



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ- BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE
LATERRE DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Réf:..... /UAMOB /F .SNV.ST/DEP .BIO/2018

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER

Domaine : SNV

Filière : sciences biologiques

Spécialité : biotechnologie microbienne

Présenté par :

ZANE NADIA & DJOUHRA OUISSAM

Thème

**Evaluation de l'effet antimicrobienne d'extrait
brute et l'étude phytochimique e de la plante**
Retama Raetam

Soutenu le : 01/07/2018

Devant le jury composé de :

Nom et prénom

Mme DOUMANDJI

univ .de Bouira

présidente

Mr HAMDANI

univ .de Bouira

promoteur

MmeIAZZOURENE

univ .de Bouira

Examineur

Année Universitaire : 2017 /2018

Sommaire

Listes des figures

Listes des tableaux

Introduction.	01
Partie I : synthèse bibliographique	03
Chapitre I : Généralité sur la plante <i>Retama –Reatam</i>	03
I-1-Définition des plantes médicinales.....	03
I-2-utilisation des plantes médicinales.....	03
✓ Utilisation en médecine.....	03
✓ En agriculture.....	04
✓ En cosmétique.....	04
I-3- description botanique.....	04
I-4-description géographique de la <i>Retama –Reatam</i>	07
I-5- Importance de <i>Retama –Reatam</i>	07
✓ Intérêt écologique	07
✓ Intérêt pharmacologique	07
✓ Intérêt industriel et économique	08
I-6- définition phytochimique	08
I-6-1-définition des principes actifs	08
I-6-2-différents groupes des principes actifs	08
I-6-2-1-Polyphénols	09
I-6-2-2-Flavonoïdes	09
I-6-2-3- Tanins	10
I-6-2-4-Alcaloïdes.....	11
I-6-2-5- Huiles essentielles:.....	11
I-6-2-6-Les saponosides	12
Chapitre II : Généralité sur les méthodes d'extraction	13
II-1-Définition sur les techniques d'extraction. ;.....	13
II-1-1- Bref historique de l'extraction ;.....	13
II-1-2-Définition sur les techniques d'extraction	14
II-2-Différent méthodes d'extraction et leur principe.	15

Sommaire

II-2-1 Principale méthode d'extraction ;	15
II-2-1 -1 Extraction par entraînement à la vapeur d'eau ;	15
II-2-1-2 Extraction par hydro distillation	15
II-2-1-3 La distillation à vapeur saturée ;	16
II-2-1-4 L'hydrodiffusion	16
II-2-1-5 L'expression à froid	16
II-2-2 Autres méthodes d'obtention des extraits volatils ;	17
II-2-2-1 Extraction par solvants	17
II-2-2-2 Extraction par micro- ondes	17
II-2-2-3Extraction des extraits aromatiques par solvant organique sur appareillage Soxhlet	17
II-2-2-4 . Extraction assistée par Ultrason	18
Partie II : Volet expérimental	20
Présentation du laboratoire d'accueil	20
1- Présentation de l'entreprise	20
2- Historique et activité	20
3- Principales unités	20
Matériels et méthodes	21
I-1-Matériel	21
I-1-1-Matériels non biologiques	21
I-1-2-1- Séchage et conservation de la plante	23
I-1-2-2-caractéristiques des poudres obtenues	23
I-2-Méthodes	24
I-2-1- screening phytochimiques	25
I-2-1-1-Test Tanins	25
I-2-1-2- test des Saponosides	25
I-2-1-3-Test Flavonoïdes	25
I-2-1-4-test des alcaloïdes	26

Sommaire

I-2-1-5-Glycosides.....	26
I-2-1-6-Stérols et triterpènes.....	26
I-3- Les méthodes d'extraction	27
I- 3-1-Extraction de l'extrait brut par soxhlet	27
I-3-2- l'extraction aqueuse Extraction.....	29
I-4-Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits	31
I-4-1-Micro-organismes testés.....	31
I-4-2-Tests antibiogramme.....	32
• Revivification et repiquage des germes	32
• Préparation de l'inoculum bactérien	32
• Préparation des boîtes de pétri	33
• Ensemencement	33
• préparation des disques.....	33
• Antibiogramme.....	33
• Incubation	33
Chapitre II : Résultat et discussions	35
II-1-screening phytochimique	35
II-2- Evaluation de l'activité antimicrobienne	37
Conclusion.....	41
Références bibliographiques	
Résumé	

Remerciements

En préambule à ce mémoire, nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Nous tenons à remercier chaleureusement Mr HAMDANI AZIZ notre promoteur de mémoire, pour avoir accepté de nous encadrer et pour tous les conseils, les encouragements, les orientations qu'il nous a prodigués durant la préparation de notre mémoire.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance envers Mme IAIZZOURENE qui a eu la gentillesse de lire et examiner ce travail.

Nous sommes conscientes de l'honneur que nous a fait Mme DOUMANDJI en étant présidente du jury.

Nous aimerions exprimer notre gratitude et nos remerciements à tous les membres de jury.

En fin, nous adressons nos remerciements à notre promotion, à tous nos proches et ami(es) qui nous ont toujours soutenu et encouragé pour la réalisation de ce mémoire de fin d'études.

Merci à toutes et à tous

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

*A mes chères parents, aucun hommage ne pourrait être à la hauteur, de le leur amour inestimable, leur confiance leur soutien, leur sacrifices et toute les valeurs qu'ils ont su m'inculquer .c'est à eux que je suis arrivé la aujourd'hui.
Que dieu les protège et leur procure bonne santé et long vie.*

Et bien sur mes sœurs fatiha,saliha ,souad ,zinafatima, nacira ,zahira lia ,a mon frères omar a mes amies. A mon binôme ouissam. A tous ceux qui ont contribué de près ou loin à la réalisation de ce mémoire.

Je vous dis merci

Nadia



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

*A mes chères parents, aucun hommage ne pourrait être à la hauteur, de le leur amour inestimable, leur confiance leur soutien, leur sacrifices et toute les valeurs qu'ils ont su m'inculquer .c'est à eux que je suis arrivé la aujourd'hui.
Que dieu les protège et leur procure bonne santé et long vie.*

Et bien sur mes sœurs mes frèresmes amies. A mon binômeNadia . A tous ceux qui ont contribué de près ou loin à la réalisation de ce mémoire.

Je vous dis merci

ouissam

Liste des abréviations

OMS : organisation mondiale de la santé

STZ : streptozotocine

Liste des tableaux

Tableau 01 :Systématique de <i>Retama raetam</i>	06
Tableau 02 :liste des matériels non biologique utilisés pendant la manipulation.....	21
Tableau 03 : caractéristiques générales des bactéries testées.....	31
Tableau 04 : caractéristiques générale de moisissure testée.....	31
Tableau 05 : Résultat du screening phytochimique de <i>Retama raetam</i> des deux parties tige et grain.....	35
Tableau 06 : détermination des zones d'inhibition obtenue avec les extraits grains et tige....	36

Listes des figures

N° de Figure	Titre de Figure	page
Figure 01	(A) et (B) les fruits, (C) les graines	05
Figure 02	Photo de la <i>Retama raetam</i>	06
Figure 03	Structure de base des flavonoïdes	10
Figure 04	Principe schématisé de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur de l'eau	15
Figure 05	Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation	16
Figure 06	Montage de l'appareil de soxhlet	18
Figure 07	présentation de la zone de récolte sur la carte géographique de kherreta	22
Figure 08	les tiges après séchages (photo originale)	23
Figure 09	aspect des poudres des feuilles et des graines de <i>retama raetam</i> (photo originale)	23
Figure 10	schéma générale des différentes étapes du travail	24
Figure 11	Un extracteur Soxhlet	27
Figure 12	Montage utilisé pour l'extraction de l'extrait brut de <i>Retama raetam</i> par soxhlet	28
Figure 13	les étapes d'extraction d'extrait brute	29
Figure 14	Extraction aqueuse	30
Figure 15	les souches utilisées	32
Figure 16	préparation d'inoculum bactérienne	33
Figure 17	Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de Pétri (ZAIKA, 1988)	34
Figure 18	exemple sur la zone d'inhibition obtenue dans le cas des grains <i>staphylococcus aureus</i>	38
Figure 19	exemple sur la zone d'inhibition obtenue dans le cas des grains et tige sur de la <i>Aspergillus brasiliensis</i>	39



introduction

Introduction :

Pendant très longtemps, l'homme avait recours aux moyens traditionnels pour se faire soigner d'un certain nombre de maladies. la phytothérapie en l'un des moyens au quel l'homme avait recours (**SANAGO, 2006**). La phytothérapie est une pratique très ancienne, étymologiquement elle vient du grec qui signifie « soigner par les plantes ». Elle repose en partie sur une pratique traditionnelle, fondée sur l'utilisation ancestrale et locale des plantes. Les plantes médicinales renferment de nombreuses substances actives (plus de 250) qui ont des activités thérapeutiques complémentaires ou synergiques.

Aujourd'hui, l'avancée de la science et de la technologie a permis d'identifier avec une précision aussi extraordinaire les principes actifs des extraits de plantes qui sont reproduits par l'industrie chimique pour ensuite être incorporés dans de nombreux médicaments synthétisée dans des laboratoires de fabrication pharmaceutiques (*les plantes médicinales, institut européen des substances végétales*)

L'intérêt aux plantes et aux pratiques phyto thérapeutiques n'a cessé d'augmenter, au jour d'aujourd'hui, l'industrie pharmaceutique, la médecine et la recherche scientifique y portent un intérêt accru aux plantes médicinales de part leur efficacité, en raison des avantages que présentent sur la sécurité d'utilisation pour l'organisme mais aussi pour l'enjeu économique majeur que présentent ces plantes pour le pays.

C'est dans cette optique que nous portions un intérêt à l'une des espèces de plantes dont les effets thérapeutiques ont été éprouvés à travers des utilisations ancestrales traditionnelles notamment contre des infections bactériennes ou fongiques affectant le système digestifs de l'être humaine. Il s'agit de la plantes de *Retama raetam*, une plante typique du nord de l'Afrique qui caractérise les domaines semi aride. Sa présence en Algérie est abondantes, elle prend naissance à partir de l'isohyète 600mm au nord jusqu'à l'isohyète 200 mm à la limite de la plate forme saharienne au sud.

Bien que des études scientifiques publiées ont démontré l'activité antibactérienne, antioxydant et anti fongique de la *Retama raetam*, notamment pour les feuilles, on recense très peu d'études qui étaient consacrées aux grains de cette plante, d'autre part, les espèces étudiées ont concernées les zones des hauts plateaux et les zones sahariennes dont la composition minéralogiques des sols et le caractères climatiques sont différent des zones telliennes. Dans la présente étude, nous étions intéressés à l'espèces de *Retama raetam* abondamment

Introduction

présente dans le domaine semi aride de la zone de khertata en domaine tellien de la chaine des Babords, cette zone caractérisée par la prédominance du sol calcaireux et des versants pentus mais aussi soumise à des hauteurs de pluies qui permettraient une bonne alimentation en eau mais aussi une activité minéralogique et pedogéniques importante qui assure une meilleur charge en sel minéraux .

L'objectif globale dans la présente étude est de caractériser les substances actives et l'activité antimicrobienne, notamment des grains, de l'espèce de *Retama raetam* de la région de kherrata, et ceci à travers des protocoles conventionnels appropriés à ce types d'études, quant aux objectifs spécifique de l'étude, il s'agit de démontrer la valeur écologique, économique et médicinale de cette espèces que présente pour la région.

