, la présence de différentes structures coumariniques à base de daphnétoïne, d'ombelliférone, de scopolétine et d'esculétine. De plus, la présence d'ombelliférone et de scopolétine a été aussi rapportée chez *Thymelaea hirsuta*, en plus d'autres molécules ([George et Rishi, 1982](#)).

Au cours de sa récolte et après plusieurs prospections, il a été remarqué que *Thymelaea hirsuta* n'a jamais été broutée par le bétail. Le faible intérêt pastoral des Thymelaeaceae a été expliqué par le fait qu'elles contiennent des alcaloïdes et des glucosides ([Le Floch, 1983](#)).

D'après [Touati \(1985\)](#), *Thymelaea hirsuta* ne contient pas ce genre de composés (alcaloïdes). Cependant, 36% des espèces présenteraient des alcaloïdes chez les Thymelaeaceae ([Levin, 1976](#)). Les variations, de métabolites secondaires, décelées au niveau de la partie aérienne de la plante pourrait être liée à la différence de l'origine, à la période de la récolte, à la nature du sol ou aux facteurs climatiques ([Daddona et al., 1976](#) ; [Manolaraki, 2011](#)).

Généralement, les métabolites secondaires détectées ont un large panel d'activité biologique, et sont probablement à l'origine des vertus médicinales pratiquées traditionnellement avec *Thymelaea hirsuta*. En effet, les flavonoïdes sont des antioxydants réputés par excellence ([Torel et al., 1986](#) ; [D'abrosca et al., 2007](#) ; [Amari et al., 2014](#)). Outre leur pouvoir antioxydant, ils sont des antiulcéreux, antitumoraux, antispasmodiques, antisécréteurs et antidiarrhéiques ([Di Carlo et al., 1999](#)), anti-allergiques, anti-inflammatoires, hypotenseurs et protecteurs contre le cancer et la cataracte ([Bruneton et al., 2007](#)). Ils sont également doués de vertus aphrodisiaques ([Boua et al., 2008](#)) . Les coumarines, quant à elles, possèdent des propriétés antifongique ([Sardari et al., 1999](#)), antibactérien ([Kwon et al., 1997](#), [Kayser et Kolodziej, 1997](#)), antiviral ([Fuller et al., 1994](#)), antimalarial ([Yang et al., 1992](#)), anti-inflammatoire ([Chen et al., 1995](#) ; [Okada et al., 1995](#) ; [Lino et al., 1997](#) ; [Hiermann et Schlantl, 1998](#) ; [Garcia-argaez et al., 2000](#)), anti-tumoral ([Seliger, 1997](#) ; [Kofinas et al., 1998](#) ; [Fujioka et al., 1999](#)), anticoagulant ([Egan et al., 1990](#)) et responsables de la cicatrisation des plaies. ([Garabeth F. et al., 2007](#)).

Partie expérimentale
Résultats et discussion

Selon Ybert *et al.* (2000), les tanins permettent de lutter contre les infections et de drainer les sécrétions excessives comme la diarrhée. Certains alcaloïdes renforcent l'activité cardiaque, excitent le système nerveux central, les nerfs sympathiques et stimulent la circulation sanguine (Lazurevskii *et al.*, 1966). Les polyphénols possèdent un effet de rétention du potassium ; ils manifestent donc une activité diurétique (N'guessan *et al.*, 2009).

Les saponosides ont un effet cicatrisant, antifongique, antimycosique, anti-inflammatoire et antihelminthiques (Kansole, 2009 ; N'guessan *et al.*, 2009). Quant aux stéroïdes et polyterpènes, ils ont des propriétés bactéricides (N'guessan *et al.*, 2009), et permettent de lutter contre les inflammations.

II-3- Activité antibactérienne

L'activité antimicrobienne d'huile essentielle et des différents extraits obtenus à partir de parties aérienne de *Thymelaea hirsuta* a été déterminé par la mesure des diamètres de la zone d'inhibition ainsi que le taux d'inhibition des deux souche bactérienne *Staphylococcus aureus* (Gram positive) et *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négative).

II-3-1- Méthode de diffusion sur gélose

Les observations effectuées sur l'effet des différents extraits sur la croissance bactériennes des différentes souches avec la méthode de diffusion sur gélose sont regroupées dans le tableau 3 et 4 et représentées dans les figures 27-28 ci-après.

II-3-1-1- *Staphylococcus aureus*

II-3-1-1-1-Effet de l'extrait d'éther de pétrole(E1)

L'extrait (E1) a provoqué une baisse dans le développement de la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* (Gram⁺). Contrairement au témoin, les valeurs enregistrées montrent que l'extrait a eu un effet inhibiteur avec une zone d'inhibition dont le diamètre significatif correspond à $28 \pm 1,41$ mm (Fig. 15).

Les résultats ont permis de déterminé la concentration minimale inhibitrice avec 500 µg/mL, il semble que cela dépend de la bactérie ciblée.

II-3-1-1-2- Effet de l'extrait dichlorométhane (E2)

Les observations faites, montre que l'extrait (E2) a eu le même effet que l'extrait précédent, la zone d'inhibition correspond à $17,5 \pm 0,71$ mm (Fig. 16).

L'extrait a présenté une action positive aux différentes concentrations appliquées sur *S. aureus* ; donc la CMI est à 500 µg/mL pour *S. aureus*.

II-3-1-1-3- Effet de l'extrait méthanol (E3)

L'histogramme de la figure 16 montre que l'extrait méthanolique(E3) a eu une action active sur le germe bactérien contrairement au témoin (DMSO). La zone d'inhibition observée été de $25,5 \pm 3,54$ mm (Fig. 17). La CMI est de l'ordre de 500 µg/mL.

II-3-1-1-4-Effet de l'extrait éthanol (E4)

L'extrait (E4) montre une bonne efficacité sur la souche *S. Aureus* avec une zone d'inhibition de l'ordre de $29,5 \pm 3,54$ mm (Fig. 18). La CMI a été identique à celle de l'extrait méthanol(E3).

II-3-1-1-5- Effet de l'extrait aqueux (E5)

Contrairement aux autres extraits, l'extrait (E5) ne présente aucune inhibition sur la souche *S. Aureus*.

II-3-1-1-6-Effet de l'huile essentielle (E6)

Les résultats obtenus montrent que l'extrait (E6) a eu une très grande influence sur la bactérie, la zone d'inhibition est de $29 \pm 1,41$ mm (Fig. 20). La CMI est la même que les extraits méthanol (E3).

Tableau 3 : Diamètre d'inhibition en mm après traitement avec les solutions mères (10mg/ml)

Extraits les bactéries	E1	E2	E3	E4	E5	E6	T(DMSO)	Gent
<i>S. aureus</i>	24 ± 1,41	19,5 ± 0,71	22,5 ± 3,54	27,5 ± 3,54	12,5 ± 3,54	31 ± 1,4 1	0 ± 0	35,5 ± 0,71

E1 : l'extrait d'éther de pétrole

E2 : l'extrait de dichlorométhane

E3 : l'extrait de méthanol

E4 : l'extrait de l'éthanol

E5 : l'extrait aqueux

E6 : l'extrait d'huile essentielle

T(DMSO) : le DMSO

Gent : antibiotique Gentamicine à 10 mg/ml

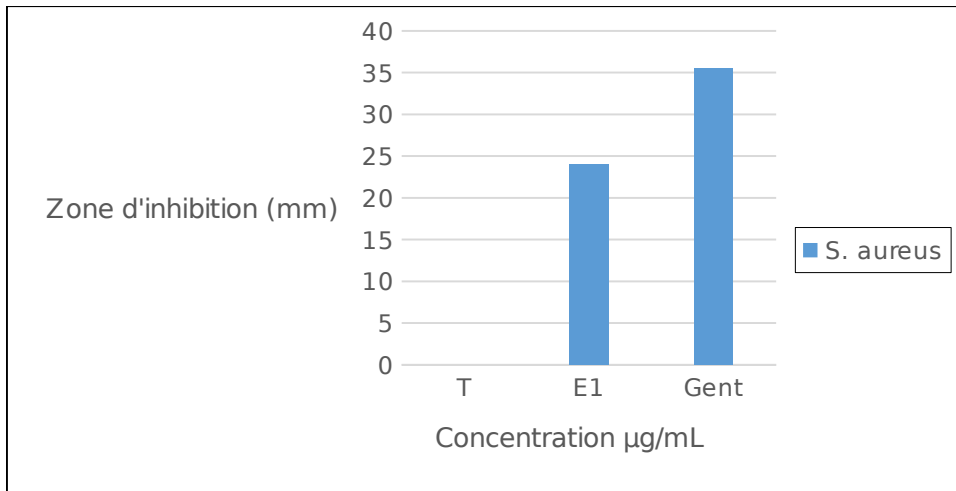


Figure 15 : Effet de l'extrait E1 sur la croissance de *S. aureus*.

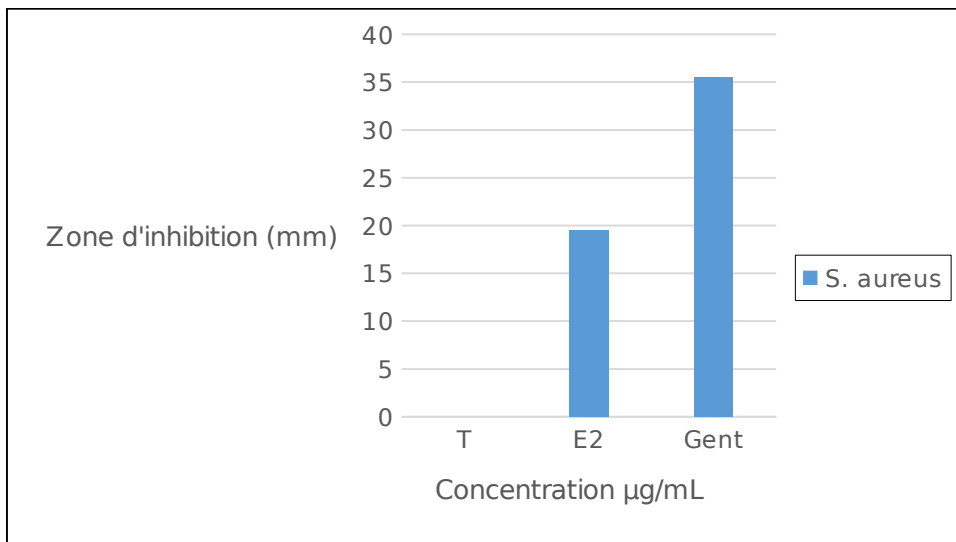


Figure 16 : Effet de l'extrait E2 sur la croissance de *S. aureus*

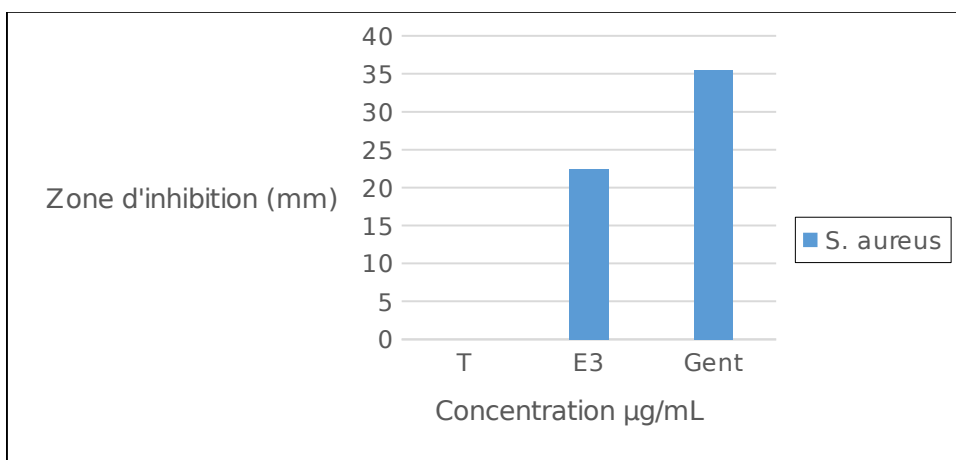


Figure 17 : Effet de l'extrait E3 sur la croissance de *S. aureus*

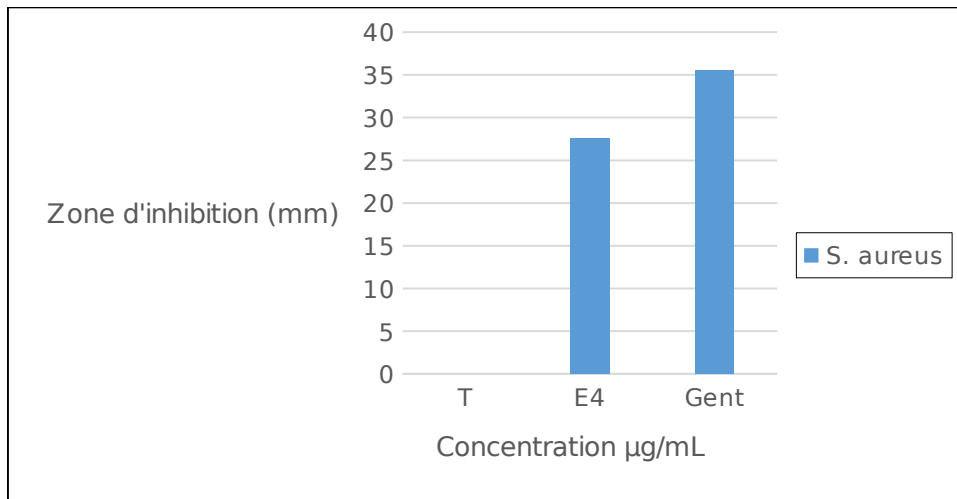


Figure 18 : Effet de l'extrait E4 sur la croissance de *S. aureus*

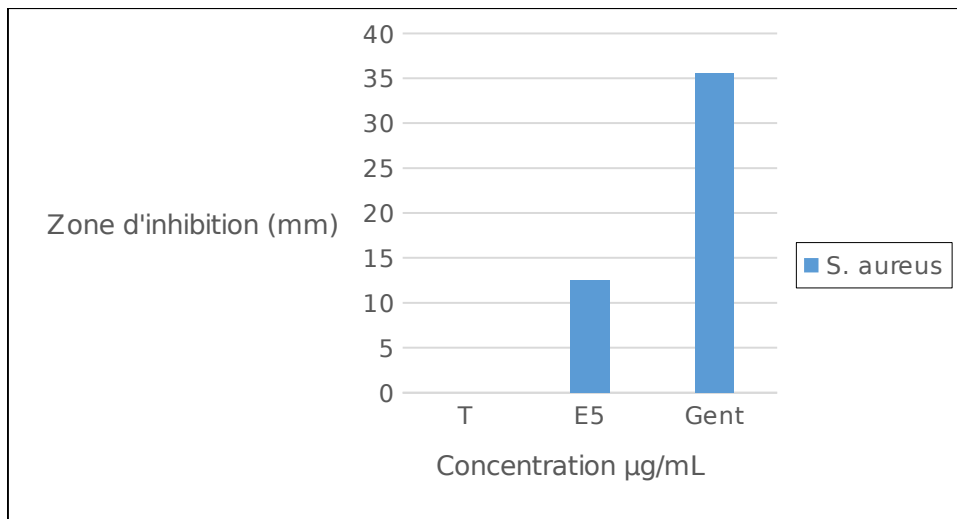


Figure 19 : Effet de l'extrait E5 sur la croissance de *S. aureus*

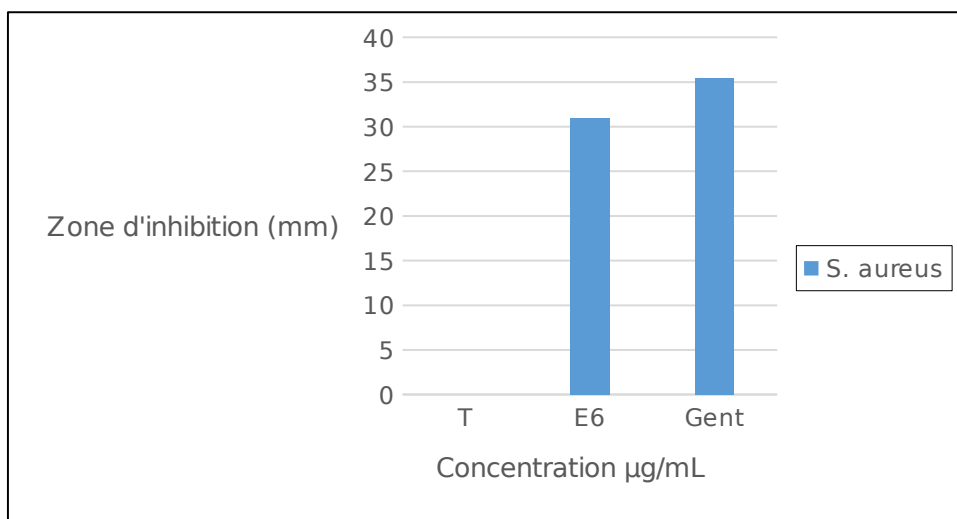


Figure 20 : Effet de l'extrait E6 sur la croissance de *S. aureus*

II-3-1-2- *Pseudomonas aeruginosa*

II-3-1-2-1 Effet de l'extrait d'éther de pétrole(E1)

D'après les résultats obtenus, on a remarqué que l'extrait (**E1**) a provoqué une baisse dans le développement de la souche bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* (Gram⁻). Contrairement au témoin, les valeurs enregistrées montrent que l'extrait a eu un effet inhibiteur avec une zone d'inhibition dont le diamètre significatif correspond à $17 \pm 1,41$ mm qui était moins important par rapport à *S. aureus* (Fig. 21).

Les résultats ont permis de déterminer la concentration minimale inhibitrice qui est de 1000 µg/mL.

II-3-1-2-2- Effet de l'extrait dichlorométhane (E2)

L'extrait (**E2**) a eu le même effet que l'extrait précédent sur, la zone d'inhibition correspond à $11,5 \pm 2,12$ mm (Fig. 22).

L'extrait a présenté une action positive seulement aux concentrations 1000 µg/mL et 5000 µg/mL ; donc la CMI est 1000 µg/mL pour *P. aeruginosa*.

II-3-1-2-3- Effet de l'extrait méthanol (E3)

L'histogramme de la figure 23 montre que l'extrait méthanolique(**E3**) a eu une action active sur le germe bactérien contrairement au témoin (DMSO). La zone d'inhibition observée été de $23 \pm 4,24$ mm pour *P. aeruginosa*. La CMI est de l'ordre de 1000µg/mL.

II-3-1-2-4- Effet de l'extrait éthanol (E4)

Les observations faites, montre que l'extrait (**E4**) à moins d'efficacité sur la souche *P. aeruginosa* avec $12,5 \pm 2,12$. La CMI a été identique à celle de l'extrait méthanol(**E3**) (Fig. 24).

II-3-1-2-5- Effet de l'extrait aqueux (E5)

Contrairement aux *S. Aureus*, l'effet inhibiteur de l'extrait (**E5**) est présent sur la souche *P. aeruginosa*. La CMI est de l'ordre de 1000 µg/mL pour *P. aeruginosa* (Fig.25).

II-3-1-6- Effet de l'huile essentielle (E6)

Les résultats obtenus montre que l'extrait (**E6**) a eu une très grande influence sur germe bactérien, la zone d'inhibition est de $21 \pm 1,41$ mm. La CMI est la même que les extraits précédent (Fig. 26).

Tableau 4 : Diamètre d'inhibition en mm après traitement avec les solutions mères (10mg/ml)

extraits les bactéries	E1	E2	E3	E4	E5	E6	T(DMSO)	Gent
<i>P.aeruginosa</i>	15 ± 1,41	13,5 ± 2,12	22 ± 4,24	13,5 ± 2,12	17,5 ± 3,54	20 ± 1,4 1	0 ± 0	34,5 ± 0,71

