

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun de Tiaret

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

THÈSE

Présentée Par

Mme : SEHARI Mira

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

DOCTORAT (LMD)

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences agronomiques

Spécialité: Valorisation de la flore dans la phyto-protection,

THEME :

"Extraction et utilisation des propriétés antimicrobiennes et anti oxydantes d'extraits aqueux et d'huile essentielle de plusieurs plantes aromatiques"

Soutenu le : 28 / 12 / 2020

Membres de jury :

Pr BOUCHENAF	Nadia	Présidente	Université Ibn khaldoun Tiaret
Pr BELKHODJA	Moulay	Examineur	Université Oran I HBB Oran
Pr AGGAD	Hebib	Examineur	Université Ibn khaldoun Tiaret
Dr AYACHE	Abbassia	Examinatrice	Université Dj.liabes Sidi Belabbes
Dr LABDELLI	Fatiha	Examinatrice	Université Ibn khaldoun Tiaret
Pr HASSANI	Abdelkrim	Directeur de Thèse	Université Ibn khaldoun Tiaret

Année universitaire : 2019 – 2020

Remerciements

Je remercie, tout d'abord, **le tout puissant** الله qui m'a donné la force, le courage et la volonté pour achever ce travail qui s'inscrit comme une modeste contribution dans le monde scientifique.

Ensuite, il est de mon devoir et surtout il m'est agréable d'exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette Thèse. En effet, ma contribution scientifique est le fruit de la participation et le soutien de nombreuses personnes.

Mes plus vifs remerciements s'adressent d'abord à mon directeur de thèse, **Mr HASSANI Abdelkrim**, Enseignant-chercheur -Professeur à la faculté SNV, Université Ibn Khaldoun de Tiaret, qui m'a accordé l'honneur de diriger cette étude, pour sa gentillesse, ses conseils, ses qualités humaines et qui a su être patient et a pu supporter ma lourdeur et mes impatiences: qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon profond respect.

De même que mes remerciements s'adressent aussi aux membres du jury:

Tout d'abord, Mme la présidente, **Mme Bouchenafa Nadia**, Enseignante-chercheuse -Professeure à la faculté SNV, Université Ibn Khaldoun de Tiaret; que je remercie d'avoir accepté de présider le jury.

Ensuite, **Pr Belkhodja moulay**, de l'université Ahmed Ben Bella, Oran 1, que je remercie aussi d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

De même que le **Pr Aggad hebib** de l'institut vétérinaire, Université de Tiaret;

Puis, **Mme Ayache Abbassia**, Enseignante-chercheuse - Maitre de Conférences à l'Université Djilali Liabes, Sidi Bellabbes;

Enfin, **Mme Labdelli Fatiha**, Enseignante-chercheuse - Maitre de Conférences à la faculté SNV, Université Ibn Khaldoun de Tiaret;

Je vous remercie vivement pour votre disponibilité, votre gentillesse et d'avoir accepté de juger ce travail. Je suis très honorée d'avoir pu bénéficier de vos

remarques constructives et je tiens vivement à vous assurer de mon respect, de ma reconnaissance ainsi que de mon estime et de ma profonde gratitude.

Je n'oublie pas de remercier tout particulièrement et vivement le **Pr Aggad hebib** et son assistant **Mr Abdalli mustapha** de m'avoir accueilli dans leur laboratoire "**d'Hygiene et pathologie animale**" et de m'avoir permis de travailler librement sans aucune contrainte; Merci encore une fois de m'avoir facilité le travail.

Ma gratitude est aussi exprimée à mon amie **Boumethred turkia**, Enseignante-chercheuse -Professeure à la faculté "centrale" Dpt de Chimie ainsi que **Mme Mokhfi Fatima zohra**, Enseignante-chercheuse à la faculté SNV, Université Ibn Khaldoun de Tiaret; qui ont veillé au bon déroulement de mon travail, pour leur importante contribution dans cette étude à travers les connaissances qu'elle m'ont transmises, et leur aide infallible dans l'acquisition du Matériel expérimental et la documentation nécessaire, merci pour leur patience et leur générosité.

Ma gratitude et mes remerciements envers **Mr Bensaïd**, physicien enseignant-chercheur à la faculté SNV de Tiaret, pour son interprétation concernant les graphes de la Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier de type FTIR; de même pour **Mr Yazli wassim** microbiologiste enseignant-chercheur à la faculté SNV de Tiaret, pour m'avoir procuré des souches fongiques du **labo de phytopathologie de l'université ABB Oran 1** que je remercie au passage; Il en est de même pour **Mme Tahir fatiha**, Doctorante et Chef de service au Centre de recherche ITGC de Tiaret

Je tiens à exprimer mes chaleureux remerciements à **Mr Kaddari bouderballa** et à **Mr. Khane** responsables des laboratoires d'expérimentations, pour leur disponibilité, leur amabilité, leurs conseils et encouragements, qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et de ma reconnaissance.

Mes vifs remerciements vont également à tous les ingénieurs et techniciens des laboratoires et en particulier **Mrs. Benhalima et Bachir, Melle Bensatal karima, Saliha, Mabrouka, et Melle Kheira** du labo de Microbiologie pour leur disponibilité, leur amabilité, leur aide Ô combien précieuse lors de mes séances d'extractions et d'analyses.

Un grand merci à **Mr Ait hamou Mohamed**, Enseignant-chercheur à la faculté SNV, Université Ibn Khaldoun de Tiaret, spécialiste en Botanique de m'avoir orienté pour la détermination du matériel végétal et pour sa bonne humeur permanente;

Qu'il me soit permis d'exprimer ma profonde gratitude à Tous mes enseignants du Master d'Agro-biotechnologie en M1 et M2, à la faculté SNV, Université Ibn Khaldoun de Tiaret, en particulier **Mr Benbegarra M, Mr Kouadria M, Mme Labdelli F, Mme Bouchenafa N , Mr Kaddar ainsi que Mr Zebbar A** (Directeur du centre de recherche agronomique INRAA de Tiaret) pour m'avoir formé, m'avoir guidée, conseillée et orientée avec beaucoup de pertinence, chaque fois que cela était nécessaire: qu'ils trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements.

Je tiens également à remercier tous ceux et celles que je n'ai pas nommés qui ont contribué à la réalisation de ce travail de près ou de loin et qui m'ont soutenue dans les moments difficiles.

Résumé

En Agriculture, la lutte contre les ravageurs et bioagresseurs (fongiques et bactériens, en particulier) repose principalement sur l'utilisation de pesticides chimiques qui, malheureusement, perdent de leur efficacité face à des parasites qui développent de plus de plus de résistance à leur rencontre suite à leur application répétée. Par conséquent, comme alternative pour remplacer ces pesticides chimiques dans la protection des cultures, beaucoup de chercheurs se penchent sur l'utilisation de métabolites secondaires de certaines plantes spontanées comme bioprotectants.

A cet effet, les différents travaux, réalisés au cours de cette thèse, ont permis de déterminer la composition chimique et de mettre en exergue les propriétés antibactériennes, antifongiques et antioxydantes d'extraits végétaux de trois espèces végétales (*Thymus vulgaris*, *Urtica dioïca* et *Punica granatum*) à l'égard de microorganismes bactériens (*Staphylococcus Aureus*- *Pseudomonas aeroginosae*- *Echerchia coli*) et fongiques (*Fusarium oxysporum*-*Fusarium lycopersici* et *Aspergillus niger*).

Ainsi, le rendement moyen obtenu pour l'huile essentielle du Thym est de 1,14% du poids frais, pour les extraits d'Ortie, on a eu **12,52%**, **15,57%** et **17,01%** respectivement pour les extraits Aqueux, Ethanolique et Méthanolique et pour l'Ecorce de Grenade, les rendements obtenus sont **14,73%**, **15,19%** et **17,34%** pour les mêmes extraits. D'autre part, les résultats de l'activité antibactérienne de nos extraits végétaux, révèlent qu'*Escherichia coli* est plus sensible que *Staphylococcus aureus*. Par contre, *Staphylococcus aureus* (Gram+) est le plus résistant suivit par *Escherichia coli* (Gram-) et enfin par *Pseudomonas aeroginosa* (Gram-) face aux antibiotiques de synthèse.

Pour l'huile essentielle du Thym, les résultats révèlent qu'*Escherichia coli* est très sensible par rapport à *Pseudomonas aeruginosa* car les diamètres varient de **27,51 à 47,69mm** pour ce dernier et de **30,27 à 61,80mm** pour *Escherichia coli*. D'autre part, cette huile s'est avéré fongicide par contact direct, avec **100% d'inhibition** cela pour les trois souches de champignons utilisés à la dose de 30µl. De même que cette huile a montré de bons effets antifongiques et bactéricides proportionnels à la concentration appliquée.

Par ailleurs, l'étude de l'activité antioxydante des extraits végétaux testés (méthode du DPPH) a montré que les extraits éthanoliques, méthanoliques et aqueux possèdent une activité antioxydante modérée mais satisfaisante qui pourraient remplacer certains additifs alimentaires synthétiques pour être bénéfique pour la santé humaine.

Mots-clés: huile essentielle, extraits végétaux, plante PAM, Bio agresseurs, bio pesticides

Abstract

In agriculture, the control of pests and bioaggressors (fungal and bacterial, in particular) is mainly based on the use of chemical pesticides which, unfortunately, lose their effectiveness in the face of parasites that develop more resistance to them as a result of their repeated application. Therefore, as an alternative to replacing these chemical pesticides in crop protection, many researchers are looking at the use of secondary metabolites of some spontaneous plants as bioprotectors.

To this end, the various studies carried out in this thesis have identified the chemical composition and highlighted the antibacterial, antifungal and anti-oxidant properties of the plant extracts of the three plant species (*Thymus vulgaris*, *Urtica dioica* and *Punica granatum*) in respect of bacterial microorganisms (*Staphylococcus Aureus*- *Pseudomonas aeruginosa*- *Escherichia coli*) and fungal (*Fusarium oxysporum* - *Fusarium lycopersici* and *Aspergillus niger*).

Thus, the average yield obtained for *Thymus* essential oil is 1.14% of the fresh weight, for Nettle extracts it was 12.52%, 15.57% and 17.01% respectively for water extracts, Ethanoic and Methanoic, and for the skin of Granada, the yields are 14.73%, 15.19% and 14.73% 17.34%. On the other hand, the antibacterial activity of our plant extracts estimated in terms of the diameter of the inhibition zone against tested microbial strains reveals that *Escherichia coli* is more sensitive than *Staphylococcus aureus*. On the other hand, *E. coli* and *Staphylococcus aureus* that are Gram+ are more resistant to synthetic antibiotics than *Pseudomonas aeruginosa*.

The antimicrobial effect of extracts may be due to their terpenic alcohols, which are particularly active against microbial cells because they are soluble in aqueous media and cause extensive damage to the cell walls of microorganisms for *Thymus* Essential Oil, the inhibition diameters show that *Escherichia coli* is very sensitive to *Pseudomonas aeruginosa*, ranging from 27.51 to 47.69mm for *Pseudomonas aeruginosa* and from 30.27 to 61.80mm for *Escherichia coli*.

On the other hand, the essential oil of *Thym* was fungicide by direct contact, with 100% inhibition this for the three strains of fungi used at the concentration of 30µl. Just as this oil showed good antifungal and bactericidal effects proportional to the concentration applied. Furthermore, the study of the antioxidant activity of the tested plant extracts (**DPPH** method) has shown that the ethanolic, methanolic and aqueous extracts have a moderate but satisfying antioxidant activity beneficial to human health and may contain certain synthetic food additives

Keywords: *essential oil, vegetable extracts, PAM plant, bioaggressors, organic pesticides*

ملخص

في مجال الزراعة، تقوم السيطرة على الآفات والمعتدين البيولوجيين (الفطريات والبكتيريا بوجه خاص) أساسا على استخدام مبيدات الآفات الكيميائية التي تفقد للأسف فعاليتها في مواجهة الطفيليات التي تزداد مقاومة لها نتيجة لتطبيقها المتكرر. لذلك، كبديل للاستعاضة عن هذه المبيدات الكيميائية في حماية المحاصيل، ينظر العديد من الباحثين إلى استخدام الأيض الثانوي لبعض النباتات العفوية كمحمية حيوية

تحقيقا لهذه الغاية، فإن الأعمال المختلفة التي أجريت خلال هذه الأطروحة جعلت من الممكن تحديد التركيب الكيميائي وتسليط الضوء على الخصائص المضادة للبكتيريا والفطريات ومضادات الأكسدة للمستخلصات النباتية من الأنواع النباتية الثلاثة (*Thymus vulgaris* و *Urtica dioica* و *granatum Punica*) ضد الكائنات الحية الدقيقة (المكورات العنقودية الذهبية - الزائفة الزنجارية - *Echerchia coli*) والفطريات (*Fusarium oxysporum* - *Fusarium lycopersici*- *Aspergillus niger*).

وبالتالي، فإن متوسط العائد الذي تم الحصول عليه من زيت الأساسي للزعر هو 1.14% من الوزن الطازج، بالنسبة لمستخلصات نبات الحريق، كان هناك 12.52% و 15.57% و 17.01% على التوالي للمستخلصات المائية والإيثانولية. و ميثانولية و لقشورالرمان، العائد المتحصل عليه هو 14.73% و 15.19% و 17.34%. لنفس المقطعات

من ناحية أخرى، فإن النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصاتنا النباتية المقدر من حيث قطر منطقة التثبيط مقابل السلالات الميكروبية المختبرة، تكشف أن الإشريكية القولونية أكثر حساسية من المكورات العنقودية الذهبية. من ناحية أخرى، فإن *Staphylococcus aureus* و *Gram + E. coli* أكثر مقاومة من *Pseudomonas aeruginosa* ضد المضادات الحيوية الاصطناعية. قد يكون التأثير المضاد للميكروبات للمستخلصات بسبب الكحولات التيربينية التي تنشط بشكل خاص ضد الخلايا الميكروبية لأنها قابلة للذوبان في الأوساط المائية وتتسبب في أضرار جسيمة في جدران الخلايا من الكائنات الحية الدقيقة.

بالنسبة لمعالي الزعتر، تكشف أقطار التثبيط عن أن الإشريكية القولونية حساسة جدًا مقارنةً بالزائفة الزنجارية لأن الأقطار تختلف من 27.51 إلى 47.69 ملم للخط الزائفة الزنجارية ومن 30.27 إلى 61.80 ملم للإشريكية القولونية. من ناحية أخرى، وجد أن زيت الزعتر العطري مبيد للفطريات عن طريق الاتصال المباشر، مع تثبيط 100% ذلك للسلالات الثلاثة من الفطر المستخدم بتركيز 30 ميكرو لتر. مثلما أظهر هذا الزيت تأثيرات جيدة مضادة للفطريات والجراثيم تتناسب مع التركيز المطبق.