Pour en aboutir aux résultats de ce travail, il a été question de mener l'opération sur plusieurs étapes, depuis la collecte de l'échantillon de l'espèce, à l'extraction puis à l'analyse et l'interprétation.

A souligner que ce travail a été réalisé avec un partenaire externe spécialisé dans la fabrication des médicaments où la pertinence des expériences réalisées aux laboratoires est exigée d'amont en aval.

Donc ; le travail dans son ensemble est contenu dans le présent document, qui est un mémoire de fin d'études de master. Ainsi pour ce faire, il a été question de subdiviser le document en deux partie distinctes déclinées en quatre chapitre en tout, deux chapitre pour la première partie qui est consacrée principalement à la synthèse bibliographique et les généralités sur les plantes médicinale, puis la description écologique de la plante étudiée. La deuxième parte composées de deux chapitres est dédiée essentiellement à l'expérimentation, l'interprétation et la discussion des résultats. Une conclusion est faite à la lumière des résultats obtenus.



Partie I : synthèse bibliographique



*Chapitre I : généralités sur la
plante Retama-Raetam*

I -Généralité sur la *Retama Raetam*

1- Définition des plantes médicinales

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 6377 espèces de plantes sont utilisées en Afrique, dont plus de 4000 sont des plantes médicinales, ce qui constitue 90% de la médecine traditionnelle en Afrique .

Dans le code de la Santé publique, il n'existe pas de définition légale d'une plante médicinale au sens juridique, mais en France « une plante » est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et que son usage est exclusivement médicinal. C'est-à-dire qu'elles sont présentées pour leurs propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales .

Ce sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Leur action provient de leurs composés chimiques (métabolites primaires ou secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents (SANAGO, 2006).

I-2 - utilisation des Plantes médicinales

Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (FARNSWORTH et al., 1986). (On appelle plante Médicinale toutes plantes renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, Soulager ou guérir des maladies .

Depuis longtemps l'homme utilise les plantes comme une source principale de nourriture, par la suite s'est développé pour les utiliser comme médicaments et remèdes à fin de soigner les différentes maladies (DAMINTOTI, 2005).

L'utilisation des plantes médicinales dans différents domaines

A. Utilisation en médecine : en tant que médicament pour l'homme ; exemple :

- En dermatologie, gastrites aiguës, toux, ulcères d'estomac, laxatifs, sommeil et désordres nerveux.
- Systèmes cardiovasculaires.
- Activité antimicrobienne, antivirale, antiparasitaire : les produits naturels des plantes depuis des périodes très anciennes ont joué un rôle important dans la découverte de nouveaux agents thérapeutiques.

B. En agriculture : exemple l'utilisation des huiles dans l'agriculture dans les contrôles de divers insectes et nématodes

C. En cosmétique : Des produits de beauté, parfums et articles de toilette, produits d'hygiène (PORTER, 2001).

I-3-Description botanique de *Retama raetam* :

Arbuste saharien de 1 à 3,5 m de hauteur à rameaux veloutés, fleurs blanches de 8-10 mm, étendard égalant la carène ou plus long, gousse non dilatée sur sa nature ventrale contenant une petite graine (QUEZEL et SANTA, 1962).

Retama raetam est fréquente dans le nord et l'est de la méditerranée et de la péninsule du Sinaï (MITTLER et AL., 2000) .

En Algérie Les *Retames raetam* occupant une place considérable dans les régions arides et semi-arides.

La floraison est longue et précoce de la fin d'hiver à début printemps, selon le climat, elle peut s'étendre jusqu'au mois de mai (SELAMI, 2000) .

Le fruit est une étroite gousse indéhissante de moins de 2 cm, acuminées, avec une extrémité aigue, portant une à deux graines (QUEZEL et SANTA, 1962). Les graines contiennent de la cytosine, un alcaloïde toxique



Figure 01 : (A) et (B) les fruit, (C) les graines

La *Retam raetam* c'est espèce fixatrice de dune, grâce à leur système racinaire très développé, selon (ZOHARY, 1961), les racines de *Retama raetam* pénètrent jusqu'à 20m de profondeur dans le sol.



Figure 02 : Photo de la *Retama raetam*

Tableau 01 : Systématique de *Retama raetam*

Regne	Plantae
K ;Embranchement	Spermatophytes
Sous Embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicot
Sous- Classe	Rosids
Ordre	Fabiales
Famille	Fabacées
Sous- Famille	Faboideae
Genre	<i>Retama</i>
Espèce	<i>Retama raetam</i>

(OZENDA, 1991)

I-4-Distribution géographique de la *Retama raetam* :

Les rétames sont caractérisés par une large distribution géographique, originaires du nord-ouest Africain et probablement des îles Canaries (Zohary, 1959).

Se localise au sud de l'Europe, sur les pourtours du bassin méditerranéen, et le long de la côte de l'Espagne (Andalousie)

En Algérie les rétames occupent une surface considérable du nord vers le sud (Thomas, 1968).

Retama raetam est localisé dans le sud oranais, sud de Djelfa, Ain Safra, Touggourt, au centre de la Kabylie bouira Bejaïa. à l'est de Biskra, également à Ouargla (Allal-benfakih. I ; 2006), c'est une plante C3 commune des écosystèmes arides qui entourent la méditerranée, cette plante utilise comme stratégie d'acclimation une dormance partielle pour résister aux longues périodes de sécheresse.

I-5-importance de *Retama raetam* :

Retama raetam très intéressantes, du point de vue biochimique, moléculaire et écologique.

- **Intérêt écologique :**

La *Retama raetam* joue un rôle très important dans le maintien de l'équilibre des milieux naturels et des écosystèmes, reconnues comme étant des plantes des zones arides et semi arides.

S'adapte aux conditions les plus extrêmes de sécheresse et de salinité grâce à leur morphologie et leur structure xéromorphique elle développe un mécanisme moléculaire qui lui permet de résister aux changements climatiques (manque de nutriments et stress hydrique) et cela en entrant dans une phase de dormance partielle, en supprimant l'expression de certains gènes, grâce à une enzyme de défense qui est l'ascorbate peroxydase (APx). (Mittler.R et al 2000,) Grâce à leur très grande capacité symbiotique, la *Retama raetama* contribue à la bio fertilisation des sols salins et pauvres, et joue un rôle important dans le cycle de l'azote.

- **Intérêt pharmacologique :**

En médecine traditionnelle, *Retama raetam* est utilisé dans le traitement de plusieurs maladies comme l'eczéma, elle est utilisée dans le sud dans les soins en cas de morsures de serpents (El HAMROUNI A, 2001).

en effet l'administration orale d'une dose de 20mg/kg de l'extrait aqueux de *Retama raetam*, réduisait de façon significative le taux de glucose dans le sang des rats normaux, ainsi que des rats diabétiques dont le diabète a été induit par streptozotocine (STZ).

Retama raetam influe aussi sur le métabolisme lipidique, selon (MAGHRANI.M et AL 2004), l'administration d'extraits aqueux de *Retama raetam* induit une baisse de la concentration des triglycérides dans le plasma des rats normaux et diabétiques et conduirait à une baisse significative du poids.

En plus *Retama raetam* a une activité antioxydante (SAADAOUIL.B et AL ; 2007), ainsi qu'antimicrobienne et cytotoxique.

De ce fait, on constate la large capacité pharmacologique des *Retames*, et leur éventuelle utilisation en phytothérapie, et donc la nécessité d'approfondir les connaissances sur ces espèces, au niveau moléculaire et génétique.

- **Intérêt industriel et économique :**

La *Retama raetam* sont considérés comme un excellent fourrage, de plus leur bois est utilisé en chauffage.

Ils sont riches en fibre, dont la longueur moyenne atteint 1,93mm (BAHL, 1991) ils pourraient donc être valorisés dans l'industrie papetière.

Les *Retama raetam* sont aussi des plantes ornementales en raison de leurs multiples fleurs odorantes.

I-6- Définition phytochimie:

C'est la science qui étudie la structure, le métabolisme et la fonction, ainsi que les méthodes d'analyses, de purification et d'extraction des substances naturelles issues des plantes. Elle est indissociable avec les autres disciplines telles que la Pharmacognosie (DI-PIETRO. M., (2004).

I-6-1- Définition des Principes actifs

Le principe actif c'est une molécule contenu dans une drogue végétale ou dans une préparation à base de drogue végétale et utilisé pour la fabrication des médicaments

. Cette molécule présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'homme ou l'animale, elle est issue de plantes fraîches ou des séchées, nous pouvons citer comme des parties utilisées: les racines, écorces, sommités fleuries, feuilles, fleurs, fruits, ou encore les graines (DI-PIETRO. M., (2004).

Les plantes contiennent des métabolites secondaires peuvent être considérées comme des substances indirectement essentiels à la vie des plantes par contre aux métabolites primaires qu'ils sont les principales dans le développement et la croissance de la plante, les métabolites secondaires participent à l'adaptation de la plante avec l'environnement, ainsi à la tolérance contre les chocs (lumière UV, les insectes nocifs, variation de la température ...). Ces composés sont des composés phénoliques, des terpènes et stéroïdes et des composés azotés dont les alcaloïdes.

I-6-2- Différents groupes des Principes actifs

Les métabolites secondaires se classent en de nombreux groupes, dont trois grands groupes chez les plantes :

- Composés Phénoliques : tanins, lignine, flavonoïdes
- Composés Azotés: alcaloïdes, bétalaïne, hétérosides cyanogènes et glucosinolates
- Terpènes: hémiterpènes(C5), monoterpènes (C10), sésquiterpènes (C15), Diterpènes (C20), triterpènes (C30), tétraterpènes (C40) et polyterpènes (+ que C40).

I-6-2-1- Polyphénols:

Les polyphénols ou composés phénoliques forment une grande classe de produits chimiques qui on trouve dans les plantes au niveau des tissus superficielles, ils sont des composés photochimiques polyhydroxylés et comprenant au moins un noyau aromatique à 6 carbones. Ils subdivisent en sous classe principales; les acides phénols, les flavonoïdes, les lignines, les tanins. Comme ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes, elles ont un rôle principale à la vie de plante, à la défense contre les pathogènes; principalement les moisissures et les bactéries phytopathogènes et la protection contre les rayonnements UV; sachant que tous les composés phénoliques absorbent les rayonnements solaire

Les polyphénols ont également un rôle dans le contrôle de la croissance et le Développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance. Les polyphénols sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation (**BRUNETON. J., (1999).**

I-6-2-2-Flavonoïdes :

Terme en latin ; flavus= jaune. Ont une structure de C₆-C₃-C₆ à poids moléculaire faible, ils peuvent être considérés parmi les agents responsables des couleurs de plante à côté des chlorophylles et caroténoïdes . Les flavonoïdes ont des sous-groupes caractérisés à contenant deux ou plusieurs cycles aromatiques existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, chacun portant une ou plusieurs groupes hydroxyles phénoliques et reliées par un pont carbone

Les flavonoïdes sont généralement des antibactériennes. Ils peuvent être exploités de plusieurs manières dans l'industrie cosmétique et alimentaire (jus de citron) et de l'industrie pharmaceutique (les fleurs de trèfle rouge traitent les rhumes et la grippe en réduisant les sécrétions nasales), comme certains flavonoïdes ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antivirales. (BRUNETON. J., (1999).

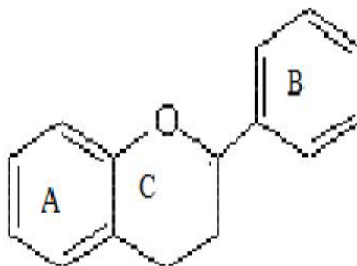


Figure 03 : Structure de base des flavonoïdes (BRUNETON. J., (1999).