E1 : l'extrait d'éther de pétrole

E2 : l'extrait de dichlorométhane

E3 : l'extrait de méthanol

E4 : l'extrait de l'éthanol

E5 : l'extrait aqueux

E6 : l'extrait d'huile essentielle

T(DMSO) : le DMSO

Gent : antibiotique Gentamicine à 10 mg/ml

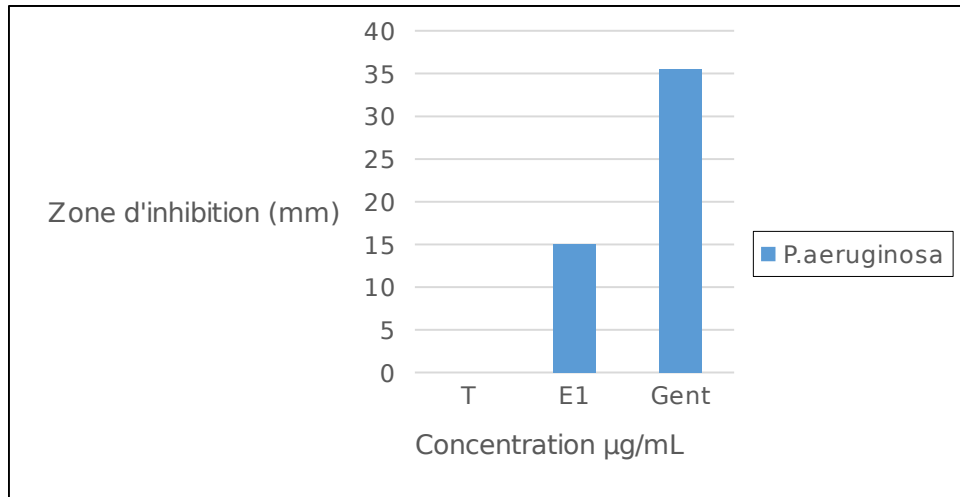


Figure 21 : Effet de l'extrait E1 sur la croissance de *P. aeruginosa*

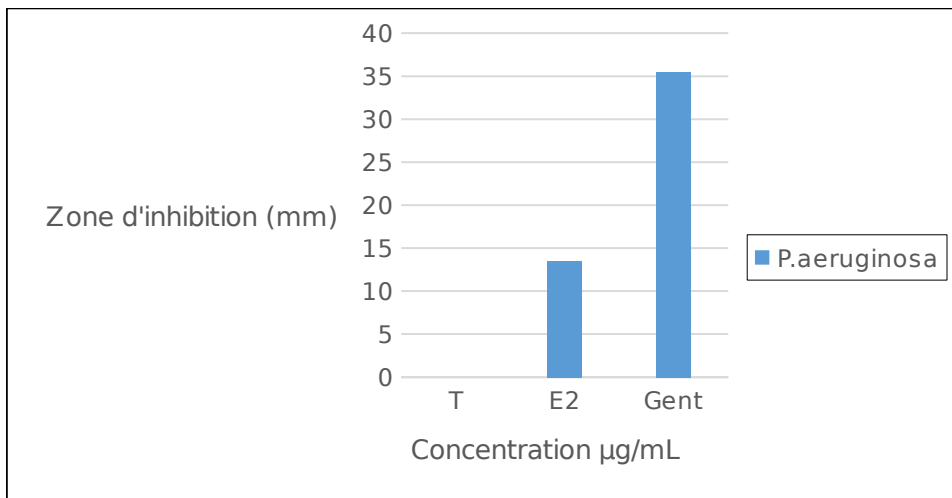


Figure 22 : Effet de l'extrait E2 sur la croissance de *P. aeruginosa*

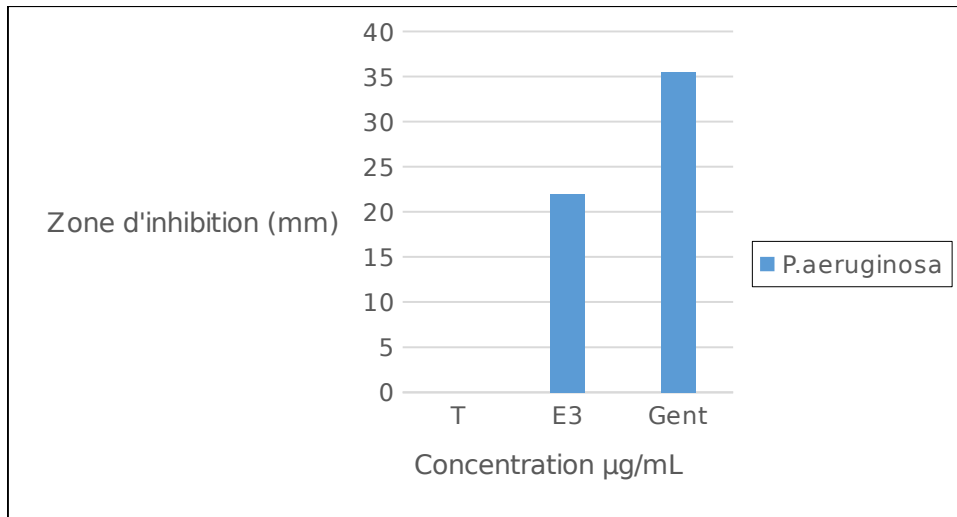


Figure 23 : Effet de l'extrait E3 sur la croissance de *P. aeruginosa*

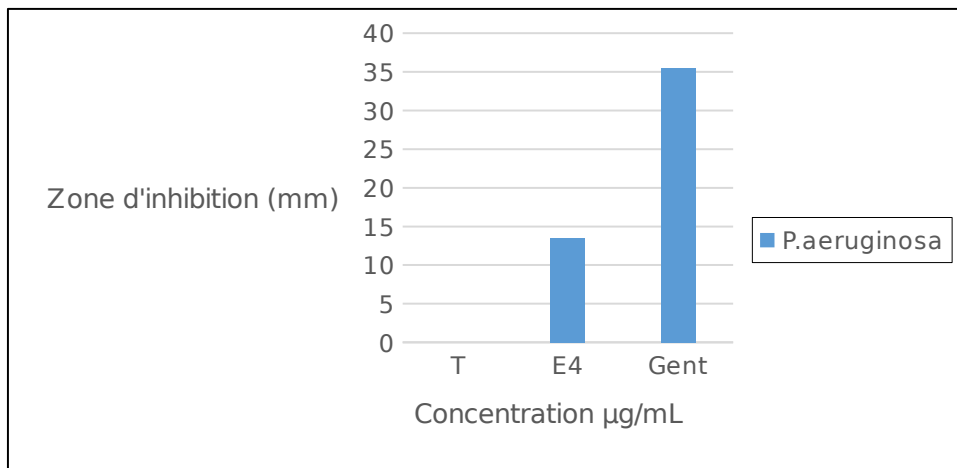


Figure 24 : Effet de l'extrait E4 sur la croissance de *P. aeruginosa*

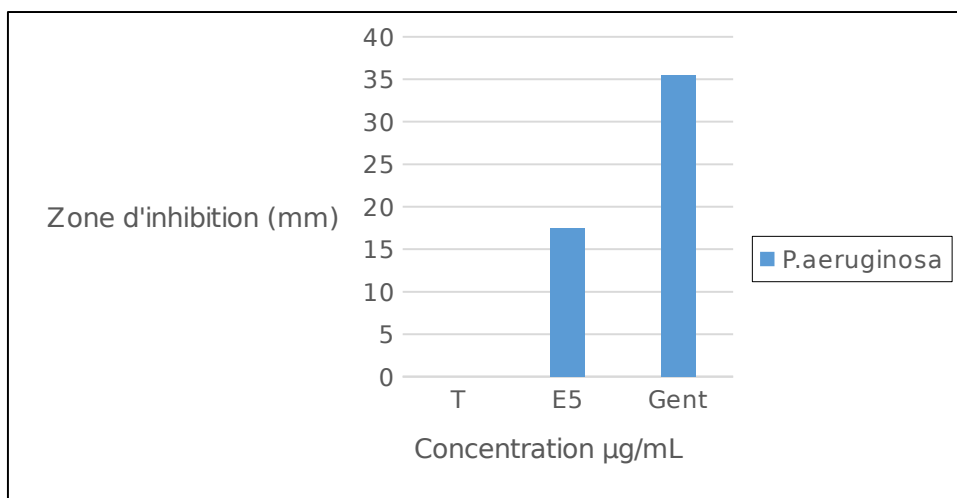


Figure 25: Effet de l'extrait E5 sur la croissance de *P. aeruginosa*

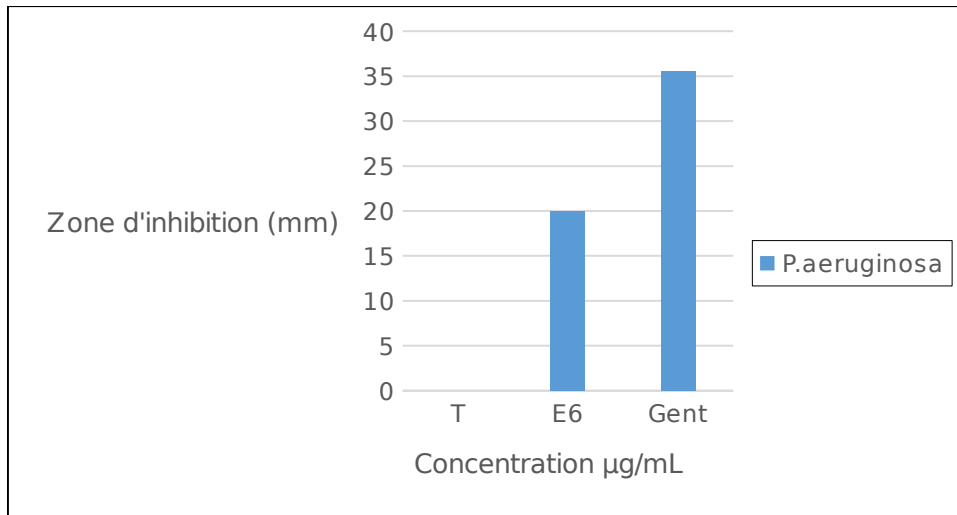


Figure 26 : Effet de l'extrait E6 sur la croissance de *P. aeruginosa*

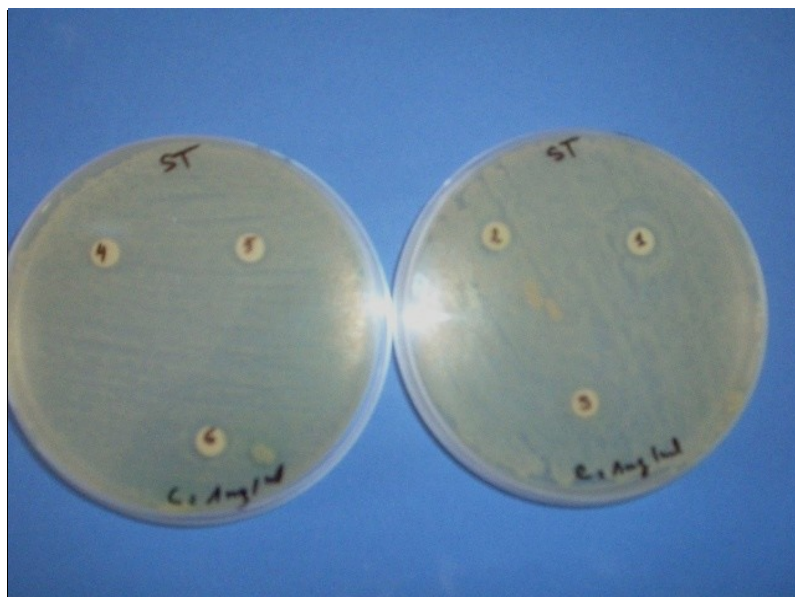


Figure 27 : Mise en évidence de l'activité des extraits de *Thymelaea*

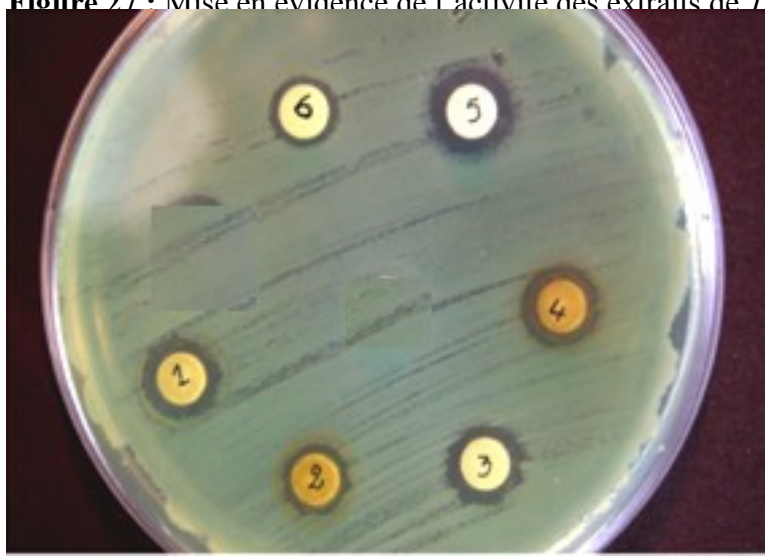


Figure 28 : Mise en évidence de l'activité des extraits de *Thymelaea hirsuta* sur *P. aeruginosa*.

II-3-2- Méthode de contact (mesure de la viabilité)

II-3-2-1-Effet sur *Staphylococcus aureus*

Le taux d'inhibition de cette espèce est important avec les différents extraits même à une faible concentration (500 µg/mL), l'éther de pétrole (76%), l'éthanol (78%), le HE (78%), le méthanol (72%), le dichlorométhane (75%) et la solution aqueuse (58%) (Fig.29). A 1000 µg/mL le taux d'inhibition a augmenté (Fig. 30) mais très important à la concentration 5000 µg/mL pour les extrait d'éther de pétrole, d'éthanol et celui d'huile essentielle (Fig. 31).

II-3-2-2- Effet sur *Pseudomonas aeruginosa*

Comme précédemment, l'extrait d'éther de pétrole, d'éthanol et huile essentielle ont montré plus d'effet que les autres extraits. Le dichlorométhane semble paraître plus ou moins actifs. Cette observation a été notée à 500 µg/mL et 1000 µg/mL (Fig.29, 30).

Tous les extraits ont été efficaces à 5000 µg/mL, mais les plus significatifs sont l'extrait d'éther de pétrole, le méthanol et la décoction (Fig. 31).

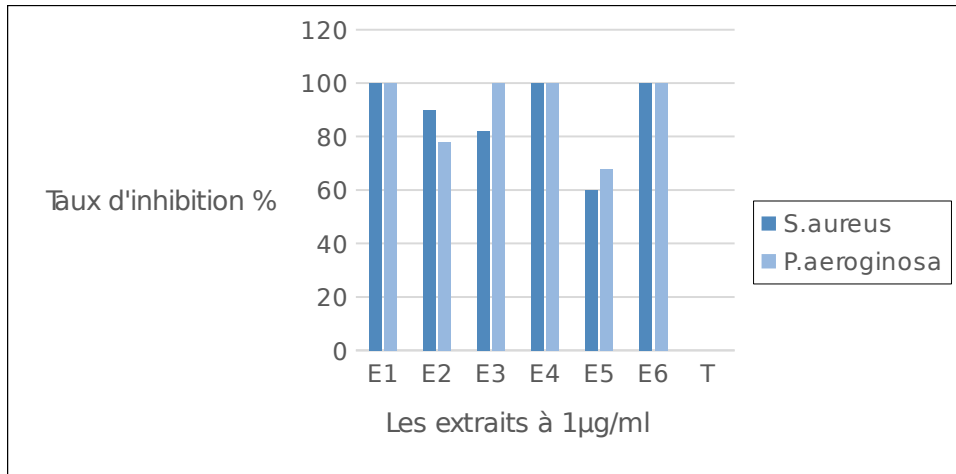


Figure 29 : Taux d’inhibition des deux souches *S. aureus* et *P. aeruginosa* par les différents extraits de *Thymelaea hirsuta* (concentration 500µg/ml)

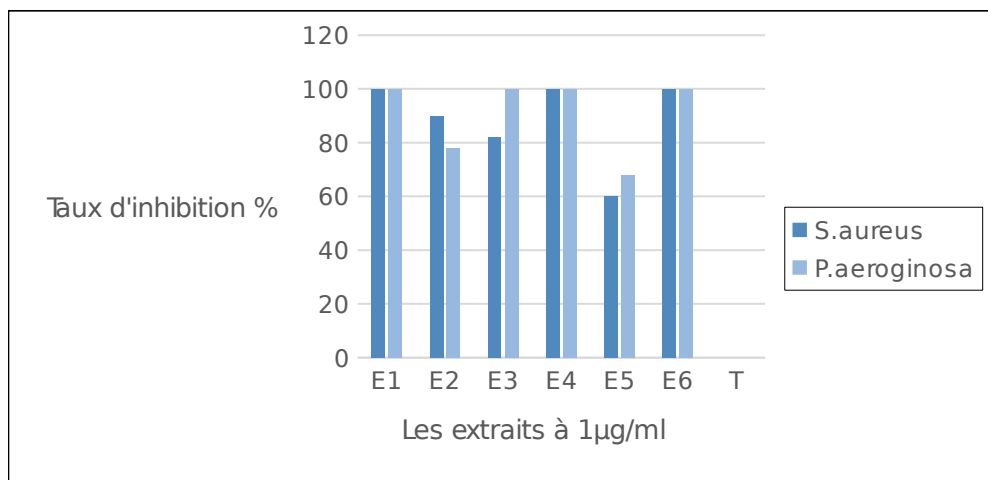


Figure 30 : Taux d’inhibition des deux souches *S. aureus* et *P. aeruginosa* par les différents extraits de *Thymelaea hirsuta* (concentration 1000µg/ml)

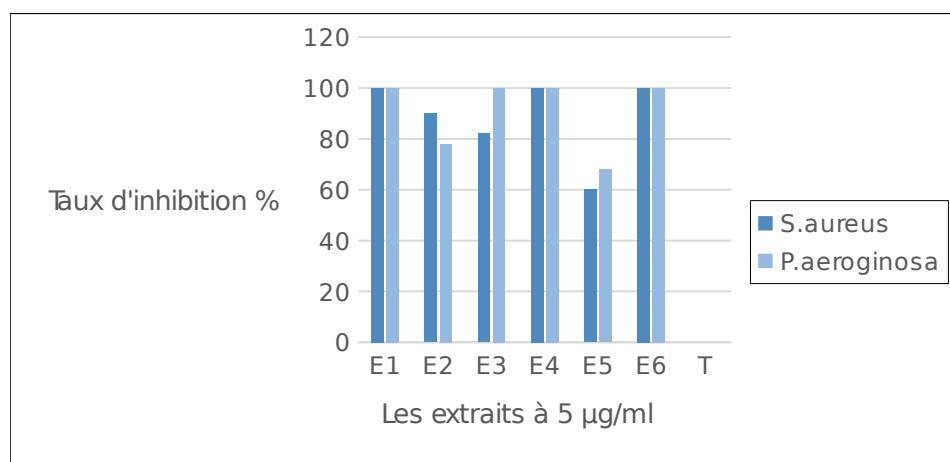


Figure 31 : Taux d'inhibition des deux souches *S. aureus* et *P. aeruginosa* par les différents extraits de *Thymelaea hirsuta* (concentration 5000µg/ml)

L'utilisation des plantes médicinales est aujourd'hui la forme de médecine la plus répandue dans le monde. Le recours au traitement par les plantes ainsi que la recherche de nouvelles substances à activités biologiques constituent une des plus grandes préoccupations scientifiques. En effet, il est établi que l'un des aspects les plus importants de l'activité antibactérienne des plantes médicinales, fait que celles-ci soient incapables de développer une résistance pendant le traitement. Cela est dû à leurs modes d'action qui est complètement différent de celui des antibiotiques.

Thymelaea hirsuta, est une plante du terroir, utilisée par nos grands-parents, pour soigner les infections cutanées, ce qui constitue un patrimoine dont les secrets sont encore non élucidés, ceci nous a incité à évaluer ses propriétés sur deux bactéries : *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Plusieurs études menées par [Jones et al. \(2003\)](#) et [Rennie et al. \(2003\)](#) montrent que les infections cutanées sont dues principalement à *Staphylococcus aureus*, soignée par de nombreuses plantes qui ont montré une efficacité certaine contre ce germe, par contre *Pseudomonas aeruginosa* montrent une résistance aux différents extraits végétaux, sachant que le germe est fréquent dans le milieu hospitalier et réputé pour son extrême résistance ([Anonyme, 2006](#)).

L'activité antimicrobienne des extraits de plantes est due aux différents agents chimiques présent dans ces extraits, y compris les huiles essentielles.

Les flavonoïdes et les triterpénoïdes ainsi que d'autres composés de nature phénolique ou groupes hydroxyle libres, qui sont classifiés comme composés antibiotiques

très actifs (Rojas et al. 1992 ; Marjorie, 1999). La variation de la composition chimique explique donc les variations observées dans l'activité antimicrobienne des extraits d'une même plante ou de plantes différentes.

L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composés à l'origine de cet extrait (Essawi et Srour, 2000). Pour cela, la comparaison cas par cas de l'activité antimicrobienne de plusieurs extraits, en se basant sur le dosage d'un seul constituant actif, nous semble inutile.

L'étude *in vitro* a indiqué que l'application des différents extraits de *Thymelaea hirsuta* sur les souches étudiées révèle que les extraits ont joué un rôle important dans la réduction de la croissance bactérienne.

En effet, Les tests menés sur *S. aureus* et *P. aeruginosa* par la méthode dite de diffusion sur gélose ont montré que les extraits E₁, E₂, E₃, E₄ et E₆ ont un effet antibactérien très efficaces vis-à-vis de l'espèce. Pour ce qui est de la méthode dite de contact direct les extraits E₁, E₄ et E₆ ont manifesté une action inhibitrice. Il apparaît donc lors de cet essai et après comparaisons des deux méthodes que la seconde a montrées de meilleurs résultats que ceux de la méthode de diffusion sur gélose.

Plusieurs recherches ont montré que les extraits bruts de certains principes actifs s'opposaient à la prolifération bactérienne (Jhon, 1983), ceci s'explique par leur mode d'action. En effet, Jarraud et al., (2002), ont révélé que certains composés actifs empêchent la réplication de l'ADN en se combinant avec certains éléments de celui-ci pour former des ponts stables par liaison covalente entre les deux chaînes. Ainsi, lors de la mitose, l'ADN ne peut plus dédoubler, car sa structure moléculaire est altérée.

D'autre part, quelques composés actifs sont capables d'inhiber l'activité enzymatique de certaines protéines des parois bactériennes qui jouent un rôle majeur dans le pouvoir pathogène, un rôle éventuel dans l'antigénicité spécifique (Talia et al., 2000).

D'une manière générale, l'effet antibactérien des extraits de *Thymelaea hirsuta* est très efficace sur *Staphylococcus aureus* qui est un gram positif comparé au gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*). Ces résultats corroborent ceux d'une équipe de recherche mené par Tarigui et al., (2013) qui a testé l'effet antibactérien de composés actifs de plusieurs plantes contre des bactéries Gram positif et Gram négatif. Les résultats indiquent que *S. aureus* est plus sensible que le genre *P. aeruginosa*.

Comme la structure de la paroi des bactéries à gram négatif est constituée d'une couche mince de peptidoglycanes qui ne représentent que 10% du poids sec, contrairement aux bactéries à gram positif, qui représente plus de 40%. Il est probable que les composés soufrés sont plus perméables aux parois des bactéries à gram positif, ce qui les rend plus efficaces contre ces dernières.

Par ailleurs, [Ikigai et al. \(1993\)](#), suggèrent que la différence de sensibilité est causée par la répulsion entre les principes actifs et les parois lipopolysaccharidique des bactéries Gram négatif.

Globalement, ces composés actifs agissent par un mécanisme physique, physicochimique et biochimique sur les microorganismes tandis que leurs actions inhibitrices sont basées surtout sur la multiplicité des influences individuelles affectant : L'ADN, quelques protéines spécifiques et l'activité de certains enzymes cellulaire ([Could, 1964](#) [Inluck et Jagu, 1997](#) ; [Cowan, 1999](#)). Par ailleurs, l'effet inhibiteur des principes actifs est expliqué par leurs pouvoirs d'absorption en privant les bactéries de certains ions métalliques ([Scalbert, 1991](#)). De même, les composés actifs peuvent attaquer la membrane cellulaire en la perforant ce qui se traduit par une augmentation de flux de protons vers l'intérieur de la cellule et un accroissement des besoins en énergie des microorganismes ([Could et al., 1983](#) et [Eklund, 1985](#) [In Luck et Joyer, 1997](#) ; [Ikigai, 1993](#)).

Il est plus judicieux de dire que l'effet antimicrobien de *Thymelaea hirsuta* à large spectre est dû à l'inhibition d'une multitude de systèmes enzymatiques thiols dépendants. Il est donc difficile, de définir la cible la plus spécifique, car l'effet des principes actifs de *Thymelaea hirsuta* peut agir à différents niveaux mais surtout en fonction du milieu, de l'espèce, de la plante et de ses constituants mais aussi de la teneur en substance active. [Lawson \(1996\)](#), a rapporté que la quantité et la composition chimique des composés organosulfurés varient selon l'âge de la plante et la méthode d'extraction utilisée. La difficulté réside donc dans la nature de ces composés et leurs volatilités.

II-4- Activité antifongique

II-4-1- identification des souches fongiques

II-4-1-1- Etude morphologique

-Trichophyton Rubrum

Les colonies apparaissent en 5 à 10 jours, elles sont plates, blanches et duveteuses, avec un revers coloré d'un pigment rouge brun à violet (Fig. 32). Les microconidies sont peu abondantes, disposées en acladium. Les macroconidies sont rarement observées.

- *Microsporium gypseum*

Les colonies apparaissent en 4 à 5 jours, elles sont planes, habituellement poudreuses ou granuleuses, mais parfois duveteuses. Le mycélium est rare en primoculture. On observe de nombreuses macroconidies(Fig.33), les microconidies piriformes sont plus rares.

- *Microsporium audouinii*

Les colonies apparaissent vers le 8^{ème} jour, et sont caractéristiques vers le 15^{ème} jour, avec une couleur blanchâtre ou grisâtre finement duveteuses ou parfois légèrement poudreuse. En vieillissant, elles acquièrent une texture plus épaisse. Les filaments mycéliens, cloisonnés, sont assez épais et présentent parfois des dilatations (mycélium en raquette), Certaines souches produisent des microconidies piriformes souvent nombreuses(Fig.34).

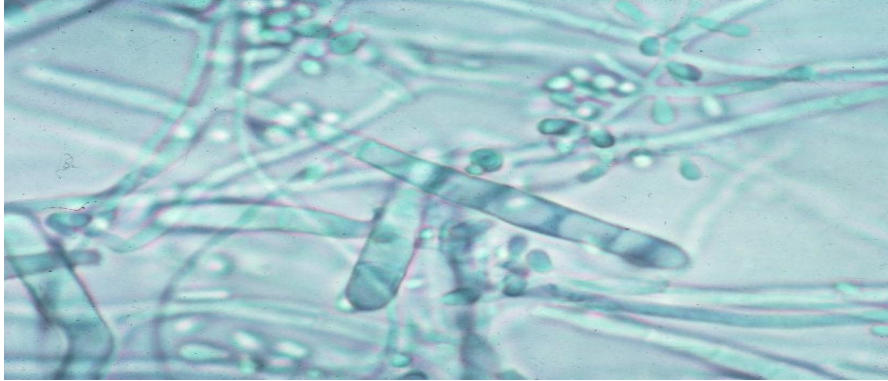


Figure32 : Aspect microscopique de *Trichophyton Rubrum* (X40).

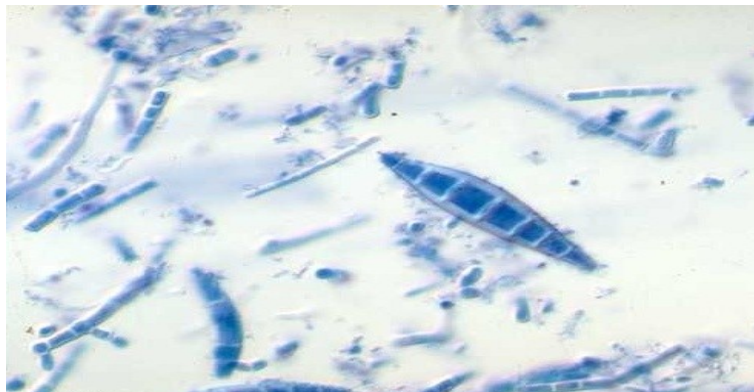


Figure 33 : Aspect microscopique de *Microsporum gypseum*(X40).

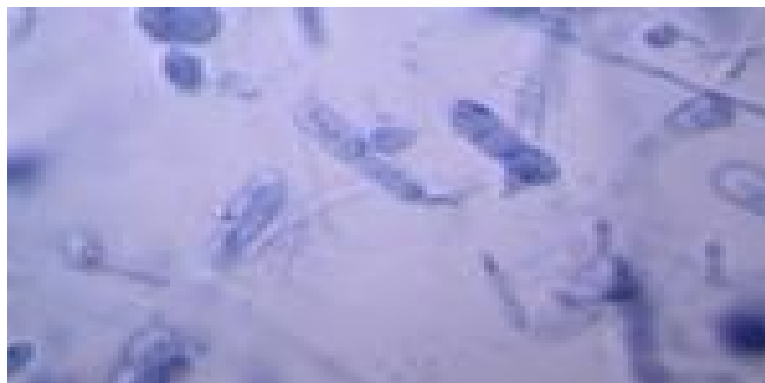


Figure 34 : Aspect microscopique de *Microsporum audouinii* (X40).

II-4-2- Les résultats

II-4-2-1- Taux d'inhibition

II-4-2-1-1- *Trichophyton Rubrum*

Les agissements des différents extraits de *T. hirsuta* sur l'inhibition de *Trichophyton Rubrum* sont représentés dans les figures 35-36-37-38-39 et 40

II-4-2-1-1-1- Huile essentielle (HE)

Comme les extraits cités, l'inhibition du champignon est influencée par la concentration d'HE et permet d'obtenir $43,20 \pm 1,55\%$ sur le lot $400\mu\text{g/mL}$, $52,35 \pm 2,78\%$ à $450\mu\text{g/mL}$, et $56,65 \pm 1,20\%$ sur le lot de $500\mu\text{g/mL}$, alors qu'à $750\mu\text{g/mL}$ elle est de l'ordre de $86,64 \pm 0,56\%$, mais 100% pour les lots de 850 et $1000\mu\text{g/mL}$ (Fig. 35).

II-4-2-1-1- 2- Extrait d'éther de pétrole

L'inhibition de la croissance, après 10 jours d'incubation, est plus prononcée à fortes concentrations (100% sur les essais de 850 et $1000\mu\text{g/mL}$) et diminue progressivement avec la baisse de cette dernière. C'est ainsi qu'à $750\mu\text{g/mL}$, une inhibition de l'activité cellulaire de l'ordre de $78,45 \pm 1,15\%$ a été enregistrée et ce n'est qu'à $46,7 \pm 7,88 - 48 \pm 2,75$ et $52,34 \pm 0,4\%$ qu'ont été obtenues les résultats sur les tests de $400 - 450$ et $500\mu\text{g/mL}$ (Fig. 36).

II-4-2-1-1-3- Extrait Dichlorométhane

Les doses utilisées permettent chez le dichlorométhane d'agir différemment sur l'inhibition de la croissance du pathogène. En effet, l'inhibition est la même comme précédemment (100%) à 850 et $1000\mu\text{g/mL}$, alors que celle-ci baisse à $750\mu\text{g/mL}$ atteignant $78,60 \pm 0,80\%$, par contre, une chute de la concentration de l'extrait comprise entre 500 et $450\mu\text{g/mL}$ a entraîné une réduction remarquable de son efficacité et enregistre par conséquent des données de l'ordre de $42,77 \pm 1,21(400\mu\text{g/mL}) - 51,94 \pm 0,39 (450\mu\text{g/mL})$ et $52,23 \pm 2,78\%$ ($500\mu\text{g/mL}$) (Fig. 37).

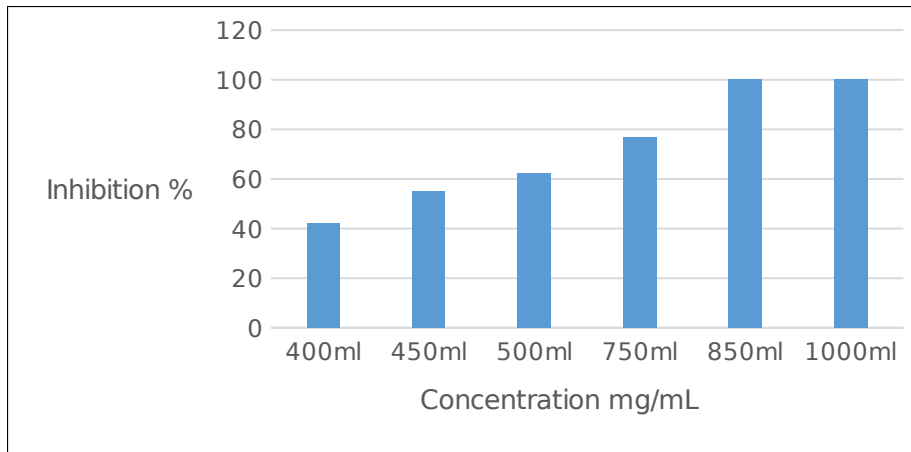


Figure 35 : Taux d'inhibition de *Trichophyton Rubrum* traité par l'HE du mélange feuille/fleur de *Thymelaea hirsuta*.

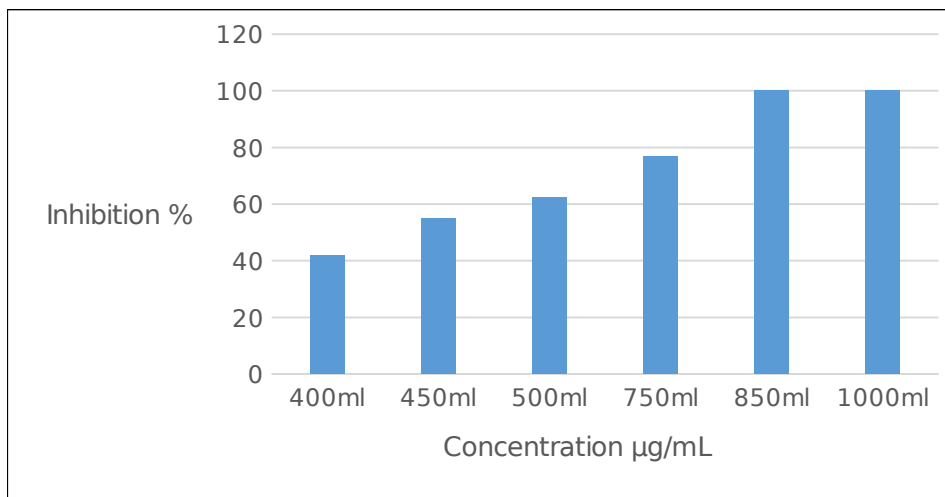


Figure 36 : Taux d'inhibition de *Trichophyton Rubrum* traité à l'extrait éther de pétrole du mélange feuille/fleur de *Thymelaea hirsuta*.