علاوة على ذلك، أظهرت دراسة النشاط المضاد للأكسدة في المستخلصات النباتية التي تم اختبارها (طريقة DPPH) أن المستخلصات الإيثانولية والميثانولية والمائية لها نشاط مضاد للأكسدة معتدل ولكنه مرض مفيد لصحة الإنسان وقادر على تعويض بعض الإضافات الغذائية الاصطناعية.

الكلمات المفتاحية: الزيت الأساسي، المستخلصات النباتية، نبات عطري وطبي، الطفيليات، المبيدات الحيوية

LISTE DES ABREVIATIONS

ABA:	Acide abscissique
AMX:	Amoxicilline
APG:	Angiosperm Phlogeny Group
ATCC:	American Type Culture Collection
C.C.L.S:	Coopérative des céréales des légumes secs
CZ:	Cefazolin
D.O. :	Densité optique
D.S.A:	Direction des services agricoles.
DL50 :	dose létale 50
EA :	extrait aqueux
Ery:	Erythromycin
FAO:	Food and agriculture organization.
Gen:	Gentamycine
GN :	gélose nutritive
H₂O₂ :	peroxyde d'hydrogène
H₂S :	sulfure d'hydrogène
HE :	huile essentielle
HPLC :	High performance liquid chromatography
I (%) :	Inhibition (pourcentage)
IR :	infrarouge
CH₃OH :	méthanol
mg Eq/g :	milligramme d'équivalent par gramme
O₃:	Ozone
OH⁺:	Radical hydroxyle
RA:	Rifampicine
TDA :	tryptophane désaminase

LISTE DES FIGURES

Figure 01: Schéma de l'environnement biotique des plantes)	05
Figure 02 : Rôles des essences contenues dans les végétaux (Franchomme, 2015)	11
Figure 03: tissus végétaux spécialisés dans le stockage des huiles essentielles.....	11
Figure 04: Mode d'action des antioxydants primaires (Dacosta, 2003).	18
Figure 05: les systèmes de défense contre les radicaux libres (Kohen et Nyska, 2002)	21
Figure 06: Mécanisme de réduction du radical libre DPPH par un antioxydant	21
Figure 07 : Le dispositif expérimental de la technique d'hydrodistillation	22
Figure 08 : Procédé de l'entraînement à la vapeur d'eau	25
Figure 09 : Schéma du dispositif expérimental pour enfleurage a froid (Plaques de verre enduites de graisse)	26
Figure 10: Schéma simplifié de différents modules du chromatographe en phase gazeuse (le couplage CPG-SM) (Marouf et Tremblin, 2015).	31
Figure 11: Organigramme des étapes suivies durant le protocole expérimental	32
Figure 12: Photo de la plante (a), feuilles (b) et de Tiges(c) du Thym (<i>Thymus vulgaris</i>)	33
Figure 13: Photo du fruit et de la fleur (a), de la plante (b) et de l'écorce de la grenade (c)	35
Figure 14: Maladies traitées par <i>Punica granatum</i> (Seeram <i>et al</i> , 2006)	35
Figure 15 : Photo de la coupe transversale du fruit du grenadier variété Sefri (a), variété Kabylie (b) et variété Wonderful (c) (Hmid, 2013).	36
Figure 16: L'ortie dioïque : photographie (a), dessin (b) - floraison de fin printemps à l'automne: fleurs femelles verdâtres pendantes, fleurs mâles jaunâtres en épi	36
Figure 17: Zone géographique de récolte du matériel végétal: le Thym (a) [Tidda - Daïra de Oued Lili, W. de Tiaret], l'Ortie (b) [commune de Bouchékif, station d'épuration, W. de Tiaret], le Grenadier (c) [lieu dit "Willis" Abdelmalek ramdane (36°07'08.2"N et 0°16'11.3"E; Alt.103m, W. de Mostaganem]	38

Figure 18: dispositifs expérimentaux de l'hydrodistillation (extraction de l'HE)	39
Figure 19 : Organigramme des étapes d'étude des propriétés de l'huile essentielle du Thym des extraits végétaux de l'Ortie et de l'écorce de la Grenade	40
Figure 20: Etapes de préparation de l'extrait aqueux: plante séchée (a), poudre végétale b), mélange poudre végétale + eau distillée (c) agitation magnétique du mélange (d)	41
Figure 21: Protocole de préparation d'extrait méthanolique par macération.....	42
Figure 22 : Photographies de l'évaporateur rotatif (type Büchi Rotavapor R- 200) (a) et de l'autoclave (stérilisateur) (b)	43
Figure 23 : Schémas de la méthode des aromagrammes en boîte de Pétri.....	45
Figure24: Ensemencement des suspensions bactériennes standardisées (a) et dispositif expérimental de l'activité antibactérienne (b)	47
Figure 25: Etapes du procédé de détermination de la CMB en boîte de Pétri	48
Figure 26 : Photo du Spectrophotmètre type "biochrom-libraS6" pour la DO des paramètres biochimiques	49
Figure 27 : Photographies d' <i>aspergillus Niger</i> (b) et (b)	50
Figure 28 : Schéma du dispositif expérimental concernant le test d'efficacité antifongique de l'HE du Thym et des extraits aqueux et alcooliques de l'Ortie et de l'écorce de Grenade	51
Figure 29: Mécanisme de réduction du radical libre DPPH par un antioxydant.....	52
Figure 30. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique et de la quercétine.....	54
Figure 31. Méthode de la vanilline pour quantifier les tannins selon Julkunen (1985)	55
Figure 32: Chromatographe Master GC Dani et appareil de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier de type FTIR – 8400	57
Figure 33: Comparaison de l'Effet des extraits de feuilles d'Ortie et celui des antifongiques de synthèse sur le Taux d'inhibition des champignons pathogènes (diamètre en mm)	60
Figure 34. Comparaison de l'Effet des extraits de l'écorce de Grenade sur le Taux d'inhibition des champignons pathogènes (diamètre en mm)	61
Figure 35. Histogramme comparatif des % d'inhibition de l'HE du Thym sur, <i>F. oxysporum</i> , <i>F. lycopersici</i> et <i>aspergillus niger</i> à doses croissantes (10,15,30 µl et les Témoins)	62

Figure 36. Photos montrant les zones d'inhibition provoquées par l'huile essentielle du Thym à doses croissantes sur <i>l'Aspergillus niger</i> (10µl, 15µl, et 30µl)	62
Figure 37: inhibition du développement de <i>Fusarium oxysporum</i> sous l'effet de l'huile essentielle du Thym à doses croissantes (10µl, 15µl, et 30µl)	63
Figure 38: Taux d'inhibition des Bactéries traitées par les extraits végétaux (mm)	64
Figure 39: Résultats de l'effet bactéricide de l'extrait méthanolique à 10% de l'Ortie, sur Pseudomonas (a) Staph aureus (b) E.Coli (c) (photo originale)	64
Figure 40: Taux d'inhibition des Bactéries traitées par les extraits végétaux et par les antibiotiques de synthèse (diamètre en mm)	65
Figure 41: Effet de l'extrait de Grenade sur la croissance bactérienne (diamètre en mm)	66
Figure 42: Inhibition de la croissance d'E.coli (a) et de Pseudomonas aeruginosa (b) sous l'effet d'extraits aqueux et alcooliques de l'écorce de Grenade	66
Figure 43: Histogrammes comparatifs de l'effet des extraits de Grenade sur l'inhibition des bactéries (diamètre en mm)	67
Figure 44: Effet de l'HE du Thym sur Escherichia coli et Staph. aureus à doses croissantes (25, 50 et 100 µl d'HE)	67
Figure 45: Effet de l'HE du Thym sur Escherichia coli, Staphilococcus aureus et Pseudomonas aeruginosa à doses croissantes (10, 15, 20,25 et 30 µl d'HE)	68
Figure 46: Photographies originales du Témoin (a) de l'effet de l'HE du Thym sur Escherichia coli à doses croissantes (10, 20 et 30 µl d'HE) qui sont (b), (c) et (d).	68
Figure 47: Photographie de l'effet des antibiotiques de synthèse (Amoxicilline, Cefazolin, Rifampicin, Erythromicin et Gentamycine), utilisés sur <i>E.coli</i> (a) et <i>S.aureus</i> (b)	71
Figure 48: Profil d'activité antioxydante (AA) de l'acide ascorbique et des extraits végétaux des plantes testées.....	73
Figure 49. Analyse phytochimique des feuilles d' <i>Urtica dioica</i> par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (<i>Uncal - ORTIE -10%-G2-HE12_07_201808_44 - Detector B</i>)	75
Figure 50. Analyse phytochimique des feuilles d' <i>Urtica dioica</i> par spectroscopie infrarouge	76

Figure 51. Analyse phytochimique de l'écorce de Grenade (<i>Punica granatum</i>) par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	77
Figure 52. Analyse phytochimique des feuilles et tiges du <i>Thym</i> (<i>Thymus vulgaris</i>) par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	78
Figure 53. Analyse phytochimique par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) des poudres des trois espèces végétales testées.....	79
Figure 54. Composition chimique de l'huile essentielle du Thym obtenus par (CG / SM).	81
Figure 55. Composition chimique des feuilles d' <i>Urtica dioica</i> obtenus par (CG / SM).	82
Figure 56. Composition chimique de l'écorce de Grenade (<i>Punica granatum</i>) obtenus par (CG / SM).	83
Figure 57 : Analyse de sensibilité selon les "Box splot" ("boîtes à moustaches") des 03 souches bactériennes en fonction des concentrations d'extraits d'Ortie	85
Figure 58 : Analyse de sensibilité ("boîtes à moustaches") ou "Box splot" des 03 souches bactériennes en fonction des concentrations d'extraits de grenade.....	86
Figure 59 : Analyse de sensibilité (boîtes à moustaches) des 03 souches bactériennes en fonction des concentrations d'HE du Thym.....	86
Figure 60: Photo de croissance fongique sous l'effet de l'HE du Thym.....	Annexe

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01: Classification des ennemis des cultures (Sauvion, et al., 2013)	06
Tableau 02: principales moisissures des céréales (Pfohl-Leszkowicz, 1999)	08

Tableau 03: Exemples de certaines formes appartenant à l'espèce <i>Fusarium oxysporum</i> .	08
Tableau 04: Différents pesticides chimiques utilisés en agriculture.	10
Tableau 05: Nomenclature des plantes médicinales locales (région de Tiaret)	13
Tableau 06: les terpènes et phénols des huiles essentielles (Willem, 2004).	19
Tableau 07: principaux constituants des HE en terpènes et phénols (Willem, 2004).	19
Tableau 08: Données sur le principe actif de l'HE de quelques végétaux odorants	20
Tableau 09: Rendement en HE de plantes médicinales utilisées (Eberhard et al, 2005)	27
Tableau 10 : Caractéristiques des souches de <i>Fusarium</i> testées sur milieu PDA.	44
Tableau 11 : Diamètre des zones d'inhibition de la croissance microbienne en 5 classes	48
Tableau 12 : Rendement d'extraits végétaux d'Ecorce de Grenade et d'Ortie.	58
Tableau 13: Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle du Thym.....	59
Tableau 14 : Effet des extraits des feuilles d'Ortie et de l'Ecorce de grenade sur le développement fongique (diamètre en mm)	60
Tableau 15: Effet de l'huile essentielle du Thym sur la croissance fongique (diamètre mm)	61
Tableau 16: Les valeurs de CMI et CMF de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> sur les souches fongiques. Testées	63
Tableau 17: Taux d'inhibition du développement bactérien (diamètre en mm) des extraits des feuilles d'Ortie et de l'Ecorce de grenade	64
Tableau 18: Taux d'inhibition du développement bactérien (diamètre en mm) sous l'effet des antibiotiques de synthèse.....	69
Tableau 19: Valeurs de CMI et CMB de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> sur les souches bactériennes testées.	70
Tableau 20: pourcentages d'inhibition (PI) de l'absorbance de la solution de DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique et des extraits végétaux utilisés.....	72
Tableau 21: spectre phytochimique des feuilles d' <i>Urtica dioica</i> réalisé par FTIR.....	75
Tableau 22: spectre phytochimique des extraits méthanoliques de l'écorce de Grenade, réalisé par FTIR	78

Tableau 23 : Résultats de l'analyse chimique par Chromatographie (CPG / SM) de l'huile essentielle du Thym et des extraits végétaux de l'Ortie et d'écorce de grenade81

ANNEXES

Tableau 01: Effet des extraits de feuilles d'Ortie sur la croissance fongique (diamètre en mm)

Tableau 02: Taux d'inhibition du développement bactérien (diamètre en mm)

Tableau 03: Effet de l'extrait de Grenade sur le Taux d'inhibition du développement bactérien (diamètre en mm)

Tableau 04: Résultats de l'effet bactéricide de l'HE du Thym sur E.coli et Staphylocoques aureus,

Tableau 05: composition phytochimique l'HE du Thym, réalisé par FTIR

Tableau 06: Densités optiques en fonction des concentrations de l'acide ascorbique et des extraits végétaux utilisés

Tableau 07 : Analyse de sensibilité des 03 souches bactériennes en fonction des concentrations d'HE du Thym

Tableau 08: composition phytochimique de la Grenade réalisé par HPLC (CG /MS)

Tableau 09: composition phytochimique du Thym réalisé par HPLC (CG /MS)

Tableau 10 : Attributions IR (g) poudre d'écorce de grenade

Tableau 11: Attributions IR (o) poudre végétale d'ortie

Tableau 12: Attributions R (t) poudre de Thym

TABLE DES MATIERES

Résumé

Remerciements

Liste des abréviations.

Liste des figures.

Liste des tableaux.