I-6-2-3- Tanins :

Les tanins sont une famille complexe de principes actifs qu'on trouve dans l'ensemble des végétaux, et dans toutes leurs parties (écorces, racines, feuilles, etc.). Ils ont la capacité de former des complexes avec des macromolécules (les protéines ...) et des liaisons entre les fibres de collagènes, d'où leur viennent la plupart de leurs propriétés (**PAOLINI. V., PH. DORCHIES, (2003)**). Leur structure chimique est particulièrement variable, mais comporte toujours

Une partie poly phénolique; il existe deux catégories de tanins, d'origine biosynthétiques différentes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**PAOLINI. V., PH. DORCHIES, (2003)**).

□ Les tanins hydrolysables : Ce sont des esters d'oses et d'acides phénols (acide gallique ou ellagique) (**BOUNATIROU. S., S. SMITI, (2007)**).

□ Les tanins condensés : ou les tanins catéchiques ou proanthocyanidols : Ce sont des polymères flavanoliques, constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone le plus souvent C4-C8 ou C4-C6 tel la Catéchine ou l'epicatechine.

les tanins ont un très grand pouvoir antibactérien, antiviral, anti-inflammatoire et une activité antimutagène. Les plantes riches en tanins sont utilisées dans les cas de rhume, de maux de gorge, les problèmes de sécrétions trop importantes, les infections internes ou externes, blessures, coupures et brûlures. Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus souples et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure, elles rendent les selles plus liquides, facilitant ainsi le transit intestinal

I-6-2-4-Alcaloïdes

Les alcaloïdes constituent avec les hétérosides, la majorité des principes actifs des plantes médicinales. la plupart des alcaloïdes sont solubles dans l'eau et l'alcool et ont un goût amer et certains sont fortement toxiques.

Les alcaloïdes sont des molécules d'origine naturelle. On les trouve principalement chez les végétaux, mais aussi chez les animaux et chez certains microorganismes. Les alcaloïdes forment un groupe hétérogène du point de vue de leur structure, de leurs propriétés et de leurs effets biologiques. Ils agissent directement sur le système nerveux avec des effets sur la conscience et la motricité. L'action sur le système nerveux peut aller jusqu'à une action antispasmodique, et mydriatique, anesthésique locale ou analgésique et narcotique (**BRUNETON. J., (1999)**).

I-6-2-5- Huiles essentielles:

Ce sont des molécules à noyau aromatique et caractère volatil offrant à la plante une odeur caractéristique et on les trouve dans les organes sécréteurs .

Jouent un rôle de protection des plantes contre un excès de lumière et attirer les insectes pollinisateurs.

Ils sont utilisées pour soigner des maladies inflammatoires telles que les allergies, eczéma, favorise l'expulsion des gaz intestinales comme les fleurs frais ou séchées de plante "camomille" .

L'utilisation pharmaceutique des huiles essentielles se fonde sur leurs odeur et leur saveur ; leur effet irritant sur la peau et les muqueuses ; leur propriétés désinfectantes et leur action bactéricide .s

Les huiles essentielles se composent surtout de **BOREE 2012,**) terpènes, produits volatils souvent mélangés à d'autres substances.

I-6-2-6-Les saponosides :

On entend par saponosides (mot latin « sapon », savon ; « saponaire », l'herbe a savon), des hétérosides à aglycones de structure stéroïde ou triterpénique qui tiennent une grande place parmi les substances d'origine végétale (**ROBINET. F-G., (1951)**)

Les saponosides ont une activité expectorante, ils rendent un peu moussant la Muqueuse des bronches inflammatoires et facilitent l'expectoration. De plus, ils sont de puissants hémolysants, ils possèdent également des propriétés édulcorantes, largement utilisées dans l'industrie agro-alimentaire (**BRUNETON. J., (1999).**)

D'autre part les travaux de ont mis en évidence l'activité antifongique de saponosides triterpéniques extraits du lierre sur les levures et les dermatophytes. Dans un même ordre d'idée, les saponosides l' α -hédérine ont montré une activité anti tumorale et antibactérienne



*Chapitre II : généralités sur les
méthodes d'extraction*

Chapitre II : généralité sur les techniques d'extraction

II-1-Définition sur les techniques d'extraction :

II-1-1- *Bref historique de l'extraction*

Si la bibliographie résultant du mot clef « extraction » révèle un très grand nombre de travaux, aucun d'entre eux ne concerne directement notre approche de l'extraction de la matière végétale assistée par induction directe, et très peu d'entre eux concernent plus particulièrement le domaine des réactions de synthèse assistées du même procédé. En effet, l'extraction est présentée, la plupart du temps, comme un procédé de séparation par lequel un matériau peut être traité par différentes méthodes. Dans le cas particulier des huiles essentielles, d'une façon générale, l'extraction est faite par entraînement à la vapeur d'eau. Cette méthode est un procédé de séparation basé après condensation sur la différence de composition entre l'eau et la vapeur produite pendant l'exécution de l'opération unitaire .

Sur le plan historique, le développement des procédés d'extraction a ses origines dès l'antiquité. Par exemple, les colorants ont toujours joué un rôle très important dans la vie de l'homme. Des fragments de tissus teints à partir de garance, datés de 3500 ans avant JC, ont été découverts dans les ruines de certaines civilisations indiennes . Le bleu maya a été découvert **en 1931** sur les peintures murales de Chichen Itza en Yucatan, Mexique.

Plus tard, au cours du **18^{ième} siècle**, commence l'utilisation de solvants d'origine pétrochimique pour extraire les matières naturelles. En France, a été breveté par E. Deiss en **1855**, un procédé pour extraire la graisse à partir d'arêtes, d'os et de bois qui utilise du disulfite de carbone comme solvant. Une année plus tard, le même auteur a développé une méthode pour l'extraction des huiles de graines et a construit une usine productrice d'huile d'olive à Marseille .

En 1870, l'extraction par solvant en batch a été mise en œuvre comme un procédé industriel en Europe; cette innovation industrielle s'est développée dans toute la France et l'Italie. Par ailleurs, le disulfite de carbone, le naphte, le trichloréthylène et l'éthanol sont commercialisés très tôt comme solvants pour l'extraction des huiles de graines. (**MARTINI et SEILLER, 1999**).

Aux alentours de **1905 – 1910**, le naphte et le gasoil commencent à être des produits recherchés. Pendant et après la première guerre mondiale, l'Europe a stocké des graisses et huiles pour l'usage alimentaire, produire des explosifs ainsi que pour d'autres usages indus-

triels. Les analyses de Johnson et Lusas en 1983, indiquent qu'avant 1920 une méthode d'extraction continue et à contre-courant du haricot de soja a été mise en œuvre par Bollman et Hildebrandt en Allemagne. A partir des années 1940, l'industrie d'extraction des huiles exige un produit exempt de solvant. Alors, les produits sont portés à ébullition et distillés pour avoir une meilleure pureté.

Like ns et Nickerson en 1964, inventent un procédé de distillation – extraction simultanée pour l'industrie de la bière. Leurs travaux vont constituer la base d'innombrables recherches afin d'améliorer la qualité des produits et de réduire les temps d'extraction. (**MARTINI et SEILLER, 1999**).

I1-1-2-Définition sur les techniques d'extraction

Dans le secteur agroindustriel et particulièrement des extractions, il existe différentes méthodes d'exploitation des plantes aromatiques, tinctoriales et riches en matière lignocellulosiques dont l'expression à froid, l'extraction par solvant organique volatil, l'extraction par gaz liquéfié, par fluide à l'état supercritique, par microondes, par ultrasons, entraînement à la vapeur d'eau et enfin l'hydro distillation , De tous ces procédés, ce dernier est le plus employé à l'échelle industrielle pour la production d'huiles essentielles.

Les principales raisons de cette préférence sont liées à la facilité de mise en oeuvre du procédé, sa sélectivité et donc la qualité des produits obtenus. En effet, les installations d'hydro distillation sont relativement simples (**MARTINI et SEILLER, 1999**).

Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale a traité, des caractéristiques physico chimique de l'essence a extraire de l'usage de l'extrait et l'arôme de départ au cours de l'extraction.

Les procédés d'extraction classiques à partir de la matière végétale sont souvent réalisés dans des installations spécifiquement pour chacune d'entre elles (**MARTINI et SEILLER, 1999**).

La recherche d'un nouvel équipement répondant aux critères suivants :

- Extraire et isoler un produit de bonne qualité
- Minimiser le temps d'extraction
- Être flexible et adaptable à la diversité de la matière première
- Définir l'utilisation du réacteur assisté par induction thermomagnétique directe dans le domaine des extractions de métabolites secondaires.

II-2- Définition des méthodes d'extraction et leur principe

II-2-1 Principale méthode d'extraction

Il existe plusieurs méthodes de distillation dont voici les principales :

II-2-1 -1 Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées. L'injection de vapeur se fait à la base de l'alambic.

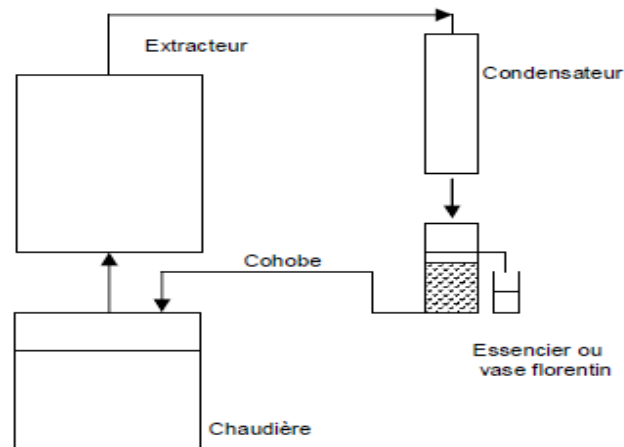


Figure 04 : Principe schématisé de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur de l'eau (Richard et Peyron, 1992).

II-2-1-2 Extraction par hydro distillation

L'hydro distillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition. Elle est généralement conduite à pression atmosphérique. La distillation peut s'effectuer avec ou sans cohobage des eaux aromatiques obtenues lors la décantation.

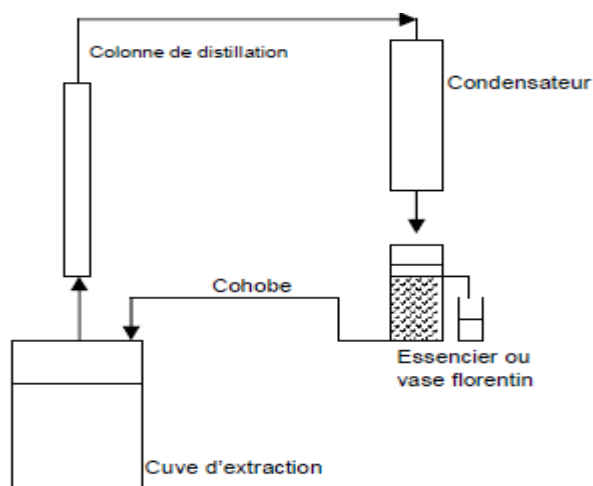


Figure 05: Principe schématisé de l'appareillage d'hydro distillation. (Richard et Peyron, 1992).

II-2-1-3 La distillation à vapeur saturée

Dans cette variante, la matière végétale n'est pas en contact avec l'eau. La vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées. La distillation à vapeur saturée est la méthode la plus utilisée à l'heure actuelle dans l'industrie pour l'obtention des huiles essentielles à partir de plantes aromatiques ou médicinales. En général, elle est pratiquée à la pression atmosphérique ou à son voisinage et à 100°C, température d'ébullition d'eau. Son avantage est que les altérations de l'huile essentielle recueillie sont minimisées .