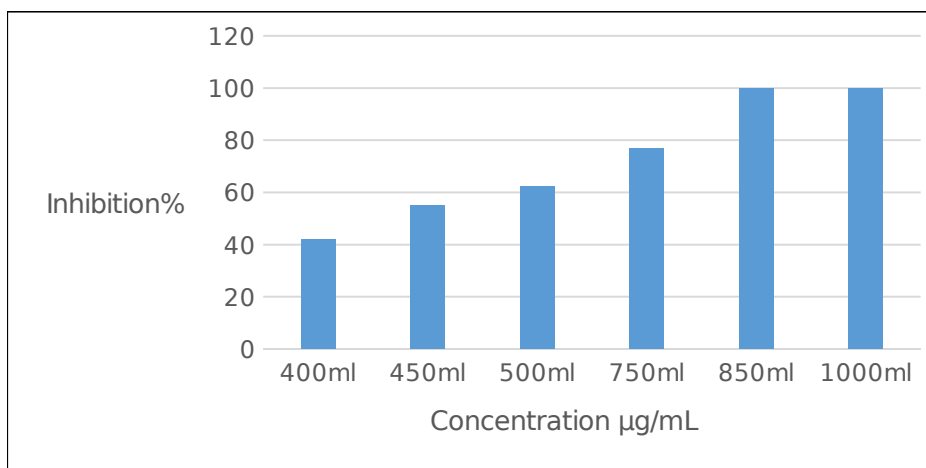


Figure 37 : Taux d'inhibition de *Trichophyton Rubrum* traité à l'extrait Dichlorométhane du mélange feuille/fleur de *Thymelaea hirsuta*.

II-4-2-1-1- 4- Extrait méthanolique

La figure 38 montre une variation dans l'inhibition de *Trichophyton Rubrum* lorsqu'il est traité à l'extrait méthanolique à différente concentration. La variation de la concentration conduit à une inhibition du champignon étudié mais à des taux différents. Les valeurs sont comme suites : $38,44 \pm 2,46\%$ - $44,91 \pm 1,93\%$ - $44,9 \pm 1,93$ et $54,52 \pm 1,25\%$ respectivement pour les doses de 400 – 450 – 500 et 750 $\mu\text{g/mL}$, alors que celle de 850 et 100 $\mu\text{g/mL}$ sont extrêmes (100%).

II-4-2-1-1- 5- Extrait éthanolique

Comme cité précédemment, la propriété antifongique de l'extrait éthanolique vis-à-vis de *Trichophyton Rubrum* a été également vérifiée. L'extrait a conduit à une inhibition de la croissance mycélienne du champignon étudié, mais à des taux différents et cela selon la concentration employée. Dans les lots de 400 – 450 et 500 $\mu\text{g/mL}$, les taux d'inhibition sont de l'ordre de $76,44 \pm 1,29\%$ - $45,36 \pm 3,91\%$ et $49,71 \pm 1,03\%$, par contre, ils se chiffrent à $76,44 \pm 1,29\%$ pour 750 $\mu\text{g/mL}$ et 100% à 850 et 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 39).

II-4-2-1-1- 6- Extrait aqueux

L'expérimentation a montré que les taux d'inhibition dépendent, bien entendu, des concentrations du milieu de culture en extrait aqueux produit à partir du mélange feuilles/fleur, Et permis d'obtenir : $37,95 \pm 1,27\%$ (400 $\mu\text{g/mL}$ – $47,56 \pm 2,41\%$ (450 $\mu\text{g/mL}$) – $51,27 \pm 2,62\%$ (500 $\mu\text{g/mL}$) – $81,78 \pm 1,27\%$ (750 $\mu\text{g/mL}$) et 100% (850 et 1000 $\mu\text{g/mL}$) (Fig. 40).

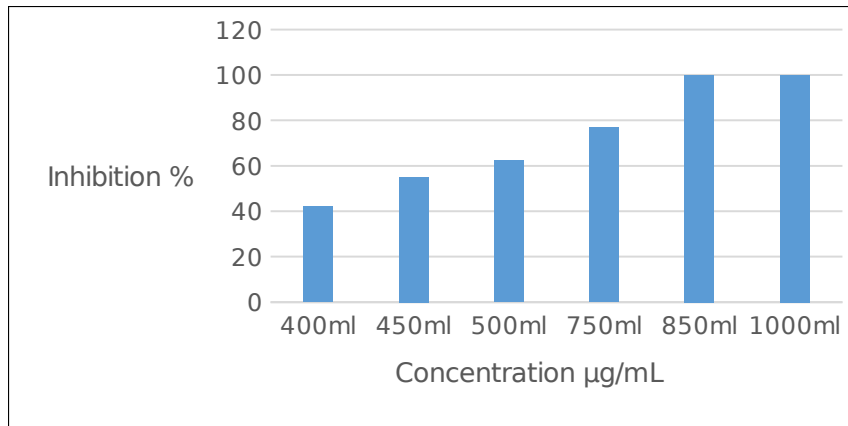


Figure 38 : Taux d'inhibition de *Trichophyton Rubrum* traité à l'extrait Méthanol du mélange feuille/fleur de *Thymelaea hirsuta*.

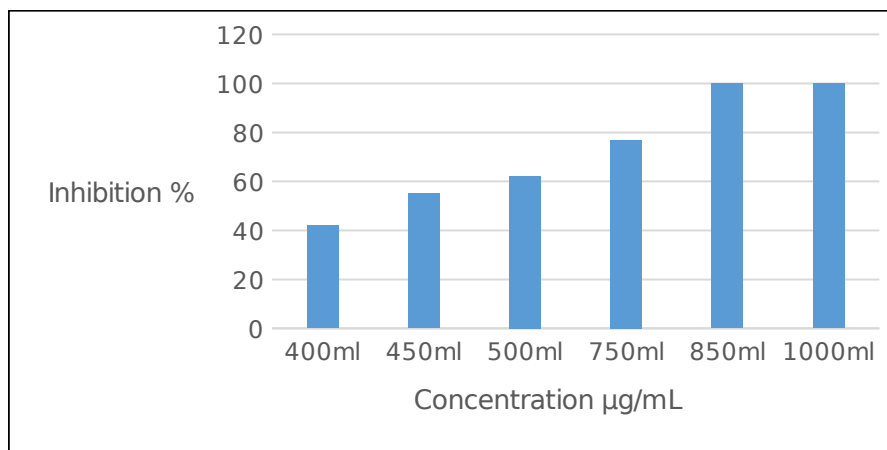


Figure 39 : Taux d'inhibition de *Trichophyton Rubrum* traité à l'extrait éthanolique du mélange feuille/fleur de *Thymelaea hirsuta*.

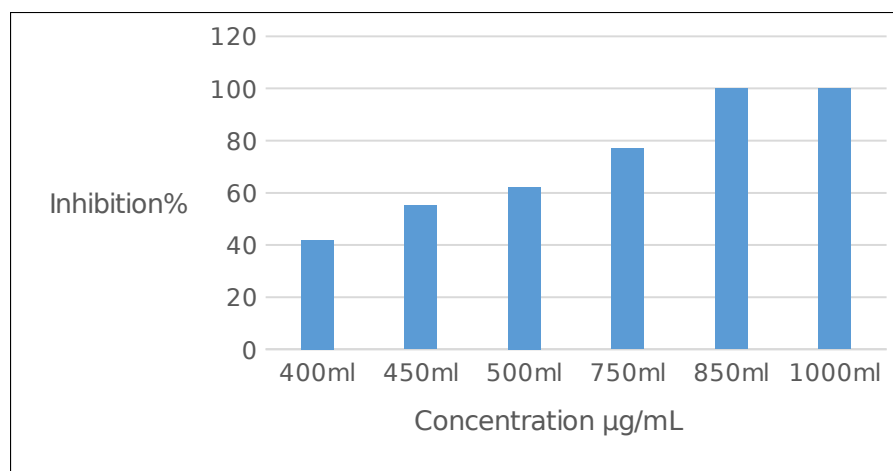


Figure 40 : Taux d'inhibition de *Trichophyton Rubrum* traité à l'extrait aqueux du mélange feuille/fleur de *Thymelaea hirsuta*.

II-4-2-1-2- *Microsporium gypseum*

C'est un champignon dans la croissance est rapide. Dans les conditions favorables, sa croissance est achevée en 6 jours après son inoculation dans le milieu de culture et atteint ainsi un diamètre maximum de $54,333 \pm 1,7$ mm (contre $62,333 \pm 1,7$ mm pour *Trichophyton Rubrum* avec une vitesse donc de $7,762$ mm/j (contre 5.23 mm/j).

Comme le champignon précédant, le développement de *Microsporium gypseum* est affecté également par la présence des différents extraits naturels de *Thymelaea hirsuta*.

II-4-2-1-2-1- Huile essentielle (HE)

Sous l'effet d'HE, l'essai a enregistré des taux d'inhibition variables, le plus fort est obtenu à 850 et 1000 μ g/ml avec 100% d'inhibition, les autres tests donnent $84,26 \pm 0,76\%$ pour le 750 μ g/ml, $64,12 \pm 3,61\%$ et $59,57 \pm 3,10\%$ du 450 et 500 μ g/ml mais seulement $44,92 \pm 0,84\%$ pour le cas de 400 μ g/mL (Fig. 41).

II-4-2-1-2-2- Extrait d'éther de pétrole

Les résultats montrent des taux d'inhibition croissants, cette évolution a été conditionnée par la concentration de l'extrait d'éther de pétrole dans le milieu (comme tous les extraits préalablement étudié). Le minimum d'inhibition est obtenu lorsque le milieu est traité à une concentration relativement faible (400 μ g/mL) avec $43,20 \pm 2,27\%$ et un maximum de 100% à 850 et 1000 μ g/mL. Entre les deux valeurs limites, il a été enregistré des valeurs de $53,39 \pm 0,79\%$ - $61,27 \pm 1,36\%$ et $77,49 \pm 1,46\%$ correspondant aux concentrations de 450–500 et 750 μ g/mL (Fig. 42).

II-4-2-1-2-3- Extrait Dichlorométhane

L'action de l'extrait Dichlorométhane sur *Microsporium gypseum* ressemble à celle précédemment observée ; sa présence inhibe l'activité du champignon étudié.

C'est ainsi qu'une extinction totale (100%) du pathogène a été enregistrée sur les tests de 850 et 1000 μ g/mL. Par contre, au-dessous de la dose extrême, le taux d'inhibition régresse progressivement pour atteindre la valeur minimale de $42,03 \pm 3,81\%$ à 400 μ g/ml, alors que les 450 – 500 et 750 μ g/mL enregistrent respectivement $55,04 \pm 0,55$ – $62,31 \pm 2,18$ et $76,94 \pm 1,18\%$ (Fig. 43).

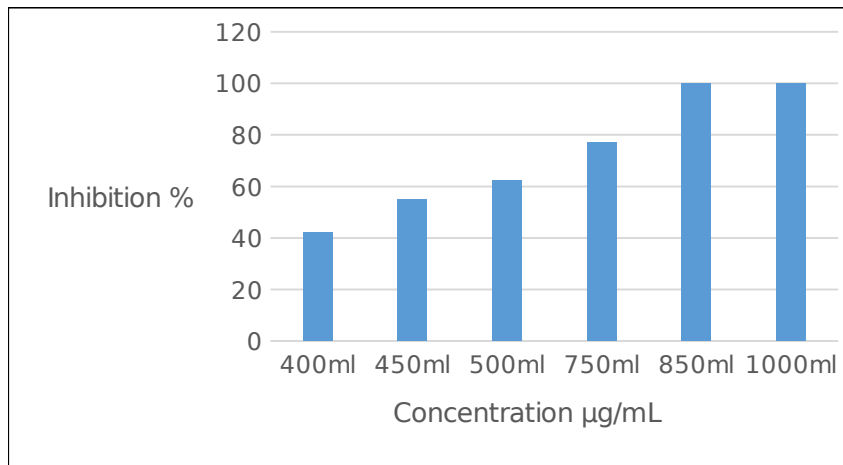


Figure 41 : Taux d'inhibition de *Microsporium gypseum* traité par l'HE du mélange feuille/fleur de *Thymelaea hirsuta*.

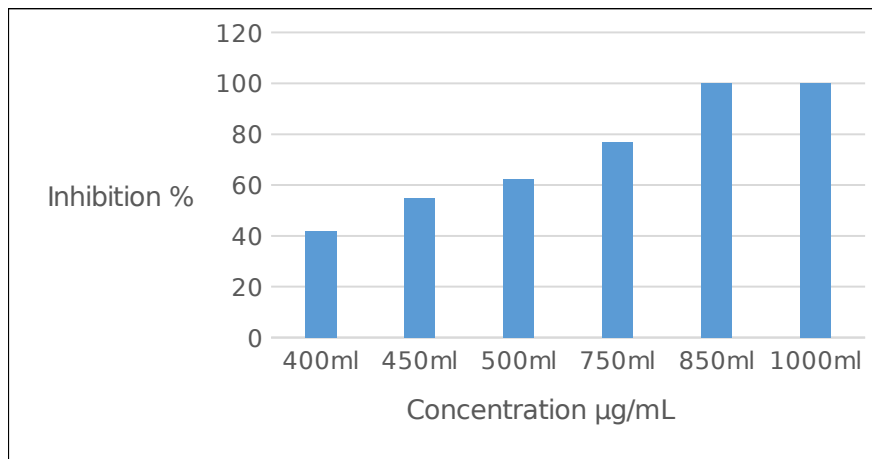


Figure 42 : Taux d'inhibition de *Microsporium gypseum* traité à l'extrait éther de pétrole du mélange feuille/fleur de *Thymelaea hirsuta*.

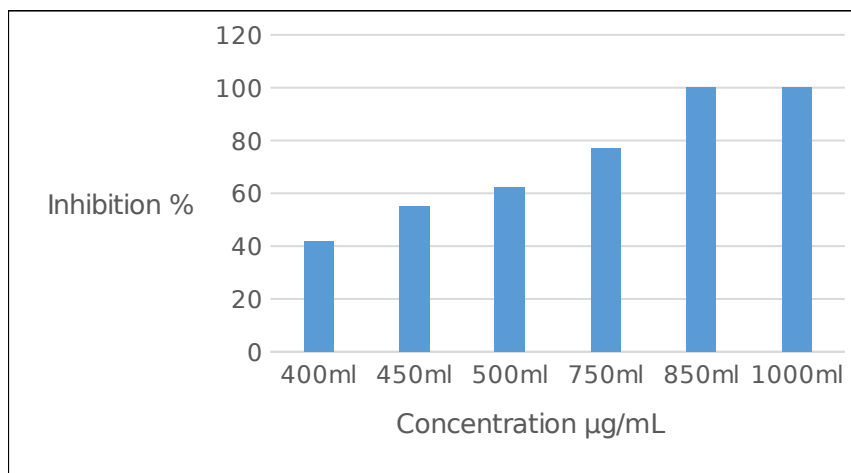


Figure 43 : Taux d'inhibition de *Microsporium gypseum* traité à Dichlorométhane du mélange feuille/fleur de *Thymelaea hirsuta*.

II-4-2-1-2-4- Extrait Méthanolique

De même pour l'extrait méthanolique, le taux d'inhibition enregistré sur les différents lots est également proportionnel à la concentration appliquée. Les résultats obtenus sont : $39,91 \pm 1,65\%$ - $57,27 \pm 1,25\%$ - $65,75 \pm 0,69\%$ - $79,75 \pm 1,59\%$ et $100 \pm 00\%$ respectivement pour les concentrations $400\mu\text{g/mL}$ - $450\mu\text{g/mL}$ - $500\mu\text{g/mL}$ - $750\mu\text{g/mL}$ et $850 - 1000\mu\text{g/mL}$ (100%) (Fig.44).

II-4-2-1-2-5- Extrait éthanolique

Le même schéma se présente pour l'extrait éthanolique. Pour les mêmes concentrations, une fourchette des taux d'inhibition comprise entre $43,20 \pm 2,04\%$ et 100% est observée. Cependant, des taux intermédiaires de $52,24 \pm 1,70\%$ - $59,56 \pm 0,41\%$ et $76,94 \pm 1,18\%$ correspondent à $450 - 500$ et $750\mu\text{g/mL}$ (Fig. 45).

II-4-2-1-2-6- Extrait aqueux

Le taux d'inhibition des concentrations étudiées ($400 - 450 - 500 - 750 - 850$ et $1000\mu\text{g/mL}$) se chiffre à $42,04 \pm 2,48\%$ - $51,01 \pm 4,16\%$ - $54,02 \pm 7,26 - 78,62 \pm 1,30\%$ et 100% (Fig. 46).

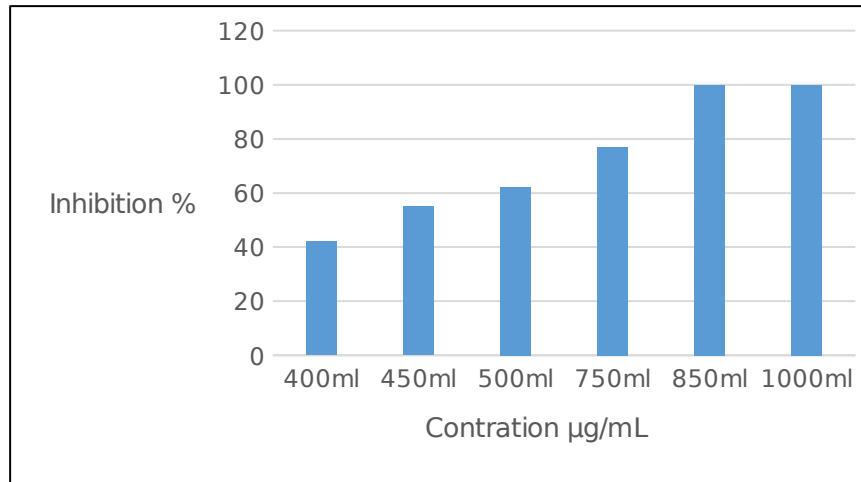


Figure 44 : Taux d'inhibition de *Microsporium gypseum* traité à l'extrait Méthanolique du mélange feuille/fleur de *Thymelaea hirsuta*.

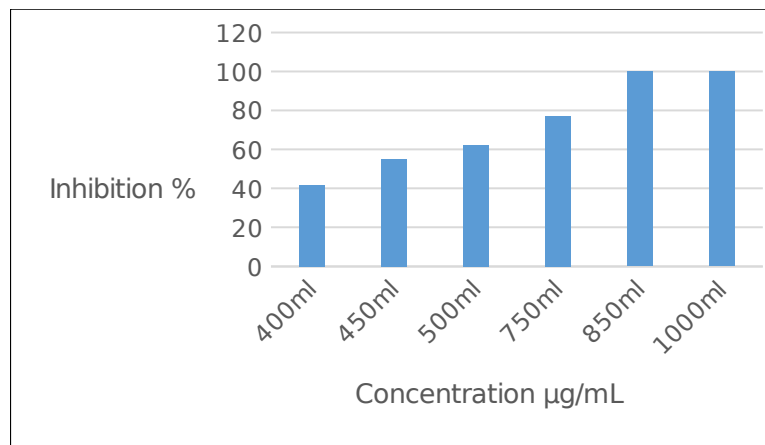


Figure 45 : Taux d'inhibition de *Microsporium gypseum* traité à l'extrait éthanolique du mélange feuille/fleur de *Thymelaea hirsuta*.

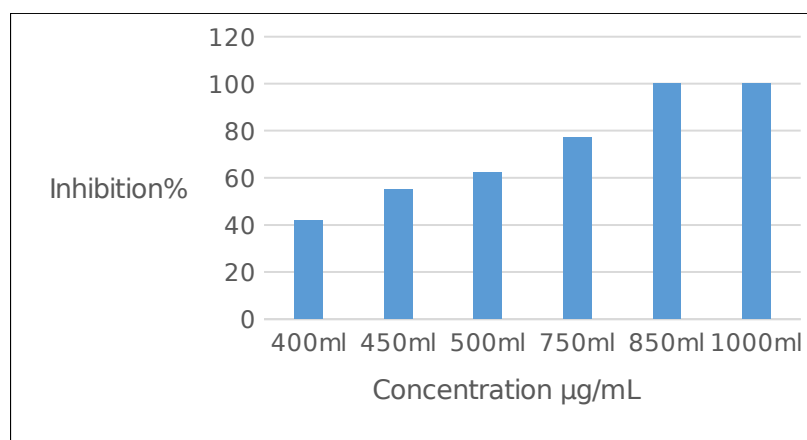


Figure 46 : Taux d'inhibition de *Microsporium gypseum* traité à l'extrait aqueux du mélange feuille/fleur de *Thymelaea hirsuta*.

II-4-2-1-3- *Microsporium audouinii*

Les agissements des différents extraits de *T. hirsuta* sur l'inhibition de *Microsporium audouinii* sont représentés dans les figures 47-48-49-50-51 et 53

II-4-2-1-3-1- L'huile essentielle (HE)

Comme les extraits cités, l'inhibition du champignon est influencée par la concentration de l'huile essentielle et permet d'obtenir $43,20 \pm 155\%$ sur le lot $400\mu\text{g/mL}$, $52,35 \pm 2,78\%$ à $450\mu\text{g/mL}$, et $56,65 \pm 1,20\%$ sur le lot de $500\mu\text{g/mL}$, alors qu'à $750\mu\text{g/mL}$ elle est de l'ordre de $86,64 \pm 0,56\%$, mais 100% pour les lots de 850 et $1000\mu\text{g/mL}$ (Fig. 47).

II-4-2-1-3-2- Extrait d'éther de pétrole

L'inhibition de la croissance, après 15 jours d'incubation, est plus prononcée à fortes concentrations (100% sur les essais de 850 et $1000\mu\text{g/mL}$) et diminue progressivement avec la baisse de cette dernière. C'est ainsi qu'à $750\mu\text{g/mL}$, une inhibition de l'activité cellulaire de l'ordre de $76,45 \pm 1,14\%$ a été enregistrée et ce n'est qu'à $43,68 \pm 7,88 - 46,98 \pm 2,76$ et $51,34 \pm 0,39\%$ qu'ont été obtenues les résultats sur les tests de 400 – 450 et $500\mu\text{g/mL}$ (Fig. 48). En se basant sur l'évolution de cette inhibition qui est conditionnée par la concentration appliquée.

II-4-2-1-3-3- Extrait Dichlorométhane

Les doses utilisées pour l'extrait précédent, permettent chez le dichlorométhane d'agir différemment sur l'inhibition de la croissance du pathogène. En effet, l'inhibition est la même comme précédemment (100%) à 850 et $1000\mu\text{g/mL}$, alors que celle-ci baisse à $750\mu\text{g/mL}$ atteignant $78,60 \pm 0,80\%$, par contre, une chute de la concentration de l'extrait comprise entre 500 et $450\mu\text{g/mL}$ a entraîné une réduction remarquable de son efficacité et enregistre par conséquent des données de l'ordre de $42,77 \pm 1,21(400\mu\text{g/mL}) - 51,94 \pm 0,39 (450\mu\text{g/mL})$ et $52,23 \pm 2,78\%$ ($500\mu\text{g/mL}$) (Fig. 49).

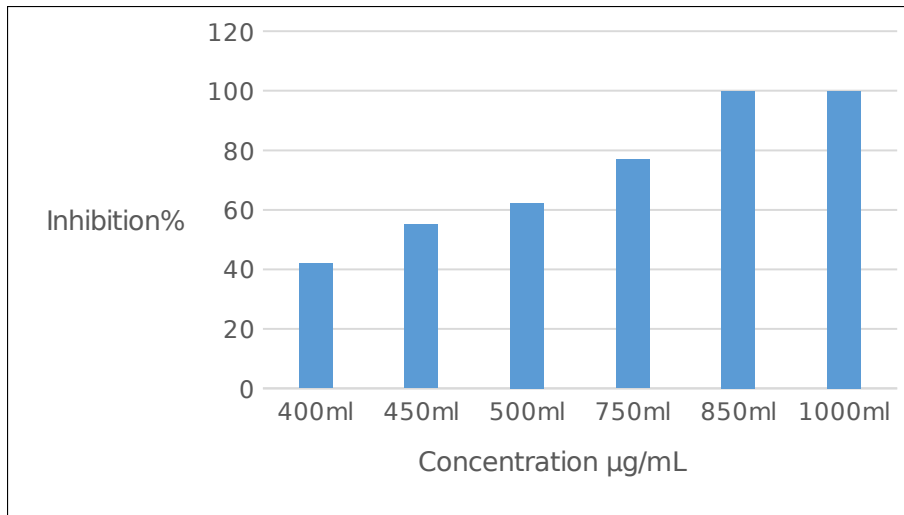


Figure 47 : Taux d'inhibition de *Microsporium audouinii* traité par l'HE

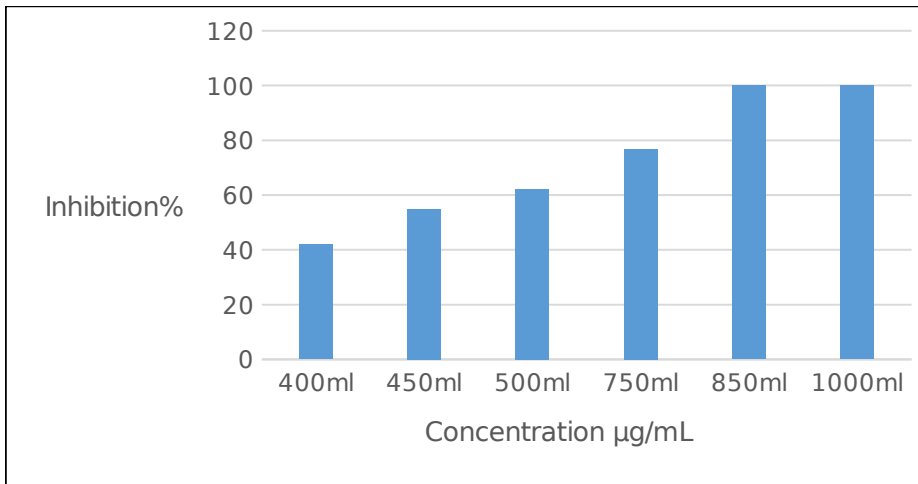


Figure 48 : Taux d'inhibition de *Microsporium audouinii* traité à l'extrait d'éther de pétrole.

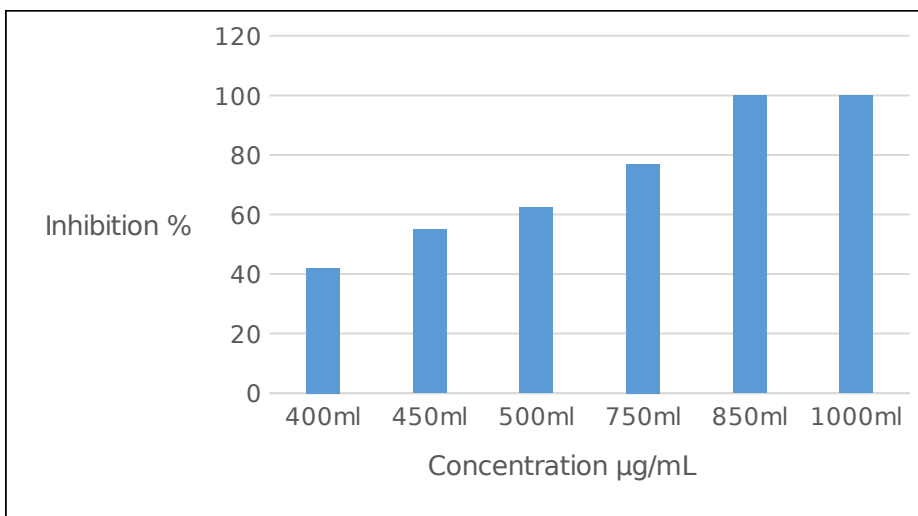


Figure 49 : Taux d'inhibition de *Microsporium audouinii* traité à l'extrait dichlorométhane.