INTRODUCTION GENERALE01

Première Partie : Synthèse Bibliographique

Chapitre I -

Bio-agresseurs des cultures, des semences stockées et moyens de lutte

I-1- Facteurs d'altération.....	05
I-1-1- Maladies parasitaires et ravageurs (facteurs biotiques)	05
I-1-2- Agents phytopathogènes (microbiologiques)	06
a- Les bactéries phytopathogènes.....	07
b- Les champignons phytopathogènes	08
I-1-3- Agents biologiques: Les ravageurs sont des animaux	09
a) Les vertébrés:	09
b) Les arthropodes :	09
I-1-4- Méthodes de lutte «modernes»	10

Chapitre II :

Généralités sur la phytothérapie et le métabolisme secondaire des plantes

I-2 -1- Le pouvoir des plantes	11
I-2-2- Domaines d'application des plantes médicinales	

I-2-2- Définition de la phytothérapie.....	14
I-2-3- Intérêts des métabolites secondaires des plantes thérapeutiques	14
I-2-4- Nature chimique des métabolites secondaires des plantes thérapeutiques	14
I-2-4-1- Les composés phénoliques :	14
a- Rôles pour la plante	14
b- Utilisations par l'Homme	14
I-2-4-2- Les alcaloïdes	16
a- Rôles pour la plante	16
b- Utilisations par l'Homme:	16
I-2-4-3- Les terpénoïdes:	16
a- Rôles pour la plante	16
b- Utilisations par l'Homme:	16
I-2-5- Les huiles essentielles	17
- Description.....	18
- Répartition systématique et caractères chimiques	18
I-2-6- L'activité antioxydante	19
I-2-6-1- Les antioxydants	19
a) Les antioxydants primaires	20
b) Les antioxydants secondaires.....	21
I-2-6-2- Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydant	22
I-2-6-3- Méthode d'analyse de l'Activité antioxydante des extraits végétaux.....	22

Chapitre III :

Méthodes d'extraction des extraits végétaux

I-3-1- Méthodes d'extraction des extraits végétaux.....	24
I-3-1-1- La Macération.	24
I-3-1-2- La Décoction.....	24

I-3- 2- Les méthodes classiques d'extraction des HE.....	24
a) Hydro distillation	25
b) La distillation a la vapeur saturé.....	25
c) L'Hydro diffusion	25
d) L'expression au solvant volatil.....	25
e) L'expression à froid	26
f) L'enfleurage	26
I-3- 3- Les nouvelles méthodes d'extraction des HE.....	27
a) L'extraction au CO2 supercritique.....	27
b) La distillation fractionnée	27
c) Extraction assistée par micro-onde	27

Chapitre IV:

L'Analyse phytochimique des extraits végétaux

I-4-1- Le Screening phytochimique	28
I-4-2- Quelques méthodes de dosage	29
a- Dosage des phénols totaux.....	29
b- Dosage des flavonoïdes	30
c- Dosage des tanins	30
I-4-3- Le profil spectrophotométrique.....	31

Deuxieme Partie: Partie Experimentale

Chapitre I:

Matériel et méthodes

2-1- Le matériel végétal utilisé:	33
A. Le thym (<i>Thymus vulgaris</i>)	33

a) Description botanique	33
b) Classification :	33
c) Distribution géographique :	33
d) Propriétés du thym :	33
B. Le grenadier (<i>Punica granatum</i>)	34
a) Description botanique :	34
b) Classification : Classification botanique du grenadier (Spichiger et <i>al.</i> , 2009)	35
c) Distribution géographique :	35
d) Propriétés du grenadier:	35
C. L'Ortie dioïque, (<i>Urtica dioica</i>)	37
a) Description botanique	37
b) Classification	37
c) Distribution géographique	37
d) Propriétés de L'ortie dioïque	37
2-2- Extraction des extraits végétaux	39
2-2- 1- Extraction de l'huile essentielle du Thym (<i>Thymus vulgaris</i>) Par hydrodistillation .	39
2-2-2- Extraction des extraits végétaux des feuilles d'Ortie (<i>Urtica dioica</i>)	40
2-2-3- Extraction des extraits végétaux de l'Ecorce de Grenade (<i>Punica granatum</i>)	42
2-3- Le Matériel microbiologique	43
2-4- Le Matériel de laboratoire (Les Réactifs)	44
2-5- Etude des activités biologiques (Test d'efficacité des extraits végétaux)	45
2-5- 1- Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits:	46
a) Repiquage des espèces bactériennes :	46
b) Préparation de l'inoculum et des disques:	46
c) Préparation des milieux de culture et des extraits à tester :	46
d) Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	47

2-5- 2- Test in vitro de l'activité antifongique :	49
a) Préparation des milieux de culture:	49
b) Ensemencement et Préparation des disques	50
2-6- Etude de l'activité antioxydante : le Test de DPPH	52
2-7- L'analyse phytochimique des extraits végétaux	58
2-7- 1. Le Screening phytochimique	58
a) Dosage des phénols totaux.....	53
b) Dosage des flavonoïdes	53
c) Dosage des tanins	54
2-7- 2. Le profil spectrophotométrique	55
2-7-2-1- Utilisation du HPLC (Chromatographie liquide à haute performance) couplé à un spectromètre de Masse	55
a) le principe:	56
b) L'analyse:	56
c) Identification des composés chimiques	56
2-7-2-2- Utilisation du FTIR (de l'anglais <i>Fourier Transform InfraRed spectroscopy</i>)	57
2-8- Analyses statistiques.....	57

Troisième Partie: Résultats Et Discussions

3-1- Interprétations des résultats	58
3-1-1- Rendements des extractions	58
3-1-2- Interprétations des Résultats de l'effet fongicide des extraits végétaux testés	59
a) L'effet fongicide des extraits d'Ortie	59
b) L'effet fongicide des extraits de l'écorce de Grenade	60
c) L'effet fongicide de l'huile essentielle du Thym	61
3-1-3- Interprétations des Résultats de l'effet bactéricide des extraits végétaux testés	63

a) L'effet bactéricide des extraits d'Ortie.....	63
b) L'effet bactéricide des extraits de grenade.....	65
c) L'effet bactéricide de l'huile essentielle du Thym	67
d) Résultats des tests d'antibiogramme comparatif avec antibiotiques de synthèse	69
3-1- 4- Activité antioxydante	71
3-1-5- Interprétations des résultats de l'Analyse phytochimique par FTIR.....	74
a) Analyse phytochimique des extraits de l'Ortie	74
b) Analyse phytochimique des extraits de l'écorce de Grenade	77
c) Analyse phytochimique de l'huile essentielle du Thym.....	78
3-1-6- Interprétations de l'Analyse phytochimique	79
3-1- 7- Discussion	82
Conclusion générale	91
Perspectives	94
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction Générale

INTRODUCTION GENERALE

Avec la prise de conscience de l'impact environnemental et sanitaire des pesticides de synthèse et l'apparition de phénomènes de résistance face à ces produits, de nouveaux types de produits de protection des cultures font leur apparition : les bio-pesticides. Il s'agit de produits naturels d'origine végétale, animale ou microbienne, à priori moins rémanent et moins impactant pour l'environnement que les pesticides conventionnels. Car, en Agriculture, la lutte contre les ravageurs et bioagresseurs (fongiques et bactériens, en particulier) repose principalement sur l'utilisation de pesticides chimiques qui, malheureusement, perdent de leur efficacité face à des parasites qui développent de plus de plus de résistance à leur rencontre suite à leur application répétée, (**Lamberth et al., 2013**).

En effet, vu leur efficacité et leur application facile et pratique, l'utilisation de pesticides chimiques (fongicides, insecticides,...) constitue à l'heure actuelle la technique la plus utilisée tels que le bromure de méthyle, la phosphine, le malathox et le digran qui sont actuellement utilisés car efficaces pour un large spectre de ravageurs (**Mueller, 1990**).

Néanmoins, malgré leur efficacité, l'usage excessif de ces fumigants a conduit à des effets secondaires inattendus tels que l'épuisement de l'ozone, la pollution environnementale, la résistance des ravageurs, et la nocivité pour la santé humaine. Et parmi les conséquences les plus directes, citons l'apparition de résistances des bio-agresseurs, l'appauvrissement de la faune auxiliaire utile, entraînant de graves perturbations au niveau des équilibres biocénotiques, ainsi qu'une contamination de l'environnement et l'apparition de résidus toxiques dans les denrées récoltées ou leurs produits de transformation (**Descoins, 1991**).

D'autre part, l'impact des pesticides sur l'environnement comprend aussi des effets sur les espèces non-ciblées telle que les abeilles et les autres pollinisateurs, car ils sont pulvérisés globalement sur les parcelles cultivées ou plus de 90 % des insecticides et des herbicides atteignent une destination autre que leurs cibles (**Lamberth et al., 2013**). L'essentiel de ces produits aboutissent dans les sols où ils subissent des phénomènes de dispersion et suite à leur rémanence dans le sol, ils s'infiltrant dans le produit agricole.

En outre, ces produits de synthèse phytosanitaires sont non seulement onéreux mais souvent inefficaces et dangereux aussi bien pour les animaux, les plantes, l'homme et l'environnement, (**Daoudi et al., 2015**).

Introduction Générale

Par ailleurs, le passage d'une agriculture conventionnelle à une agriculture intensive rend l'utilisation des produits phytosanitaires indispensable pour lutter contre les bio-agresseurs, mais leur impact négatif sur la santé humaine et l'environnement a poussé les chercheurs et les professionnels du secteur agroalimentaire vers la recherche de solutions alternatives pour une agriculture "propre", biologique et durable.

Par ailleurs, les denrées stockées subissent aussi des pertes allant de 5 à 15% du poids total des céréales, légumineuses et plantes oléagineuses dans le monde, (**Hill, 1990**) et cela suite à la prolifération de nombreux agents de détériorations tels que les rongeurs et les insectes ainsi que les microorganismes telles que les bactéries et les moisissures qui réduisent la valeur nutritionnelle des denrées, modifient leur aspect organoleptique et provoquent des problèmes économiques dus aux coûts de détoxification des grains (**Mishra et Dubey, 1994**).

Ainsi, les problèmes de résistance et de nocivité des pesticides synthétiques ont abouti à la nécessité de trouver des alternatives plus efficaces et plus saines, (**El Idrissi et al, 2014**) et dans ce contexte, la connaissance des remèdes traditionnels déterminés empiriquement, ainsi que les récentes découvertes des activités antimicrobiennes, des huiles essentielles et des extraits végétaux, parallèlement à une meilleure connaissance de leur action, constituent actuellement une base de données très importante pour servir à un développement scientifique rigoureux inhérent à la lutte biologique par l'utilisation de ces substances naturelles.

Néanmoins, les cultures sont menacées en permanence par des facteurs altérageux susceptibles de déprécier la valeur des productions agricoles en quantité et en qualité. Et face à ces facteurs altérageux, les végétaux spontanés ont dû lutter pendant des millions d'années pour survivre, en élaborant et diversifiant leurs stratégies de résistance et en l'occurrence elles ont développé des stratégies d'adaptation en synthétisant de nombreuses molécules servant à les défendre contre d'éventuels agresseurs.

Ainsi, un grand nombre de plantes aromatiques, médicinales ou autres, possédant des propriétés biologiques très intéressantes trouvent application dans divers domaines à savoir en médecine, en pharmacie, en cosmétique et en agriculture (**Mohamedi, 2006**). En effet, les plantes ont, par sélection naturelle au cours de l'évolution, développé des mécanismes d'adaptation aux conditions environnementales variées, de pressions de sélection, exercées par les agents pathogènes et les prédateurs (**Deshayes, 1991**).

Introduction Générale

Ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. A cet effet, l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études (**Zeghad, 2009**).

Par conséquent, comme alternative pour remplacer ces pesticides chimiques dans la protection des cultures, beaucoup de chercheurs se penchent sur l'utilisation de métabolites secondaires de certaines plantes spontanées. En effet, depuis toujours les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le *métabolisme secondaire* (**Fouché et al, 2000**).

L'extraction et la production de molécules bioactives à partir de ces plantes, peut constituer un moyen de valorisation de ces espèces et extériorise leur potentiel. Mais, seule une poignée de ces richesses a été explorée et font actuellement l'objet d'un fort regain d'intérêt en vue de nouvelles applications (**Boufares, et al., 2019**).

Par ailleurs, de par sa position géographique et sa diversité climatique, l'Algérie recèle un patrimoine végétal important. Parmi ses ressources naturelles, les plantes aromatiques et médicinales (PAM) occupent une large place et peuvent jouer un grand rôle dans la phytoprotection. Cependant, malgré la nature hétérogène d'une biodiversité immense du continent africain en général et de l'Algérie en particulier, peu d'efforts sont consacrés au développement des agents thérapeutiques de ces plantes.

Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à trois espèces de plantes très communes et très utilisées dans nos régions (*Thymus vulgaris*, *Urtica dioica* et *Punica granatum*) pour les valoriser dans le domaine de la phytoprotection. Ainsi au cours de cette thèse et à travers différents criblages écologique, économique et biologique trois extraits végétaux efficaces, ont été sélectionnés sur des cibles biologiques d'intérêt et présentant une toxicité sur organismes plus faible que des fongicides conventionnels. Les molécules responsables de l'activité ont été identifiées par fractionnement bio-guidé et analyses spectrales. L'activité des extraits a pu être validée in vitro sur certaines souches bactériennes et fongiques.

En effet, nous avons évalué l'activité antifongique et antibactérienne des extraits éthanoliques, méthanoliques et aqueux préparés à partir des feuilles et des tiges d'Ortie (*Urtica dioica* L.), et de l'écorce de grenade (*Punica granatum*), et l'huile essentielle du

Introduction Générale

Thym (*Thymus vulgaris*) pour tester les propriétés antimicrobiennes de ces plantes qui sont des espèces végétales aromatiques spontanées originaires d'Afrique du Nord (**Quezel et Santa, 1963**) très utilisées en médecine traditionnelle et cela empiriquement depuis des millénaires en phytothérapie. L'activité antifongique se définira sur des souches choisies qui sont *Fusarium oxysporum*- *Fusarium lycopersici* et *Aspergillus niger* et l'activité antibactérienne sur les souches suivantes: *Staphylococcus Aureus*- *Pseudomonas aeruginosae*- *Echerchia coli*.

Ainsi, notre but est de rechercher de nouveaux produits bioactifs naturels pour remplacer les pesticides chimiques afin de protéger les cultures et de préserver la santé humaine et l'environnement. A cet effet, le présent travail est organisé en trois parties successives et complémentaires :

- La première partie est une recherche bibliographique qui compte trois chapitres:
 - Bio-agresseurs des cultures, des semences stockées et moyens de lutte
 - Généralités sur la phytothérapie et le métabolisme secondaire des plantes
 - Méthodes d'extraction des huiles essentielles et d'extraits végétaux
- La deuxième partie résume la partie expérimentale qui comporte quatre volets :
 - Le matériel végétal: Le Thym (*Thymus vulgaris*), l'Ortie (*Urtica dioica*) et l'Ecorce de grenade (*Punica granatum*).
 - Extraction et rendement de l'huile essentielle et des extraits végétaux.;
 - Analyse des **propriétés antimicrobiennes et anti oxydantes** des extraits végétaux.
 - la phytochimie des extraits végétaux
- La troisième et dernière partie est consacrée aux résultats obtenus, à leur interprétation et leur discussion pour terminer avec une conclusion générale et des perspectives.