II-2-1-4 L'hydrodiffusion

Elle consiste à pulser de la vapeur d'eau à travers la masse végétale, du haut vers le bas. Ainsi le flux de vapeur traversant la biomasse végétale est descendant contrairement aux techniques classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant. L'avantage de cette technique est traduit par l'amélioration qualitative et quantitative de l'huile récoltée, l'économie du temps, de vapeur et d'énergie .

II-2-1-5 L'expression à froid

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'encre des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à

l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique .

II-2-2 Autres méthodes d'obtention des extraits volatils :

II-2-2-1 Extraction par solvants

La méthode de cette extraction est basée sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. L'extraction se fait dans des extracteurs de construction variée, en continu, semi-continu ou en discontinu. Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool. L'extraction par les solvants est très coûteuse à cause du prix de l'équipement et de la grande consommation des solvants. Un autre désavantage de cette extraction par les solvants est leur manque de sélectivité; de ce fait, de nombreuses substances lipophiles (huiles *fixes*, phospholipides, caroténoïdes, cires, coumarines, etc.) peuvent se retrouver dans le mélange pâteux et imposer une purification ultérieure (Brian, 1995).

II-2-2-2 Extraction par micro- ondes

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

.

II-2-2-3 Extraction des extraits aromatiques par solvant organique sur appareillage Soxhlet

L'extraction par solvant organique à chaud est actuellement largement utilisée. Le principe de cette méthode consiste à faire tremper les plantes dans un solvant organique volatil à chaud, soit pour obtenir des produits que l'on ne peut extraire par un autre procédé, soit en vue de rendements plus élevés. Dans l'appareillage Soxhlet un système de régénération interne du solvant permet de mettre en contact en permanence le végétal avec du solvant pur. Le choix du solvant est influencé par des paramètres techniques et économiques : sélectivité, stabilité, inertie chimique et température d'ébullition pas trop élevée pour permettre son élimination totale (**J. Bruneton, Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3e édition revue, Paris, 1999**)



Figure 06 : Montage de l'appareil de soxhlet.

II-2-2-4 . Extraction assistée par Ultrason

C'est une technique fréquemment utilisée pour l'extraction des composés bioactifs à partir des matières végétales. (**JINCHAO et XUEGUANG, 2005 ; YA-QIN *et al.*, 2008; CHUNG *et al.*, 2010 ; ARCEUSZ *et al.*, 2013**). Les ultrasons sont des ondes vibrationnelles mécaniques de fréquence allant de 16 KHz à 1 GHz pouvant se propager dans les solides, les liquides et les gaz. Dans un milieu liquide, la propagation des ondes va générer des cycles successifs de compression (haute pression) et de raréfaction (basse pression). Cette différence

de pression va générer des mouvements moléculaires au sein du milieu. Lors d'un cycle de raréfaction la distance entre les molécules est augmentée et au-dessus d'une certaine distance dépendant de chaque milieu, des bulles de cavitations vont se former. Ces bulles vont croître pendant les phases de raréfaction et diminuer pendant les phases de compression. La répétition de ces cycles va conduire à l'implosion des bulles de cavitation, libérant ainsi une grande quantité d'énergie.

Lorsque les bulles de cavitation sont formées à proximité d'une surface solide elles deviennent asymétriques, et l'implosion qui en résulte produit des jets de liquide projetés à très grande vitesse vers la surface du solide, ainsi qu'une augmentation locale de la température et de la pression. Dans le cas d'une matrice végétale, ces jets de liquides vont percer les parois végétales et permettre ainsi la libération des molécules dans le milieu liquide (**YA-QIN, *et al.*, 2008; CHUNG *et al.*, 2010; MICHEL, 2011**).

C'est un nouvel outil permettant d'augmenter les rendements ou/et d'accélérer les cinétiques d'extraction, et simple à mettre en place. Permet d'effectuer plusieurs extractions simult-

La réduction de la température de fonctionnement permettant l'extraction des composés thermolabiles, possibilité d'utilisation de n'importe quel type du solvant ce qui permet d'intervenir dans l'extraction d'une large variété de composés naturels.



Partie II : volet expérimental



Chapitre I : matériels et méthodes

I-Présentation du laboratoire d'accueil

Le présent travail qui porte sur l'extraction des substances actives de la *Retama raetam* son analyse physico-chimique et évaluation de son activité antimicrobienne sur certains microorganismes. Cette expérimentation est réalisée au niveau du laboratoire de la microbiologie département des Sciences biologiques (faculté SNV) de Bouira et au niveau de l'entreprise la SARL Génériclab sise à Rouiba

I-1- Présentation de l'entreprise :

Génériclab est une entreprise privée à statut de SARL, située dans la zone d'activité de Rouiba c'est un laboratoire pharmaceutique actuellement spécialisé dans la fabrication des médicaments génériques.

I-2- Historique et activité

Le mois de **juillet de l'année 1992**, date de sa création, elle se lance dans la fabrication sous licence 'Peters' (France) de produits désinfectants à usage hospitalier, destinés à lutter contre les infections nosocomiales.

2002 ; une année cruciale ; (GENERICLAB) succédera à PHDH et aura comme nouvelle mission l'importation et la fabrication des médicaments.

2003 fut la date du lancement, Génériclab met sur le marché son premier médicament façonné (en sous-traitance chez SAIDAL group). Parallèlement, elle crée le département marketing, fort d'un réseau de visiteurs médicaux.

2004 la réalisation d'une unité de fabrication de collyre et gouttes (liquide), ce-ci selon les normes GMP et FDA, et doté de matériel à la fine pointe de la technologie.

2010 lancements de la production de produit liquide suivi du produit en forme sèche (comprimés et gélules) en 2011.

I-3- Principales unités :

- **Unité de direction**
- **Unité de production**
 - a. **Atelier forme sèche :**
 - **Unité de fabrication**
 - **Unité de stockage**
 - b. **Atelier forme liquide**
 - **Unité de fabrication**
 - **Unité de stockage, magasin**

- **laboratoire de control de qualité**
- **Unité de stockage des produits finis, destinés a la vente.**

MATEREL ET METHODES :

La qualité et la pertinence des résultats dépendent intimement de la méthode d'extraction la plus convenable et appropriée choisie. C'est pour quoi, un intérêt particulier est porté sur la méthode, le choix des solvants et le suivi précis du protocole conventionnel des tests d'activité antimicrobienne, à cet effet, nous nous étions fait aider par un groupe d'enseignants de différent spécialités à savoir ; un écologiste, biochimiste, microbiologiste et des laborantins maitrisant l'appareillage utilisé.

I -1-Matériel

I-1-1-Matériels non biologiques :

L'ensemble de matériel non biologique utilise pour réaliser cette étude résumé dans le tableau suivant :

Tableau 2: liste des matériels non biologique utilisés pendant la manipulation

Verreries et petits matériels	Appareils	Réactifs et produits chimiques
Bécher 250 ml	Agitateur magnétique	Hexane
Fiole 100ml	Balance analytique	Méthanol
Entonnoirs	Etuve	Ethanol
Tubes à essai	Rota-vapeur	Acétone
Boîtes de pétri	Spectrophotomètre	KOH
Bec benzène		Milieu gélose nutritive
Micropipettes		NH ₄ OH
Papier wattman		l'alcool éthylique 50 %, NH ₃

I-1-2-Matériel biologique :

La plante de *Retama raetam* objet du projet d'étude a été récupérée au niveau du domaine tellien nord de l'Algérie précisément dans la région de kherrata , l'altitude du site s'élève à 700 , elle est constituée de feuilles et des graines qui ont été récoltées pendant les den moi de février et Mars dans les régions kherrata dans la chaine de babords tel que l'illustre la carte de localisation. Et les souches utilisées sont : E.coli , Staphylococcus aureus, Aspergillus brasiliensis.

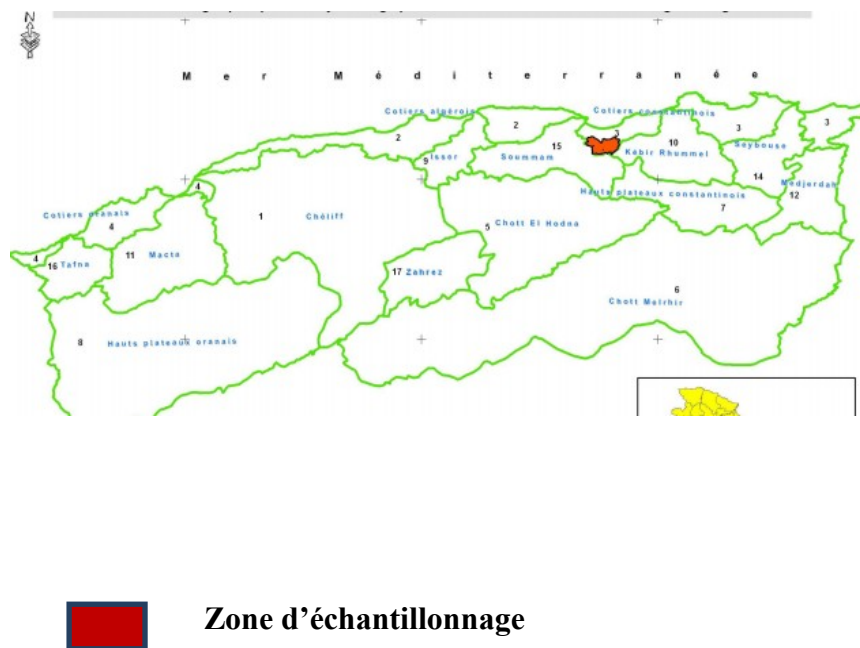


Figure 07: présentation de la zone de récolte sur la carte géographique de Bejaia
(HAMDANIA 2012)

I-1-2-1- Séchage et conservation de la plante :

Les différentes parties de la plante sélectionnées (les feuilles et les graines) sont nettoyées, séchées à l'air libre, à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 20 jours, puis broyées à l'aide d'un électrique et conservées à sec dans des boîtes en verre, à température ambiante à l'abri de la lumière.



Figure 08: les tiges après séchages (**photon originale**)

I-1-2-2-caractéristiques des poudres obtenues :

Les parties d'intérêts ont été broyées afin obtenir une poudre relativement fine ayant une couleur verdâtre foncée pour les feuilles et la poudre des graines est de couleur marron clair (**figure 05**)



Figure 09 : aspect des poudres des feuilles (B) et des graines (A) de *Retama raetam* (**photon originale**).