II-4-2-1-3-4- Extrait Méthanolique

Comme cité précédemment, la propriété antifongique de l'extrait méthanolique vis-à-vis de *Microsporum audouinii* a été vérifiée. La variation de la concentration conduit à une inhibition du champignon étudié mais à des taux différents, les valeurs sont comme suites : $38,44 \pm 2,46\%$ - $44,91 \pm 1,93\%$ - $44,9 \pm 1,93$ et $54,52 \pm 1,25\%$ respectivement pour les doses de 400 – 450 – 500 et 750 $\mu\text{g/mL}$, alors que celle de 850 et 1000 $\mu\text{g/mL}$ sont extrêmes (100%) (Fig. 50).

II-4-2-1-3-5- Extrait Ethanolique

La figure 51 montre une variation dans l'inhibition de *M. audouinii* lorsqu'il est traité à l'extrait éthanolique à différente concentration. En effet, le taux d'inhibition du pathogène augmente avec l'accroissement de la concentration. Dans les lots de 400 – 450 et 500 $\mu\text{g/mL}$, les taux d'inhibition sont de l'ordre de $76,44 \pm 1,29\%$ - $45,36 \pm 3,91\%$ et $49,71 \pm 1,03\%$, par contre, ils se chiffrent à $76,44 \pm 1,29\%$ pour 750 $\mu\text{g/mL}$ et 100% à 850 et 1000 $\mu\text{g/mL}$.

II-4-2-1-3-6- Extrait aqueux

L'action de l'extrait aqueux sur *M. audouinii* ressemble à ceux précédemment étudiés ; sa présence inhibe l'activité du champignon. L'expérimentation a montré que les taux d'inhibition dépendent des concentrations du milieu de culture et enregistrent ainsi : $37,95 \pm 1,27\%$ (400 $\mu\text{g/mL}$ – $47,56 \pm 2,41\%$ (450 $\mu\text{g/mL}$) – $51,27 \pm 2,62\%$ (500 $\mu\text{g/mL}$) – $81,78 \pm 1,27\%$ (750 $\mu\text{g/mL}$) et 100% (850 et 1000 $\mu\text{g/mL}$) (Fig. 52).

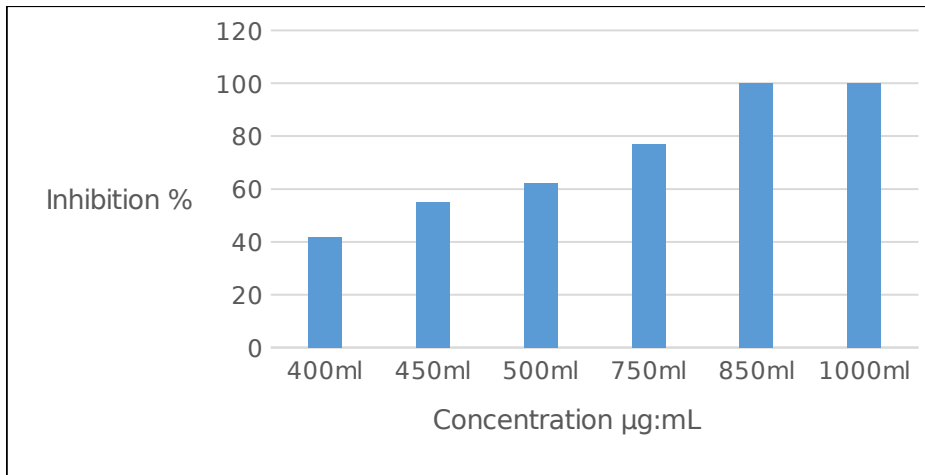


Figure 50 : Taux d'inhibition de *Microsporium audouinii* traité à l'extrait méthanolique.

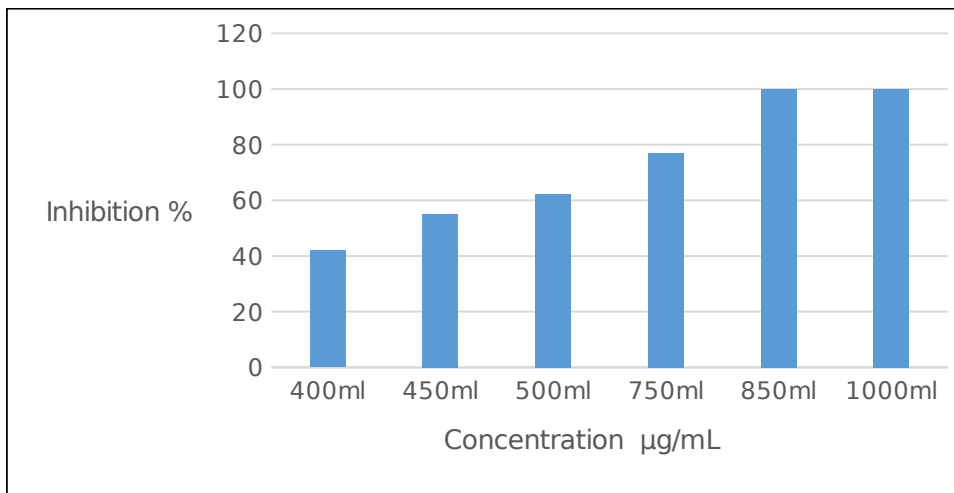


Figure 51 : Taux d'inhibition de *Microsporium audouinii* traité à l'extrait éthanolique.

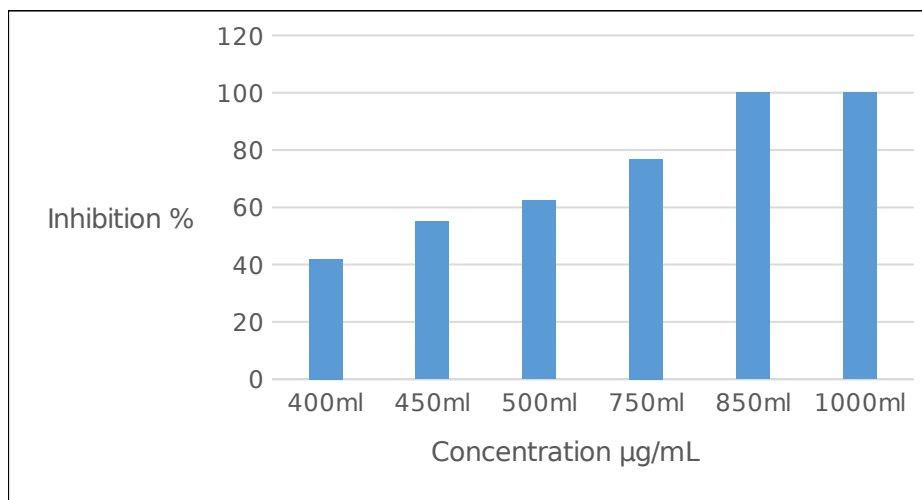


Figure 52 : Taux d'inhibition de *Microsporium audouinii* traité à l'extrait aqueux.

II-4-2-2- La croissance mycélienne

II-4-2-2-1- *Trichophyton Rubrum*

II-4-2-2-1-1- Huile essentielle (HE)

La méthode dite par hydrodistillation semble plus performante dans l'extraction des métabolites à propriétés antifongiques par rapport à la méthode précédente. Les résultats sont relativement plus intéressants que ceux enregistrés dans les essais cités précédemment.

Les résultats de l'étude statistique ressemblent à celle de tous les extraits précédemment étudiés. Le test $F_{6,14} = 10692,52$ à $p < 0,05$ justifie également l'influence de la dose du décocté sur la propagation du pathogène avec des moyennes significativement différentes : $41,422 \pm 1,679\text{mm}$ (témoin) – $24,178 \pm 0,685\text{mm}$ ($400\mu\text{g/mL}$) – $17,156 \pm 0,844\text{mm}$ ($450\mu\text{g/mL}$) – $14,889 \pm 0,55\text{mm}$ ($500\mu\text{g/mL}$) et $4,822 \pm 0,426\text{mm}$ pour le $750\mu\text{g/mL}$ (aucun résultat numérique n'est relevé à 850 et $1000\mu\text{g/mL}$).

La croissance du champignon est importante ($,333 \pm 1,7\text{mm}$), lorsque aucune substance n'est ajoutée au milieu de culture (essai témoin), et tendent à diminuer progressivement avec l'addition d'huile essentielle ; la quantité additionnée influence la croissance mycélienne du champignon et permettent d'obtenir les valeurs suivantes : $33,333 \pm 00,00\text{mm}$ ($400\mu\text{g/mL}$), $27 \pm 1,247\text{mm}$ ($450\mu\text{g/mL}$) et $23,00 \pm 00,00\text{mm}$ pour $500\mu\text{g/mL}$ et ce n'est que $8,333 \pm 0,471\text{mm}$ pour celui traité à raison de $750\mu\text{g/mL}$ (Fig. 53).

Dans le comportement physiologique du champignon, les mêmes paramètres ayant été observés lors des traitements précédents, ont été également enregistrés après utilisation du décocté. Les plus fortes concentrations affectent également sa vitesse de croissance et aucune spore n'a été formée dans tous les lots traités même à faible dose.

II-4-2-2-1-2- Extrait d'éther de pétrole

L'extrait éther de pétrole a confirmé sont effets sur la croissance du dermatophytes considéré. La croissance diminue significativement en fonction de leurs doses avec des valeurs moyennes de $43,422 \pm 1,679\text{mm}$ – $28,044 \pm 1,101\text{mm}$ – $21,6 \pm 0,879\text{mm}$ – $19,044 \pm 0,977\text{mm}$ – $8,2 \pm 0,59\text{mm}$ – $00 \pm 00\text{mm}$ – $00 \pm 00\text{mm}$ respectivement pour $0\mu\text{g/mL}$ – $400\mu\text{g/mL}$ – $450\mu\text{g/mL}$ – $500\mu\text{g/mL}$ – $750\mu\text{g/mL}$ – $850\mu\text{g/mL}$ – $1000\mu\text{g/mL}$.

Après une journée d'incubation du pathogène dans un milieu contrôlé sa croissance semble lié à la concentration du milieu de culture. C'est ainsi qu'une légère activité avec des valeurs de $5,333 \pm 1,247$ (essai control) et $4,333 \pm 0,471\text{mm}$ est visible uniquement à des

doses de 0 μ g/mL et 400 μ g/mL. Par contre, les concentrations suivantes : 450 μ g/mL – 500 μ g/mL – 750 μ g/mL retardent la stimulation de l'activité du champignon ; plus la concentration est forte et plus la phase de latence est longue. Les résultats récapitulés dans le tableau 23 (Annexe 3) enregistrent $02 \pm 0,816$ mm pour la dose de 450 μ g/mL après 2 jours d'incubation et $3,333 \pm 0,471$ mm pour les concentrations de 500 μ g/mL – 750 μ g/mL, celle-ci est observée 04 jours après le début de l'expérimentation ; toutes fois, la croissance mycélienne (Fig. 54) semble inactive pour des concentrations de l'ordre de 850 μ g/mL et 1000 μ g/mL (doses létales).

Les données enregistrées montrent aussi une différence dans la durée de la multiplication des cellules mycéliennes nécessaire pour accomplir la phase exponentielle du cycle de développement du champignon être également affectée. Contrairement au témoin un arrêt de l'activité cellulaire est noté 7 jours seulement après son incubation dans le milieu à raison de 450- 500 et 750 μ g/mL.

D'une manière générale, La présence de l'extrait éther de pétrole bloque la formation des spores.

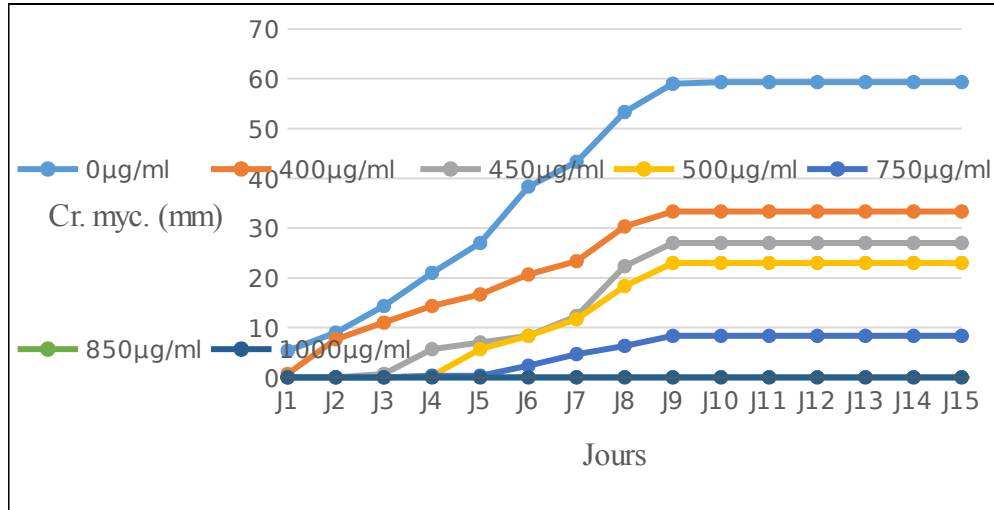


Figure 53 : Cinétique de croissance mycélienne de *Trichophyton Rubrum* traité à l'HE

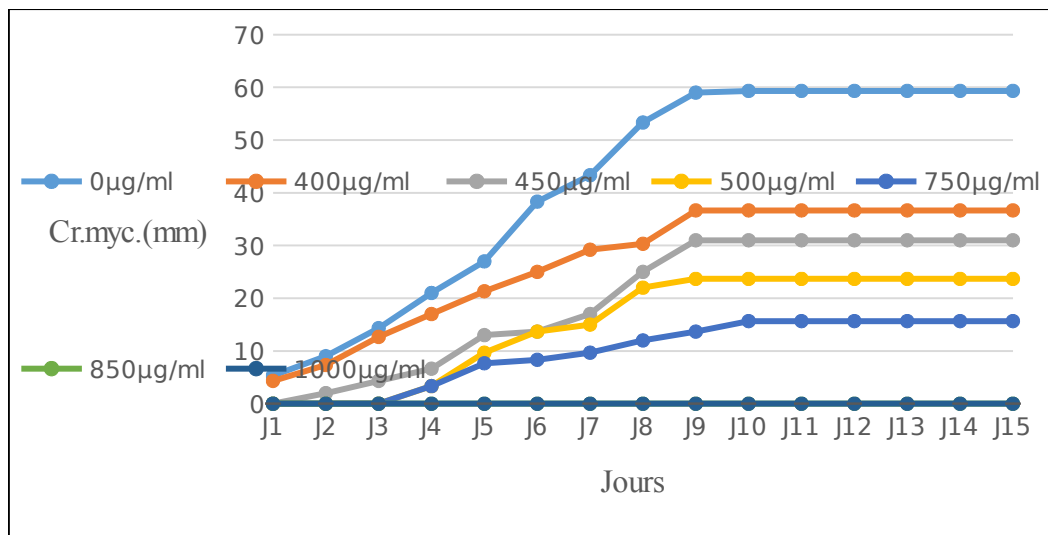


Figure 54 : Cinétique de croissance mycélienne de *Trichophyton Rubrum* traité à l'extrait d'éther de pétrole.

II-4-2-2-1-3- Extrait Dichlorométhane

Comme l'extrait précédent, celui du dichlorométhane a également confirmé son effet antifongique sur *Trichophyton Rubrum*. Après incubation, un maximum d'activité de $59,333 \pm 1,7$ mm de diamètre occupé a été observé chez le témoin. Parallèlement, l'expérimentation a montré, d'une part, que la croissance du champignon régresse ; cette dernière agit sensiblement à l'accroissement de la concentration appliquée ($37,667 \pm 1,155$ mm – $32,333 \pm 1,555$ mm – $28,667 \pm 1,528$ et $15,333 \pm 0,577$ mm respectivement pour les doses de 400 – 450 – 500 et 750 $\mu\text{g/mL}$) et devient nulle à 850 et 1000 $\mu\text{g/mL}$. L'analyse de la variance bifactorielle (Annexe 3) a révélé également l'effet du facteur "concentration" avec un test $F_{6,14} = 7700,143$ à $P < 0,05$. Les valeurs moyennes de la croissance mycélienne du test de Newman-Keuls sont significativement différentes avec $25,467 \pm 1,101$ mm – $18,489 \pm 0,879$ – $16,6 \pm 0,977$ – $8,289 \pm 0,51$ – 00 ± 00 et 00 ± 00 mm respectivement pour 400 $\mu\text{g/mL}$ – 450 $\mu\text{g/mL}$ – 500 $\mu\text{g/mL}$ – 750 $\mu\text{g/mL}$ – 850 $\mu\text{g/mL}$ et 1000 $\mu\text{g/mL}$ par rapport au témoin qui a enregistré une moyenne de croissance de l'ordre de $41,422 \pm 1,679$ mm.

Dans son cycle de développement, l'inhibition de la croissance de *Trichophyton Rubrum* est observée non seulement sur l'importance de sa croissance mycélienne, mais aussi sur son comportement vis-à-vis de l'extrait étudié (Fig. 55). La croissance semble s'achevée dans les lots traités quelques jours avant celle du témoin ; le champignon termine son cycle de développement plus rapidement, cette dernière (croissance) dépend de la concentration du milieu extérieur avec 8 jours dans le lot témoin, ainsi que 8 jours pour les doses comprises entre 400 - 500 $\mu\text{g/mL}$ et la concentration de 750 $\mu\text{g/mL}$.

Le temps pris en compte pour sa phase exponentielle semble être lié également à la concentration de l'extrait pour que le champignon puisse exprimer sa croissance mycélienne. Comme l'extrait précédent, les résultats obtenus sur les lots traités sont largement les mêmes que celui du témoin (8 jours), une réduction progressive est observée lorsque la concentration en extrait augmente et enregistre de ce fait _ jours pour le 400 $\mu\text{g/mL}$ – 9 jours (450 $\mu\text{g/mL}$) – 8 jours (500 $\mu\text{g/mL}$) et pour le lot 750 $\mu\text{g/mL}$.

D'une manière générale, la présence de l'extrait de dichlorométhane (comme tous les extraits) a inhibée l'apparition des spores.

II-4-2-2-1-4- Extrait méthanolique

La réaction du champignon vis-à-vis de l'extrait méthanolique ressemble à celle de tous les extraits étudiés. C'est ainsi que sa croissance est importante ($59,333 \pm 1,7$ mm), lorsque aucune substance n'est rajoutée au milieu de culture (essai témoin), et tendent à régresser avec l'addition de l'extrait méthanolique ; la quantité additionnée influence la croissance mycélienne du champignon et permettent donc d'obtenir les valeurs suivants : $40,333 \pm 0,471$ – $36,333 \pm 1,247$ – $36,333 \pm 1,27$ - $30,333 \pm 0,41$ – 00 ± 00 et 00 ± 00 respectivement pour les concentrations de 400 – 450 – 500 – 750 – 850 et 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 56).

La variation de la concentration du milieu de culture joue un rôle considérable dans le fonctionnement physiologique du champignon. Les moyennes de croissance mycéliennes (Tab.9) enregistrées diffèrent significativement ($F_{6, 14} = 7151,079$, $P < 0,05$) et tendent à démontrer l'importance du facteur "dose" de cette extrait dans la limitation de l'activité dermatophytique avec $41,422 \pm 1,679$ mm pour le témoin ($0\mu\text{g/mL}$), $26,978 \pm 0,888$ mm ($400\mu\text{g/mL}$), $24,422 \pm 1,168$ mm ($450 \mu\text{g/mL}$), $19,867 \pm 1,066$ mm ($500\mu\text{g/mL}$) et $16,489 \pm 0,718$ mm ($750\mu\text{g/mL}$). Mais aucun signe de vitalité n'a été observé aux doses de 850 et $1000\mu\text{g/mL}$, mettant ainsi en évidence la propriété létale de l'extrait méthanolique avec de telles concentrations.

L'influence de la composition chimique du milieu de culture sur le comportement de *Trichophyton Rubrum*, elle peut se traduire par :

1- sa vitesse de multiplication est ainsi rapide, elle est proche de 5,2 mm/jour lorsqu'il est inoculé dans des conditions favorables à son développement (témoin). Par contre, celle-ci se serait alors déprimée en présence de l'extrait méthanolique.

Les mesures effectuées ont donné les résultats suivants : $3,484$ mm/j – $3,121$ mm/j – $3,121$ mm/j et $2,833$ mm/j respectivement pour les doses de 400 – 450 - 500 et $750 \mu\text{g/mL}$.

2- la durée de la phase exponentielle est relativement longue chez le témoin (8 jours) et de même dans les boîtes de 400 – 450 - 500 $\mu\text{g/mL}$ ainsi que $750 \mu\text{g/mL}$. Cette différence est due, en partie, à la phase de latence observée lorsque *Trichophyton Rubrum* est traité à raison de $750\mu\text{g/mL}$.

En fait, la présence de l'extrait méthanolique (comme les extraits précédents) rompt la production des spores et joue probablement le rôle d'inhibiteur métabolique naturel.

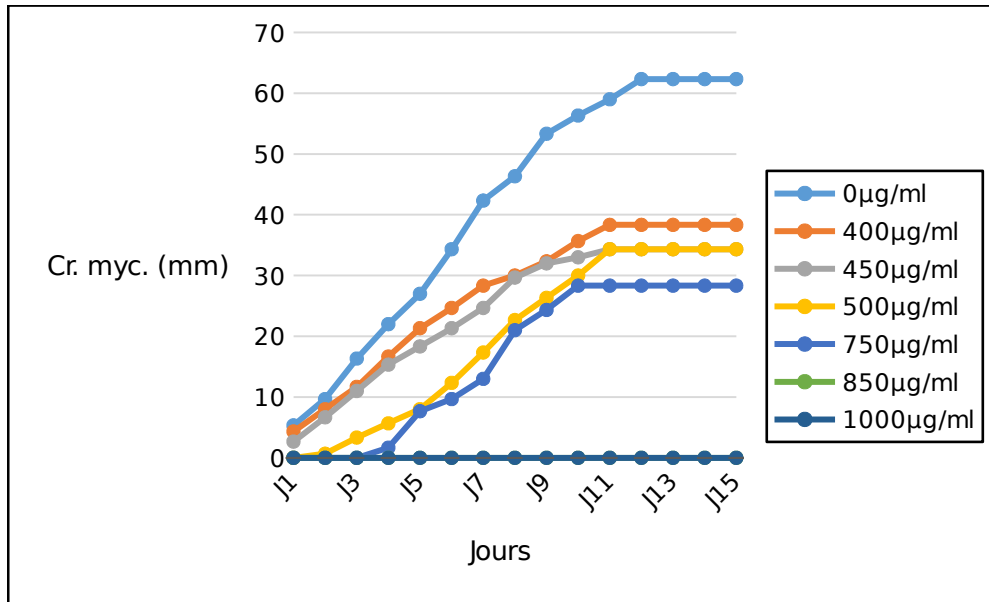


Figure 55 : Cinétique de croissance mycélienne de *Trichophyton Rubrum* traité à l'extrait de Dichlorométhane

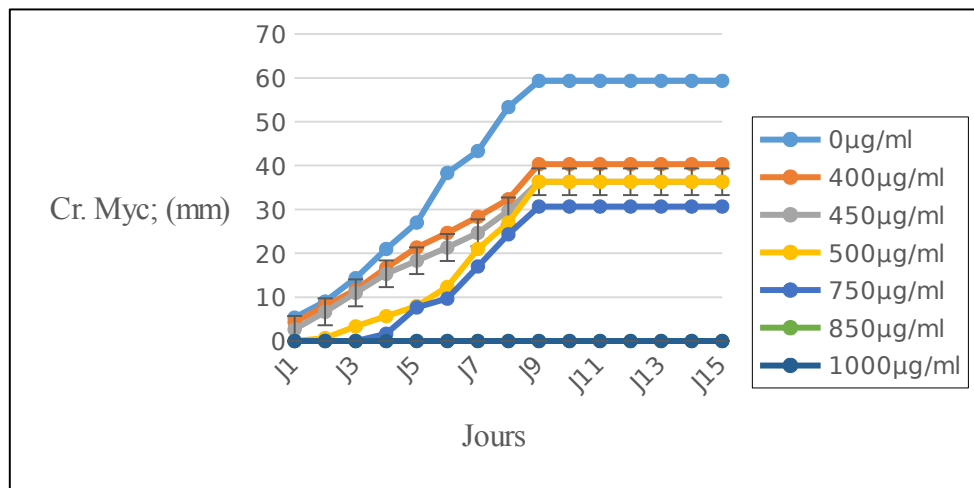


Figure 56 : Cinétique de croissance mycélienne de *Trichophyton Rubrum* traité à l'extrait méthanolique.

II-4-2-2-1-5- Extrait éthanolique

L'extrait éthanolique semble réagir avec la même tendance présente dans tous les essais réalisés par la méthode des solvants organiques. La croissance mycélienne réagit inversement à l'augmentation de la concentration. Comparativement au témoin ($41,422 \pm 1,679\text{mm}$), les moyennes enregistrées sont statistiquement différentes avec $26,978 \pm 0,888\text{mm}$ – $20,667 \pm 1,101\text{mm}$ – $18,156 \pm 0,969\text{mm}$ – $9,178 \pm 0,444\text{mm}$ – $00 \pm 00\text{mm}$ – $00 \pm 00\text{mm}$ respectivement pour $400\mu\text{g/mL}$ - $450\mu\text{g/mL}$ - $500\mu\text{g/mL}$ - $750\mu\text{g/mL}$ - $850\mu\text{g/mL}$ - $1000\mu\text{g/mL}$.

Sa vitesse de multiplication ressemble à celle enregistrée avec l'éther de pétrole et le méthanol, à des doses faibles (400 et $450\mu\text{g/mL}$), par contre, elle est fortement réduite à $750\mu\text{g/mL}$ ($1,467$ mm/j contre $2,833$ mm/j).

Tout au long de son cycle de développement, on remarque que la concentration appliquée affecte également les différentes phases de croissance. La phase exponentielle a duré 8 jours (témoin) – 8 ($400\mu\text{g/mL}$) – 8 ($450\mu\text{g/mL}$) – 10 ($500\mu\text{g/mL}$) – 8 ($750\mu\text{g/mL}$) – 0 ($850\mu\text{g/mL}$) et 0 jours ($1000\mu\text{g/mL}$). la croissance observée est cumulée, elle est restée inchangée (phase stationnaire), c'est ainsi que les maxima des croissances enregistrées de *Trichophyton Rubrum* sont respectivement de l'ordre de $59,333 \pm 1,7\text{mm}$ – $38,667 \pm 0,471\text{mm}$ – $32,333 \pm 1,633\text{mm}$ – $30,333 \pm 0,471\text{mm}$ – $11,667 \pm 0,471\text{mm}$ – $00 \pm 00\text{mm}$ et $00 \pm 00\text{mm}$ (Fig. 57). En revanche, la phase de latence semble très courte chez le témoin et celui traité à raison de $400\mu\text{g/mL}$.