Premiere Partie

Synthèse Bibliographique



Chapitre I -

Bio-agresseurs des cultures, des semences stockées et moyens
de lutte

Introduction

Les bonnes pratiques de conservation consistent à maintenir le plus longtemps possible la qualité du produit en agissant sur les divers mécanismes d'altération car le grain ne peut se conserver indéfiniment sans s'altérer et perdre ses qualités. Trois facteurs déterminent l'intensité du processus d'altération au cours de la conservation à savoir la température, l'hydratation du grain (teneur en eau) et la durée de stockage,

I-1- Facteurs d'altération

I-1-1- Maladies parasitaires et ravageurs (facteurs biotiques)

L'environnement biotique d'une plante est représenté par l'ensemble des êtres vivants qui interagissent avec elle. Ces organismes peuvent être pathogènes pour la plante, ou bien mutualiste ou symbiotique ou encore constituer des ravageurs ou des compétiteurs (figure 01) (Jean-François, et al., 2017).

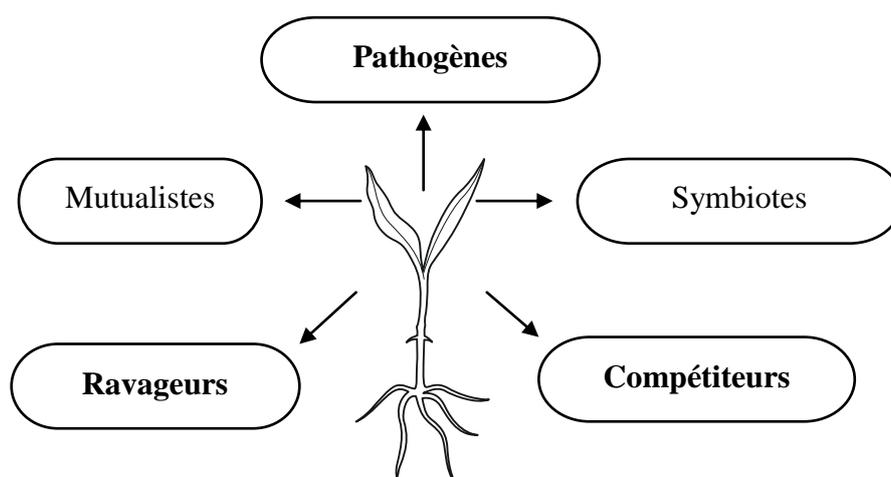


Figure 01: Schéma de l'environnement biotique des plantes.

Les ennemis des cultures appelés aussi bio-agresseurs, sont des organismes qui causent des dégâts aux plantes cultivées (et aux denrées récoltées et stockées).

Il existe une grande diversité de maladies parasitaires causées par l'action d'agents pathogènes (virus, bactéries, mycoplasmes, champignons, phanérogames), qui se développent sur les cultures et sur les denrées récoltées et stockées (**Tab. 01**). Ces parasites sont infectieux (envahissent l'hôte et s'y multiplient) et contagieux (ce transmettent d'une plante infectée à une plante saine) (**Sauvion, et al., 2013**).

I-1-2- Agents phytopathogènes (microbiologiques)

Les agents phytopathogènes sont de différents types : virus, bactéries, champignons et qui représentent de nombreux genres et espèces provoquant des maladies. L'agent pathogène peut être nécrotrophe car il tue les cellules de la plante puis s'y multiplie. Il présente alors un large spectre d'hôte et peut attaquer plusieurs familles de plantes. L'agent pathogène peut aussi être biotrophe, il se multiplie à l'intérieur de son hôte lorsque celui-ci est en vie, son spectre d'hôte est alors souvent étroit et ne peut infecter qu'une famille, voire qu'un genre ou qu'une espèce de plante. Enfin, l'agent pathogène peut être hémibiotrophe ce qui signifie biotrophe aux premiers stades de l'infection ensuite nécrotrophe. (Jean-François, et al., 2017)

Tableau 01. Classification des ennemis des cultures (Sauvion, et al., 2013).

	Règne	Groupe	Ravageurs ou parasites
Animal	- Invertébrés	- Nématelminthes - Mollusques - Arthropodes	- Nématodes - Gastéropodes (escargots, limaces,) - Insectes, acariens
	- Vertébrés	- Oiseaux - Mammifères	- Moineaux, étourneaux - Surmulot, Meniones...
Végétal	- Phanérogames	- Dicotylédones	- Cuscutacées : <i>Cuscuta</i> - Orobanchacées <i>Orobanche</i> - Loranthacées : <i>Phoradendron Viscum</i>
Microbien	- Eucaryotes	- Champignons	- Phycomycètes - Ascomycètes - Basidiomycètes - Deutéromycètes
	- Procaryotes	- Bactéries - Protozoaires	- <i>Pseudomonas, Xanthomonas,...</i> - <i>Phytomonas ;Mycoplasmes...</i>
	- Virus	- Particules allongées ou isométriques	- Virus de la mosaïque du tabac, du concombre - Virus Y de la pomme de terre,... - Exocortis des <i>Citrus</i> , - Sommet buissonnant de la tomate (TBSV).

a- Les bactéries phytopathogènes

Organismes vivants microscopiques unicellulaires dont la taille est de 01 à 10 microns. Ce sont des procaryotes (noyau imparfait) protégé par une gaine et pourvu d'un unique chromosome nu (**Richard, et al., 2018**).

Les bactéries phytopathogènes sont classées en huit genres : *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Xanthomonas*, *Ralstonia* et *Streptomyces* qui sont répartis pour certains sous toutes les latitudes et causent des dégâts considérables aux cultures dont les symptômes ressemblent à ceux occasionnés par des champignons ou des insectes. Pour cette raison la seule observation des symptômes ne permet pas de déterminer l'agent des dégâts (**Lairini et al., 2014**).

Sur les graines fraîchement récoltées, les bactéries se comptent par millions/gramme de MF. La population bactérienne est surtout composée par des eubactéries dont de nombreuses entérobactéries, notamment des coliformes pigmentés ou « bactéries jaunes » toujours abondantes sur les céréales (**Multon, 1982**).

b- Les champignons phytopathogènes

Les champignons sont des eucaryotes unicellulaires ou pluricellulaires. Ils sont la principale cause de maladies chez les plantes, on estime environ à 2 % des 100 000 espèces recensées de champignons qui sont susceptibles d'infecter les plantes (**Lairini et al., 2014**).

Ces champignons sont nécrotrophes, biotrophes ou même hémibiotrophes, ils sont capables d'infecter n'importe quel tissu à n'importe quel stade de croissance de la plante.

L'infection se déroule selon un processus, appelé « cycle de la maladie » qui comprend des étapes obligatoires (inoculation, germination, pénétration et invasion) (**Fandohan et al., 2004**).

Les champignons se développent au champ, ou au cours du stockage. Au cours des stockage en silo, il se développe une flore composée de champignons qui sont principalement des aspergillus (*A. candidus*, *A. versicolor*, *A. flavus*, *A. niger*) et des *Penicillium* (*P. cyclopium*, *P. glabrum*, ...) (**Tab.02**) dont l'évolution est fonction de l'humidité des graines et du lieu de stockage (**Larpen, 1990**).

Certaines peuvent faire baisser la faculté germinative tandis que d'autres secrètent des mycotoxines. Plus de 150 espèces des moisissures et de levures parasitent les grains de céréales (**Leyral et Vierling, 2001**)

Tableau 02: principales moisissures des céréales (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Champignons	Toxines	Denrées
Claviceps	Alcaloïdes de l'ergot	Blé et dérivés, seigle
Fusarium	fumonisines, Fusarine, moniliformine	Blé, Maïs, orge, Avoine..
Aspergillus	Aflatoxine, stérigmatocystine, ochratoxine	Blé, Mais,
Penicilliums	Patuline, Citrinine pénitrem A, Ochratoxine A	Blé, riz, orge

Tableau 03: Exemples de certaines formes appartenant à l'espèce *Fusarium oxysporum*.

Formes spéciales	Plantes hôtes	Première description
<i>F. oxysporum f. sp. albedinis</i>	Palmier dattier	Gordon (1965)
<i>F. oxysporum f. sp. ciceris</i>	Poids chiche	Matuo et Sato (1962)
<i>F. oxysporum f. sp. fabae</i>	Fève	Yu et Fang (1948)
<i>F. oxysporum f. sp. lentis</i>	Lentille	Gordon (1965)
<i>F. oxysporum f. sp. lycopersici</i>	Tomate	Snyder et Hansen (1940)
<i>F. oxysporum f. sp. phaseoli</i>	Haricot	Kendrick et Snyder (1942)
<i>F. oxysporum f. sp. pisi</i>	Petit pois	Snyder et Hansen (1940)
<i>F. oxysporum f. sp. radicis-lycopersici</i>	Tomate	Jarvis et Shoemaker (1978)
<i>F. oxysporum f. sp. raphani</i>	Radis	Kendrick et Snyder (1942)

1-1-3- Agents biologiques: Les ravageurs sont des animaux**a) Les vertébrés:**

En particulier de petits vertébrés rongeurs (souris, rats) et des oiseaux peuvent vivre au dépend des stocks de grains mal protégés dont ils peuvent consommer des quantités considérables. En outre, leurs déjections peuvent servir de vecteurs à des germes pathogènes. Ainsi, ils interviennent dans le processus de contamination provoquant des lésions physiques dans les tissus végétaux qui favorise la pénétration des spores (**Jouany et Yiannikouris, 2002**).

b) Les arthropodes :

Les insectes et les acariens sont les plus petits ravageurs des denrées stockés. La présence de ces arthropodes est révélatrice de mauvaises conditions de conservation. Les insectes endommagent l'enveloppe des grains, ce qui favorise la pénétration des moisissures a l'intérieur de la graine et de même pour les acariens vivants sur les grains moisiss qui récupèrent et transportent les spores des champignons sur leurs corps mais également dans leurs tubes digestifs et leurs déjections (**Molinie et Pfohl-Leswick, 2003**).

En Algérie, les principales espèces ravageuses des denrées stockées sont des Coléoptères et des Lépidoptères avec comme principaux ravageurs des céréales:

- **Lépidoptères:** *Sitotroga cerealella*, *Ephestia kuehniella* et *Plodia interpunctella*,
- **Coléoptères:** *Sitophilus oryzae*; *Trogoderma granarium* et *Tribolium castaneum*.

Les insectes présentent comme effet direct sur le grain entreposé une perte de poids de la valeur nutritive et du pouvoir germinatif. De plus, l'humidité issue de leur activité et les produits d'excrétion favorise l'apparition de moisissures dans les lieux de stockage (**Benayad, 2008**). Ils consomment les grains au cours du développement larvaire, qui, souvent a lieu, sous forme cachée à l'intérieur du grain. C'est le cas des charançons. La conséquence première est la perte en poids et le germe du grain est aussi consommé (en priorité les lépidoptères), ce qui entraîne d'importantes pertes du pouvoir germinatif.

Ils contaminent les céréales par les restes de leur développement larvaire (déchets, œuf..), par leurs déjections, par les sécrétions malodorantes et toxiques des adultes et des larves qui déprécient fortement la denrée. Leur développement produit des déchets fins (farines) qui favorisent l'attaque d'autres d'insectes (*Tribolium* suit *Sitophilus*) et le développement de micro-organismes.

1-1-4- Méthodes de lutte «modernes»

- **Lutte biologique** : Recherche de mâles stériles (élevage puis des lâchers de males stériles); attaque des insectes par virus ou champignons; cultures résistantes (locales). .

- **Lutte physique**: - *par le froid* : à - de 10°C le développement des insectes est bloqué)

- *par le chaud* : (traitement des produits de 60° C à 180° C), Ce choc thermique de quelques minutes, suivi d'un refroidissement rapide, entraîne une totale mortalité des insectes sans affecter les qualités technologiques du produit.

- **Lutte chimique**: Emploi de composés toxiques pour les insectes qui est efficace mais qui doit être appliquée avec précaution **par contact** (grain recouvert d'une pellicule de produit insecticide) ou **par fumigation** (détruction rapide de toutes formes d'insectes contenues dans les grains, (Aouni et al, 2013). (Tab.04)

Tableau 04: Différents pesticides chimiques utilisés en agriculture

	Effets
<u>Organochlorés DDT/DDE</u>	- Amincissement de la coquille de l'œuf chez les oiseaux de proie. - <u>Perturbateur endocrinien</u> : Perturbation de la <u>thyroïde</u> chez rongeurs, oiseaux,
DDT / <u>Parathion</u>	Sensibilité aux infections fongiques.
<u>Chlordane</u>	Interaction avec le système immunitaire des <u>vertébrés</u> .
<u>Carbamate</u>	- Perturbation de la <u>thyroïde</u> chez rongeurs, oiseaux et poissons. - Dégradation de fonctions métaboliques tels que la <u>thermorégulation</u> , - Réduction du taux d'éclosion et de la reproduction chez les vertébrés
<u>herbicide Phenoxy 2,4-D</u>	Interaction avec le système immunitaire des <u>vertébrés</u> .
<u>Atrazine</u>	- Interaction avec le système immunitaire des <u>vertébrés</u> . - l'atrazine tue le <u>phytoplancton</u> .
<u>Imidaclopride, Pyréthrianoïde</u>	Troubles du butinage et de production de nouvelles reines abeilles.
<u>Thiaméthoxame</u>	Forte mortalité des <u>abeilles</u> à miel du à l'échec du retour à la ruche.
<u>Bénomyl</u>	- Altération florale et réduction des 2/3 de visites d'abeilles - changement visiteuses grandes abeilles remplacée par petites abeilles.
<u>Thiocarbamate- Triazole</u>	Perturbation de la <u>thyroïde</u> chez rongeurs, oiseaux et les poissons. Dégradation de fonctions métaboliques tels que la <u>thermorégulation</u> , Troubles du développement, diminution du taux d'éclosion chez vertébrés.

Chapitre II :

Généralités sur la phytothérapie et le métabolisme secondaire
des plantes

Chapitre II : Généralités sur la phytothérapie et le métabolisme secondaire des plantes

Une plante médicinale est une plante que l'on cultive ou que l'on cueille dans son milieu naturel pour ses propriétés médicinales. L'être humain utilise des plantes depuis des milliers d'années pour traiter divers maux, le monde végétal est à l'origine d'un grand nombre de médicaments. Selon **Malo, (1991)**, il existe environ 300 000 espèces de plantes dans le monde, dont environ le tiers a été utilisé par les sociétés à des fins médicinales. Par ailleurs, sur les 300 000 espèces végétales recensées sur la planète plus de 200 000 espèces vivent en pays tropicaux d'Afrique et ont des vertus médicinales (**Millogo et al, 2005**)

Aujourd'hui les principes actifs des plantes sont des composants essentiels d'une grande partie de nos médicaments et produits de soins (**Hans, 2007**). Malgré les multiples progrès de la médecine moderne, il y a un net regain d'intérêt vis-à-vis de la phytothérapie. Selon l'OMS plus de 80% de la population mondiale ont recours à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de la santé.