I-2-Méthodes :

Principe suivi:

le principe globale du procédé expérimental suivi pour la réalisation de l'étude est adopté selon l'organigramme ci-après (Figure 10)

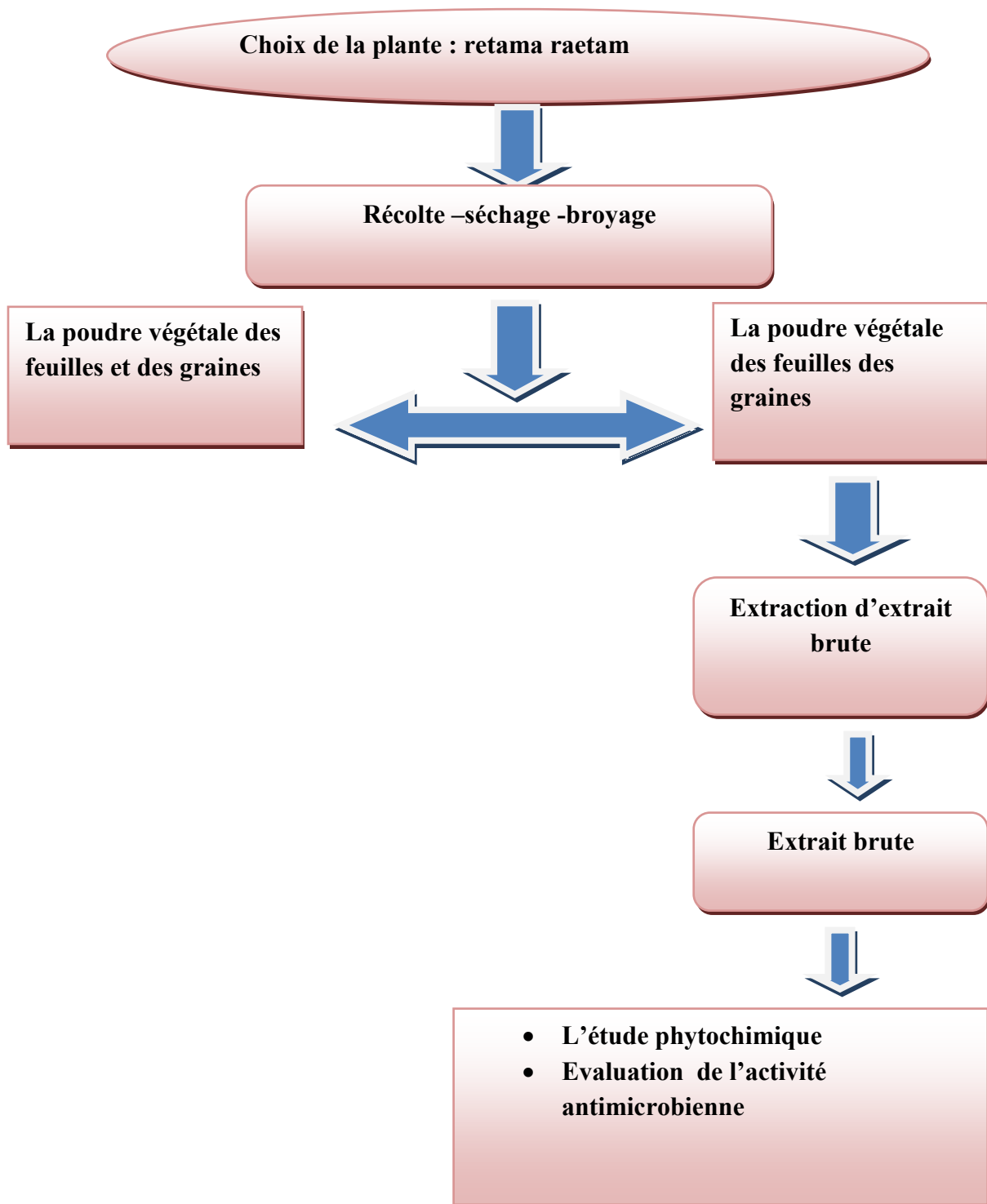


Figure 10: schéma générale des différentes étapes du travail.

I-2-1- screening phytochimiques :

Ce sont des techniques qui permettent de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Elles se basent sur des réactions chimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques, Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais on peut citer les principaux : les alcaloïdes, les poly phénols (flavonoïdes, anthocyanes, tannins), les saponosides, les stéroïdes, les coumarines les stérols, les terpènes...etc.

I-2-1-1-Test Tanins :

Nous avons introduit 10 g de la plante de *Retama raetam* mise en poudre, en extrait par l'alcool éthylique 50 %, puis on filtre, ensuite on ajoute au filtrat quelques gouttes FeCl₃ (1%).

L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleu-vert indique la présence des tanins.

(GILDERNE. I.E., F.R. HOFFMAN, (1912).

I-2-1-2- test des Saponosides :

Les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse. Leur détection est réalisée en mélangeant 2 g de poudre de plante avec 80 ml d'eau distillée, puis porter à l'ébullition pendant 5 min et puis nous faisons la filtration. Le filtrat refroidit et agité vigoureusement pendant 2 min.

La formation d'une mousse plus ou moins importante indique la présence de Saponosides.

Pas de mousse = test négatif

Mousse moins de 1cm = test faiblement positif

Mousse de 1-2cm = test positif

Mousse plus de 2cm = test très positif. **(GILDERNE. I.E., F.R. HOFFMAN, (1912).**

I-2-1-3-Test Flavonoïdes :

Nous avons pris 10 g de plante, et est mise en poudre, puis mélangé avec 100 ml d'une solution l'alcool éthylique 50 %, (1%). Ce mélange est macéré durant 24h, après filtration nous avons ajouté NH₄OH au filtrat jusqu'à la basicité. L'apparition d'une couleur jaune claire ou orange indique la présence des flavonoïdes. **(GILDERNE. I.E., F.R. HOFFMAN, (1912).**

I-2-1-4-test des alcaloïdes :

Réactif de Mayer : Dissoudre 6,8 g de $HgCl_2$ dans l'eau distillée. Dissoudre 25g de KI dans l'eau distillée. Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 1000 ml d'eau distillée.

10 g de la plante, mise en poudre, est pesée puis mélanger à 50 ml d'une solution HCl (1%). Ce mélange est ensuite filtrer puis en y ajoute NH_3 jusqu'à un pH= 8 à 9, on fait ensuite l'extraction par $CHCl_3$. On évapore $CHCl_3$, on ajoute à l'extrait sec 2 ml de HCl (1%), puis on ajoute 3 gouttes de réactif de Mayer. L'apparition de précipité blanc ou une phase trouble indique la présence des alcaloïdes. (GILDERNE. I.E., F.R. HOFFMAN, (1912).

I-2-1-5-Glycosides:

On prend 5 g de plante mise en poudre on y ajoute 50 ml d'une solution de l'acide tartrique 2% dans 1 ml d'éthanol, on agitant pendant 2 heures, après filtration et lavage par l'éthanol, on met le filtrat dans un bain marie.

Dans un tube à essai, on ajoute à 2 ml du filtrat, 2 gouttes de la liqueur de Fehling. On chauffe, la réduction de la liqueur de Fehling montre la présence des glycosides. .

I-2-1-6-Stérols et triterpènes :

5g de plante, mise en poudre, a été mis dans 20 ml de chloroforme. Après filtration la solution obtenue est répartie entre deux tubes à essais (l'un servira de référence). On ajoute d'abord anhydride d'acétate (Ac_2O), ensuite nous avons ajouté 1ml d' H_2SO_4 au fond du tube sans agiter.

La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et d'une coloration violette de la couche surnageante révèlent la présence des stérols et des triterpènes. C'est la réaction de Liebermann-Buchard [81,82]. (GILDERNE. I.E., F.R. HOFFMAN, (1912).

I-3- Les méthodes d'extraction :

Selon la bibliographie consultée, il nous a paru plus intéressant d'adopter une des méthodes jugées plus adéquate et plus efficace pour en extraire les substances présentes dans la plante utilisée, il s'agit de la méthode d'extraction par soxhlet. Ce choix est justifié par le fait que l'appareillage est porté de main, ainsi les réactifs qui sont disponibles au niveau du laboratoire de l'université, d'autre part par le souci du rendement qui est très conséquent en utilisant ce type de méthode et d'appareil.

I-3-1-Extraction de l'extrait brut par soxhlet :

L'extraction de l'extrait brute à partir de la poudre des feuilles et des graines, qui permet de faire l'extraction continue d'un solide par un solvant

- **Mode opératoire :** dans une cartouche nous avons mis 25g de poudre de la plante de *retama raetam* et dans le ballon 200ml de l'éthanol puis nous avons ajusté de la température à 90 °C l'extraction est laissée pour suivre pendant 5 cycles après le refroidissement total dans ballons, l'extrait est récupéré dans une fiole bien fermée et couverte de papier aluminium

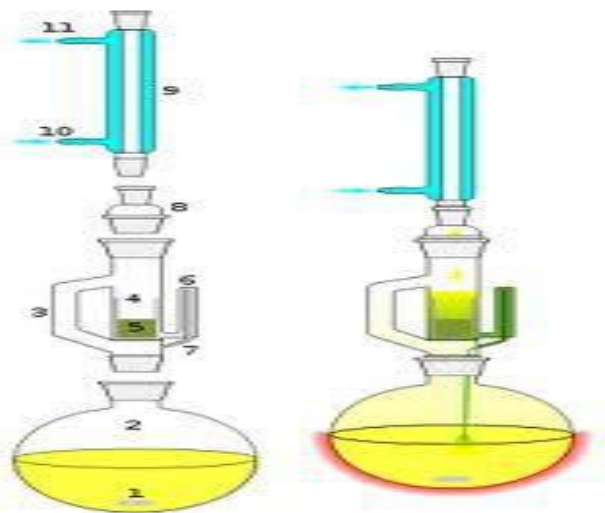


Figure 11: Un extracteur Soxhlet

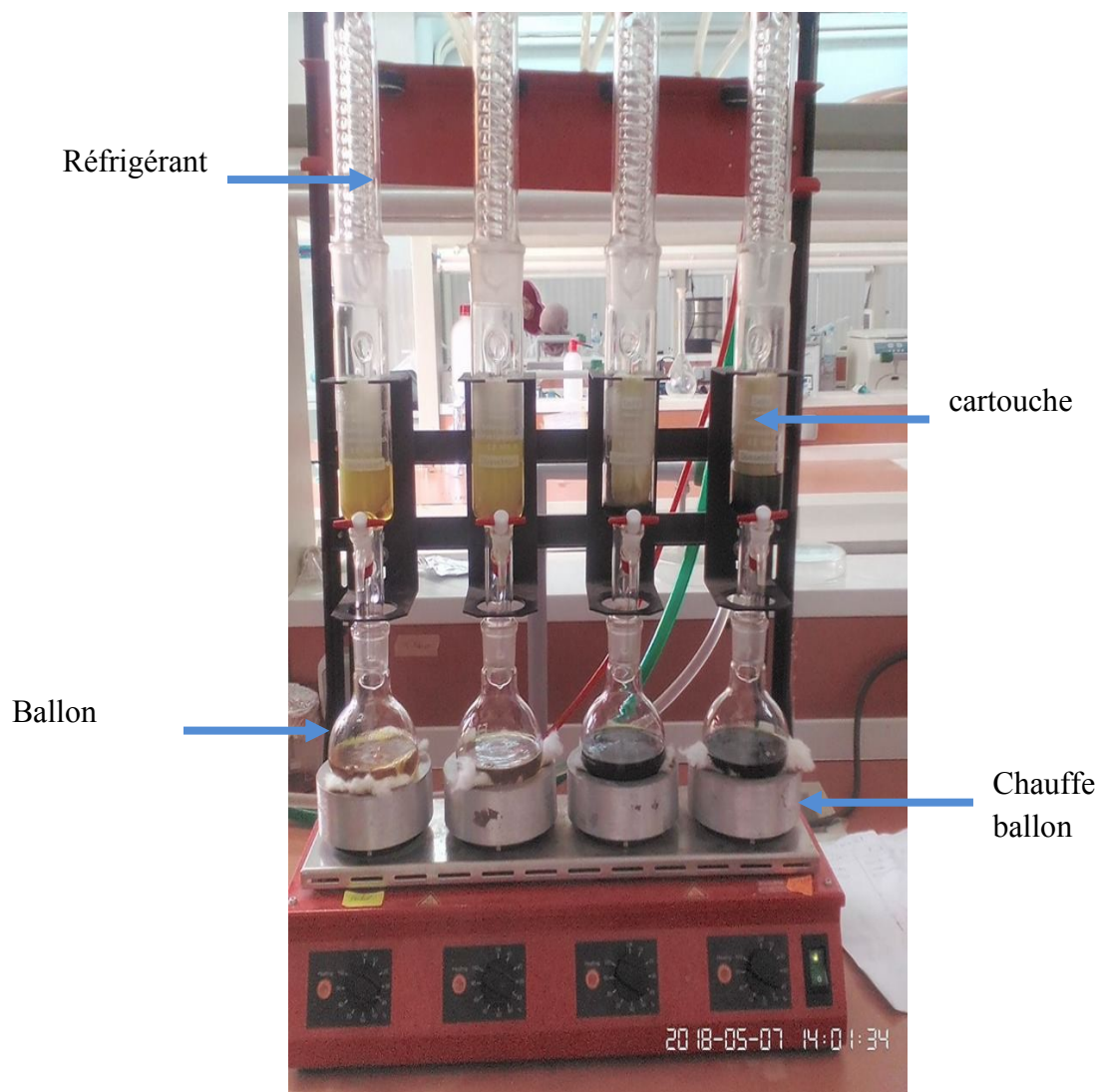


Figure 12: Montage utilisé pour l'extraction de l'extrait brut de *Retama raetam* par soxhlet (photon originale).