Les observations enregistrées sur la sporulation, avec les différents extraits, peuvent être évidemment repris pour l'extrait éthanolique.

II-4-2-2-1-6- Extrait aqueux

Le résidu des opérations précédentes à l'aide des solvants organiques a subi une extraction avec de l'eau distillée, le produit final à donner l'extrait aqueux.

Les résultats montrent une différence dans la croissance et le développement du dermatophytes (Fig. 58). C'est ainsi que tous les lots qui ont été soumis à un traitement ont montré une réduction de l'activité fongique par rapport au témoin ($59,333 \pm 1,7\text{mm}$) conduit dans les mêmes conditions de l'expérimentation, par contre, l'action semble fongicide à partir de $850\mu\text{g/mL}$. Les données enregistrées à la fin de son cycle de

développement sont les suivantes : $38,667 \pm 0,943\text{mm}$ – $32,667 \pm 1,247\text{mm}$ – $30,333 \pm 0,943\text{mm}$ – $11,333 \pm 0,471\text{mm}$ – $00 \pm 00 \text{ mm}$ – $00 \pm 00\text{mm}$, respectivement pour les concentrations de $400\mu\text{g/mL}$ - $450\mu\text{g/mL}$ - $500\mu\text{g/mL}$ - $750\mu\text{g/mL}$ - $850\mu\text{g/mL}$ - $1000\mu\text{g/mL}$.

L'analyse de la variance a justifié l'influence du facteur concentration de l'extrait aqueux sur la croissance mycélienne de *Trichophyton Rubrum* ($F_{6, 14} = 8524,5$, $P < 0,05$). En effet, les moyennes sont significativement différentes, le plus fort étalement est observé chez le témoin en absence d'extrait avec $41,422 \pm 1,679\text{mm}$, alors que celles des traitements ont subi progressivement une réduction significative et se chiffrent alors à $27,756 \pm 1,015\text{mm}$ ($400\mu\text{g/mL}$) – $20,00 \pm 1,044\text{mm}$ ($450\mu\text{g/mL}$) – $17,289 \pm 0,853\text{mm}$ ($500\mu\text{g/mL}$) – $7,111 \pm 0,426\text{mm}$ ($750\mu\text{g/mL}$) – $00 \pm 00\text{mm}$ ($850\mu\text{g/mL}$) – $00 \pm 00\text{mm}$ ($1000\mu\text{g/mL}$).

L'absence des spores dans les lots expérimentaux (après 15 jours d'essai) constitue un fait important dans la limitation de la propagation du champignon. Ces résultats confirment ceux obtenus avec les différents extraits (par l'utilisation des solvants organiques).

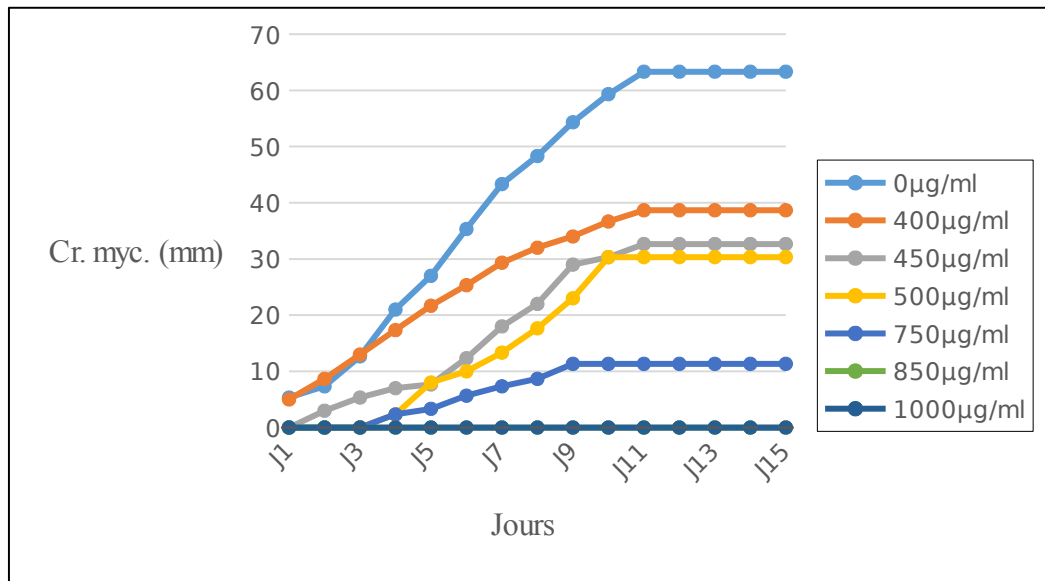


Figure 57 : Cinétique de croissance mycélienne de *Trichophyton Rubrum* traité à l'extrait Ethanolique.

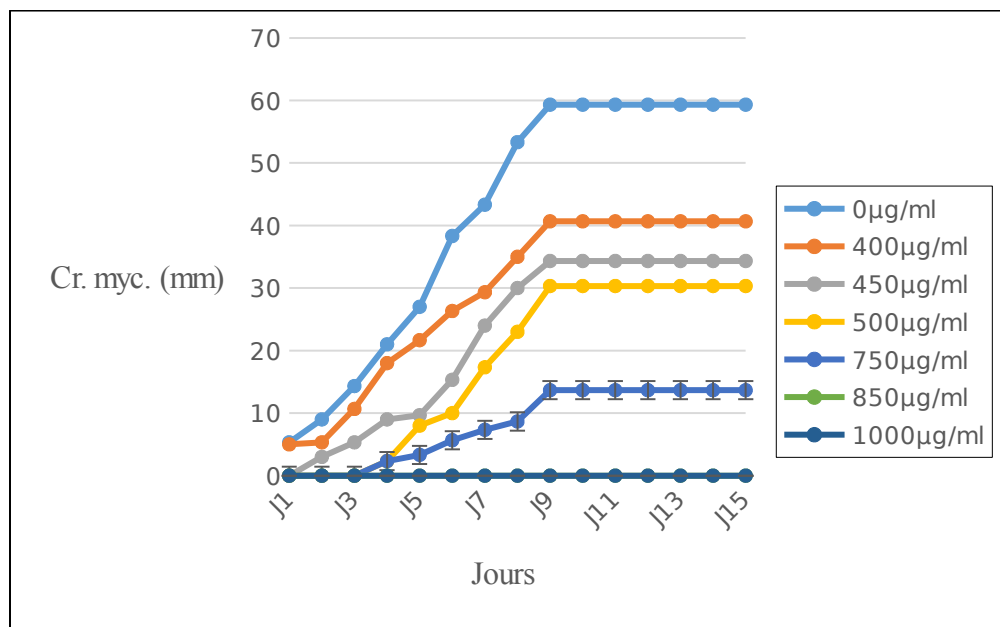


Figure 58 : cinétique de croissance mycélienne de *Trichophyton Rubrum* traité à l'extrait aqueux.

II-4-2-2-2- *Microsporium gypseum*

II-4-2-2-2-1- Huile essentielle (HE)

Comme chez *Trichophyton Rubrum*, l'huile essentielle a gêné le développement normal de *M. gypseum*, par rapport au témoin réalisé dans les mêmes conditions mais en absence de l'extrait, les élargissements observés sur son tissu mycélien montrent qu'ils sont morphologiquement discernables, le pathogène est d'autant plus actif dans les conditions normales, son optimum de croissance est atteint sur le témoin avec $54,333 \pm 1,7$ mm. En revanche, cette dernière diminue considérablement en présence de l'extrait (HE), justifiant ainsi son action inhibitrice dans l'activité du dit champignon (Fig. 59).

La réponse du champignon vis-à-vis d'HE dépend entre autres de sa concentration appliquée dans le milieu de culture. En effet, à la fin de son cycle de développement, les maximums de croissance cellulaire sont de l'ordre de $27,666 \pm 0,471$ – $18,333 \pm 1,247$ – $16,333 \pm 2,625$ et $4,333 \pm 0,408$ mm respectivement pour les 400 – 450 – 500 et 750 μ g/mL (850 et 1000 μ g/mL sont considérées comme doses létales).

Cet effet a été remarquablement confirmé, les moyennes calculées à l'aide du logiciel Stat box ont été comparées comme précédemment par le même test d'analyse (Newman-Keuls).

L'analyse des différentes croissances mycéliennes ($F_{6, 14} = 5087,551$, $P < 0,05$) sont significativement différentes avec $54,333 \pm 1,7$ mm de diamètre enregistré sur le lot témoin (0 μ g/ml), $21,778 \pm 0,615$ mm sur le lot 400 μ g/mL, $13,956 \pm 1,552$ mm sur celui de 450 μ g/mL et $11,259 \pm 2,175$ mm sur le lot 500 μ g/mL, par contre celui traité à 750 μ g/mL n'a enregistré que $2,978 \pm 0,48$ mm.

En outre, l'effet bénéfique d'HE issu du mélange feuilles/fleurs de *Thymelaea hirsuta* se remarque également sur le comportement de *M. gypseum* ; l'arrêt des divisions cellulaires et précoce sur les lots traités : sur les essais de 450 – 500 et 750 μ g/mL, la croissance a été achevée 6 jours après l'incubation, par contre, elle a enregistré 7 jours sur le témoin et le lot de 400 μ g/mL.

Enfin, le cycle de reproduction semble également perturbé, en effet la sporulation est inhibée par l'addition d'HE et aucune spore n'a été formée.

II-4-2-2-2-2- Extrait d'éther de pétrole

Les résultats montrent une nette variation de la croissance et du développement de *Microsporium gypseum* lorsqu'il est traité à l'extrait d'Ether de pétrole, comparée à l'essai témoin réalisé dans les mêmes conditions expérimentales (Fig. 60). En effet, le maximum de croissance est conditionné par la présence de l'extrait, par sa concentration et la durée d'incubation.

Afin d'évaluer cet effet (effet de la concentration), une étude statistique a été réalisée ; c'est ainsi que la concentration du milieu de culture en extrait semble influencer la croissance de *Microsporium gypseum* ($F_{6,14} = 8583.239$, $P < 0.05$). Les moyennes calculées à partir des résultats obtenus à différentes concentrations ont été significativement différentes avec des valeurs de : $44,6 \pm 1,728$ – $23,467 \pm 0,615$ – $17,444 \pm 1,115$ – $12,8 \pm 1,181$ – $6,00 \pm 0,461$ – 00 ± 00 et 00 ± 00 mm respectivement pour le témoin - 400 – 450 – 500 – 750 – 850 – 1000 μ g/mL.

Après un jour d'incubation du pathogène dans le milieu control et en raison de sa croissance rapide, le déclenchement de la multiplication mycélienne a été plus important (11,333mm). Celui-ci diminue progressivement en fonction de la concentration du milieu, il est de l'ordre de 5,666mm lorsqu'il est traité à raison de 400 μ g/mL et nulle dans le reste des essais. Ce n'est qu'après 2 (450 μ g/mL) et 3 jours (500 et 750 μ g/mL) que l'initiation cellulaire a eu lieu sur les lots expérimentés.

Comme les essais cités précédemment, la formation des spores est bloquée en présence des métabolites secondaires de *Thymeleae hirsuta* et cela quel que soit la nature des principes actifs, leurs méthodes d'extraction et même de leurs concentrations employées dans les milieux de cultures.

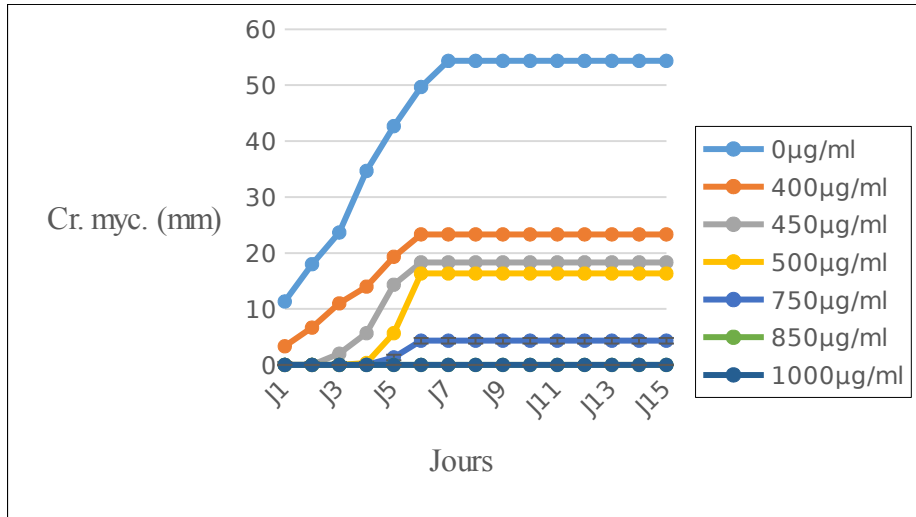


Figure 59 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporium gypseum* traité à l'HE.

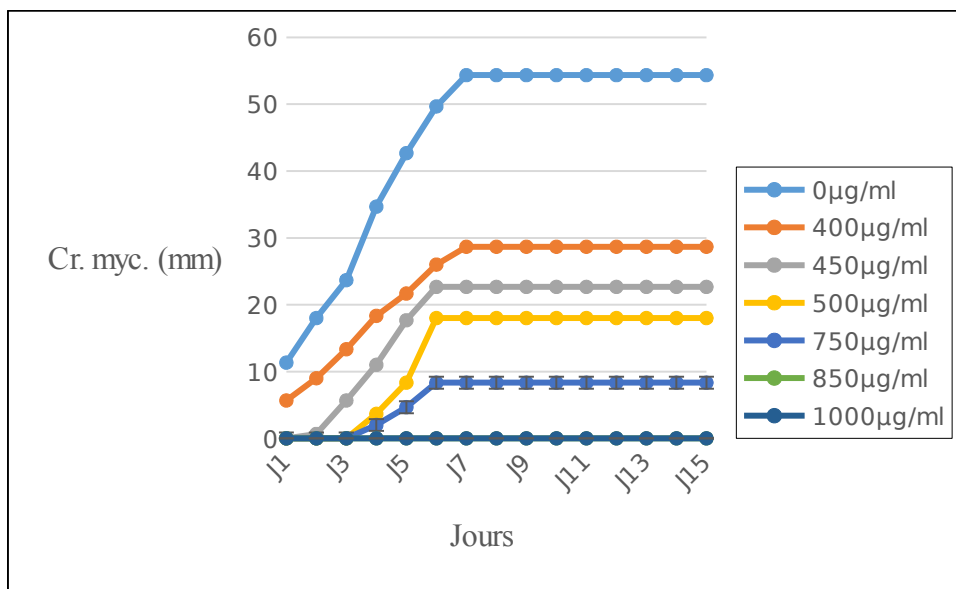


Figure 60 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporium gypseum* traité à l'extract Ether de pétrole.

II-4-2-2-3- Extrait Dichlorométhane

Comme l'extrait précédent, celui du dichlorométhane a également confirmé son effet antifongique sur *Microsporium gypseum*. Après 15 jours d'incubation, un maximum d'activité de $54,333 \pm 1,7$ mm de diamètre occupé a été observé chez le témoin. Parallèlement, l'expérimentation a montré, d'une part, que la croissance du champignon régresse ; cette dernière agit sensiblement à l'accroissement de la concentration appliquée ($29,333 \pm 1,247$ mm – $21,666 \pm 0,471$ – $17,333 \pm 0,943$ et $8,666 \pm 0,471$ mm respectivement pour les doses de 400 – 450 – 500 et 750 $\mu\text{g/mL}$) et devient nulle à 850 et 1000 $\mu\text{g/mL}$. Pour déterminer l'influence du facteur concentration, une analyse statistique par l'étude de la variance à deux critères de classification a été effectuée, dans cet essai, une différence significative a été également observée entre les moyennes des activités mycéliennes. La valeur de l'effet du facteur "concentration" ($F_{6,14} = 9850,853$ à $P < 0,05$) est très largement supérieure à celle tabulée ($F_{6,14} = 2,85$ à $P < 0,05$). Les moyennes des différentes croissances mycéliennes se chiffrent donc à $44,6 \pm 1,728$ mm pour le témoin et $24,4 \pm 1,108$ mm - $16,756 \pm 0,628$ mm - $12,378 \pm 0,816$ mm - $6,244 \pm 0,426$ mm – 00 ± 00 mm - 00 ± 00 mm respectivement pour les mêmes doses utilisées.

Par ailleurs, le développement de *Microsporium gypseum* a suivi la même tendance que pour l'éther de pétrole ; les modifications provoquées sur la composition chimique du milieu de culture, par l'addition de l'extrait de dichlorométhane ont perturbé le fonctionnement du pathogène. En effet, une décroissance a été observée dans les lots expérimentés ; une réduction d'une journée (6 jours après inoculation) a été enregistrée dans la durée nécessaire à l'accomplissement de la croissance des essais allant de 450 à 1000 $\mu\text{g/mL}$, contrairement au témoin et l'essai 400 $\mu\text{g/mL}$ (7 jours après). En outre, en stimulant la phase de latence, le champignon semble réagir différemment vis-à-vis de l'extrait de dichlorométhane comme précédemment. C'est ainsi qu'un jour après l'incubation, le témoin et le lot 400 $\mu\text{g/mL}$ ont enregistré une activité évaluée à $11,333 \pm 0,943$ et $5,333 \pm 0,943$ mm, contrairement aux autres lots (absence d'activité). Le début de toute activité fongique dépend donc de la concentration de l'extrait dans le milieu où se développe le pathogène ; $0,667 \pm 0,577$ mm dans l'essai 450 $\mu\text{g/mL}$ a été observée le deuxième jour, par contre, ceux de 500 et 750 $\mu\text{g/mL}$ ont marqué un ajournement avec $4,333 \pm 0,577$ et $2,333 \pm 0,577$ mm après 4 jours d'incubation (850 et 1000 $\mu\text{g/mL}$ étant fongicides) (Fig. 61).

D'une manière générale, la présence de l'extrait de dichlorométhane (comme tous les extraits) a inhibée l'apparition des spores.

II-4-2-2-2-4- Extrait Méthanolique

La réaction du champignon vis-à-vis de l'extrait méthanolique ressemble à celle de tous les extraits étudiés. C'est ainsi que sa croissance est importante ($54,333 \pm 1,7\text{mm}$), lorsque aucune substance n'est rajoutée au milieu de culture (essai témoin), et tendent à régresser avec l'addition de l'extrait méthanolique ; la quantité additionnée influence la croissance mycélienne du champignon et permettent donc d'obtenir les valeurs suivants : $30,667 \pm 2,082$ – $20,333 \pm 0,577$ – $15,333 \pm 1,155$ - $7 \pm 0,816$ – 00 ± 00 et 00 ± 00 respectivement pour les concentrations de 400 – 450 – 500 – 750 – 850 et 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Statistiquement ($F_{6,14} = 6814,936$, $P < 0,05$), les moyennes de croissance cellulaire : $44,6 \pm 1,728\text{mm}$ (témoin) – $24,644 \pm 1,181\text{mm}$ (400 $\mu\text{g/mL}$) – $15,212 \pm 0,59\text{mm}$ (450 $\mu\text{g/mL}$) – $10,444 \pm 1,692\text{mm}$ (500 $\mu\text{g/mL}$) – $4,333 \pm 0,696\text{mm}$ (750 $\mu\text{g/mL}$) – $00 \pm 00\text{mm}$ (850 $\mu\text{g/mL}$) et $00 \pm 00\text{mm}$ (1000 $\mu\text{g/mL}$) sont significativement différentes, justifiant ainsi l'influence du facteur dose dans la dispersion du champignon sur les boîtes de pétri.

La production des cellules mycéliennes devrait avoir également un rapport avec le contenu du milieu de culture auquel est soumis le pathogène et être susceptible de varier avec les variations des concentrations de l'extrait étudié. Ces changements conduisent d'une part à une réduction du temps nécessaire à sa croissance (phase exponentielle) et enregistrent ainsi les mêmes résultats cités précédemment (7 jours pour le témoin et le 400 $\mu\text{g/mL}$ contre 6 jours pour 450 – 500 – 750 $\mu\text{g/mL}$ et 0 pour 850 et 1000 $\mu\text{g/mL}$). D'autre part, une immobilisation momentanée de l'activité du champignon a été observée au début des traitements et a duré 2 - 3 jours respectivement pour les essais de 450 et 500 - 750 $\mu\text{g/mL}$, contrairement au témoin et celui de 400 $\mu\text{g/ml}$ dont la croissance mycélienne a été notée dès le premier jours et se chiffrant à $11,33 \pm 1,155$ et $3,667 \pm 0,577\text{mm}$. Par contre pour ceux de 850 et 1000 $\mu\text{g/mL}$, aucune motivation n'a été enregistrée (Fig.62).

L'expérimentation réalisée par ajout de l'extrait méthanolique confirme la richesse que présente *Thymelaea hirsuta* en composés naturels pouvant inhiber la production de spores chez les espèces fongiques étudiées.

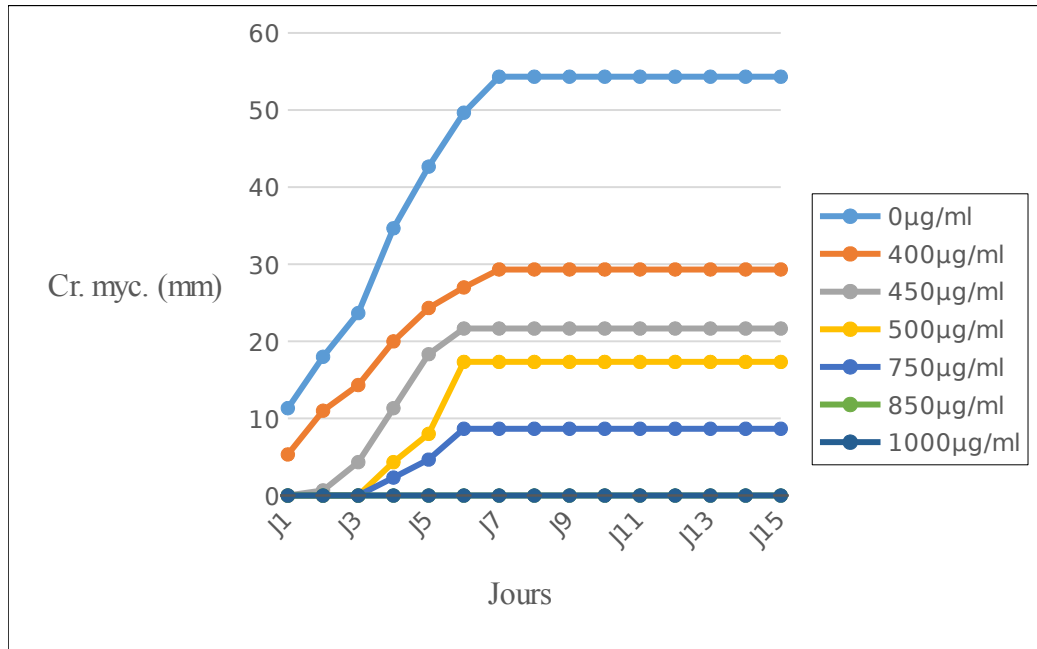


Figure 61 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporium gypseum* traité à l'extrait Dichlorométhane.

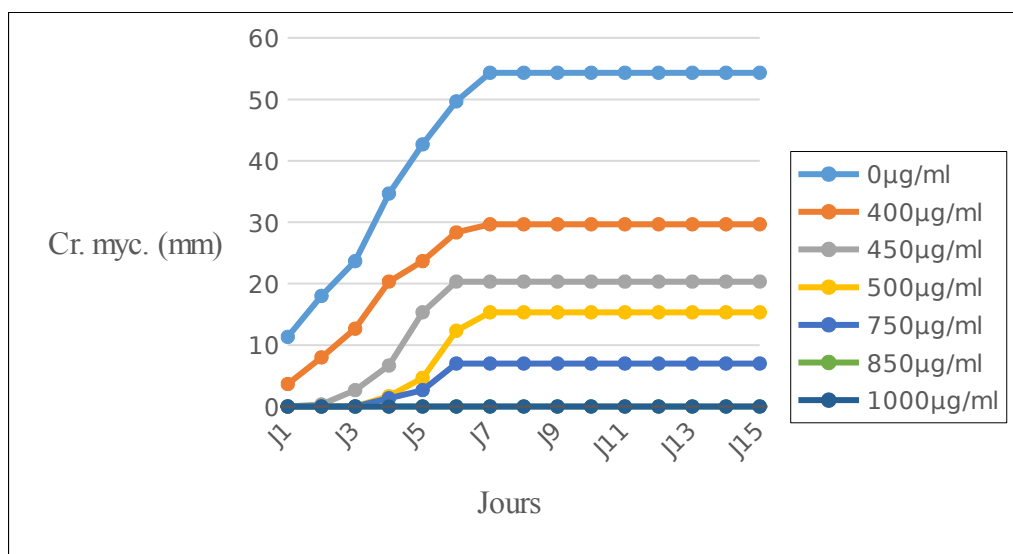


Figure 62 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporium gypseum* traité à l'extrait Méthanolique.

II-4-2-2-2-5- Extrait éthanolique

L'extrait éthanolique montre un effet puissant, sa réaction contre la prolifération des cellules mycéliennes de *Microsporium gypseum* est également confirmée ; elle est forte en son absence et enregistre un maximum de $54,333 \pm 1,7$ mm. En revanche, sa présence dans le milieu de culture a induit une régression dans leurs diffusions. Celle-ci est organisée selon la concentration de l'extrait éthanolique (Fig. 63) ; une relation inversement proportionnelle est observée, l'augmentation progressive de la dose employée a entraîné une réduction du diamètre envahi par *Microsporium gypseum*.

De même pour cet extrait, l'analyse de la variance (Annexe 2) a montré également l'influence du facteur concentration ($F_{6,14} = 10188,05$, $P < 0,05$) dans la limitation et l'empêchement du développement du pathogène basée sur sa propriété inhibitrice.

Après 7 jours d'activité, le champignon s'est arrêté de croître dans les essais témoins et celui de $400\mu\text{g/mL}$. Cependant, un recule d'une journée dans l'achèvement de sa croissance a été observée dans les tests de $450\mu\text{g/mL}$ - $500\mu\text{g/mL}$ - $750\mu\text{g/mL}$.

Quelque soit la quantité d'extrait éthanolique additionnée au milieu de culture, 15 jours après l'inoculation du champignon, aucune spore n'a été détectée sur les différents essais.

II-4-2-2-2-6- Extrait aqueux

Le résidu des opérations précédentes à l'aide des solvants organiques a subi une extraction avec de l'eau distillée, le produit final a donné l'extrait aqueux.

Les bioessais réalisés sur *Microsporium gypseum* ont confirmé à leur tour l'action antifongique de l'extrait aqueux. Les résultats montrent une croissance importante ($54,333 \pm 1,7$ mm) en absence de l'extrait, par contre, sa présence influence la croissance mycélienne du pathogène (Fig. 39) et permette d'obtenir les valeurs suivantes : $29,333 \pm 0,471$ – $24 \pm 1,633$ – $18,666 \pm 0,943$ – $7,666 \pm 0,471$ – 00 ± 00 et 00 ± 00 mm respectivement pour les concentrations de 400 – 450 – 500 – 750 – 850 et $1000\mu\text{g/mL}$ (Fig. 64).