I- 2 -1- Le pouvoir des plantes : (Fig.02)

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes, depuis le 18ème, au cours duquel des savants ont commencé à extraire et à isoler les substances chimiques qu'elles contiennent. On considère les plantes et leurs effets en fonction de leurs principes actifs. La recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de médicaments essentiels. (**Franchomme, 2015**)



Figure 02 : Rôles des essences contenues dans les végétaux (**Franchomme, 2015**)

Aujourd'hui, les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique, il est impossible d'imaginer le monde sans la quinine qui est employée contre la malaria ou sans l'éphédrine que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes (Iserin *et al*, 2001)

I-2-2- Domaines d'application des plantes médicinales

Il est acquis que les plantes médicinales sont en mesure de soigner des maladies simples comme le rhume, ou d'en prévenir de plus importantes comme l'ulcère, la migraine, l'infarctus en plus de certaines allergies ou affections. Si l'on y ajoute leurs vertus réparatrices, tonifiantes, sédatives, revitalisantes ou immunologiques, on mesure mieux l'aide précieuse qu'elles nous apportent au quotidien. Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique, (Aouni *et al*, 2013).

a) Utilisation en médecine humaine:

En urologie, dermatologie, gastrites aiguës, toux, ulcère d'estomac, laxatives, sommeils et désordre nerveux, immunostimulantes, antispasmodique et anti-inflammatoire (melaleuca alternifolia, achillea millefolium,...), Contre le diabète (*Azadirachta indica*), (Hossein, 2005). L'arbre de thé (*Melaleuca alternifolia*) est reconnu pour ces propriétés antimicrobiennes, anti-infectieux, antifongiques, antivirales, (Svoboda *et Hapson*, 1999).

b) Utilisation en alimentation: Assaisonnement, des boissons des colorants épices et herbes aromatiques, considéré comme condiment et aromates, (Richard *et Multon*, 1992).

c) Utilisation en cosmétique : Produits de beauté, de toilettes, d'hygiène et parfums.

b) Utilisation en agriculture

L'*Azadirachta indica* est un arbre qui se développe sur tout le continent indien, est une plante médicinale. Très important au Bangladesh, de 12 à 18 mètres de hauteur avec une circonférence de 1,8 à 2,4 mètres. L'huile essentielle de cet arbre à une utilisation dans le contrôle de divers insectes et nématodes parasites de plantes cultivées, (Hossein *et Lytle*, 2005).

Le souci officinal (*Calendula officinalis*) est l'une des herbes les plus utilisées pour ses vertus médicinales dans le monde. En raison de son action nématicide, cette plante fait une excellente plante compagne pour les poireaux, ail et oignons ainsi que pour les fraisières et la tomate.

Chapitre II : Généralités sur la phytothérapie et le métabolisme secondaire des plantes

Dans des expériences en pots dans une culture de tomate, **Chavagnat et Jeudy**, (1980), ont observé que les extraits de *Calendula officinalis* tuaient les larves et les adultes du nématode *Meloidogyne incognita* tout en empêchant l'éclosion des œufs. Dans une culture de fraise, on a pu réduire le nombre de nématodes infectant les plants de 19,2 à 1,5 par plant en utilisant *C. officinalis* comme engrais vert (**Hossein et Lytle, 2005**).

Tableau 05: Nomenclature des plantes médicinales locales (région de Tiaret)

Nom botanique	Nom commun	Famille	strate
<i>Artemisia herba-alba L.</i>	Armoise blanche	Composée	Arbuste
<i>Ceratonia siliqua L.</i>	Caroubier	Légumineuse	Arbre
<i>Cupressus sempervirens L.</i>	Le cyprès	Cupressacées	Arbre
<i>Eucalyptus globulus L.</i>	Eucalyptus	Myrtacées	Arbre
<i>Laurus nobilis L.</i>	Laurier	Lauracées	Arbre
<i>Lavandula stoechas L.</i>	Lavande	Labiées	Arbuste
<i>Mentha pulegium L.</i>	Menth pouliot	Labiées	Arbuste
<i>Myrtus communis L.</i>	Le myrte	Myrtacées	Arbuste
<i>Nerium oleander L.</i>	Laurier rose	Apocynacées	Arbuste
<i>Opuntia ficus-indica L.</i>	Figuier de barbarie	Cactacées	Arbuste
<i>Peganum harmala L.</i>	Harmel	Zygophylacé	Arbuste
<i>Rosmarinus officinalis L.</i>	Romarin	Labiées	Arbuste
<i>Thymus vulgaris algériensis L.</i>	Thym	Labiées	Arbuste
<i>Trigonella foenum graecum L.</i>	Fenugrec	Légumineuse	Herbe
<i>Urtica dioica L.</i>	Ortie	Urticacées	Herbe

Source : conservation des forêts de Tiaret, 2016

I-2-3- Définition de la phytothérapie

Comme son nom l'indique, la phytothérapie, c'est l'art de traiter par les plantes. La phytothérapie est une médecine très ancienne, (**Anton et Lobstein., 2005**). C'est aussi l'ensemble des soins thérapeutiques faisant directement appel aux drogues d'origine végétales.

I-2-4- Intérêts des métabolites secondaires des plantes thérapeutiques

Les plantes sont immobiles par conséquent elles développent des stratégies pour survivre et se reproduire. Les métabolites secondaires sont impliqués étroitement dans ces stratégies à savoir la vie de relation, (**Fouché et al, 2000**). Parmi leurs fonctions :

- ✦ **Dissuader les prédateurs:** les odeurs repoussent les herbivores tel le Pélargonium..
- ✦ **Attirer les pollinisateurs :** Les couleurs et les odeurs attirent les insectes.
- ✦ **Décourager la compétition d'autres espèces:** c'est l'allélopathie tel le Noyer qui produit la juglone pour inhiber la croissance d'autres plantes à 8 m autour de lui, (**Fouché et al, 2000**)

I-2-5- Nature chimique des métabolites secondaires des plantes thérapeutiques

Les métabolites secondaires participent à la vie de relation de la plante et ont des rôles très variés. Ils peuvent servir de défense (sécrétions amères ou toxiques pour les prédateurs) ou au contraire, attirer certaines espèces ayant des rôles bénéfiques (pollinisateurs). Il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés dont :

1. **Les Phénols** : tanins, lignine, flavonoïdes
2. **Les alcaloïdes** (métabolites Azotés): hétérosides cyanogènes et glucosinolates
3. **Les Terpènes**: hémiterpènes(C5), monoterpènes(C10), sésquiterpènes(C15)...

I-2-5-1- Les composés phénoliques :

Molécules aromatiques constituées d'un groupement phényl (C6) et d'un hydroxyle (-OH). Il en existe environ 4500 qui dérivent d'acides aminés aromatiques: tyrosine et phénylalanine.

- **Phénols** antioxydants ou anti-inflammatoires (saule), stimulants la bile (Artichaut) ;
- des coumarines qui confèrent des propriétés anti-œdémateuses (figuier, céleri) ;
- des quinones, naphthoquinones comme la juglone de la feuille de noyer .

a) Rôles pour la plante:

Les composés phénoliques comme **la lignine** ont des rôles structuraux (xylème). La lignine abondante après la cellulose. D'autres composés phénoliques comme **les flavonoïdes** sont responsables de la couleur, des arômes et des parfums des plantes (attraction des pollinisateurs)

Les coumarines interviennent dans un mécanisme de défense contre les herbivores.

Les tanins ont aussi cette propriété. Ils sont présents dans l'écorce, le bois et les feuilles.

b) Utilisations par l'Homme :

✦ La lignine fait partie des fibres alimentaires bénéfique dans le transit intestinal et stimulent la flore bactérienne (diminution des risques de cancer colorectal). Les flavonoïdes sont cancéro-protectrices. Les coumarines et les tanins ont des propriétés anti-oxydantes. (**Fouché et al, 2000**)

I-2-5-2- Les alcaloïdes :

Principaux composants du métabolisme secondaire. Il en existe environ 12000 répertoriés à ce jour. Produits d'origine végétale souvent basiques (goût amer), hydrophiles qui existent souvent dans la plante sous forme de sels. Leurs précurseurs sont des acides aminés simples comme la tyrosine (tyr), le tryptophane (trp) ou la lysine (lys) (**Willem, 2004**).

a) Rôles pour la plante:

Le principal rôle des alcaloïdes est de défendre la plante contre les mammifères et les insectes. Leur mode d'action dépend de l'espèce végétale: syndromes neurologiques, des vomissements etc... Pour les plantes de type digitale, la digitaline entraîne une augmentation des contractions cardiaques voire un arrêt cardiaque selon la dose. Les Solanacées possèdent des composés toxiques qui perforent les membranes.

b) Utilisations par l'Homme : De nombreux alcaloïdes sont utilisés en pharmacie :

- La morphine: antalgique majeur extrait des graines du *Papaver somniferum*
- La quinine permet de lutter contre le paludisme
- L'atropine dilate les pupilles, ce qui facilite les examens ophtalmologiques
- D'autres alcaloïdes telle la nicotine dans la fabrication d'insecticides et de cigarettes,

I-2-5-3- Les terpénoïdes:

Molécules à nombre de carbones multiple de 5, et dont le précurseur est l'isopentényl diphosphate ou IPP. Ce sont des lipides synthétisés à partir de l'acétyl-CoA, molécules hydrophobes. Il existe 20 000 molécules connues avec comme motif commun cette base isoprène. Les terpénoïdes sont stockés dans les vacuoles et dans le latex (déchet laiteux)

a) Rôles pour la plante:

Les terpénoïdes sont des anti-herbivores. Ils peuvent provoquer des convulsions, des allergies de la peau. Ils ont un goût amer. Les terpénoïdes contenus dans le latex sont utiles à la plante pour lutter contre les prédateurs et utiles aussi au développement de la plante :

- Gibbérélines (diterpènes): phytohormones impliquées dans allongement de la tige et la floraison.
- Les caroténoïdes, impliqués dans photosynthèse, aspect coloré des végétaux (carotte, tomate,...) et précurseurs d'hormones végétales (ABA).

b) Utilisations par l'Homme : De nombreux terpénoïdes dégagent de fortes odeurs : le menthol et le limonène et sont utilisés comme antiseptiques et dans certains domaines comme la cosmétique. Le taxol, extrait de l'If du Pacifique, anti-cancéreux car il inhibe la division cellulaire. Des monoterpènes Volatils, eugénol (girofle), anéthole (anis, fenouil), etc.. De nombreuses espèces végétales leur doivent leur odeur (anis, thym, verveine, ...) et sont antiseptiques (cinéole de l'eucalyptus), (**Amarti et al., 2008**).

I-2-6- Les huiles essentielles

a) Description

Les huiles essentielles sont des mélanges de composés aromatiques liquides, lipophiles et volatils qui sont stockés dans des tissus végétaux spécialisés et extraits des plantes grâce à des procédés physiques (hydrodistillation, expression à froid ...), (**Hostettman, 2000**).

La norme AFNOR NF T 75-006 (février 1998) définit l'huile essentielle (essences ou huile volatile): « produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation sèche. Les plantes aromatiques synthétisent naturellement les

Chapitre II : Généralités sur la phytothérapie et le métabolisme secondaire des plantes

huiles par des cellules sécrétrices chlorophylliennes puis elles sont transportées dans d'autres parties (fig.03), (**Willem, 2004**).

A partir du fructose provenant de la photosynthèse. Celui-ci sera métabolisé directement en PEP (Phosphoénolpyruvate) ou après plusieurs réactions intermédiaires en IPP (Isopentényl-pyrophosphate) pour la synthèse des molécules aromatiques volatiles via deux voies principales :

- La voie des terpènes : plusieurs unités d'IPP suivie de transformations (hydrogénation, oxygénation...) permettant l'obtention des mono, di- ou sesquiterpènes constituant de nombreuses familles chimiques contenues dans les HE (phénols, alcools, oxydes, aldéhydes, cétones...);
- La voie du phénylpropane : après passage par des intermédiaires tels que l'acide cinnamique, elle aboutit à des substances aromatiques tels que certains acides (acide salicylique), leurs esters (salicylate de méthyle), certains phénols (eugénol)... (**Franchomme et al, 2001; Faucon and Lobstein, 2015**).

Par ailleurs, en fonction de l'organe considéré, on distingue plusieurs types de cellules sécrétrices:

- Les cellules épidermiques (pétales) ; (**Faucon and Lobstein, 2015**)
- Les poils sécréteurs (tiges, feuilles, calices) ;
- Les cellules sécrétrices épaisses (tiges, écorces, racines, graines, feuilles), (**Fig.03**);
- Les poches sécrétrices (provenant de cellules sécrétrices)

- Schizogènes: cellule sécrétrice se partage en deux, la poche se forme entre les deux feuilles

- Lysigènes : plusieurs cellules groupées forment une poche, par lyse de leur paroi

-Schizolysigènes: formée par deux types de poches précédentes (péricarpes) (**Fig.03**)

- Canaux sécréteurs: formées de poches sécrétrices allongées (bois, racines). (**Fig.03**)

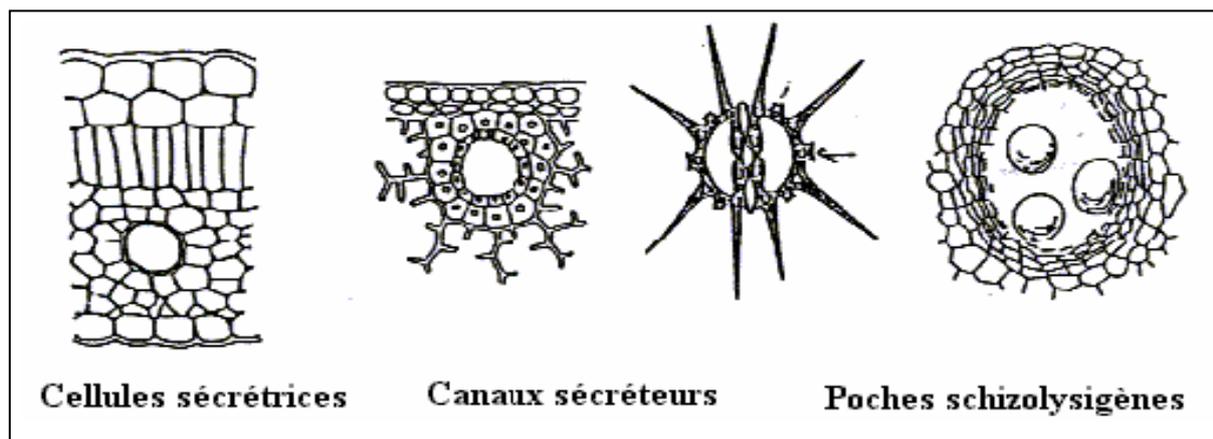


Figure 03: tissus végétaux spécialisés dans le stockage des huiles essentielles

b)-Répartition systématique et caractères chimiques :

L'huile essentielle d'une plante est le suc huileux qu'on extrait et qui contient des molécules diverses dont certaines sont responsables du parfum dégagé par la plante. L'élément majoritaire est appelée *principe actif* de l'HE. Cette huile est extraite de différentes parties de la plante: ●Fleurs (Pétale de Rose, Lavande...); ●Baies (Genévrier...); ●Écorce de Fruits (Citron...); ●Boutons floraux (Clou de Girofle...); ●Graines (Anis...); ● Feuilles (Eucalyptus...). (Hostettman, 2000). La teneur des plantes en HE est faible de l'ordre de 1 à 3% à l'exception du clou de Girofle (14 à 19 %), de la noix de Muscade (8 à 9 %) et de la Cardamome (4 à 10 %).