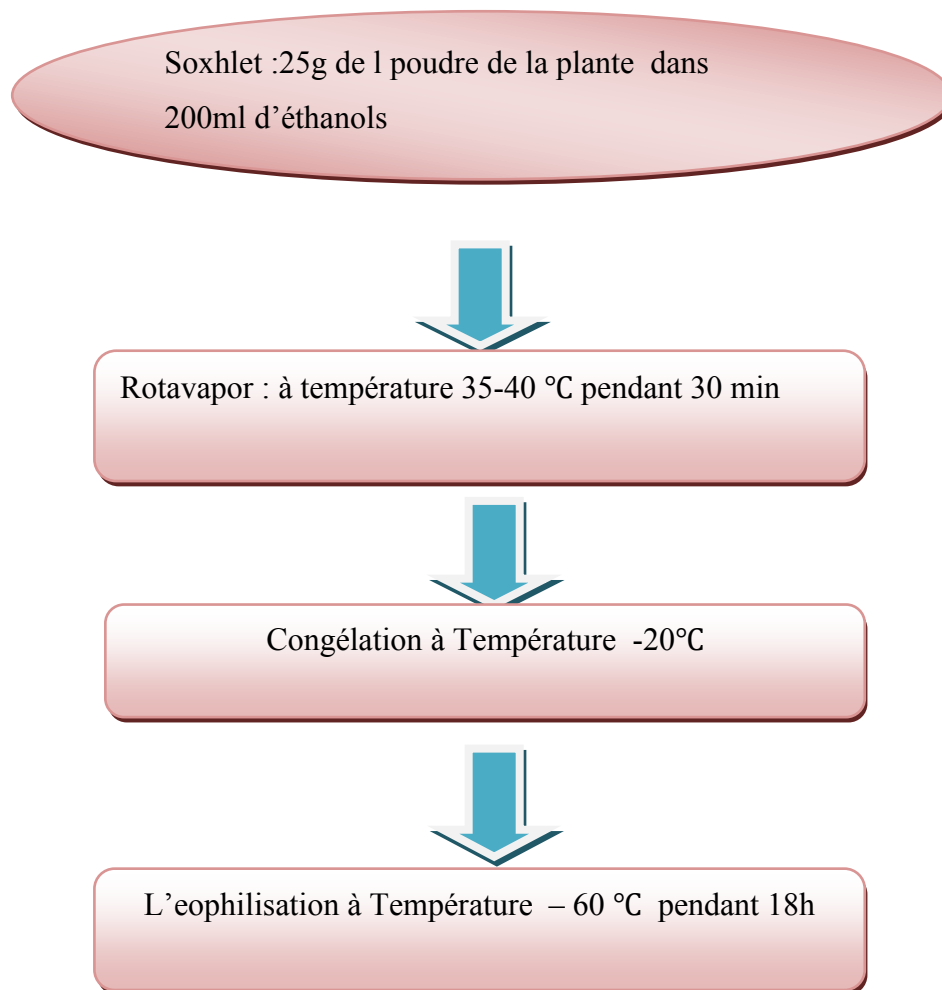


Figure 13: les étapes d'extraction d'extrait brute

I-3-2-l'extraction aqueuse :

Dans un bécher on a mise 25g de la poudre végétale de *retama raetam* avec 200ml d'eau distillée le mélange est agiter pendant 45 minutes a l'aide d'un agitateur magnétique.

La solution obtenue est laisse filtrer 24 heure, le filtrat est récupérer dans un fiole bien fermée est couvert d'un papier aluminium puis parte au réfrigérateurs

(a 4°C).



Figure 14 : Extraction aqueuse

I-4-Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits :

La multi résistance microbienne pose de grands problèmes au niveau de la santé publique. En fait, il ne reste que peu d'agents antimicrobiens effectifs contre certains microbes multi résistants. Les scientifiques sont donc à la recherche de nouveaux produits antimicrobiens. Cette recherche a évalué l'activité antimicrobienne de substances naturelles provenant des plantes (*Retama raetam*) (**Activité antimicrobienne de produits naturels originaires du Nord de l'Ontario, Janique Vandal, Léo G. Leduc,**)

I-4-1-Microorganismes testés

Le nombre des souches bactériennes testées lors de notre étude est 2 souches qui sont fournies par laboratoire de la microbiologie generic lab.

Quelques caractéristiques générales de ces bactéries sont présentées dans le

Tableau 03: caractéristiques générales des bactéries testées.

Nom de la souche	Références	Gram	Famille
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	Négatif	Eterobacteriaceae
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Positif	Micrococcaceae

Tableau 04 : caractéristiques générale de moisissure testée.

Nom de la souche	Références	Famille
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATTC 16404	Moisissures

I-4-2-Tests antibiogramme

C'est une technique très utilisée en bactériologie médicale, appelée également la méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Plus le diamètre de la zone d'inhibition crée autour de la colonie bactérienne est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique ; par contre plus il est petit, plus la bactérie est résistante .

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits brute des grains et des tiges, on a appliqué les étapes suivantes selon.

- **Revivification et repiquage des germes :**

Les différentes espèces bactériennes ont été repiquées sur gélose nutritive en boîtes de pétri (90 mm) par la méthode des stries, puis incubées à 37°C pendant 24h afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation d'inoculum



Figure 15: les souches utilisées E.coli ,S.aureus .Aspergillus

- **Préparation de l'inoculum bactérien :**

Une parcelle de la colonie cible obtenu après revivification a été prélevée à l'aide d'une pipette pasteur puis homogénéisée avec 9ml d'eau physiologique stérile dans un tube à essai. Des dilutions sont effectuées dans même solution, jusqu'à avoir une densité microbienne de 10^8 UFC /ml (DO=0,08 à 0, 1 pour une longueur d'onde $\lambda=625$ nm). Cette concentration a subi ensuite deux dilution décimales afin d'atteindre une concentration finale de 10^6 UFC/ml

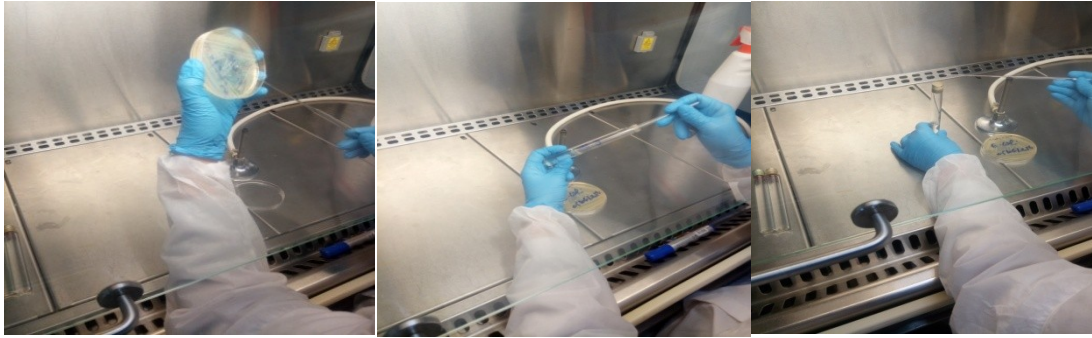


Figure 16: préparation d'inoculum bactérienne.

Préparation des boîtes de pétri : la gélose de Muller Hinton stérile prête à l'usage a été coulée dans des boîtes de pétri stériles .l'épaisseur de la gélose est de 4mm répartie uniformément dans les boîtes .ces dernières doivent être séchées pendant 24h à température de 37°C avant leur utilisation

- **Ensemencement :** les milieux de cultures préalablement préparés, sont ensemencés par étalement à l'aide d'un écouvillon stérile imbibé de la suspension bactérienne déjà préparée. L'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries sur les milieux
- **préparation des disques :** des disques de papier wattman de 6mm de diamètre, stériles (120°C pendant 20 min par autoclavage), ont été chargés de l'extrait naturel à tester. En parallèle, on utilise des disques imprégnés d'éthanol qui vont servir de témoin négatif.
- **Antibiogramme :** sur chaque boîte de pétri ensemencée, on dispose après séchage, les disques contenant la différente concentration des extraits étudiés allant 20ug/disque à 120 ug/disque. Du même un disque témoin imprégné d'éthanol a été déposé dans la même condition.
- **Incubation :** les boîtes ont été mises à 4°C pendant 24h pour assurer la diffusion des extraits testés dans le milieu ensemencé, puis incubées dans l'étuve à 37 °C pendant 24h.

L'activité antimicrobienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque .un extrait est considéré actif lorsqu'on mesure une zone d'inhibition autour de chaque de disque dont le diamètre est supérieur à 7 mm

En parallèle, des boîtes de pétri contenant le milieu Muller Hinton on étéensemencées avec les souches et testées leur sensibilité ou extraits

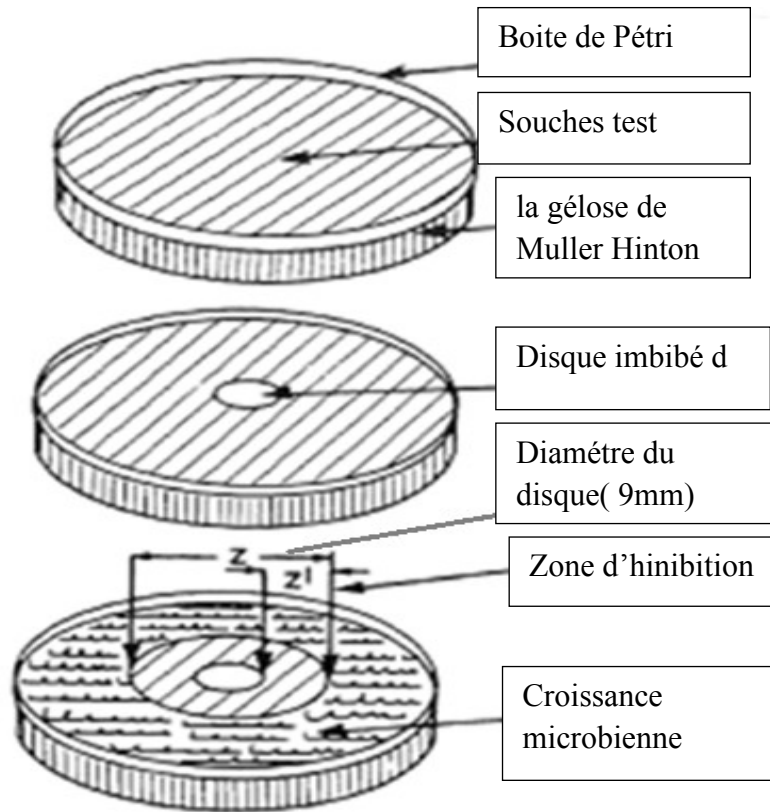


Figure 17: Illustration de la méthode des aromatoigrammes sur boîte de Pétri (ZAIKA,1988) .