Tout comme les essais précédents, l'analyse de la variance (Annexe 3) a confirmé l'influence du facteur concentration de l'extrait aqueux sur la croissance mycélienne de *Microsporium gypseum* ($F_{6, 14} = 3536,886$, $P < 0,05$). En effet, les moyennes sont

significativement différentes, le plus fort étalement est observé chez le témoin en absence d'extrait avec $44,6 \pm 1,728\text{mm}$, alors que celles des traitements ont subi progressivement une réduction significative et se chiffre alors à $24,022 \pm 0,707\text{mm}$ ($400\mu\text{g/ml}$) – $18,444 \pm 1,398\text{mm}$ ($450\mu\text{g/mL}$) – $14,644 \pm 3,104\text{mm}$ ($500\mu\text{g/mL}$) – $5,578 \pm 0,426\text{mm}$ ($750\mu\text{g/mL}$) – $00 \pm 00\text{mm}$ ($850\mu\text{g/mL}$) – $00 \pm 00\text{mm}$ ($1000\mu\text{g/mL}$).

Contrairement au témoin et à l'essai de $400\mu\text{g/mL}$ (7 jours), un arrêt de l'activité cellulaire a été noté 6 jours seulement après son incubation dans les milieux à raison de 450 – 500 et $750\mu\text{g/mL}$.

Ces données, comme celle du champignon précédent, laisse penser que la durée de son activité dépend essentiellement de la concentration employée.

La présence de l'extrait aqueux dans le milieu a inhibé complètement l'apparition des spores et confirme par conséquent ceux obtenus préalablement.

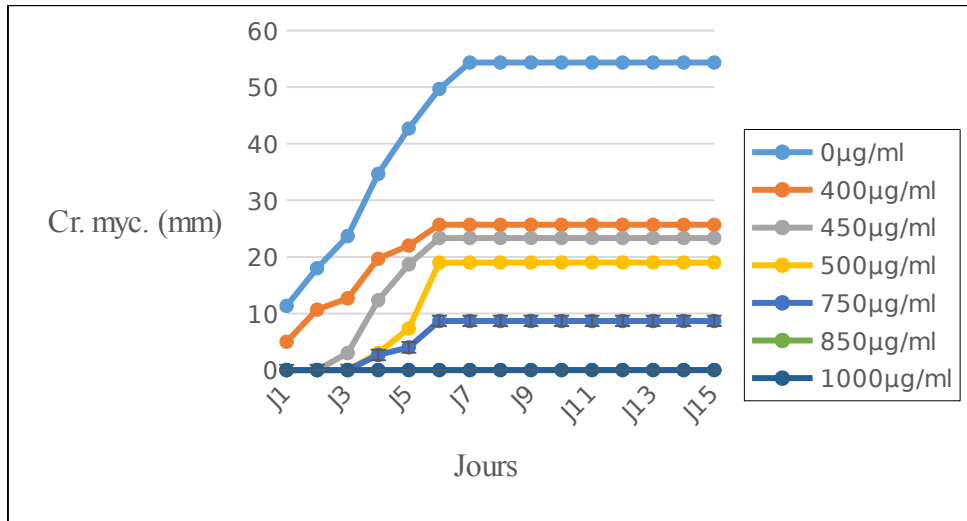


Figure 63 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporium gypseum* traité à l'extrait Ethanolique.

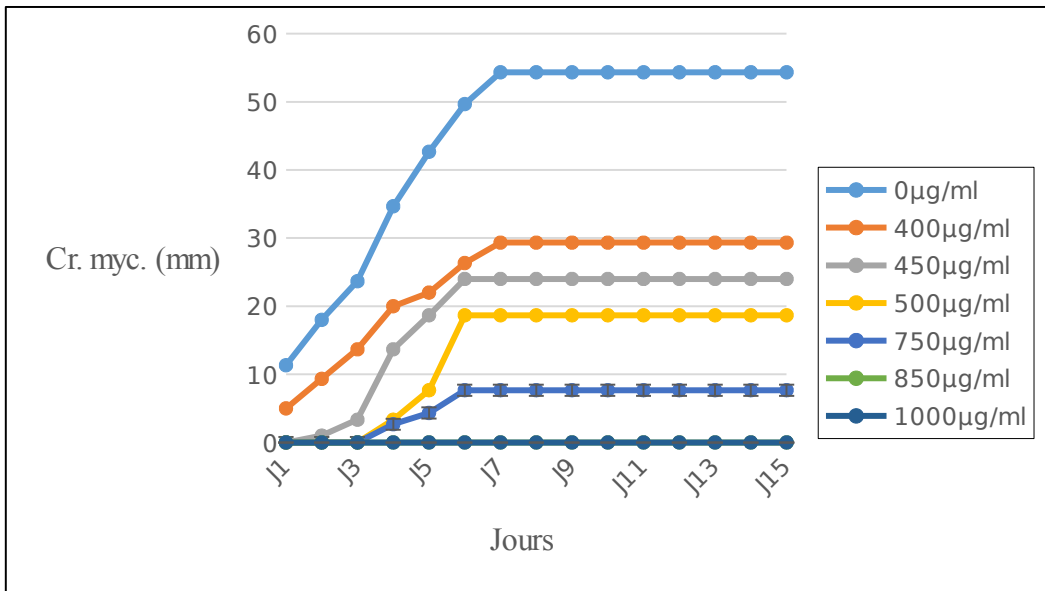


Figure 64 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporium gypseum* traité à l'extrait aqueux.

II-4-2-2-3- *Microsporum audouinii*

II-4-2-2-3-1- L'huile essentielle (HE)

Comme chez *M. gypseum*, l'huile essentielle a gêné le développement normal de *Microsporum audouinii* par rapport au témoin réalisé dans les mêmes conditions mais en absence de l'extrait, les élargissements observés sur son tissu mycélien montrent qu'ils sont morphologiquement discernables, le pathogène est d'autant plus actif dans les conditions normales, son optimum de croissance est atteint sur le témoin avec $62,333 \pm 1,7$ mm. En revanche, cette dernière diminue considérablement en présence de l'extrait (HE), justifiant ainsi son action inhibitrice dans l'activité du dit champignon (Fig. 65).

Les résultats de l'étude statistique ressemblent à celle de tous les extraits précédemment étudiés. Le test $F_{6,14} = 10692,52$ à $p < 0,05$ justifie également l'influence de la dose du HE sur la propagation du pathogène avec des moyennes significativement différentes : $41,422 \pm 1,679$ mm (témoin) – $24,178 \pm 0,685$ mm ($400\mu\text{g/mL}$) – $17,156 \pm 0,844$ mm ($450\mu\text{g/mL}$) – $14,889 \pm 0,55$ mm ($500\mu\text{g/mL}$) et $4,822 \pm 0,426$ mm pour le $750\mu\text{g/mL}$ (aucun résultat numérique n'est relevé à 850 et $1000\mu\text{g/mL}$).

Dans le comportement physiologique du champignon, les mêmes paramètres ayant été observés lors des traitements précédents, ont été également enregistrés après utilisation de l'HE. Les plus fortes concentrations affectent également sa vitesse de croissance et aucune spore n'a été formée dans tous les lots traités même à faible dose.

II-4-2-2-3-2- Extrait d'éther de pétrole

Les métabolites secondaires extraits par l'éther de pétrole ont confirmé leurs effets sur la croissance du dermatophytes considéré. En effet, la croissance diminue significativement ($F_{6,14} = 7417,518$, $P < 0,05$) en fonction de leurs doses avec des valeurs moyennes de $41,422 \pm 1,679$ mm – $26,044 \pm 1,101$ mm – $19,6 \pm 0,879$ mm – $18,044 \pm 0,977$ mm – $9,2 \pm 0,59$ mm – 00 ± 00 mm – 00 ± 00 mm respectivement pour $0\mu\text{g/mL}$ – $400\mu\text{g/mL}$ – $450\mu\text{g/mL}$ – $500\mu\text{g/mL}$ – $750\mu\text{g/mL}$ – $850\mu\text{g/mL}$ – $1000\mu\text{g/mL}$.

Les données enregistrées (Annexe 3) montrent aussi une différence dans la durée de la multiplication des cellules mycéliennes nécessaire pour accomplir la phase exponentielle du

cycle de développement de *M.audouinii*. Il est important de signaler que l'activité mycélienne est achevée 12 jours après l'incubation sur l'essai témoin, 10 jours sur les lots de 400µg/mL – 450µg/mL – 500µg/mL et 9 jours pour le milieu de 750µg/mL. Cependant, l'activité observée à la fin du stade de croissance a enregistré une réduction dans le diamètre de l'espace envahi par le pathogène, ce dernier est aussi affecté par la dose employée de l'ordre de 62,333±1,7 – 34,667±1,247 – 30,333±0,943 – 30,333 ± 0,943 – 14,667 ±0,471mm respectivement pour les concentrations de 0µg/mL - 400µg/mL - 450µg/mL – 500µg/mL et 750µg/mL (Fig. 66).

Le phénomène de la sporulation, pour le lot témoin, au cours de la phase stationnaire, la formation des spores a débuté directement après achèvement de la croissance du champignon étudié (12jours) ; 15 jours après, toute la surface gélosée de la boîte de Pétri s'est noircie par étalement et dispersion des spores qui ont été formés dans la période comprise entre le 12^{ème} et 15^{ème} jour après la mise en culture. Contrairement au témoin, aucune différenciation des conidiospores n'a été décelée sur les boîtes de Pétri des lots expérimentaux.

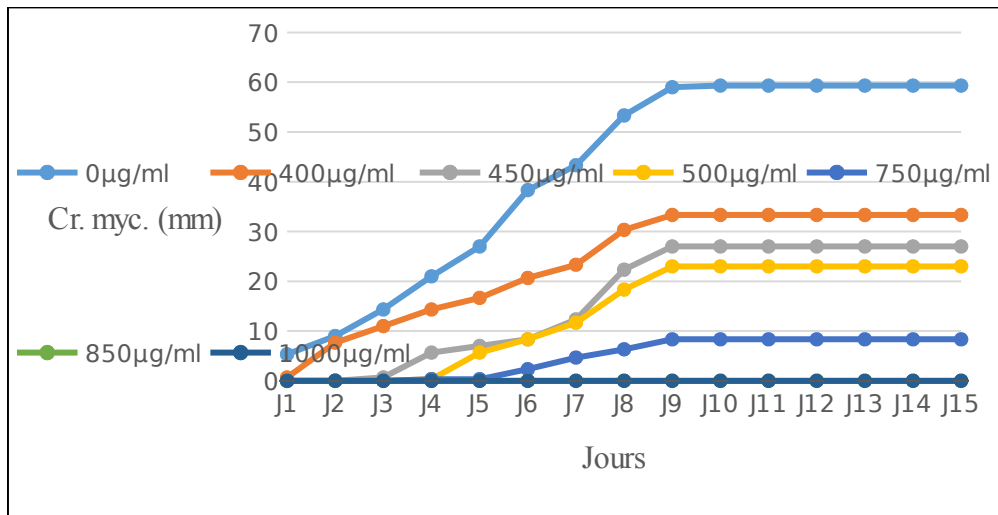


Figure 65 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporium audouinii* traité par HE

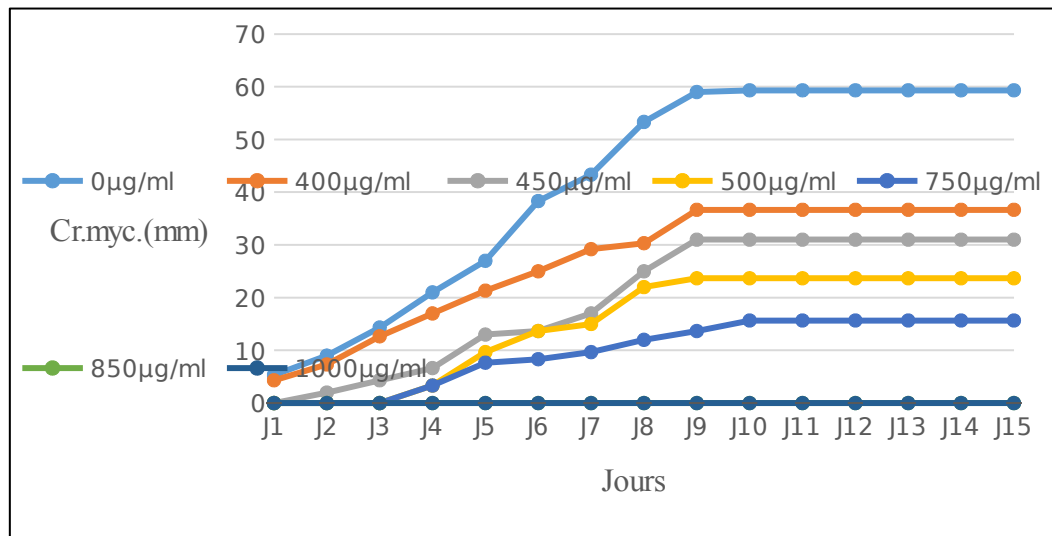


Figure 66 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporium audouinii* traité à l'extrait d'éther de pétrole.

II-4-2-2-3-3- Extrait Dichlorométhane

L'extrait de dichlorométhane a confirmé son action antimicrobienne à l'encontre de *Microsporium audouinii*. L'analyse de la variance bifactorielle (Annexe 3) a révélé également l'effet du facteur "concentration" avec un test $F_{6, 14} = 7700,143$ à $P < 0,05$. Les valeurs moyennes de la croissance mycélienne du test de Newman-Keuls sont significativement différentes avec $25,467 \pm 1,101$ mm – $18,489 \pm 0,879$ – $16,6 \pm 0,977$ – $8,289 \pm 0,51$ – 00 ± 00 et 00 ± 00 mm respectivement pour $400\mu\text{g/mL}$ – $450\mu\text{g/mL}$ – $500\mu\text{g/mL}$ – $750\mu\text{g/mL}$ – $850\mu\text{g/mL}$ et $1000\mu\text{g/mL}$ par rapport au témoin qui a enregistré une moyenne de croissance de l'ordre de $41,422 \pm 1,679$ mm. Cependant, les maximum de croissance, 15 jours après l'inoculation dans les boîtes de Pétri, les données enregistrés sont de l'ordre de : $62,333 \pm 2,082$ mm ($0\mu\text{g/mL}$) – $35,667 \pm 1,155$ mm ($400\mu\text{g/mL}$) – $30,333 \pm 1,555$ mm ($450\mu\text{g/mL}$) – $29,667 \pm 1,528$ ($500\mu\text{g/mL}$) mais seulement $13,333 \pm 0,577$ mm pour le lot $750\mu\text{g/ml}$ et nulle dans le cas de 850 et $1000\mu\text{g/mL}$.

Dans son cycle de développement, l'inhibition de la croissance de *Microsporium audouinii* est observée non seulement sur l'importance de sa croissance mycélienne, mais aussi sur son comportement vis-à-vis de l'extrait étudié (Fig. 67).

La croissance semble s'achevée dans les lots traités quelques jours avant celle du témoin ; le champignon termine son cycle de développement plus rapidement, cette dernière (croissance) dépend de la concentration du milieu extérieur avec 12 jours dans le lot témoin, entre 10 – 11jours pour les doses comprises entre 400 et $500\mu\text{g/mL}$ et 9 jours pour la concentration de $750\mu\text{g/mL}$.

En revanche, pour le témoin et l'essai $400\mu\text{g/mL}$, l'activité cellulaire est stimulée 1 jour après l'inoculation et enregistre de ce fait $5,333$ et $3,333$ mm. Toutefois, en présence de l'extrait introduit à différentes concentrations, un retard dans son activité a été observé ; la sensibilité du champignon est confirmée, ce n'est qu'après 4 jours qu'il s'est exprimé à 500 et $750\mu\text{g/mL}$ avec $2,333$ mm, alors qu'à $450\mu\text{g/mL}$ c'est 2 jours après avec $1,00$ mm.

Par ailleurs, le temps pris en compte pour sa phase exponentielle semble être lié également à la concentration de l'extrait pour que le champignon puisse exprimer sa croissance mycélienne. Comme l'extrait précédent, les résultats obtenus sur les lots traités

sont largement inférieurs à celui du témoin (12 jours), une réduction progressive est observée lorsque la concentration en extrait augmente et enregistre de ce fait 11 jours pour le 400µg/mL – 9 jours (450µg/mL) – 8 (500µg/mL) et seulement 6 jours pour le lot 750µg/mL.

Après 15 jours de traitement, le champignon se trouve incapable pour produire des spores.

II-4-2-2-3-4- Extrait Méthanolique

Contrairement au témoin, dans le dispositif expérimental, les concentrations utilisées pour les extraits précédents (extraits d'éther de pétrole et de dichlorométhane) permettent également chez le méthanolique de contrer et de s'opposer à la propagation du pathogène. La variation de la concentration du milieu de culture joue un rôle considérable dans le fonctionnement physiologique du champignon, les moyennes de croissance mycéliennes enregistrées diffèrent significativement ($F_{6, 14} = 7151,079$, $P < 0,05$) et tendent à démontrer l'importance du facteur "dose" de cette extrait dans la limitation de l'activité dermatophytique avec $41,422 \pm 1,679$ mm pour le témoin (0µg/mL), $26,978 \pm 0,888$ mm (400µg/mL), $24,422 \pm 1,168$ mm (450 µg/mL), $19,867 \pm 1,066$ mm (500µg/mL) et $16,489 \pm 0,718$ mm (750µg/mL). Mais aucun signe de vitalité n'a été observé aux doses de 850 et 1000µg/mL, mettant ainsi en évidence la propriété létale de l'extrait méthanolique avec de telles concentrations.

La figure 68 schématise l'influence de la composition chimique du milieu de culture sur le comportement de *Microsporium audouinii*, elle peut se traduire par :

1- sa vitesse de multiplication est ainsi rapide, elle est proche de 5,2 mm/jour lorsqu'il est inoculé dans des conditions favorables à son développement (témoin). Par contre, celle-ci se serait alors déprimée en présence de l'extrait méthanolique. Les mesures effectuées ont donné les résultats suivants : 3,484 mm/j – 3,121 mm/j – 3,121 mm/j et 2,833 mm/j respectivement pour les doses de 400 – 450 - 500 et 750 µg/ml.

2- la durée de la phase exponentielle est relativement longue chez le témoin (12 jours), 11 jours dans les boîtes de 400 – 450 - 500 µg/mL, mais seulement de 7 jours à 750 µg/ml. Cette différence est due, en partie, à la phase de latence observée lorsque *Microsporium audouinii* est traité à raison de 750µg/mL.

Après 15 jours de suivi, aucune sporulation n'a été observée. En fait, la présence de l'extrait méthanolique (comme les extraits précédents) rompt la production des spores et joue probablement le rôle d'inhibiteur métabolique naturel.

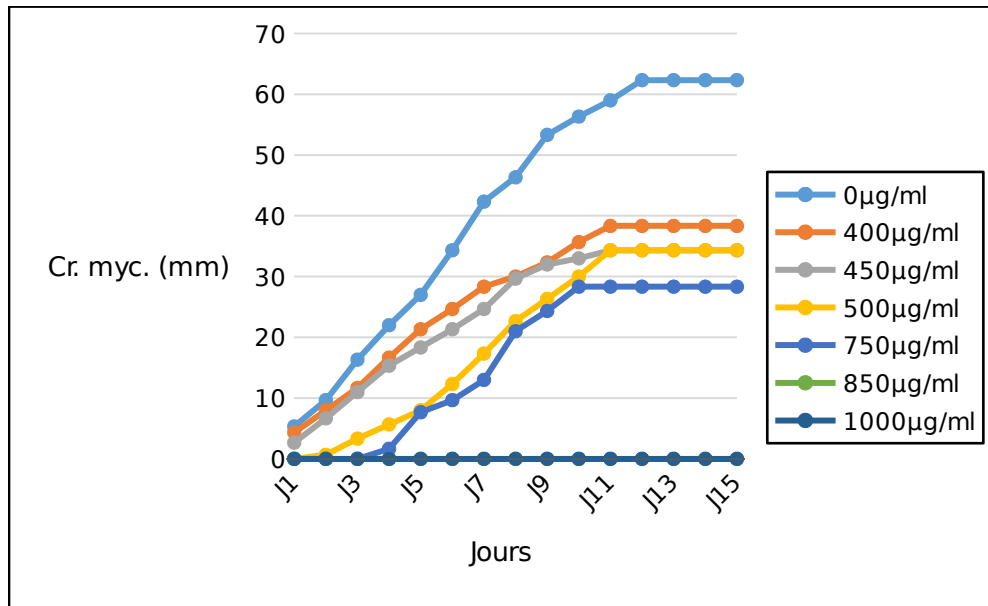


Figure 67 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporium audouinii* traité à l'extrait de Dichlorométhane.

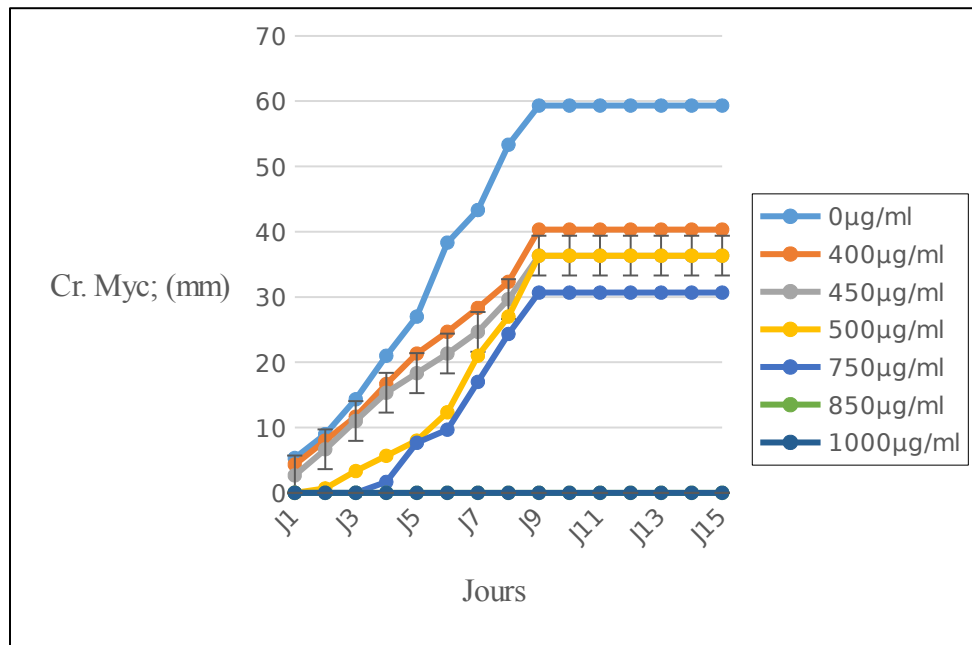


Figure 68 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporium audouinii* traité à l'extrait méthanolique.

II-4-2-2-3-5- Extrait Ethanolique

La croissance mycélienne du champignon réagit inversement à l'augmentation de la concentration. Comparativement au témoin ($41,422 \pm 1,679\text{mm}$), les moyennes enregistrées sont statistiquement différentes avec $26,978 \pm 0,888\text{mm}$ – $20,667 \pm 1,101\text{mm}$ – $18,156 \pm 0,969\text{mm}$ – $9,178 \pm 0,444\text{mm}$ – $00 \pm 00\text{mm}$ – $00 \pm 00\text{mm}$ respectivement pour $400\mu\text{g/mL}$ - $450\mu\text{g/mL}$ - $500\mu\text{g/mL}$ - $750\mu\text{g/mL}$ - $850\mu\text{g/mL}$ - $1000\mu\text{g/mL}$.

A des doses faibles (400 et $450\mu\text{g/mL}$), sa vitesse de multiplication ressemble à celle enregistrée avec l'éther de pétrole et le méthanol, par contre, elle est fortement réduite à $750\mu\text{g/mL}$ ($1,467\text{ mm/j}$ contre $2,833\text{ mm/j}$).

Tout au long de son cycle de développement, on remarque que la concentration appliquée affecte également les différentes phases de croissance (Fig. 69). La phase exponentielle a duré 12 jours (témoin) – 11 ($400\mu\text{g/mL}$) – 11 ($450\mu\text{g/mL}$) – 10 ($500\mu\text{g/mL}$) – 9 ($750\mu\text{g/mL}$) – 0 ($850\mu\text{g/mL}$) et 0 jours ($1000\mu\text{g/mL}$). Au-delà de ces périodes limites, et du fait que la croissance observée est cumulée, elle est restée inchangée (phase stationnaire), c'est ainsi que les maxima des croissances enregistrées de *Microsporumaudouinii* sont respectivement de l'ordre de $62,333 \pm 1,7\text{mm}$ – $38,333 \pm 0,471\text{mm}$ – $34 \pm 1,633\text{mm}$ – $31,333 \pm 0,471\text{mm}$ – $14,667 \pm 0,471\text{mm}$ – $00 \pm 00\text{mm}$ et $00 \pm 00\text{mm}$. En revanche, la phase de latence semble très courte chez le témoin et celui traité à raison de $400\mu\text{g/mL}$, au bout d'une journée d'incubation, les deux lots enregistrent une croissance mycélienne respective de $5,333 \pm 1,247$ et $4,00 \pm 00\text{mm}$. Par contre, elle se prolonge progressivement avec l'augmentation de la dose et entraîne une prolongation de cette phase avec 1 jour pour $450\mu\text{g/mL}$ et 3 jours pour 500 et $750\mu\text{g/mL}$.

Les observations enregistrées sur la sporulation, avec les différents extraits, peuvent être évidemment repris pour l'extrait éthanolique.

II-4-2-2-3-6- Extrait aqueux

La réaction de *Microsporum audouinii* aux extraits aqueux ressemble à ceux précédemment étudiés. Les résultats montrent une différence dans la croissance et le développement du dermatophytes (Fig. 70). C'est ainsi que tous les lots qui ont été soumis à un traitement ont montré une réduction de l'activité fongique par rapport au témoin ($62,333 \pm 1,7\text{mm}$) conduit dans les mêmes conditions de l'expérimentation, par contre, l'action semble fongicide à partir de $850\mu\text{g/mL}$. Les données enregistrées à la fin de son cycle de développement sont les suivantes : $38,667 \pm 0,943\text{mm}$ – $32,667 \pm 1,247\text{mm}$ – $30,333 \pm$

0,943mm – 11,333 ± 0,471mm – 00 ± 00 mm – 00 ± 00mm, respectivement pour les concentrations de 400µg/mL - 450µg/mL - 500µg/mL - 750µg/mL - 850µg/mL - 1000µg/mL.

Tout comme les essais précédents, l'analyse de la variance a justifié l'influence du facteur concentration de l'extrait aqueux sur la croissance mycélienne de *Microsporium audouinii* ($F_{6, 14} = 8524,5$, $P < 0,05$). En effet, les moyennes sont significativement différentes, le plus fort étalement est observé chez le témoin en absence d'extrait avec $41,422 \pm 1,679$ mm, alors que celles des traitements ont subi progressivement une réduction significative et se chiffrent alors à $27,756 \pm 1,015$ mm (400µg/mL) – $20,00 \pm 1,044$ mm (450µg/mL) – $17,289 \pm 0,853$ mm (500µg/mL) – $7,111 \pm 0,426$ mm (750µg/mL) – 00 ± 00 mm (850µg/mL) – 00 ± 00 mm (1000µg/mL).

Cette différence observée est certainement due à la présence des métabolites secondaires inhibiteurs de l'activité du champignon. Ainsi des remaniements sont observés sur la cinétique de croissance du champignon dans les lots traités :

- La durée nécessaire pour l'achèvement de toute multiplication mycélienne est affectée négativement, ceci est fonction de l'augmentation de la concentration du milieu en extrait naturel ; elle est de 12 jours (témoin) – 11 (400 et 450µg/mL) -10 (500µg/mL) et 9 jours (750µg/mL).