Certaines familles se caractérisent par le grand nombre d'espèces à essences qu'elles groupent telles que **les labiées** (Thym, Menthe, Lavande, Sauge, ...), **les Umbellifères** (Anis, Fenouil, Cumin, Coriandre, Persil, etc.), les Myrtacées (Myrthe, Eucalyptus), etc... (Fouché et al., 2000). Elles ne sont pas solubles dans l'eau et on les retrouve dans le protoplasme sous forme d'émulsion plus ou moins stable. Par contre, solubles dans les solvants organiques (acétone, ...) et dans l'alcool.

Elles diffusent par les épidermes et se répandent dans l'air (odeur caractéristique des végétaux odoriférants. Ces essences sont souvent colorées (jaune, rouge, brun et vert ou bleu) et ont des propriétés antiseptiques, insecticides, fongicides, bactéricides et agissent dans les domaines de santé, (Willem, 2004; Anton et al., 2005).

- **Effet antibactérien:** Inhibition des bactéries, (phénols, aldéhydes et cétones).

Chapitre II : Généralités sur la phytothérapie et le métabolisme secondaire des plantes

- **Effet antiviral:** Traitement des virus de l'herpès, la grippe, le sida, **Effet antifongique:** s'opposent au développement des champignons et moisissures.
- **Effet Antiparasitaire:** Inhibition et destruction des parasites, (phénols...) (**Fouché et al, 2000; Hostesttman et al, 2000**).
- **Effet insecticide :** Les HE peuvent s'appliquer en cas de piqûres d'insectes.
- **Effet de cicatrisation et anti-brûlure.**

Tableau 06: les terpènes et phénols des huiles essentielles (Willem, 2004).

Les monoterpènes	Stimulants du système immunitaire; antiseptiques, Antalgiques, Action révulsive sur la peau donc utiles en cas de douleur localisée	le thym, le cyprès, la sauge officinale...
Les monoterpénols	contre les champignons, les virus et les bactéries. Stimulent le système nerveux Ne brûlent pas la peau et ne sont pas toxiques pour le foie.	le bois de rose, camomille, l'eucalyptus, la marjolaine.
Les phénols	Immunostimulants, Anti-microbes, virus, champignons et bactéries. Peuvent endommager le foie en détruisant les cellules hépatiques	le clou de Girofle, le thym, l'origan, le poivre noir...

Tableau 07: principaux constituants des HE en terpènes et phénols (Willem, 2004).

Elément	Caractéristiques	Plante aromatique
Les acides	Anti-inflammatoires puissants, calmants	clou Girofle et genévrier
Les aldéhydes	Anti- inflammatoires, Calmants du système nerveux; Anti- infectieux. irrite la peau.	le citron, la mélisse, la verveine, la coriandre
Les cétones	Anti-inflammatoires; Anti-infectieux, Stimulent le système immunitaire Anti-coagulantes.	camomille, fenouil, romarin, l'eucalyptus
Les coumarines	Neuro-sédatives, Anti-coagulantes; Les coumarines en excès endommagent le foie.	l'angélique, le céleri, l'oranger doux et amer...
Les éthers	Antispasmodique; antalgiques, Antidépresseur; Inversion des effets si les doses sont trop fortes	l'anis étoilé, l'estragon, le basilic, la rose de Damas.
Les esters	Antispasmodiques, Anti- arythmiques,	la lavande et géranium...

Tableau 08: Données sur le principe actif de l'HE de quelques végétaux odorants

Principe actif	Densité	T° d'ébullition (° C).	Solubilité: g/100 ml.	
			Eau.	Cyclohexane
Aldéhyde salicylique.	1,167	196,5	ps	∞
Cuminaldéhyde.	0,978	235	i	s
Anéthole.	0,994	235,3	tps	s
Estragol.	0,964	215	i	s
Eucalyptol.	0,924	176-7	tps	∞
Acétate de linalile.	0,895	220	tps	∞
Limonène.	0,842	177	i	∞

* **i:** insoluble, **tps:** très peu soluble, **ps:** peu soluble, **s:** soluble, **∞:** très soluble

I-2-7- L'activité antioxydante

I-2-7-1- Les antioxydants

Les antioxydants sont des composés qui peuvent inhiber ou retarder les dommages oxydatifs et protègent contre de nombreuses maladies (**Akshatha et al., 2015**). Ce sont des molécules capables d'interagir avec les radicaux libres en empêchant la propagation des réactions en chaîne d'oxydation (**Charles, 2013**). Les principaux antioxydants sont : la vitamine C et E, les caroténoïdes, les polyphénols et les enzymes endogènes (superoxyde dismutase et la catalase).

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS. Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (**Favier, 2003**).

a) Les antioxydants primaires

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces. Cette ligne de défense est constituée de superoxyde dismutase (SOD), de catalase et de peroxydase (glutathion et ascorbate) (**Favier, 2003**). Ces enzymes anti

oxydantes permettent l'élimination des radicaux libres primaires, selon les réactions suivantes (Fig. 04):

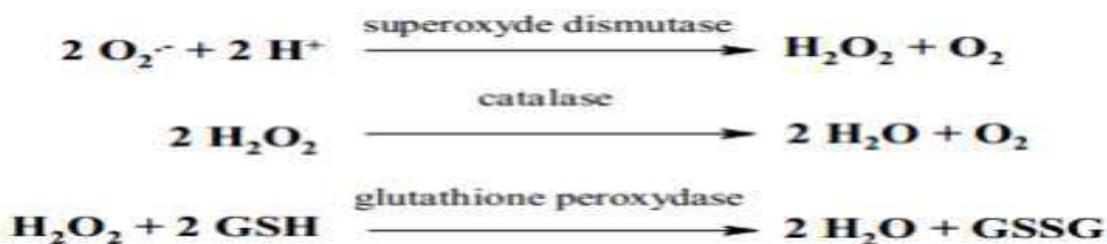


Figure 04: Mode d'action des antioxydants primaires (Dacosta, 2003).

De ce fait elles préviennent la formation de radicaux libres à partir des lipides membranaires et contribuent à la protection des membranes de la peroxydation lipidique, (Dacosta, 2003).

b) Les antioxydants secondaires

Ce sont des molécules exogènes. Contrairement aux enzymes antioxydantes, une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes (Fig. 5).

Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydants in vivo ont été proposés tels que la vitamine E, l'acide ascorbique, le β-carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques,... (Gheffour et al., 2015).

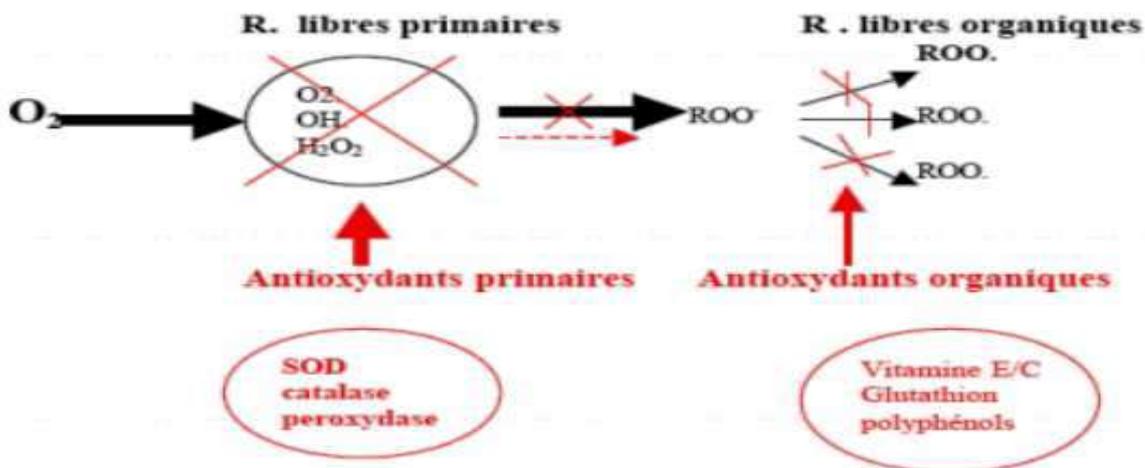


Figure 05: les systèmes de défense contre les radicaux libres

I-2-7-2- Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydant

Les ROS ont des rôles physiologiques très importants en agissant, à faibles concentrations, sur la régulation des réponses biologiques, la transduction du signal et autres voies de signalisation (**Favier, 2003**). Dans l'ensemble de nos tissus sains, les défenses antioxydantes sont capables de faire face et détruire les radicaux produits en excès. On dit que la balance Oxydants /Antioxydants est en équilibre.

Mais dans certains cas, à cause d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution ...) ou d'une diminution des capacités antioxydantes (insuffisance d'apports des micronutriments antioxydants) un déséquilibre entre la production des radicaux libres et le système de défense est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé stress oxydatif. Pour traiter le stress oxydant, il faut aider l'organisme par l'apport d'antioxydants secondaires (vitamine C, E, caroténoïdes, polyphénols) ((**Gheffour et al., 2015**).

I-2-7-3- Méthode d'analyse de l'Activité antioxydante des extraits végétaux:

- Test de DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH°) est un radical organique stable de couleur violette, qui absorbe à 517 nm. Sa stabilité est due au fait qu'il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. En présence d'agents antioxydants qui sont des donneurs d'hydrogène (AH), le composé est réduit en une forme non radicalaire DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) (**Fig.06**) et vire au jaune (après réduction par l'agent antioxydant), ce qui diminue son absorbance (**Molyneux, 2004**).

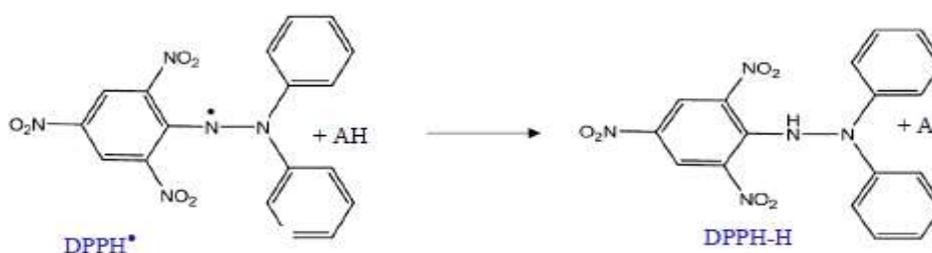


Figure 06: Réduction du radical libre DPPH par un antioxydant (**Molyneux, 2004**)

- Test de FRAP

Le pouvoir réducteur du fer (Fe³⁺) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu [26]. Un ml de l'extrait végétal est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ puis l'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min ensuite, 2.5ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés puis les tubes sont centrifugés à 3000 t/mn

pendant 10min. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre). (Singleton et Rossi, 1965)

- Blanchissement du β -carotène

La capacité des extraits aqueux et méthanolique de prévenir le blanchissement du β -carotène est déterminée selon la méthode décrite par **Bougatf et al (2009)**, ou 0,5 mg de β -carotène dans 1 ml de chloroforme est mélangée avec 25 μ l d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Le chloroforme est évaporé sous pression à 45°C au rotavapeur, ensuite 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés et le mélange obtenu est agité vigoureusement. Le milieu réactionnel contient 2.5 ml de l'émulsion de β -carotène/acide linoléique et 0.5 ml des solutions d'extraits ou des antioxydants de référence (BHT, BHA). Le mélange est placé dans un bain-marie et incubé à 50°C pendant 2 heures.

L'activité antioxydante (AA%) exprimée en % d'inhibition par rapport au contrôle négatif selon l'équation: **AA % = [1- (At0- At120) test / (At0-At120) contrôle] x 100**

- Peroxydation de l'acide linoléique

L'activité antioxydante totale des extraits aqueux et méthanolique est déterminée selon la méthode de thiocyanate ferrique décrite par **Gulcin et ses collaborateurs (2005)**. Une émulsion de l'acide linoléique est préparée en mélangeant 0,028 g d'acide linoléique, 0,028 g de Tween 20 et 10 ml de solution tampon phosphate (0,04 M, pH 7.0). Le milieu réactionnel contient 600 μ l de solutions d'extraits ou de l'antioxydant standard (BHT) à une dose bien définie (50 μ g/ml) et 600 μ l de l'émulsion de l'acide linoléique.

Le contrôle négatif contient tous les réactifs sauf l'échantillon à tester (extraits ou antioxydant standard) qui est remplacé par un volume égal de la solution tampon. Après agitation, le mélange est incubé à 25°C à l'obscurité. La lecture est faite après 15 min d'incubation puis chaque 24 heures pendant 04jours, en mélangeant 1ml d'éthanol, 20 μ l KCN, 20 μ l d'échantillon et 20 μ l de FeCl₂, l'absorbance est lue à 500 nm contre un blanc d'éthanol. Le % d'inhibition de la peroxydation lipidique est calculé selon :

$$\% \text{ d'inhibition de peroxydation} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

(Ac : absorbance du contrôle. ; At : Absorbance du test.)

Chapitre III:

Méthodes d'extraction des huiles essentielles et d'extraits
végétaux

Les huiles essentielles se trouvent en général dans les fleurs et les feuilles, ainsi que dans les fruits, bois, écorce, racines et graines. La récolte se fait au meilleur moment en fonction des substances que l'on veut extraire et des conditions extérieures (climat, saison..) car la plante ne développe pas les mêmes composantes selon la période de l'année.

Les huiles essentielles sont des essences volatiles et odorantes que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau, pressage ou incision des végétaux qui les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous produits du métabolisme secondaire. Au point de vue chimique, ce sont des mélanges complexes composés de terpènes, esters, phénols,... (**Binet et Brunel, 1986**).

I-3- Méthodes d'extraction des extraits végétaux

L'extraction est une opération qui consiste à séparer certains composés d'un organisme (animal ou végétal) selon diverses techniques, (**AFNOR, 2000**). Cette phase d'extraction de molécules organiques est primordiale dans les domaines de la chimie thérapeutique. Il existe plusieurs méthodes d'extraction dont certaines ont été développées par les artisans parfumeurs bien avant l'essor de la chimie moderne. Le procédé adéquat pour l'extraction des huiles essentielles dépend de la partie de la plante qui contient le produit volatil à extraire. Il faut en général choisir la technique la mieux adaptée parmi les trois les plus couramment utilisées : La macération, la décoction ou l'hydrodistillation.