Chapitre II :resultats et discussion

Résultats et discussions


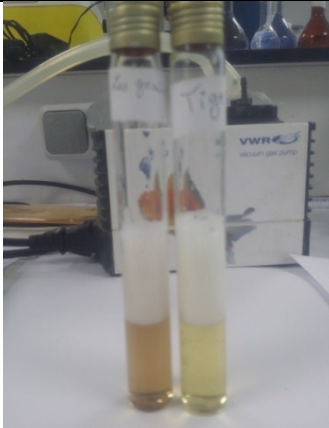
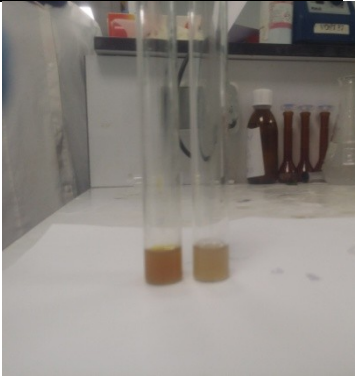

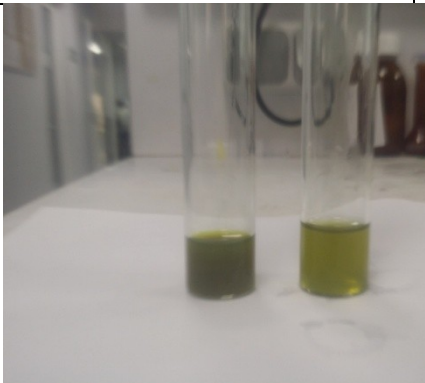
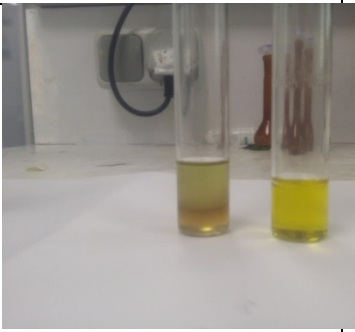
II. Résultats et Discussion

II.1. screening phytochimique

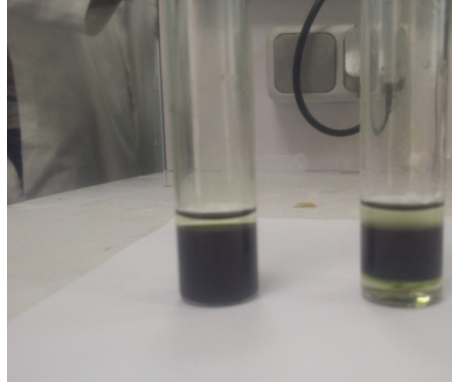
La première partie de notre étude consiste à détecter les différentes familles des composés existants dans les deux parties, tige et graine de la plante *Retama raetam*. les tests appliqués sont basés sur des phénomènes de précipitation et/ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composé. les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 05**

Tableau 05 : Résultat du screening phytochimique de *Retama raetam* des deux parties tige et grain.

++++ Présence très abondant +++ présence abondant ++ Présence modérée

		
Tanins ++	Saponosides ++++	Flavonoïdes +++
		
Alcaloïde ++++	Glucoside +++	Stérols et tritèrpenes (grains)++

Résultats et discussions

		
Stérols et tritèrpenes (tiges)++		

D'après le tableau 05 : nous remarquons que la plante de *Retama raetam* Riche en quantités importantes de substances organiques tel que : Saponosides Flavonoïdes, l'Alcaloïde et Glucoside, aussi riche en quantité plus moins par Tanins et Stérols et tritèrpenes donc il ressort de cette analyse que les feuilles et les graine de la plantes *retama raetam* possèdent presque la même composition en métabolites secondaires.

Dans les feuilles et les graines de cette plante, la recherche des alcaloïdes, des saponosides ,des flavonoïdes et Glucoside a été positive . Mais, il faut signaler que les Tanins et Stérols et tritèrpenes sont présents en faible quantité.

Résultats et discussions

II-2- Evaluation de l'activité antimicrobienne :

Face aux problèmes de la résistance bactérienne aux antibiotique synthétique; beaucoup de travaux ont été menés sur le pouvoir antimicrobien des produits naturels. D'extraits des plantes.

Pour la deuxième partie de notre étude ; nous avons testé l'action des extraits brute de deux partie de la plante les grains et les tiges sur quelque souche bactérienne an parallèle, nous avons testé l'action d'extrait sur le moisissure.

Les résultats obtenus indiquent que les deux souches bactériennes montrent une sensibilité aux extraits éthanolique par contre les extraits aqueux ne présentent aucun effet sur les deux souche bactériennes testés et aussi sur les moisissures.

Les résultats de la sensibilité aux extraits éthanoliques des grains sont présentés dans le tableau

Tableau 06 : détermination des zones d'inhibition obtenue avec les extraits grains et tiges

Souche	La concentration de l'extrait (ug / disque)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
		Grains	Tiges
E.coli	80	/	/
	100	/	/
	120	9 mm	8 mm
Staphylococcus aureus	80	/	/
	100	8 mm	8 mm
	120	8 mm	8 mm
Moisissures (Aspergillus brasiliensis)	80	/	/
	100	/	/
	120	8 mm	9 mm

Résultats et discussions

7 , 8 , 9 : légèrement inhibitrice ; (/) non inhibitrice .

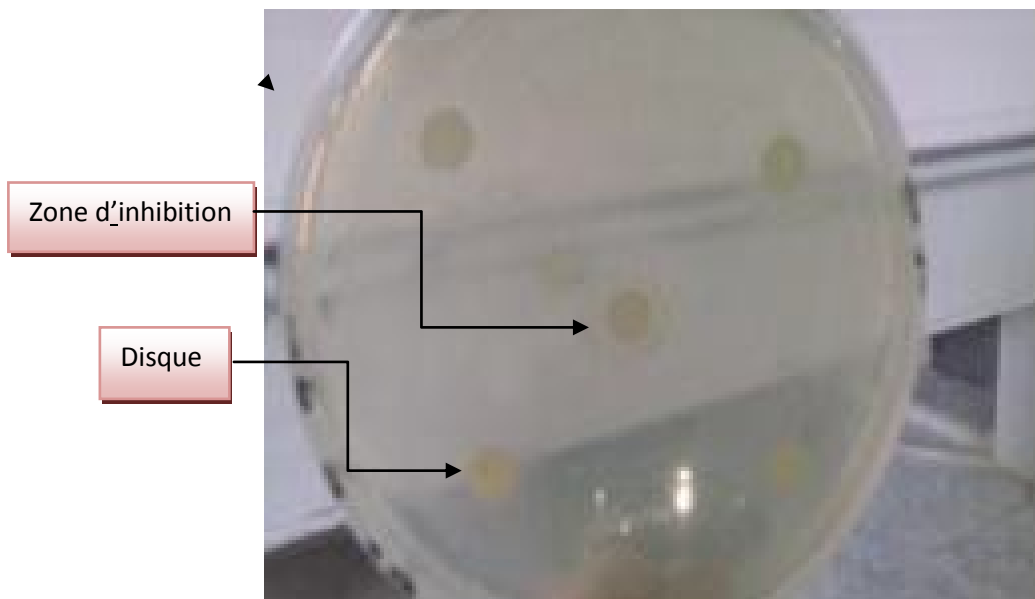


Figure 18: exemple sur la zone d'inhibition obtenue dans le cas des grains sur staphylococcus aureus

Lecture de l'aromatogramme :

L'activité antimicrobienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibitions de la croissance microbienne autour des disques contenant l'extrait à tester. Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibitions et peut être symbolisés par des croix. La souche ayant un diamètre :

- $D < 0.8\text{cm}$: Souches résistante (-)
- $0.9\text{ cm} \leq D \leq 1.4\text{cm}$: Souches sensible (+)
- $1.5\text{cm} \leq D \leq 1.9\text{cm}$: Souches très sensible (++)
- $D \geq 2\text{ mm}$: Souches extrêmes sensible (+++)(Ponce et al 2003)

Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibitions à l'extérieur de la boîte fermée. Le Classement des bactéries se fait dans l'une des catégories : sensible ou résistante (Ponce et al 2003)

Résultats et discussions

Pour nos extraits d'ont les zones d'inhibition variant entre 7 et 9 mm les résultats obtenus indiquent

- Une sensibilité de la souche Gram + *Staphylococcus aureus* aux deux extraits de l'espèce *Retama raetam* à partir d'une concentration de 100 µg/disque
- Egalement ; la souche Gram – *E. coli* présente certaines sensibilités à la concentration la plus élevée (120 µg /disque)
- Une sensibilité de *Aspergillus brasiliensis* aux deux extraits de l'espèce *Retama raetam* à partir d'une concentration de 100 µg/disque

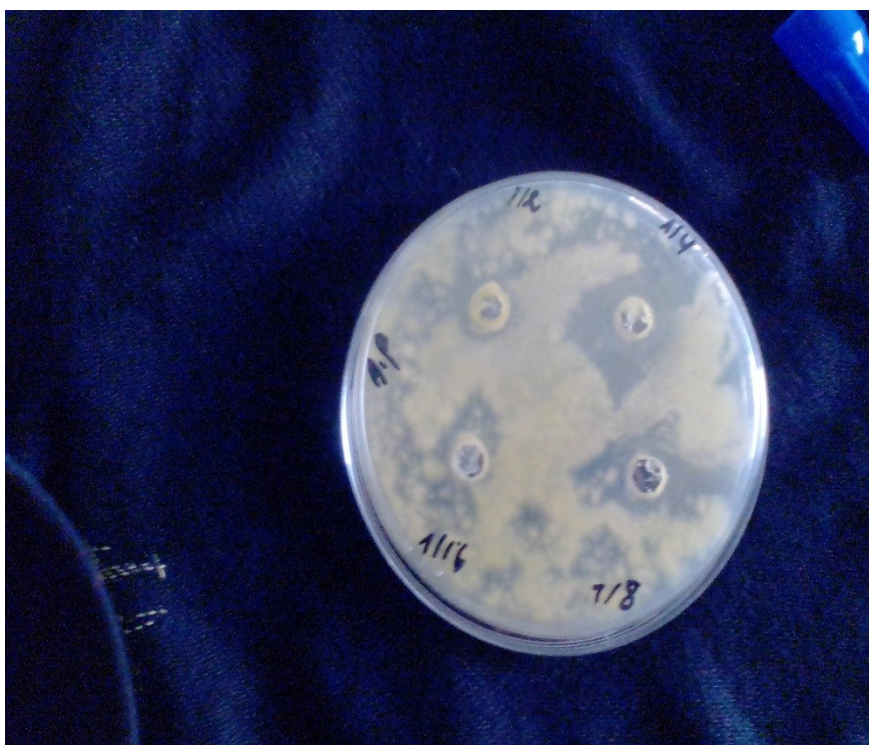


Figure 19: exemple sur la zone d'inhibition obtenue dans le cas des grains et tige sur de la *Aspergillus brasiliensis*

Selon **Maghrani.M et al; 2004**.Effect , l'activité antimicrobienne dépend de plusieurs facteurs à savoir : l'espèce de la plante , la préparation de l'extrait et la sensibilité des bactéries. Une étude a été réalisée par **KHELIF,(2014)** sur l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de l'espèce *Retama raetam* de la région Ouargla montre que des souches Gram+

Résultats et discussions

Et des Gram– présentent une sensibilité aux extraits dont le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 8 et 10 mm.