- Après l'inoculation, la mitose semble inhibé momentanément, un retard dans l'initiation de l'activité cellulaire a été observé et dépend entre autres de la concentration de l'extrait. L'augmentation de la dose appliquée agit défavorablement à la multiplication mycélienne du champignon et se résume comme suit : le lot témoin et celui de 400µg/mL, l'activité mitotique est précoce et se chiffre après un jour d'incubation à $5,333 \pm 1,528$ et $5,00 \pm 1,00$ mm. Alors que les lots de 450µg/mL - 500µg/mL et 750µg/mL ont montré comme précédemment (autres extraits) un retard remarquable dans le déclenchement de l'activité mycélienne de *Microsporium audouinii* avec respectivement 1– 4 – 4 jours.

L'absence des spores dans les lots expérimentaux (après 15 jours d'essai) constitue un fait important dans la limitation de la propagation du champignon. Ces résultats confirment ceux obtenus avec les différents extraits (par l'utilisation des solvants organiques).

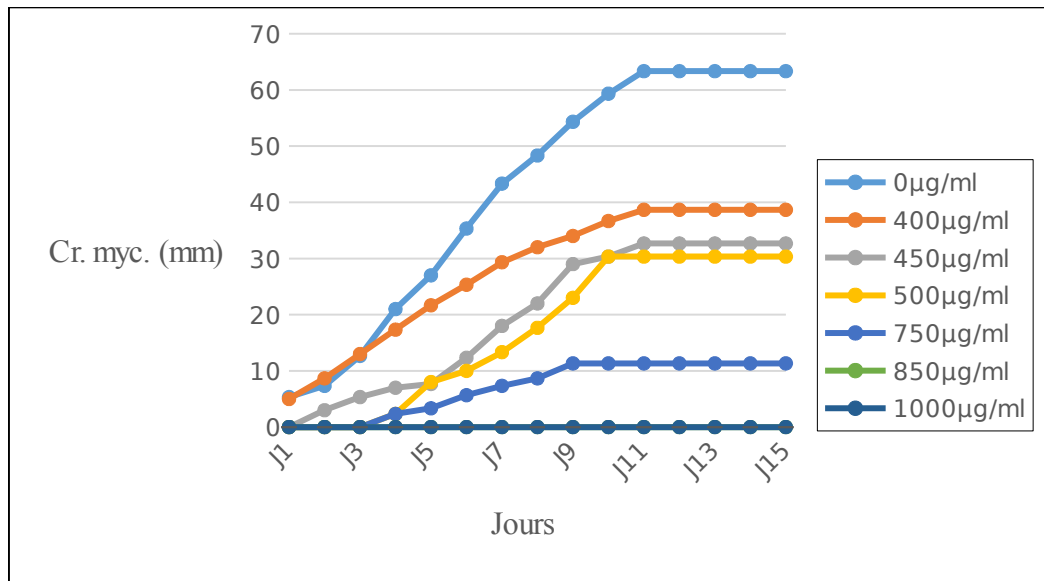


Figure 69 : Cinétique de croissance mycélienne de *Microsporium audouinii* traité à l'extrait Ethanolique.

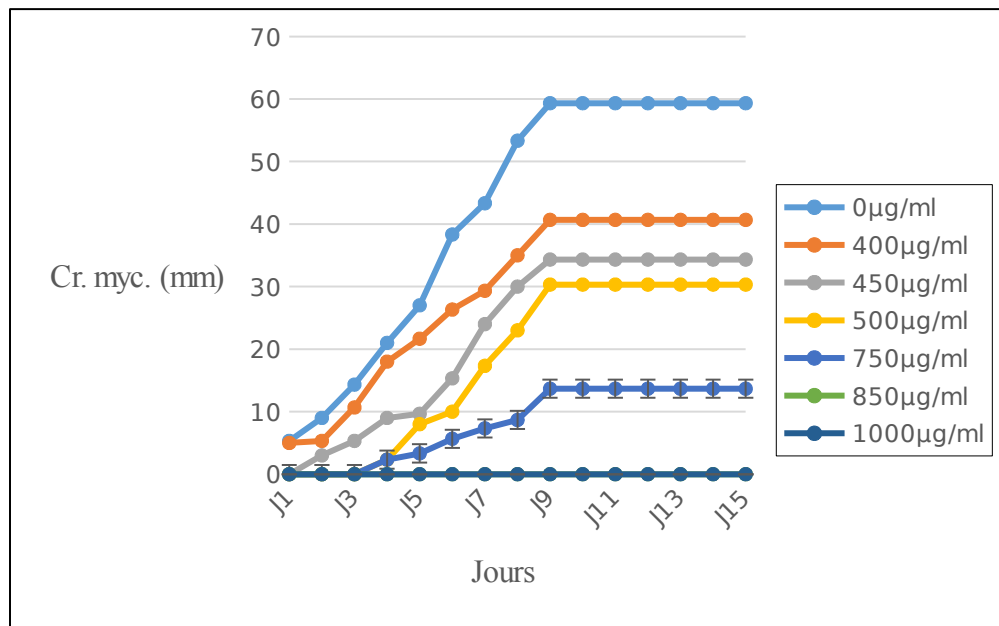


Figure 70 : cinétique de croissance mycélienne de *Microsporium audouinii* traité à l'extrait aqueux.

II-4-2-3 Concentrations inhibitrices 50 et 90

Afin de mieux cerner l'effet antifongique de *Thymelaea hirsuta*, les concentrations Inhibitrices responsables de la réduction de la croissance mycélienne, à raison de 50% et 90%, des trois dermatophytes étudiés (*Trichophyton rubrum*, *Microsporium gypseum* et *Microsporium audouinii*), les extraits ont été comparés avec l'huile essentielle.

Le tableau 7 permet de visualiser l'influence d'huile essentielle sur le comportement de *Trichophyton rubrum*, suivie de l'extrait Ether de pétrole, Dichlorométhane, S.aqueuse puis éthanol et enfin méthanol, avec des IC₅₀ respectivement de l'ordre de 477,81 ± 40,22µg/mL, 488 ± 48,92µg/mL, 510 ± 63,13µg/mL, 510,94 ± 44,41µg/mL, 524,79 ± 17,68 et 674,06 ± 20,14 µg/mL.

Concernant IC₉₀ on remarque que l'huile essentielle (767,92 ± 8,25µg/mL) confirme son influence sur *Trichophyton rubrum* suivis de l'extrait Ether de pétrole (795,31 ± 27,48µg/mL), S. aqueuse (782,50 ± 11,44µg/mL), Dichlorométhane (808,02 ± 4,32µg/mL), éthanol (809,15 ± 4,92µg/mL) et méthanol (818,64 ± 15,19µg/mL).

L'effet inhibiteur de l'huile essentielle (450,58 ± 3,12µg/mL) a été également confirmé sur *Microsporium gypseum* suivis d'éther de pétrole (512,62 ± 47,40µg/mL), S. aqueuse (454,37 ± 3,45µg/mL), méthanol (461,56 ± 11,94µg/mL), éthanol (487,48 ± 46,15µg/mL) et dichlorométhane (510 ± 63,13µg/mL) pour IC₅₀(annexe3).

Pour IC₉₀ l'huile essentielle (767,92 ± 8,25µg/mL) et suivis de éther de pétrole (795,31 ± 27,48µg/mL), S. aqueuse (782,50 ± 11,44µg/mL), dichlorométhane (808,02 ± 4,32µg/mL), méthanol (818,64 ± 15,19µg/mL) et enfin éthanol (809,15 ± 4,92µg/mL).

De la même chose pour le champignon *Microsporium audouinii* l'huile essentielle a eu une grande influence sur le comportement de ce dernier et les résultats obtenus sont les mêmes enregistrés pour *Trichophyton rubrum* que soit pour IC₅₀ et IC₉₀ (annexe3).

La comparaison des concentrations inhibitrices montre nettement que c'est au niveau d'huile essentielle que les IC₅₀ et IC₉₀ les plus intéressantes ont été détectées, contrairement aux autres extraits.

La gravité des dermatophytes, nous a conduits à nous intéresser à l'inépuisable source de produits naturels à vertu thérapeutique : les plantes médicinales. À côté des molécules de synthèse prescrites dans le traitement des dermatophytes, de nombreux produits naturels ont été testés dans le but de trouver un antifongique efficace, sans effet néfaste et moins cher (Namik et al., 1997, Kundu et al., 2002).

C'est dans cette optique que des extraits de *Thymelaea hirsuta* ont été testés contre la croissance de *Trichophyton rubrum*, *Microsporium gypseum* et *Microsporium audouinii*.

Plusieurs recherches ont été menées pour comprendre le mécanisme d'action des extraits de plantes.

De nombreux chercheurs attribuent cette fonction au réservoir des composés polyphénoliques et terpéniques de cette plante. Les mécanismes d'action des composés naturels sont expliqués de différente manière selon les auteurs.

Ces composés peuvent interférer avec les biomembranes en causant des dommages cellulaires et provoquant la fuite de matériaux cellulaires, qui par conséquent contribuent à la mort des microorganismes (Mshvildadze et al., 2000 ; Veldhuizen et al., 2006 ; Abdel ghani et al., 2008).

C'est un mécanisme possible par lequel la croissance mycélienne des champignons peut être réduite ou totalement inhibée par l'effet des extraits, en agissant sur la fonctionnalité et la structure de la membrane cellulaire (Sikkema et al., 1995).

Les composants des extraits tels que les terpènes affectent non seulement la perméabilité mais aussi d'autres fonctions dans les membranes cellulaires. Ces composés peuvent traverser les membranes cellulaires, pénètrent ainsi à l'intérieur de la cellule et interagissent avec des sites critiques intracellulaires tels que les enzymes et les protéines, ce qui conduit à la mort cellulaire (Omidbeygi et al., 2007; Cristani et al., 2007).

Les résultats émanant des tests d'inhibition des trois souches fongiques (*Trichophyton rubrum*, *Microsporium gypseum* et *Microsporium audouinii*.) indiquent clairement que les extraits et l'huile essentielle testés exercent une action antifongique. Ceci a en effet confirmé notre hypothèse quant à l'action inhibitrice de *Thymelaea hirsuta* sur les dermatophytes. De plus, l'activité antifongique observée laisse penser que *Thymelaea hirsuta* contient réellement des principes actifs sur les dermatophytes.

Les résultats obtenus montrent que les six extraits testés à raison d'une concentration de 500µg/mL diminuent considérablement le rythme de la croissance mycélienne, et à ce niveau la croissance a été réduite de moitié (50%). la dose 500µg/ml représente en effet, la concentration minimale inhibitrice qui constitue la plus faible concentration donnant une croissance minimale. Les résultats enregistrés indiquent également que l'action inhibitrice des extraits testés est proportionnelle à la dose administrée.

En revanche, l'action fongistatique voire fongicide des extraits testés est obtenue respectivement à 850 et 1000µg/mL, aucun développement mycélien n'a été observé avec un pourcentage d'inhibition de 100%. Des taux similaires d'inhibition avec les mêmes concentrations ont été signalés par Dahou et al.(2004), qui ont étudié l'activité antifongique,

mais d'extraits obtenus de *Thymelaea lythroides* sur des champignons du Riz. En ce qui concerne les espèces de *Trichophyton rubrum*, *Microsporium gypseum* et *Microsporium audouinii*. Étudiés, il a été rapporté par [Panizzi et al. \(2002\)](#) que la concentration de 200µg/mL de l'acide 2,3 dihydroxybenzoïde se révèle inhibitrice contrairement à nos résultats qui montrent que l'inhibition par un extrait naturel de *Thymelaea hirsuta* n'est obtenu qu'avec des concentrations élevées (850µg/mL).

Les travaux de [Sarker et al., \(2005\)](#) montrent, également, que l'effet d'un extrait est probablement due à la synergie entre le nombre de composants qui, lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs individuellement. Ceci est interprété par le fait que les plantes produisent une variété énorme de petites molécules antifongiques ayant un large spectre de structures telles que les terpénoïdes, les glycostéroïdes, les flavonoïdes et les polyphénols ([Seidel, 2005](#)). Par contre, [Fogliani et al. \(2005\)](#) et [Yan et al. \(2008\)](#) ont rapporté que la tendance de ces substances phytochimiques d'avoir une activité plus élevée sur l'ensemble des souches est en fonction de leurs concentrations dans les extraits.

Le criblage phytochimique du mélange fleurs /feuilles de *Thymelaea hirsuta* (Tableau 2) a montré que ce mélange contient des substances stéroïques, flavonoïdes, des flavanes, saponines, anthocyanes et leucoanthocyanes ; ces substances ont été identifiées comme produits antimycotoxiques et/ou antifongiques. En effet, les saponines se sont montrées capables d'inhiber la croissance fongique ([Suhr et al., 2003](#)).

D'une manière générale, pour les dermatophytes étudiées (*Trichophyton rubrum*, *Microsporium gypseum* et *Microsporium audouinii*.) l'extrait le plus actifs reste l'huile essentielle. Cette efficacité serait liée aux principes actifs contenus dans composé de la plante.

CONCLUSION

La phytothérapie et l'aromathérapie ont été, depuis toujours, le premier refuge biomédical de populations contre les affections médicales. Jusqu'à présent les plantes médicinales n'ont pas cessé de l'être. Mais les grands progrès de la médecine moderne ont fait dévier un petit peu les tendances thérapeutiques vers les molécules de synthèse et surtout les antibiotiques. De ce fait, plusieurs maladies sont apparues lors de l'usage abusif de ces molécules y compris le phénomène de résistance microbienne. Les chercheurs se sont trouvés, alors, obligés de tourner de nouveaux aux vertus multiples de la nature pour prévenir ces phénomènes et pour trouver de nouvelles substances d'origine naturelles dotées d'activité biologiques intéressantes aux moindres risques pour la santé.

Les tests phytochimiques réalisés par les réactions de caractérisation ont révélé la présence

des alcaloïdes, des tanins, des quinones, des oses et des holosides, des mucilages, des dérivés anthracéniques (O-hétérosides à génines réduits et C- hétérosides), des coumarines, des stérols des triterpènes, des saponosides et des anthraquinones libres à différentes proportions dans le mélange feuilles/ fleurs de la plante,

L'étude microbiologique a mis en évidence l'efficacité de la plante étudiée contre deux espèces bactériennes et trois souches fongiques de certain maladies cutanées : *Staphylococcus aureus* (Gram+) - *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-) - *Trichophyton rubrum* *Microsporium* (Croissance rapide -) *Microsporium gypseum* (Croissance rapide) et *audouinii* (Croissance lente) respectivement.

Les différents extraits préparés par les solvants organiques, l'eau et l'huile essentielle ont confirmés l'importance de *Thymelaea hirsuta* dans le traitement des infections de la peau. Pour les bactéries, ils ont montré des zones d'inhibitions variables selon le type du solvant et en fonction des bactéries lorsqu'ils ont été appliqués à 10µg/ml. Sur *S. aureus*, on note celui de l'éther de pétrole, dichlorométhane, méthanol, éthanol et L'huile essentielle. Par contre sur *P. aeruginosa*, la puissance est baissée en raison de la résistance due à la présence de la graine protectrice chez les Gram-, se sont surtout les extraits du méthanol et l'HE qui ont montré des inhibitions importantes. Les concentrations minimales inhibitrices sont à 500 et 1000µg/ml respectivement pour *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les essais par contact direct ont certifié les résultats précédents. La viabilité est nulle à 5000µg/ml (effet bactéricide), ceci est observé cher l'éther de pétrole, éthanol et HE sur

Conclusion

Staphylococcus aureus et chez l'éther de pétrole, méthanol, éthanol et HE sur *Pseudomonas aeruginosa*.

En ce qui concerne les champignons, les six extraits ont eu un effet sur la croissance du dermatophytes considéré. En effet, Le déclenchement de la croissance est en relation avec la concentration du milieu de culture ; plus la concentration est forte et plus la phase latence est longue.

La vitesse de croissance est liée également à la dose de l'extrait employé en ce qui concerne *Trichophyton rubrum* et *Microsporum audouinii*, par contre elle n'a aucun effet sur la vitesse de croissance de *Microsporum gypseum*. Les extraits de *Thymelaea hirsuta* ont inhibé à 80% Les trois souches de champignons étudiées à la concentration 750µg/ml, par contre à 500µg/ml l'inhibition été presque à 50%, en revanche, l'effet fongicide des extraits testés est obtenue respectivement à 850 et 1000µg/ml avec un pourcentage d'inhibition de 100%.

Thymelaea hirsuta peut être considérée comme une plante médicinale du faite qu'elle est riche en métabolites secondaires à activité antimicrobienne.

Les résultats enregistrés aussi bien par les différents dosages et les réactions de caractérisation que par les tests des activités biologiques ont permis de confirmer l'utilisation traditionnelle de *Thymelaea hirsuta* en milieu rural. De plus, il est à prédire que le mélange feuilles/fleurs, de *T. hirsuta* sont des antibactériens et des antifongiques naturels très efficaces, du fait qu'il s'agit des extraits bruts, et peuvent être une source très importante de constituants phytopharmaceutiques utilisés pour éradiquer ces infections.

L'ensemble de ces résultats ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances et sources naturelles biologiquement actives. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidences. Il serait souhaitable

de compléter et approfondir ce travail par une étude phytochimique plus détaillée.

*Il serait intéressant d'évaluer l'activité antibactérienne et antifongique, *in vitro*, sur des cultures cellulaires de cellules isolées de l'organisme étudié pour justifier les résultats obtenus, ainsi que sur des souches cancéreuses.

* Une utilisation *in vivo*, des molécules bioactives isolées, serait souhaitable pour déterminer les tissus et organes cibles et rechercher par conséquent leurs mécanismes d'action

Conclusion

au niveau tissulaire et moléculaire. Cette étude permettrait alors, de mettre en évidence le principe actif de (ou des) l'extrait de *Thymelaea hirsuta* et/ou une éventuelle synergie entre les différents composés chimiques.

* Enfin d'autres activités biologiques peuvent également être évaluées aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (antidiabétique, antitumorale ... et autres).

Références bibliographiques

Abdellah, H.M., Ezzat, S.M., 2011. Effct of the méthode of préparation on the composition and cytotoxic activity of the essential oil of *Piturauthos tortuosus*. *Zeischrit fur naturfoschung C* 66, 143-148.

Abdel ghani, s.b., Weaver, l., zidan, z.h., hussein, m.a., keevil, c.w. & brown, r.c.d. 2008. Microwareassisted synthesis and antimicrobial activities of flavonoid derivatives. *bioorganic & medicinal chemistry letters*, 18 : 518-522.

Abou-Karam M., El-Shaer, N.S, Shier, W.T. 1998. Inhibition of oncogene product enzyme activity as an approach to cancer chemoprevention. Tyrosine-specific protein kinase inhibition by daphnoretin from *Thymelaea hirsuta* root. *Phytother. Res*, **12**(4): 282-284.

Aboulmakarim, S., Tligui, H., Mrini, M. E., Zakaria, I., Handour, N., & Agoumi, A. 2010. Otomycoses. *Mycologie medicale elsevier*, 20(1) : 48-52.

Akrout, A., Gonzalez, L.A., El Jani, H., Madrid, P.C. 2011. Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern of Tunisia. *Food Chemistry and Toxicology*, 49: 342-347.

Al-Gaby,A.M., Allam, R.R., 2000. Chemical Analysis, Antimicrobial Activity, and the Essential Oils from Some Wild Herbs in Egypt. [Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants](#).Volume 7.

Alverson, W.S., Karol, K.G., Baum, D.A., Chase, M.W., Swensen, S.M., McCourt, R., Sytsma, K.J. 1998. Circumscription of the Malvales and relationships to other Rosidae: Evidence from *rbcl* sequence data. *Am. J. Bot*, 85: 876-887.

Amadou, D. 2005. Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* WILLD. (Myrtaceae). Thèse, Pharmacie, Université de Bamako (Mali). 99 pp.

Amari, N.O., Bouzouina, M., Berkani ,A., Lotmani, B., 2014. Phytochemi-cal screening and antioxidant capacity of the aerial parts of *Thymelaeahirsuta*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4(2): 104-109.

Anonyme. 2005. *Thymelaea hirsuta*. Paris: tela-botanica.

Anonyme, 2006. Cours de bactériologig

bibliographiques

APG (Angiosperm Phylogeny Group), 1998. An update of the angiosperm Phylogeny Group.

Azza, Z, Marnissi F, Naya A, Benjelloun N, Zamiyati S, Amrani M, et al. 2012. Toxicological evaluation of *Thymelaea hirsuta* and protective effect against CCl₄-induced hepatic injury in rats. *Int J Biol Chem Sci*, 6: 379-93.

Baba, K., Takeuchi, K., Kozawa, M. 1987. Chemical study on the constituents of the Thymelaeaceae plants - V. Structure of a new biflavonoid, daphnodorin from the root of *Daphne odora* Thunb. *Yakugaku Zasshi*, 107 : 863-868.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.

Batanoumy, K. 2005. *Thymelaea hirsuta* (L.) end. Thymelaeaceae. A guide to medicinal plant in northafrica .publié par *ilucn international malaga*, spain.

Beniston, W. S. 1984. Fleurs d'Algérie. Alger : Edition Entreprise Nationale du livre.

Berche P., Gaillard J.L., Simonet M., 1989. Bactériologie : les bactéries des infections humaines. Paris : Flammarion-médecine-sciences. P 274 - 236.

Barnes J., Anderson L.A. et Phillipson J.D. 2007; Herbal Medicines, Ed 3: Pharmaceutical Press; p: 3- 233.

Boisson B., Boissonet G., Larpent J.P., 1989. Abrégé de bactériologie générale et appliquée. Ellipses, Paris. P. 179 - 189.

Bonnaillie, B., Salacs, M., Vassiliova, E. and Saykova, I., 2012. Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide, *Arachis hypogaea* L.). *Revue de génie industriel* 7 : 35-45.

Borris, R.P., Blaskó, G., Cordell, G.A. 1988. Ethnopharmacologic and phytochemical studies of the Thymelaeaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, 24 : 41-49pp.

Brooks, G., Evans, A.T., Aitken, A., Evans, F.J., Rizk, A.F.M., Hammouda, F.M., El-

bibliographiques

Missiry, M.M., Ismail, S.E. 1990. Daphnane diterpenes of *Thymelaea hirsuta*. *Phytochemistry*, 29 (7) : 2235-2237pp.

Boua, B.B., Békro, Y.A., Mamyrbekova-Békro, J.A., Wacothon, K.C. et Ehilé, E.E. 2008.

Assessment of sexual stimulant potential of total flavonoids extracted from leaves of *Palisota hirsuta* Thumb. K. Schum (Commenilaceae). *European journal of scientific research*, 22(4): 533-538 pp.

Boucher S., Nouaille L., 2001. Les teignes des lapais et leurs traitement en France : une synthèse. *World Rabbit Science*, 9 : 39 - 45.

Boukhatem, B., Ghrici, M., Kenai, S., Tagnit-Hamou, A., 2010, Prévion de l'efficacité des cendres volantes dans le béton par l'utilisation d'un réseau de neurones artificiel, XXVIIIèmes Rencontres Universitaires de Génie Civil, La Bourboule, France, 499-508.

Bruneton, J. 1999. Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2eme édition, Paris : Editions médicales internationales, *Tec et Doc Lavoisier*, p1120.

Bruneton, J., Danielle, R., Odile, C., 2007. Pharmacognosie - Phytochimie, Plantes Médicinales. 3^{ème} Édition botanique. *Pharmacognosie phytothérapie*. Groupe liaisons. Collection porphyre.

Bruneton J., 2009. Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales, 4e éd., revue et augmentée, Éditions médicales internationales, Tec et Doc, Paris, France.

Brzozowska J., Hanower P., 1976. Recherches sur les composes phénoliques des végétaux et leur rapport avec un déficit hydrique chez des cotonniers. *Annales de l'université d'Abijan, série C (Science)*, tome XII: 65 - 80.

Chabasse, D., Bouchara, J.P., De Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., Penn, P. 2004. Cahier de formation Biologie médicale n°31: Les dermatophytes. Paris : *Raspail*, 12 : 74-76 pp.

Chen, Y.F., Tsai, H.Y., Wu, T.S. 1995. Anti-Inflammatory and analgesic activities from the roots of *Angelica pubescens*, *Planta Med.*, 61: 2-8.

Coraline, B., Aurélie, B., Tanguy, C., Aurélie, L.G. 2006. Les Huiles Essentielles. U.C.O Bretagne Nord.

bibliographiques

Cornara, L.B., Borghesi, Caporali, E., Casazza, G., Roccotiello, E., Troiano, G and Minuto, L. 2005. Floral features and reproductive ecology in *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl. *Plant systematics and evolution*, 250(3-4): p157-172.

Could, S., 1964. Antimicrobial properties of plants. *International journal of food microbiology*, 5. P. 156 – 180.

Cowan, M.M. 1999. Plant products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4) : p564-582.

Cuvier, F.G. 1825. Dictionnaire des sciences naturelles. Tome trente-huitième, F.G. Levrault, éditeur. Strasbourg, p34.

D'abrosca, D., Pacifico, S., Cefarelli, G., Mastellone, C., Fiorentino, A. 2007. 'Limoncella' apple, an Italian apple cultivar: Phenolic and flavonid contents and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 104: 1333-1337pp.

Dacosta, E. 2003. Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed). Paris, 317p.

Daddona, P.E., wright, J.L., Hutchinson, C.R. 1976. Alkaloid catabolism and mobilization in *Catharanthus roseus*". *Phytochem*, 941-945 PP.

Dahlgren, R., Thorne, R.F. 1984. The order Myrtales : circumscription, variation and relationships. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **71** : 633-699.

Decaux I. 2002. *Phytothérapie : Mode d'emploi*. Ed : Le bien public. Pp 6.

Degrade E., 1993. Chronique biostatistique ; population et échantillon. *Ann Med Milit*, Bruxelles. P. 35 – 41.

Desbois N., Théodose R., Saint-Cyr L., Boisseau-Garsaud A.M., Hélénon R., Calés-quist D.J., 2003. *Mycol. Méd*, 13 : 104 – 108.

Diallo D. 2000. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them : *Glinus oppositifolius* (Aizoaceae), *Diospyros*Thèse de doctorat, Lausanne, 148-176.

bibliographiques

Diallo, D., Sanogo, R., Yasambou, H., Traoré, A., Coulibaly, K. et Maïga, A., 2005. Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (*Rhamnaceae*), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. Bamako : Elsevier SAS pour Académie des sciences. 7 : P 1074 - 1080.

Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A & Capasso F. 1999. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, 65 (4): pp 337-353.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. 2005. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*, 97:654-660.

Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L.M., Badoc, A et Gmira, N. 2003. Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelaea lythroïdes*. *Bull. Soc. Pharm.* Bordeaux, (142) : pp 61-78.

Dohou, N., Yamni, K., Gmira, N., Idrissi Hassani, L.M. 2004. Étude de polyphénols des feuilles d'une endémique ibéro marocaine, *Thymelaea lythroïdes*. - *Acta Bot. Malacitana*, 29 : 233-239.

Dohou, N., Yamni, K., Badoc, A., Douira, A. 2004. Activité antifongique d'extraits de *Thymelaea lythroïdes* sur trois champignons pathogènes du riz. *Bull. Soc. Pharm.* Bordeaux, 143 : p31-38.

Domme, B., Denelle, N., Rioux, J.A. 1984. Proportions des sexes dans deux populations françaises de *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl. *Journal de Lettres botaniques*.