I-3- 1- La Macération.

Elle consiste à tremper un corps dans un liquide adéquat pour en extraire les composés solubles. On peut extraire facilement des huiles essentielles de certaines plantes : Anis étoilé (80% d'anéthole et d'estragol), Cumin (Cuminaldéhyde), Cannelle.

I-3- 2- La Décoction.

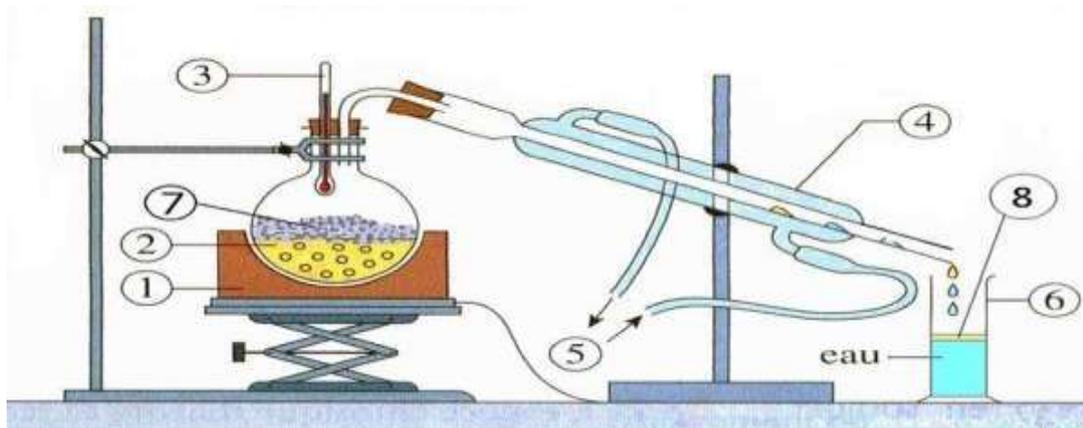
Elle consiste à placer une plante dans de l'eau et faire bouillir quelques temps pour extraire les composés solubles de la plante tel que l'eucalyptol des feuilles d'eucalyptus.

I-3- 3- Les méthodes classiques d'extraction

a)- Hydrodistillation :

L'Hydrodistillation est le procédé chimique le plus ancien, comme son nom l'indique, elle consiste à distiller un composé par entraînement à la vapeur d'eau et ne nécessite pas beaucoup de matériel. Elle est réalisée en 2 étapes, (Bachelot *et al.*, 2006).

La partie de la plante contenant la molécule à extraire est placée dans un ballon avec de l'eau. En chauffant, l'eau s'évapore entraînant avec elle les molécules aromatiques. En passant dans un réfrigérant, l'eau se condense, (fig.07) et il se forme 2 phases distinctes: l'hydrolat (eau florale) avec une densité élevée et la phase supérieure d'huile essentielle.



(1- Chauffe ballon; 2- Ballon; 3- Thermomètre; 4- Réfrigérant; 5- Entrée et sortie d'eau; 6- Erlenmeyer ; 7- Matière à extraire l'essence ; 8- Couche d'huile essentielle.)

Figure 07: Le dispositif expérimental de la technique d'hydrodistillation (Lucchesi, 2005)

b) – La distillation a la vapeur saturée : (fig.08)

Appelé aussi la distillation sèche, elle est utilisée pour la séparation des produits chimiques liquides contenus dans des matériaux solides. La plante est placée sur une grille perforée au dessus de la base de l'alambic, séparée de l'eau.

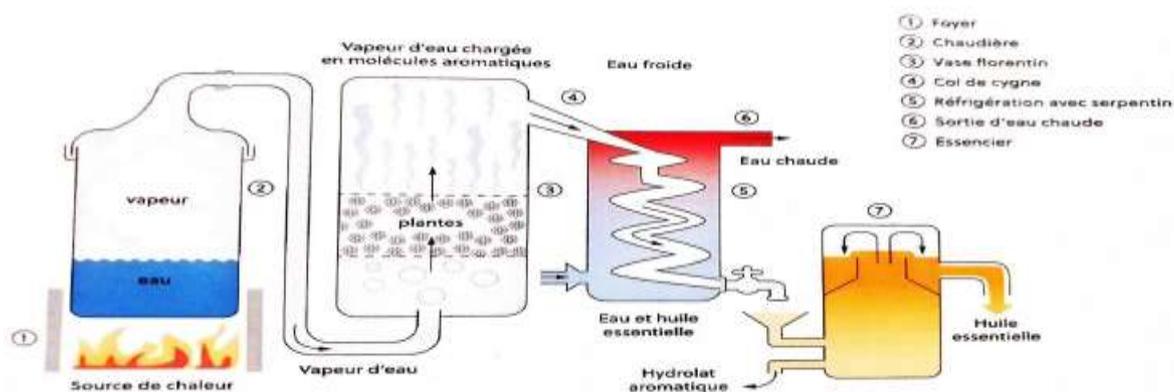


Figure 08: Procédé de l'entraînement à la vapeur d'eau (Couic-Marinier et Touboul, 2017).

La vapeur d'eau se dirige vers le haut pour faire éclater les cellules à essence et entraîne avec elle les molécules odorantes. La vapeur passe ensuite à travers un réfrigérant ou l'huile et l'eau se séparent, (**Padrini et Lucheroni, 1996; Lucchesi, 2005**).

c)- L'Hydrodiffusion :

Elle consiste à pulser la vapeur d'eau à faible pression (0.02-0.15 bar) à travers la masse végétale, du haut vers le bas. La composition du produit obtenu est qualitativement différente de celle des produits obtenus par les méthodes classiques, (**Brunetton, 1999**).

d) L'expression au solvant volatil :

En utilisant l'hexane ou le benzène comme solvant, suite à leur grand pouvoir de solubilisation et de leur volatilité, le matériel végétal, est placé dans des cuves appelées extracteurs avec solvant puis on effectue plusieurs lavages successifs. Le mélange est mis dans un décanteur pour obtenir deux phases: eau du végétal et le solvant avec les Huiles Essentielles, (**Bachelot et al., 2006**).

e) L'expression à froid: Le principe est basé sur la pression du contenu des sacs oléifères contenues dans l'écorce des fruits. C'est une méthode qui consiste à briser par pression les poches à essence (péricarpe du fruit) pour recueillir un mélange d'essences odorantes et d'eau. Peu coûteuse mais limitée aux agrumes, (**Lucchesi, 2005**).

f) L'enfleurage (à froid ou à chaud). (Fig.09).

L'enfleurage à froid tend à piquer des fleurs fraîches dans de la graisse qui absorbe les molécules odorantes. On remplace les fleurs pour gorger au maximum les graisses: C'est le défleurage. La graisse est ensuite lavée à l'alcool (**Bachelot et al, 2006**). Et l'enfleurage à chaud (ou digestion) consiste à faire fondre dans des marmites au bain-marie de la graisse à laquelle on ajoute les fleurs. Puis on filtre à travers des couches de tissus (lin et coton).



Figure 09 : Schéma du dispositif expérimental pour enfleurage a froid (Plaques de verre enduites de graisse)

I-3- 4- Les nouvelles méthodes d'extraction

a) L'extraction au CO₂ supercritique.

Le terme supercritique signifie que le CO₂, sous pression à 31°C, (75 bars à 30 °C) se trouve entre l'état liquide et l'état gazeux et il est capable de dissoudre des composés organiques. La matière végétale est chargée dans l'extracteur avec le CO₂ supercritique sous pression et réfrigéré. Le mélange est recueilli dans un vase à pression réduite. Le CO₂ s'évapore et il reste l'Huile, (Guignard, 2004; Bachelot et al, 2006).

b) La distillation fractionnée : Technique utilisée en parfumerie qui permet d'isoler les constituants d'une HE qui sont appelés isolats et qui peuvent être utilisés tel quel pour renforcer l'odeur ou transformé pour donner une nouvelle odeur, (Adam, 2005) comme Le linalol (extraits de la lavande), Le limonène(citron) et L'eugénol (clou de Girofle).

c) Extraction assistée par micro-onde : Le procédé d'extraction est basé sur l'absorption de l'énergie de la micro-onde par les composantes du matériel végétal et qui sont mesurées par une constante diélectrique, cette absorption dépend de la fréquence de l'onde et de la température du matériel végétal, (Guignard, 2004).

Tableau 09: Rendement en HE de plantes médicinales utilisées (Eberhard et al, 2005)

Plantes	Rendement (% du PF)	Plantes	Rendement (% du PF)
Lavande officinale	0,5 à 0,85	Thym vulgaire	0,15 à 2,25
Sauge officinale	0,3 à 0,35	Romarin	0.80 à 3
Sauge sclarée	0,1 à 0,18	Menthe pouliot	1 à 3

En conclusion, il faut savoir que le choix d'une technique d'extraction des extraits végétaux des plantes aromatiques doit être adapté aux composés spécifiquement recherchés. Chacune d'elles étant sélective, l'option dépend du type de produit souhaité.

Chapitre IV:

L'Analyse phytochimique des extraits végétaux

La **phytochimie**, ou chimie des végétaux, est la science qui étudie la structure, les méthodes d'analyse, de purification et d'extraction des substances naturelles issues des plantes. Les végétaux sont des organismes autotrophes qui peuvent synthétiser un grand nombre de molécules organiques complexes qui n'interviennent pas dans le métabolisme de base (**énergétique, structure, croissance et entretien**). Ces molécules qui constituent **le métabolisme secondaire** sont toutefois utiles aux plantes elles-mêmes et aux consommateurs des chaînes alimentaires pour diverses raisons.

En effet, l'utilisation des plantes, à des fins thérapeutiques, est rapportée dans les littératures antiques arabe, chinoise, égyptienne, hindou, grecque, romaine. De même qu'en Afrique, le pouvoir thérapeutique des plantes est connu depuis nos ancêtres mais ils ignoraient la composition chimique des médicaments utilisés et pour améliorer cette médecine traditionnelle, plusieurs investigations phytochimiques sont faites pour une justification scientifique quant à l'utilisation populaire de ces plantes médicinales. (N'guessan et al, 2009)

I-4-1- Le Screening phytochimique :

Il met en évidence la présence des familles de molécules actives, c'est une étude qualitative utilisée pour connaître la composition chimique globale des extraits végétaux, (Kumar et al, 2010).

a- Les Saponosides: Leur présence est déterminée par la présence ou non de mousse persistante. Deux ml de l'extrait sont mis dans un tube à essai fermé, ensuite bien agiter verticalement pendant 30 sec et laisser reposer 15min. (Kumar et al, 2010).

b- Les Coumarines: Les tubes des extraits sont recouverts avec du papier imbibé de NaOH dilué et sont portés à ébullition. Toute fluorescence jaune témoigne de la présence de coumarines après examen sous UV à 365 nm.

c- Les Tanins (hydrolysables): L'ajout de quelques gouttes de FeCl_3 à 1% permet de détecter la présence ou non de tanins. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques.

d- Les Proanthocyanidols (tanins condensés): A 2 ml d infusé sont additionnés 2 ml de HCl concentré puis laissé pendant cinq minutes dans un bain-marie bouillant. Enfin, l'apparition d'une coloration rouge indique une réaction positive. (**Kumar et al, 2010**).

e- Les Flavonoïdes: Quelques gouttes d' HCl concentré en présence de trois ou quatre tournures de magnésium. Le changement de coloration est observé: virage au rouge (flavones), virage au rouge pourpre (flavonols), rouge violacée (flavanones et flavanols).

f- Les Stéroïdes et les Triterpènes: Test de Libermann-Burschard: additionner trois gouttes d'anhydride acétique puis agiter. Ajouter une goutte de H₂SO₄ concentré. Le changement de coloration est observé pendant une heure: une coloration bleu-vert indique la ésence de stéroïdes tandis que rouge-violet à rose dénote la présence de triterpènes. (**Amarti et al., 2008**).

g- Les Alcaloïdes : Mettre quelques gouttes du réactif de Dragendorff dans un tube à essai contenant l'extrait; si la couleur change au marron foncé cela met en évidence l'existence des alcaloïdes. (**Willem, 2004**).

I-4-2- Quelques méthodes de dosage

a) Dosage des phénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits a été déterminée par la méthode de Folin–Ciocalteu (**Singleton et Rossi, 1965**) décrite par **Li et al. (2007)**. 200ml d'extrait est mélangée avec 1ml du réactif Folin–Ciocalteu préparé (10 fois dilué) et 0,8ml de carbonate de sodium à 7,5%. L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 30 minutes et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 765nm. Les résultats sont exprimés en **mg eq/g** d'acide gallique par g de matière végétale sèche.

b) Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits est déterminée selon la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (**Kim et al., 2003**). 100ml d'extrait est mélangée avec 0,4ml d'eau distillée et par la suite avec 0,03ml d'une solution de nitrite de sodium NaNO₂ à 5%. Après 5min, 0,02ml d'une solution d'AlCl₃ à 10% a été ajouté. On additionne au mélange 0,2ml de solution de Na₂ CO₃ 1M et 0,25ml d'eau distillée. L'ensemble est vortexé et l'absorbance est à 510 nm. Les résultats sont exprimés en **mg EQ/g** de catéchine par g de matière végétale sèche. (**Kumar et al, 2010**).

c) Dosage des tanins

La teneur en tanins des extraits aqueux et méthanolique est déterminée suivant la méthode décrite par **Gharzouli et al, (1999)**. Un volume de sang hémolysé est mélangé avec un volume d'échantillon (extraits ou acide tannique). Le mélange réagit pendant 20 min à T° ambiante, puis centrifugé à 4000 r/mn pendant 10min à 4°C. La lecture du surnageant est à 576 nm contre l'eau distillée. Une gamme d'étalonnage avec l'acide tannique (100 à 550µg/ml). La teneur en tanins est en **µg Eq** d'acide tannique par mg d'extrait. **Taux de précipitation (%) = [(Ac-At)/Ac] x 100**

I-4-3- Le profil spectrophotométrique

Le spectre d'absorption UV-visible décrit la variation de l'absorbance (A) en fonction de la longueur d'onde l. Le coefficient d'extinction ε pour un composé donné varie en fonction des longueurs d'onde. Un composé est caractérisé par sa longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{\max}), son coefficient d'extinction à la λ_{\max} et son spectre d'absorption. Le profil spectrophotométrique est la composition chimique globale des extraits végétaux (présence des familles de molécules actives), (**Kumar et al., 2010**). La technique est un balayage par spectrophotomètre UV-vis Shimadzu (UV-2401PC) équipé de cuves de quartz de 1cm et relié à un ordinateur; les spectres sont enregistrés contre un blanc (eau distillée); les extraits aqueux sont dilués dans de l'eau distillée au 1/10 ème, (**Benzeggouta, 2015**). La **chromatographie** par HPLC dès les années 1990, est une technique de séparation analytique de molécules présentes dans un mélange. Cela permet d'adapter les méthodes chromatographiques usuelles sur un montage haute pression.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (en anglais Gas chromatography-mass spectrometry ou GC-MS) est une technique d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse, pour la séparation des composés d'un échantillon, et de la spectrométrie de masse, pour la détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport masse sur charge. **(Fig.10)**. Cette technique permet d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances présentes en très petites quantités. Ainsi le couplage CPG-SM permet de disposer d'un outil analytique très performant.