Une étude réalisée par (THOMAS,2011) suggère la présence des substances à activité antimicrobienne dans les extraits éthanolique.

A partir de ces données, on conclut que l'espèce *Retama raetam* possède une activité antimicrobienne ce qui indique que nos résultats se concordent avec les travaux déjà réalisés.



Conclusion

Conclusion

Au terme de ce travail, nous estimons que des réponses ont été apportées à des questions soulevées plus hauts dans l'introduction où nous avons décrit le contexte dans lequel s'inscrit ce travail et cette étude. Nous estimons aussi que les objectifs fixés de cette étude ont été pleinement atteints à travers les résultats obtenus. A souligner également que des explications données viennent s'ajouter à des résultats émanant des autres travaux réalisés sur le même sujet mais dans un contexte géographique différent, c'est une étude qui vient enrichir l'actif scientifique consacré à l'étude d'une espèce de plantes, qui est *la Retama retam*, et qui recèle des potentialités thérapeutiques éprouvés traditionnellement, mais aussi expérimentalement à travers des tests d'activités antibactérienne et antifongique. En se référant aux résultats obtenus, on confirme clairement que l'espèce de *Retama ratam* est une espèce riche en substances bioactives présentées et décrites dessus et une activité antimicrobienne qui prouve la sensibilité de certains type de bactéries et de moisissures aux extraits de cette plante, cette sensibilité qui peut aller de faible à très sensible comme se voit dans le présent cas étudié par ce travail ou une sensibilité allant de 7 à 9 est enregistrée.

Si les résultats obtenus dans la présente étude consacrée à l'espèce de *Retama retam* vient corroborer ceux publiés par d'autres auteurs, ceci prouve que le processus suivi dans le développement de ce travail a été correctement réalisé selon les conditions conventionnelles. en notre qualité d'étudiants de master ayant des défis qui nous interpellent nous estimons que des précieux avantages ont été tirés à travers ce mémoire notamment la capacité de mener bien et maitriser un travail pareil mais la mise en application des enseignement théoriques acquis le long du cursus universitaire. Nous estimons que cette expérience menée et vécue dans le présent travail nous servira de manière conséquente dans notre futur parcours professionnel et éventuellement scientifique.

En perspectives, il serait intéressant :

- Etudier les molécules présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'homme
- D'élargir les prospections dans d'autres plantes médicinales de la même région et estimer leur incidence économique



Références bibliographique

Références bibliographiques

ALLAL-BENFAKIH.L ;2006 : .Recherche quantitatives sur le criquet migrateur *Locusta migratoria* (Orth.Oedipodinae) dans le Sahara algérien. Perspectives de lutte biologique à l'aide de microorganismes pathogènes et de peptides synthétiques .thèse de doctorat N°17-2006.UNIV de limoge. Laboratoire UMR INRA 1061 ;Institut National Agronomique d'El Harrach.p27.

BAHLK ,1991. Contribution à l'étude de *Rétama monosperma* étude du système racinaire et recherche des associations de type *Rhizobium*.in In Bouredje.n, 2005, étude anatomique et biochimique des protéines et des acides aminés foliaires de *Rétama monosperma*(boiss) : mémoire de magistère . UNIV.des sciences et de la technologie d'Oran MOHAMED BOUDIAF (U.S.T.O) Oran.

BRUNETON. J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation. 3ème Ed Lavoisier, Paris.)

BOREE 2012, REALISATION : Intexte édition, traduction de l'espagnol : Nicolas Blot jean –Bernard Gouillier ISBN :978-8129-0590-2)

BOUNATIROU. S., S. SMITI, 2007. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff et link, Food Chemistry.

DI-PIETRO. M., 2004. Régulation des aquaporines et réponse des racines d'*arabidopsis thaliana* a des stimuli abiotiques et nutritionnels.

DJABEUR-KAID-HARCHE.A., H. TAIEB-BRABIM-BOKHARI et ALL, 2007. Contribution à la connaissance de deux rétames: *Retama monosperma* et *R. reatam*

EI HAMROUNIA, 2001 Conservation des zones humides littorales et des écosystèmes côtiers du Cap-bon. Rapport de diagnostic des sites .partie relative à la flore et la végétation 45 .République Tunisienne .Ministère de l'environnement et de l'aménagement du territoire .agence de protection et d'aménagement du littoral.p6 /38p

Références bibliographiques

FARNSWORH N. R., AKERELE O., BINGEL A. S., SOEJARTO D. D., GUO Z., 1986- Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé*, 64 (2): 159-164.

GANOU L. 1993. Thèse de doctorat n° 689, Institut National Polytechnique de Toulouse.

GARRY FERRONI, MAMDOUHABOU-ZAID Activité antimicrobienne de produits naturels originaires du Nord de l'Ontario, Janique Vandal, Léo G. Leduc, *Département de Biologie Université Laurentienne.*

GILDERNE. I.E., F.R. HOFFMAN, 1912 Les huiles essentielles, Tome I édition schemmal .

HATIMI . A , 1995 Root symbiotes of three arborescent legume crops in the littoral dunes of Souss-Massa. In '[INRA Colloquia; Limiting factors in symbiotic nitrogen fixation in the Mediterranean basin]' pp. 183-90. (INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) .

J. BRUNETON, PHARMACOGNOSIE , PYTOCHIMIE PLANTES MEDICINALES , 3^E EDITION REVUE , Paris, 1999 ,MITTLER.R et ALL .,(2000). Living under a dormant canopy : a molecular acclimation mechanism of the desert plant *Retama rætame*.the plant journal.Blackwell ScienceLtd.

JINCHAO et XUEGUANG, 2005 ; YA-QIN et al.,2008; CHUNG et al., 2010 ; ARCEUSZ et al., 2013 KAUR. S.J., I.S. GROVER et All, (2000). *Modulatory effects of tannin fraction isolated from Terminalia arjuna on the genotoxicity of mutagens in Salmonella typhimurium.* Food and Chemical Toxicology.

LAWRENCET BRIAN M. 2000. Essential oils: from agriculture to chemistry. The international Journal of Aromatherapy., 10: 82-98.

Tourbe, C. 1996. Le secret du bleu Maya. Science et avenir : 90

MAGHRANIM et al; 2004.Effect of *Retama raetam* on lipid metabolism in normal and recent-onset diabetic rats.journal of Ethnopharmacologie, Volume 90, Issue 2-3, February 2004, pages 323-329.

Références bibliographiques

MARTINI MC., SEILER M. 1999. Actifs et additifs en cosmétologie. Procédés d'extraction des huiles essentielles. Editions Tec & Doc, Editions

MASTELIC J. 2001. The essential oil co-distillation by superheated vapour of organic solvents from aromatic plants. Flavour and Fragrance Journal. 16: 370-373.

MITTELER.R, et al ;2000. Living under a dormant canopy : a molecular acclimation mechanism of the desert plant *Retama rætama* the plant journal.Blackwell ScienceLtd. (2001) 25(4), 407-416.

PAOLINI. V., PH. DORCHIES, 2003. Effet des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro intestinales chezle mouton et la chèvre. Alter. Agri.

QUEZELE ET SANTA ; 1962.Nouvelle flore de l'Algérie. Tome I.p156-162

ROBINET. F-G., 1951. Saponosides stéroïdes et triterpéniques de synthèse. Thèse présentée pour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences Techniques, Ecole Polytechnique Fédérale, Zurich, Suisse.

SAADAOUILB et al ; 2007. Etude de la composition et du pouvoir antioxydant des composés phénoliques de quelques espèces végétales de l'aride tunisien. Revue des régions arides. ISSN 0330-7956.2007(1), pp.316-321[6 page(s) (article)]. ed. : Institu t des régions arides, Médenine, Tunisie.

SANAGO R., 2006. Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako (Mali): 53.

SELMIN ;2000. Contribution à l'étude de rétama monosperma étude du système racinaire et recherche des association de type Rhizobium. Mémoire d'ingénieur en biotechnologie. USTO.ORAN .38P

Références bibliographiques

STEINMETZ. M.D., R. ELIAS, 1993. Recherche d'une activité antitumorale de saponosides triterpéniques. 2ème colloque Européen d'ethnopharmacologie et 11ème conférence internationale d'ethnomédecine

- **THOMAS, 1968 THOMAS, J.P., 1969.**-Ecologie et dynamique de la végétation de la dune littorale dans la région de Djidjelli. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr.nord*, 59: 37-98.

.-**YA-QIN, et al.,2008; CHUNG et al., 2010; MICHEL, 2011.** Peyron L., Richard Hubert., 1992. L'extraction des épices et herbes aromatiques et les différents types d'extraits. Epices et aromates. Tec et Doc – Lavoisier, APRIA., Paris.

ZOHARY ,1962. plant life of Palestine, Israel, and Jordan, Michael Zohary. Ronald,New York
OZENDA PAUL, (1991). Flore et végétation du Sahara. 3ème édition Paris : CNRS EDITION.

Résumé

Résumé

Le but de cette étude est de contribuer à la valorisation et l'exploitation de la flore médicinale de la région de kherreta est utilisée comme médicament.

La première partie de notre étude consiste à détecter les différentes familles des composés existants dans les deux parties, tige et graine de la plante *Retama raetam*. Les tests screening phytochimique appliqués sont basés sur des phénomènes de précipitation et/ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composé

L'étude biologique a montré que les extraits possèdent des effets antimicrobiens avec des différences concentration. Pour nos extraits d'ont les zones d'inhibition variant entre 7et 9mm

Mots clés : *Staphylococcus aureus* , *E. coli*, *Aspergillus brasiliensis*, zones d'inhibition antimicrobiens, tests screening phytochimique.

Abstrat

The purpose of this study is to contribute to the development and exploitation of the medicinal flora of the kherreta region.

The first part of our study consists in detecting the different families of the existing compounds in the two parts, stem and seed of the *Retama raetam* plant. The applied phytochemical screening tests are based on precipitation and / or staining phenomena using specific reagents. to each compound family

The biological study showed that the extracts have antimicrobial effects with differences in concentration. For our extracts have the inhibition zones varying between 7 and 9mm.

Key words: *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Aspergillus brasiliensis*, zones of antimicrobial inhibition, phytochemical screening tests

ملخص

الغرض من هذه الدراسة هو المساهمة في تطوير واستغلال النباتات الطبية في منطقة خراطة. يتكون الجزء الأول من دراستنا في الكشف عن العائلات المختلفة للمركبات الموجودة في الجزأين ، ساق و بذور نبات ريتامام ريتام ، تعتمد اختبارات الفرز الكيميائي التطبيقي على الترسيب و / أو الظواهر باستخدام كواشف معينة. لكل عائلة مركبة .

وأظهرت الدراسة البيولوجية أن المستخلصات لها تأثيرات مضادة للميكروبات مع وجود اختلافات في التركيز لمستخلصاتنا لدينا مناطق تثبيط تتراوح بين 7 و 9مم.

الكلمات المفتاحية

، مناطق تثبيط مضادات الميكروبات ، *Staphylococcus aureus* ، *E. coli* ، *Aspergillus brasiliensis* : بكتيريا اختبارات التحري الكيميائي.