Dupont, H., 2000. Infections à Staphylocoques. Editions scientifiques et médicales. Elsevier SAS et SFAR.

Edenharder, R., Grünhage, D. 2003. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res*, 540 : 1-18.

Egan, D., O'kenedy, R., Moran, E., Cox, D., Prosser, E., Thornes, D., 1990. Drug. Metabolism reviews. 22 (5): 503-529.

bibliographiques

Eklund, H., Horjales, E., Jörnvall, H., Brändén, C.-I., Jeffery, J., 1985. Molecular aspects of functional differences between alcohol and sorbitol dehydrogenases. *Biochemistry* 24, 8005-8012.

El-Beheiry, M.A.H. 2000. Evaluation of the organic composition of *Thymelaea hirsuta* populations in Egypt. *Bull. Fac. Sci, Assiut Univ., D: Botany* 29 (1): p375-383.

Epifano F., Genovese S., Menghini L. and Curini M. 2007. Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*; 68: 939-953.

Erdtman, G. 1952. Pollen Morphology and Plant Taxonomy Angiosperms. *Chronica Botanica Co.* Waltham, MA, pp.431-433.

Essawi, T. et Srour, M., 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharm.* 70: 343-349.

European Pharmacopoeia, 2004. Council of Europe: Strasbourg Cedex, (5th ed) 217-218. France 2.8.12.

Faizi, S., R.A. Khan, S. Azher, S.A. Khan, S. Tauseef and A. Ahmad, 2003. New antimicrobial alkaloids from the roots of *Polyalthia longifolia* var. *pendula*. *Planta Medica*, 69: 350-355.

Fauchère, J.L., 1997. Bactériofiches : techniques en bactériologie clinique. Paris: Ellipses - Edition marketing S.A.

Ferrari, J. 2002. Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : *Gnidia involuocrata* Steud. Thèse de doctorat. Ex A. Rich. Université de Lausanne, pp9, 17, 27, 42, 48, 158, 182.

Ferron, A., 1988. Staphylococcus. In : Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine. Edition C et R, L Madeleine, 118-125.

Flandrois JP., 2000. Bactériologie Médicale. Coll Azay. Puf.

Fogliani, B., Raharivelomanana, P., Bianchini, J.P., Bouraimamadjebi, S. & Hnawia, E., 2005. Bioactive ellagitannins from *Cunonia macrophylla*, an endemic Cunoniaceae from New Caledonia. *Phytochemistry*, 66 : 241-247.

bibliographiques

Fujioka, T., Furumi, K., Fujii, H., Okabe, H., Mihashi, K., Nakano, Y., Mastunga, H., Katano, M. et Mori, M. 1999. Antiproliferative constituents from umbelliferae plants., V. A., New furanocoumarin and faltarindiol furanocoumarin ether from the root of *Angelica japonica*, *Chem. Pharm. Bull*, 47(1) : 96-100.

Fuller, R.W., Bokesch, H.R., Gustafson, K.R., Mckee, T.C., Cradellina, J.H., Mcmhon, J.B., Cragg, G.M., Sojaerto, D., Boyd, M.R. 1994. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 4 (16) : pp1961-1964.

Gagnault, J.C., Bidet, D., Gaillard, M., Perronet, J., 1997. Stéroïdes et stéroïdes , Ellipse, éd Marketing S.A., Paris, 14, 115, 119, 149, 155, 159pp.

Garabeth, F., Bouaoun, D. et Elyafi-Elzahri, G. 2007. "Quantitative study of coumarins of a wild plant *Prangos asperula* Boissier", *Phytotherapie*, 5(5) : pp259-263.

Garcia-Granados, A., Saenz de Buruaga, A. 1980a. Thymeleaceae photochemistry. I. Diterpenes, triterpenes and sterols of *Thymelea hirsuta* L. leaves. *Anales Quim., Ser. C: Quim. Org. Bioquim*, 76 (1) : p94-95.

Garnero, J., 2000. Les huiles essentielles, leurs obtentions, leurs compositions, leur analyse et leur normalisation. Editions techniques-encyclopidie des médecines naturelles. (Paris, France), *Phytothérapie, Aromathérapie*, 2 : pp2-20.

George, V., Rishi, A.K. 1982. Constituents of *Thymelaea passerina*. *Fitoterapia*, 53(5-6): pp191-192.

Gharbo, S.A., Khafagy, S.M., Sarg, T.M. 1970. Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*. *U. Arab Rep. J. Pharm. Sci.* 11 (1): p101-106.

Grosmond, G., 2001. La phytothérapie Bulletin des GTV, HS : Elevage et agriculture biologique, 143-145 Métabolites des plantes.

Guillet, E., 2002. Efficacité du lufenuron sur les dermatophytes équine étude bibliographique et clinique (42 cas). Thèse de doctorat. Faculté de médecine de Lyon, p165.

Harborne, J.B., 1994. Phenolics. In: *Natural products: their chemistry and biological significance*. Eds. Mann, J., Davidson, R. S., Hobbs, J.B., Harborne, J.B. Longman (London), 6: 361_388.

bibliographiques

Harborne, J.B. 2005. Phytochemical methods. New Delhi: *Springer Pvt. Ltd. India*, p17.

Hart, T., Shears, P., 1997. Atlas de poche de microbiologie.

Hartmann, T.2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism, Review. *Phytochemistry* 68 2831-2846.

Haslam, E., 1993. Polyphenol complexation. In: « Polyphenolic phenomena ». Ed. Scalbert A.

Haslam, E., 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat Pro*, 59: 205-215.

Havsteen, B.H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut*, 96: 67-202.

Haya, B., Amour, R. 1992 .Extraction des huiles essentielles du *clou de girofle*. Université de Blida: Institut de chimie industrielle, P.F.E.

He, W., Cik, M., Appendino, G., Puyvelde, L.V., Leysen, J.E., Kimpe, N.D. 2002. Daphnane-type diterpenes orthoesters and their biological activities. *Med Chem*, 2 : 185-200.

Heart, T., Shears, P., 2006.Atlas de poche de microbiologie. Médecine-Sciences-Flammarion.

Hegnauer, R. 1973. Chemotaxonomie der Pflanzen – Band 6. Birkhäuser Verlag, Basel.

Heining, K.H. 1951. Studies on the floral morphology of the Thymelaeaceae. *Am. J. Bot.* 38 : pp113-132.

Herbada, D. G. 2006. Origin and diversification of Thymelaea (Thymelaeaceae): inferences from a phylogenetic study based on ITS (rDNA) sequences. *plant systematics and evolution*, 257: 159-187.

Heywood, V.H., 1996, Les Plantes à Fleurs. *Editions Nathan*, Paris, pp. 159-160.

bibliographiques

Hiermann, A., Schramm, HW., Laufer, S., 1998. Antiinflammatory activity of myricitin-3-o beta-Dglucuronide and related compounds. *Inflamm. Res*, 47 : 421-427.

Holt.J.G.,Hostettmann, K., 1994. *Tout Savoir sur le Pouvoir des Plantes, Sources de Médicaments.* Editions Favre SA, Lausanne.

In luck R.G., Jagu M.B., 1997. Inhibition of mycobacterium avium complex isolates from AIDS patients by gallic. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 32(4): P. 623 – 626.

Iserin, P.M. 2001. *Encyclopedia of Medicinal Plants (2nd Edition ed.).* (T. D.-F. Edith Ybert, Ed., & P. Vican, Trans.) Larousse-Bordas (1997). ISBN: 2-03-560252-1. P. 6-16, 18-53, 335p.

Ismail, S.I. 1978. Tiliroside (kaempferol-3-p-coumaroylglucoside) from *Thymelaea hirsuta*. IV.

Jarraud, S., Mougel, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne, J., Vandenesch, F., 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun.* Feb ; 70(2):631-41.

Jeanmonod, D., Gamisans, J. 2007. *Flora Corsica*, Edisud.

Jhon, U.W., 1983. Antimicrobial compound. Ed J.A. CALLOW. p.238 6 256.

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

Jones, J.W., Hoogenboom, G., Porter, C.H., Boote, K.J., Batchelor, W.D., Hunt, L.A. Wilkens , P.W., Singh,U. , Gijsman A.J. , Ritchie J.T., 2003. The DSSAT cropping system model. *Europ. J. Agronomy* 18: 235/265

Judd, W. S., Campbell, C.S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F. and. Donoghue, E. M. J. 2002. *Plant Systematics: a phylogenetic approach.* Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.

Kansole, M.M.R. 2009. Etude ethnobotanique, phytocuimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso : cas de *Leucas martinicansis (Jacquin) R. Brown*, *Hoslundia oppossta vahl* et *Orthosiphon pallidus royle ex benth.* Mémoire pour obtenir un diplôme

bibliographiques

Diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.

Kayser, O., Kolodziej, H., 1997. Antibacterial activity of extracts and constituents of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*. *Planta Medica*. 63 : 508-510.

Khajeh, M., Yamini, Y., Sefidkon, F., Bahramifar, N., 2004. Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* Obtained by Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Hydrodistillation Methods. *Food Chemistry*. 86: 587-591.

Kofinas, C., Chinou, I., Loukis, A., Harvala, C., Roussakis, C., Maillard, M., Hostettmann, K., 1998. Cytotoxic coumarins from the aerial parts of *Tordylium apulum* and their effects on a non-smallcell bronchial carcinoma line. *Planta Medica*. 64 : 174-176.

Kone, F. 1998. Etude ethnobotanique, tri phytochimique et évaluation de l'activité antiplasmodiale de deux plantes ivoiriennes: *Mitragyna inermis* et *Terminalia glaucescens*. Thèse de doctorat en pharmacie - UFR de Pharmacie d'Abidjan. N° 358/98. p110.

Kundu, B., Scrinivasan, T., Kesarwani, A., Batras, P.K., 2002. Identification of novel antifungal mono-peptides through the screening of *Candida* spp isolated from the oral cavities. *Bioorg Med Chem Lett*; 12: 1473 - 6.

Künkele, U., Lobmeyer, T.R. 2007. Plantes médicinales : identification, récolte, propriétés et emplois. Edition Parragon, Royaume-Uni.

Kwon, Y.S., Kobayashi, A., Kajiyama, S.I., Kawazu, K., Kanzaki, H., Kim, C.M., 1997. Antimicrobial constituents of *Angelica dahurica* roots. *Phytochemistry*, 44 (5) : 887-889.

Lafont et Duval, 2001. Le préparateur en pharmacie dossier1 chimie-biochimie paris Technique et documentation.

Lamarti, A., Badoc, A., Deffieux, G., Carde, J.P. 1994. Biogénèse des monoterpènes : la chaîne isoprénique. *Bull. Soc. Pharm.* Bordeaux, 133 : 79-99.

Lansac, J. et Lecomte, P., 1984. Infections nosocomiales prévention. Paris, Arnette. P. 162.

bibliographiques

Larpent, J.P., 2000. Introduction à la nouvelle classification bactérienne principale groupes bactériens. Paris : Technique et documentation.

Lawson, S., 1996. Arachidonic acid to eicosapentaenoic acid ratio in blood correlates positively with clinical symptoms of depression. *Lipids*. Suppl:S157-61.

Lazurevskii, G. V., Terntieva, I.V., Shamshurine, A.A. 1966. Prakticheskie raboty po chimii prirodnyx soedinenii (traduit du russe); Moscou, p 335.

Leclerc, H., Gaillard J-L., Simonet, M., 1995. Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Doin Editeurs, Paris.

Le Floc'h, E. 1983. Contribution à une étude ethnobotanique de la Flore Tunisienne. Pub. Sci. Tunis. Programme Flore et végétation Tunisiennes. 2 Part. Imprimerie Officielle de la République Tunisienne, p 402.

Levin, D.A. 1976. Alkaloid bearing plants: an ecogeographic perspective. *Am. Nat.* 110(972): 261-284.

Lino, C.S., Traveira, M.L., Viana, G.S.B., Matos, F.J.A., 1997. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents : Coumarin and umbelliferone. *Phytother. Res*, 11 : 211-215.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., 1997. Biology of Microorganisms, 8th ed. Prentice Hall Upper Saddle River Press, London, 986 pp.

Manolaraki, F. 2011. Propriétés anthelminthiques du sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*). Analyse des facteurs de variations et du rôle des composés phénoliques impliqués. Thèse de Doctorat de l'université de Toulouse III, Toulouse.

Marc, T., Gerard, W., Denis, L., 2001. Classification des anti-inflammatoires *in* Guide pharmacologie. Etudiants et professionnels paramédicaux. 4ème Edition. P 426.

Marjorie, M. C., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 564-582.

bibliographiques

Michel, M.C., 2011. Effects of Task Complexity and Interaction on L2-Performance. In *Second Language Task Complexity. Researching the Cognition Hypothesis of language learning and performance*, P. Robinson (ed.), 141-174. Amsterdam and Philadelphia : John Benjamins.

Minuto, L., Casazza, G., Profumo, P. 2004. Population decrease of *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl. In *Liguriaconservation problems for the North Tyrrhenian sea Plant Biosystems*, Taylor and Francis Ltd, 138(1): pp11-19(9).

Miyamae, Y., Orlina Villareal, M., Ben Abdrabbah, M., Isoda, H., Shigemori, H., Hirseins, A.B. 2009. Daphnane diterpenoids from *T. hirsuta* that inhibit melanogenesis in B16 melanoma cells. *Journal of Natural Products*, 72 : 938-941.

Moosavi, M.A., Yazdanparast, R., Sanati, M.H. 2005a. The cytotoxic and antiproliferative effects of 3- hydrogenkwadaphnin in K562 and Jurkat cells is reduced by guanosine. *Biochem Mol Biol*, 38: 391- 398.

Moulinier, C., 2002, *Parasitologie et mycologie médicales Éléments de morphologie et de biologie.*

Mshvildadze, V., Favel, A., Delmas, F., Elias, R., Faure, R., Decanosidze, Q., 2000. Antifungal and antiprotozoal activities of saponins from *Hedera colchica*. *Pharmazie*, 55 : 325-326.

Namik, F.M., Polhamus, Marr, K.A., 1997.The inhibition action of certain spices on the growth of microorganisms *J. Indust Eng Chen*; 8: 623 - 1620.

Nawwar, M.A.M., Ishak, M.S., Sherbieny, A.D., Meshaal, S.A. 1977. Flavonoids of *Reaumuria mucronata* and *Thymelaea hirsuta*. *Phytochemistry*, 16: pp1319-1320.

Neffati, M., Najjaa, H., Máthé, A., 2009. *Medicinal and Aromatic Plants of the World - Africa Volume 3.*

bibliographiques

N'guessan, K., Kadja, B., Zirihi, N.G., Traoré, D. et Aké-Assi, L. 2009. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire), *Sciences et Nature*, 6(1) : pp1-15.

Okada, Y., Miyauchi, N., Suzuki, K., Kobayashi, T., Tisutsui, C., Mayuzumi, K., Nishibe, S., Okuyama, T. 1995. Search for naturally occurring substances to prevent the complications of diabetes. II. Inhibitory effect of coumarin and flavonoid derivatives on bovine lens aldose reductase and rabbit platelet aggregation. *Chem. Pharm. Bull*, 43(8) : 1385-1387.

Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z. & Nalhdibadi, H., 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, 18 : 1518-1523.

Panizzi, A.R, Cardoso, S.R, Ribeiro Chocorosqui, V., 2002. Nymph and adult performance of the small green stink bug, *Piezodorus guildinii* (Westwood) on lanceleaf crotalaria and soybean. *Brazilian Archives of Biology and Technology*;45:53-58.

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

Pausas, J.G., Bonet, A., Fernando, T. M., Climent, A. 2006. The role of the perch effect on the nucleation process in Mediterranean semi-arid oldfields *Acta ecologica*, (29): 346-352.

Quentin, R., Bouix, M. et Leveau. 1984. Cité dans les levures, 3^{ème} édition.

Rahman,A., Choudhary, M.I., Hayat, S., Khan, A.M., Ahmad, A., Malik, S., 1999. Spatozoate and Varninasterol from the brown Alga *Spatoglossum variabile*. *Phytochemistry*. 52: 495-499.

Renner, S. 2001. How common is heterodichogamy. *Trends in ecology. Evolution.Elsevier science*. 19(11).

Rennie, K.L., Hughes, J., Lang, R., Jebb, S.A., 2003. Nutritional management of rheumatoid arthritis: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet*. Apr;16(2):97-109.

bibliographiques

RIZK, A.M., RIMPLER, H.1972. Isolation of daphnoretin and β -sitosterol- β -Dglucoside from *Thymelaea hirsuta*. *Phytochemistry* 11 (1): 473-475.

Rizk, A. M., Hammouda, F.M., Ismail, S.I. 1975. Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*, III, Coumarins. *Acta chimica Academiae scientiarum Hungaricae*, 85(1): p107-115.

Rizk, A.M., Hammouda, F.M., Ismail, S.I. 1974. Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*. II. Lipid fraction. *Plant Med*, 26(4): p346-358.

Rizk, A.M., Hammouda, F.M. et Ismail, S.I., 1982. Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*. III. Lipid fraction. *Plant Med.*, 26 (4). P 346 - 358.

Rizk, A.M., Hammouda, F.M., Ismail, S.I., El-missiry M.M., Evans F.J. 1984. Irritant resiniferonol derivatives from Egyptian *Thymelaea hirsuta* L. *Experientia*, 40(8): 808-809.

Rojas, A., Hernandez, L., Pereda-Miranda, R., Mata, R., 1992. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacology*. 35: 275-283.

Saleh, M.R.I., Haddad, D.Y., Sar, T.M. 1965. Isolation of the crystalline principle, thymelol, from leaves of *Thymelaea hirsuta*. *U. Arab Rep. J. Pharm. Sci*, 4: p49-56.

Sardari, S., Mori, Y., Horita, K., Micetich, R.G., Nishibe, S., Daneshtalab, M., 1999. Synthesis and activity of coumarins and angular furanocoumarins. *Bioorg. Med. Chem.* 7 (9) : 1933-1940.

Sarker, S.D., Latif Z., Gray A.I., 2005. Natural products isolation. *Humana Press* (Totowa), pp1-23.

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

Seidel, V., 2005. Initial and Bulk Extraction. Natural products isolation. *Humana Press* (Totowa), pp27- 37.

Seliger, B., 1997. The effects of coumarins and its metabolites on cell growth and development. *Immunol Toda*, 93-102.

bibliographiques

- Senhaji, O., Faid, M., Elyachioui, M., Dehhaoui, M. 2005.** Étude de l'activité antifongique de divers extraits de cannelle. pp222.h
<http://france.elsevier.com/direct/mycmed/>.
- Shaltout, K.H. 1987.** Pattern, phenology and sex ratio of Egyptian *Thymelaea hirsuta* populations. *Vegetatio*, 72: 67-73.
- Shaltout, K.H. and El-Keblawy, A.A. 1992.** Sex expression in Egyptian *Thymelaea hirsuta*
- Shenbrot, G. 2004.** Habitat selection in a seasonally variable environment: test of the isodar theory with the fat sand rat, *Psammomys obesus*. *Israel/Oikos. Negev Desert*, 106: 361.
- Sikkema, J., De bont, J.A.M. & Poolman, B. 1995.** Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Mol. Biol*, 59 : 201-222.
- Singelton, P. et Sainsbury, D., 1984.** Abrégés de bactériologie. Masson, Paris. P119 - 120 - 138 - 142.
- Sofowora A., 2010.** Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Edition Karthala p.22
- Somon, E. 1987.** Arbres, Arbustes et arbrisseaux en Algérie. (No Edition 686. ed.). Alger: OPU. p135, 143.
- Stöckigt J., Sheludko Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H., Stöckigt D., 2002.** High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic- electrospray ionization mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of chromatography A* 967: 85-113.
- Suhr K.L. et Nielsen P.V., 2003.** Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *J. Appt Microbiol*; 94 (suppl 4): 74 - 665.
- Talia M., Aharon R., David M., Lev W. et Meir W., 2000.** The mode of action of allicin : its ready permeability through phospholipids membranes may contribute to its biological activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1463. P. 20 - 30.
- Tandon, S., Rastogi, R.P. 1977.** Wikstrosin, a tricoumarin from *Wikstroemia viridiflora*. *Phytochemistry*, 16 : 1991-1993.

bibliographiques

Torel, J., Cillard, J. & Cillard, P. 1986. Antioxidants activities of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*, 25 : 383-385.

Touati, D. 1985. Contribution à la connaissance du profil biochimique des dicotylédones buissonnantes et arbustes de la Méditerranée. Thèse de 3ème cycle. Université Claude Bernard, Lyon I.

Trigui, M, Hsouna, A.B., Tounsi, S. and Jaoua, S. 2013. Chemical composition and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian *Thymelaea hirsuta* with special reference to its mode of action. *Industrial Crops and Products*, 41 : 150-157.

Van der Bank, M., Fay, M.F., Chase, M.W. 2002. Molecular phylogenetics of Thymelaeaceae with particular reference to African and Australian genera. *Taxon*, 51: 329-339.

Veldhuizen, E., Tjeerdsma-Van Bokhoven, C., Zweijtzer, S.A., Burt. & Haagsman, H.P. 2006. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *J. Agric. Food Chem*, 54 : 1874- 1879.

Vessereau A., 1992. Méthodes statistiques en biologie et en agronomie. Tec&Doc, paris. P. 65 – 73.

Vernon, H., Heywood, R.K., Brummitt, A.C. and Seberg, O. 2007. Flowering Plant Families of the World. Firefly Books: Ontario, Canada.

Vickery, J.R. 1980. The fatty acid composition of seed oils from ten plant families with particular reference to cyclopropene and dihydrosterculic acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **57**, 87-91.

Vickery, J.R. 1981. The occurrence of dihydromalvalic acid in some seed oils. *J. Am. Oil Chem. Soc*, 58 : 731.

Villars, D. 1807. Catalogue méthodique des plantes. F.G. Levrault, éditeur. Strasbourg. p103.

[Wolfgang, M.C.](#), [Kulasekara, B.R.](#), [Liang, X.](#), [Dana Boyd, D.](#), [Kai Wu, K.](#), [Qing Yang, Q.](#), [Miyada, C.G.](#), [Stephen Lory, S.](#), 2003. "Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14): 8484-8489.

bibliographiques

YAN, D., Jin, C., Xiao, X.H., & Dong, X.P., 2008. Antimicrobial properties of berberines alkaloids in Franch *Coptis chinensis* by microcalorimetry. *J Biochem Biophys Methods*, 70 : 845-849.

Yang, Y.Z., Ranz, A., Pan, H.Z., Zhang, Z.N., Lin, X.B., Meshnich, SR., 1992. Daphnetin : a novel antimalarial agent with in vitro and in vivo activity. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 46 (1) : 1520.

Yanz, L. et Chunru, J.I. 1987. Chemical constituents and pharmacological actions of Thymelaeaceous plants. *Zhongcaoyao*, 18 (2) : 80-89.

Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S. 2004. Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr*, 59 : 113-122.

Ybert E., Astrid, D.D. 2000. Encyclopédie des plantes médicinales. Identifications - préparations - Soins. Larousse, Londres. p 335.

Zenk, M.H., Juenger, M. 2007. Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry Review* 68, 2757 - 2772.

Zhang, Wen Jing , b Lars Olof Björn (2009) The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants
Fitoterapia FITOTE-01795; No of Pages 12

Annexes

Annexe I

Composition des réactifs

- **Liqueur de Fehling**
 - **Réactif à chaud**

Solution A

CUSO₄35 g

Eau distillée500 ml contenant 5 ml d'H₂SO₄

Laisser refroidir puis compléter au litre avec l'eau distillée

Solution B

Sel de Seignette150 g

Eau distillée500 ml

Refroidir puis ajouter 300 ml de lessive de soude non carbonaté, compléter au litre avec l'eau distillée.

NB: mélanger les 2 solutions à volume égal au moment de l'emploi

- **Réactif de Baljet**

Acide picrique1 g

Ethanol 50°100 ml

- **Réactif de Dragendorff:**

Il s'agit d'un mélange (V/V) de deux solutions A et B.

- Solution A

Nitrate de bismuth.....1,7 g

Acide tartrique concentré.....20 g

Eau distillée..... 100 ml

- Solution B

Iodure de potassium.....10 g

Eau distillée100 ml

Annexes

Le mélange a été ensuite additionné de 10 g d'acide tartrique. Une agitation de 30mn a été nécessaire après avoir ramené son volume à 100 ml avec de l'eau distillée.

Annexes

Annexes II :

Les milieux de culture.

1. Composition des milieux de culture gélosés.

• Milieu Mueller Hinton

Infusât de viande.....	
Hydrolysât de caséine.....	2 ,0g
Amidon.....	17 ;0g
Agar-agar.....	1,5g
Eau distillée q.s.p.....	13,0g
PH.....	.1000ml
	7,4 ± 0,2

• Milieu Chapman

Extrait de viande de bœuf.....	1,0g
Peptone.....	10,0g
Chlorure de sodium.....	75,0g
Mannitol.....	10,0g
Rouge de phénol.....	0,025g
Agar-agar.....	15,0g
Eau distillée q.s.p.....	1000ml
pH.....	7,4 ± 0,2

• Gélose Sabouraud

Peptone.....	10,0g/l
Glucose massé.....	20,0g/l
Agar.....	15,0g/l
PH.....	6,3

Annexes

Composition des milieux de culture liquide

- **Bouillon BHIB**

Infusion de cerveau de veau	200g
Infusion de cœur de Bœuf.....	250g
Peptone.....	10,0g
Chlorure de sodium.....	5,0g
Phosphate Disodique.....	2,5g
Dextrose.....	2,0g
Eau distillé q.s.p.....	1000ml
pH.....	7,4 ± 0,2

- **Bouillon nutritif**

Extrait de viande.....	5,0g
Peptone pancréatique.....	10,0g
Chlorure de sodium.....	5,0g
PH.....	7,0 ± 0,2

- **Eau physiologique stérile à 9 pour 100**

Na Cl	9,0g
Eau distillée.....	1000ml

Annexes**Annexes III****Tableau 4 : IC50 et IC90 de *Trichophyton rubrum***

	Ether de pétrole	Dichlorométhane	Méthanol	Ethanol	S. aqueuse	HE
IC50	488 ± 48,92	510 ± 63,13	674,06 ± 20,14	524,79 ± 17,68	510,94 ± 44,41	477,81 ± 40,22
IC90	795,31 ± 27,48	808,02 ± 4,32	818,64 ± 15,19	809,15 ± 4,92	782,50 ± 11,44	767,92 ± 8,25

Tableau 5 : IC50 et IC90 de *Microsporium gypseum*

	Ether de pétrole	Dichlorométhane	Méthanol	Ethanol	S. aqueuse	HE
IC50	512,62 ± 47,40	490,49 ± 48,12	461,56 ± 11,94	487,48 ± 46,15	454,37 ± 3,45	450,58 ± 3,12
IC90	792,51 ± 9,34	803,04 ± 1,33	783,14 ± 6,10	789,83 ± 7,20	794,95 ± 11,28	760,25 ± 7,76

Tableau 6 : IC50 et IC90 de *Microsporium audouinii*

	Ether de pétrole	Dichlorométhane	Méthanol	Ethanol	S. aqueuse	HE
IC50	488 ± 48,92	510 ± 63,13	674,06 ± 20,14	524,79 ± 17,68	510,94 ± 44,41	477,81 ± 40,22
IC90	795,31 ± 27,48	808,02 ± 4,32	818,64 ± 15,19	809,15 ± 4,92	782,50 ± 11,44	767,92 ± 8,25