La SM en mode impact électronique (SM-IE) est la technique la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles pour connaître la masse moléculaire. Dans la source d'ionisation, les molécules peuvent être bombardées à l'aide d'électrons générés par l'incandescence d'un filament de tungstène, conduisant ainsi à la formation des ions en phase gazeuse. **Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil dont il existe plusieurs types, dont le « quadripôle » et le « piège à ions » (Marouf et Tremblin, 2015).**

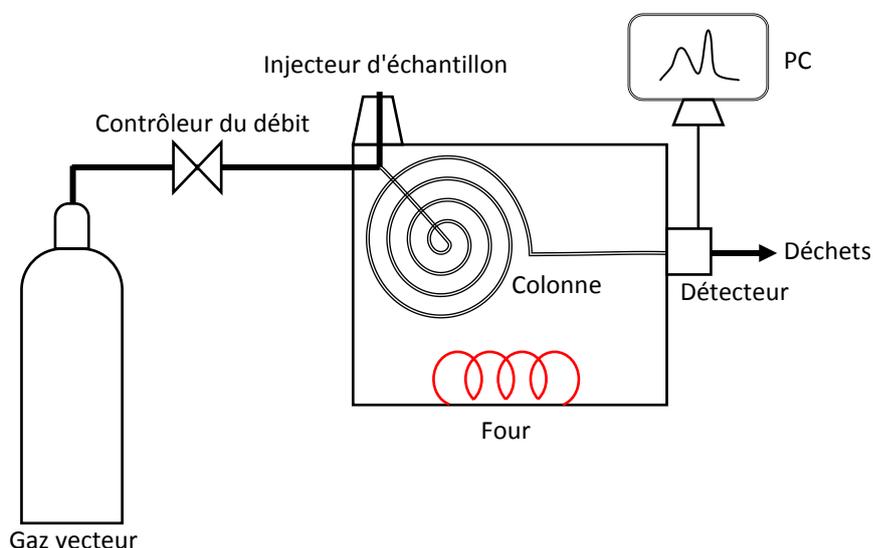


Figure 10: Schéma simplifié de différents modules du chromatographe en phase gazeuse (le couplage CPG-SM) (Marouf et Tremblin, 2015).

Deuxième partie

Partie Expérimentale

Matériel et Méthodes



Introduction:

Le but de ce travail est la valorisation de certaines plantes aromatiques et médicinales (PAM) locales dans la lutte contre les bioagresseurs des cultures et les ravageurs des semences stockées d'une part et d'autre part, remplacer les pesticides chimiques par des pesticides naturelles qui préservent l'environnement. L'étude débute par la récolte des plantes (mois de septembre) puis l'extraction des substances naturelles (extraits végétaux et huile essentielle), ensuite leur analyse phytochimique et enfin les tests d'efficacité pour l'évaluation de leurs propriétés antibactériennes, antifongiques et antioxydantes. (Fig.11)

Les matériels utilisés dans ce travail sont de trois ordres : (1) matériel végétal, constitué de trois espèces végétales locales à savoir le Thym (*Thymus vulgaris*), l'Ortie (*Urtica dioica*) et l'écorce du fruit du Grenadier (*Punica granatum*) qui sont des plantes originaires d'Afrique du Nord, (Quezel et Santa, 1963); (2) matériel biologique constitué de souches fongique et bactérienne phytopathogènes et (3) des équipements de laboratoire.

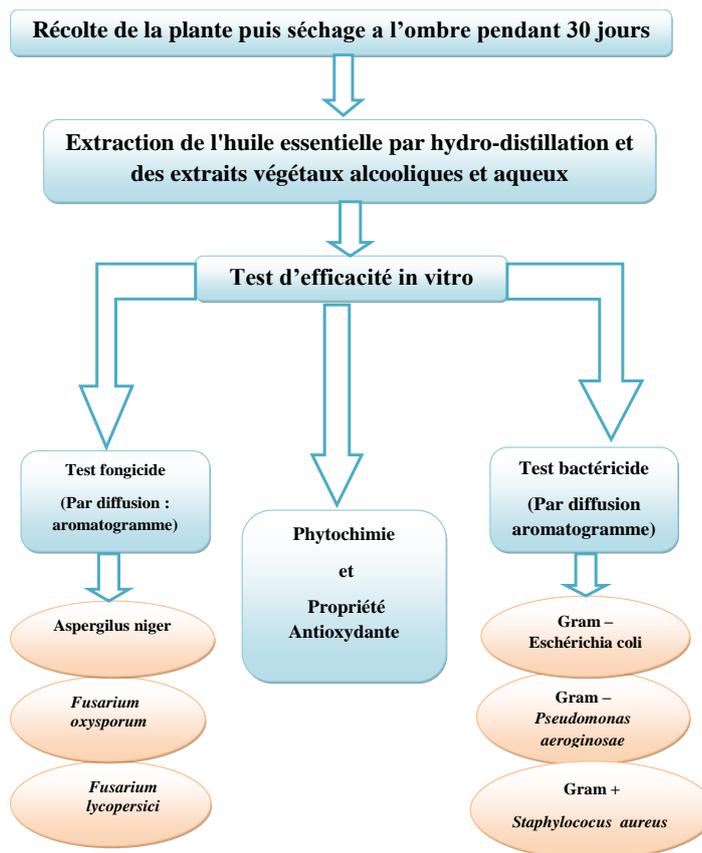


Figure 11: Organigramme des étapes suivies durant le protocole expérimental

2-1- Le matériel végétal utilisé:

A. Le thym (*Thymus vulgaris* L.) (Figure 12)

La plante étudiée a été choisie en fonction de son emploi très fréquent en Algérie. Le nom thym proviendrait aussi bien du latin *Thymus* (courage) que du grec *Thymus* (parfum) et elle a été récoltée au lieu dit Tidda (Latitude $35^{\circ}34'44.5''\text{N}$ et longitude $1^{\circ}15'45.4''\text{E}$; Altitude 440m (Daïra de Oued Lili, W. de Tiaret).

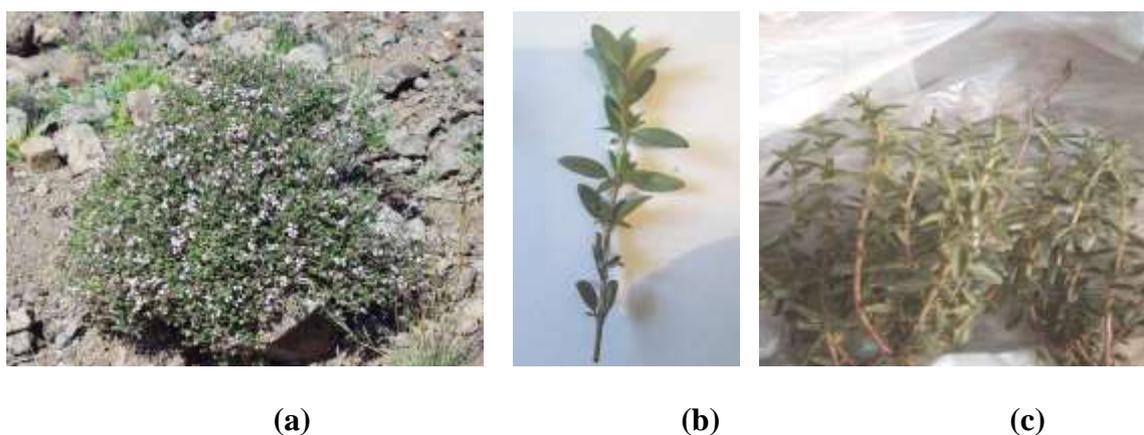


Figure 12 : Photo de la plante (a), feuilles (b) et de Tiges (c) du Thym (original)

a) **Description botanique** : *Thymus vulgaris*, est un sous arbrisseau, vivace, touffu et très aromatique de 7-30 cm de hauteur de couleur vert grisâtre. A tige ligneuse, feuilles petites blanchâtres sur face inférieure, ovales, à pétiole court. A fleurs sont roses ou blanches avec floraison en mai-juin. (Bonnier et Douin, 1990; Amarti et al, 2008).

b) Classification :

Règne : Plantae	S / règne : Tracheobionta	Division : Magnoliophyta
Classe : Magnoliopsida	S / Classe : Asterdae	Ordre : Lamiales
Famille : Lamiaceae	Genre : <i>Thymus</i>	Espèce : <i>Thymus vulgaris</i> L.

c) Distribution géographique :

Le thym est une plante originaire de l'ouest des régions méditerranéennes et du sud d'Europe (Takeuchi *et al*, 2004). Le thym commun préfère un sol légèrement acide, bien drainé et rocailleux (calcaire), en plein soleil et au sec.

Mais il se développe aussi sur sol alcalin filtrant, léger (sableux), peu humide et frais.

d) Propriétés du thym :

- Antiseptique, désinfectant dermique, vermifuge (**Bazylko et Strzelecka, 2007**)
- Propriétés antivirales, antifongiques, antibactériennes (**Jiminez-Arellanes et al, 2006**)
- Propriétés antioxydantes (**Takeuchi et al, 2004 ; Selmi et Sadok , 2008.**)

Avec les principes actifs du thym :

- **Les acides phénoliques** : acide caféique, acide rosmarinique (**Takeuchi et al, 2004**)
- **Les flavonoïdes** : hespéridine, eriotrécine, lutéoline (**Bazylko et Strzelecka, 2007**)
- **Les polyphénols** : tanin .

B. Le grenadier (*Punica granatum L.*) (Figure 13)a) Description botanique :

Punica vient de puniceus qui signifie rouge écarlate en latin et granatum pour la multiplicité des graines contenues dans le fruit. Une espèce qui appartient à la famille de Punicaceae. Arbre ou arbuste buissonnant de 2 à 5 m de hauteur au feuillage caduc. Il croît dans toute la région méditerranéenne, de façon spontanée ou cultivée;

b) Classification : Classification botanique du grenadier (**Navarro et al., 2011**)

Embranchement:	spermaphytes
Sous-embranchement:	Angiospermes
Classe:	Magnoliopsida
Ordre:	Myrtales
Famille :	Punicaceae (Lythraceae)
Genre:	<i>Punica</i>
Espèce:	<i>Punica granatum.L</i>

c) Distribution géographique :

Le grenadier est originaire du nord de l'Iran et de l'Afghanistan où il couvre de grandes étendues à l'état spontané depuis 4000 ans. On le retrouve aussi sur des bas reliefs égyptiens datant de 2500 ans avant le Christ (**Navarro et al., 2011**). Actuellement, les principaux pays de culture du grenadier sont l'Iran, l'Afghanistan, la Turquie et autour du Bassin Méditerranéen (Espagne, Italie, Grèce et Maroc). En Algérie, il fut introduit par les

Phéniciens et les centres de culture sont en Oranie (**Mostaganem (186 261 Qx)**, Relizane (90 565 Qx). (DSA, 2018) et la Mitidja.



Figure 13 : Photo du fruit et de la fleur (a), de la plante (b) et de l'écorce de la grenade (c)

d) Propriétés du grenadier:

Le fruit du grenadier (aussi les feuilles, l'écorce et les graines) est riche en composés phénoliques (Afaq, et al, 2005). Cette composition lui a attribué plusieurs propriétés aussi bien dans le domaine médical telles que des propriétés antidiabétiques [Jafri, et al, 2000] anti-microbiennes (Braga, et al., 2005) et anticancérigènes (Sarfaraz, et al., 2005) que dans le domaine agroalimentaire telles que des propriétés antioxydantes et antimicrobienne contre la détérioration des produits alimentaires (Navarro, et al., 2011).

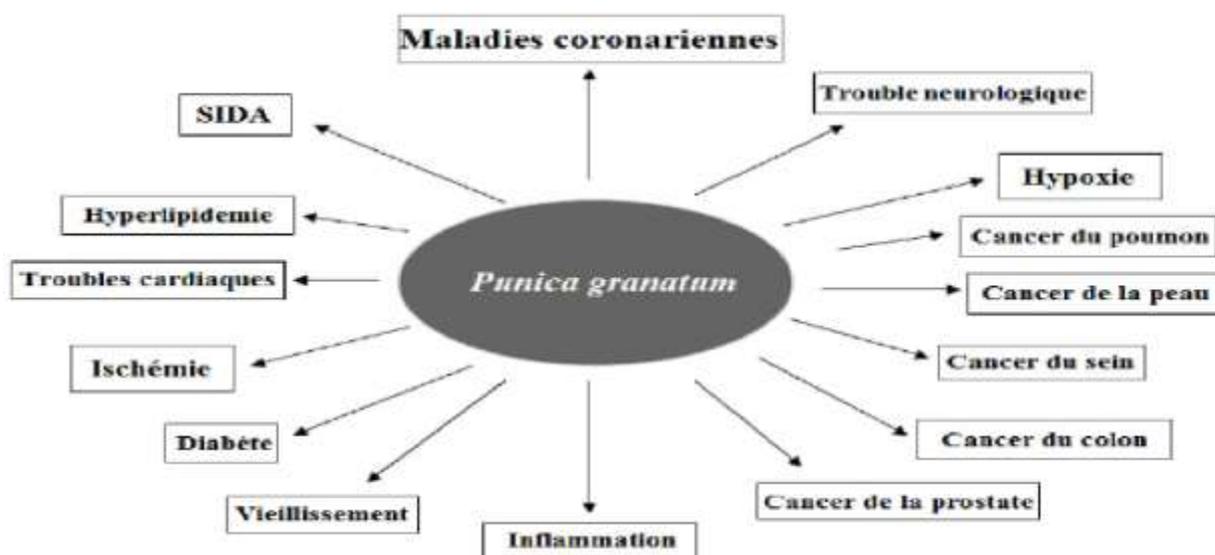


Figure 14: Maladies traitées par *Punica granatum* (Seeram et al., 2006)

Cela justifie son utilisation comme agent de conservation naturel car actuellement, on tend à substituer les agents chimiques ayant une activité anti-microbiologique et

antioxydante par des agents naturels présents dans les fruits, les légumes et les herbes aromatiques (Ayala-Zavala, et al., 2008; Lairini et al., 2014) .

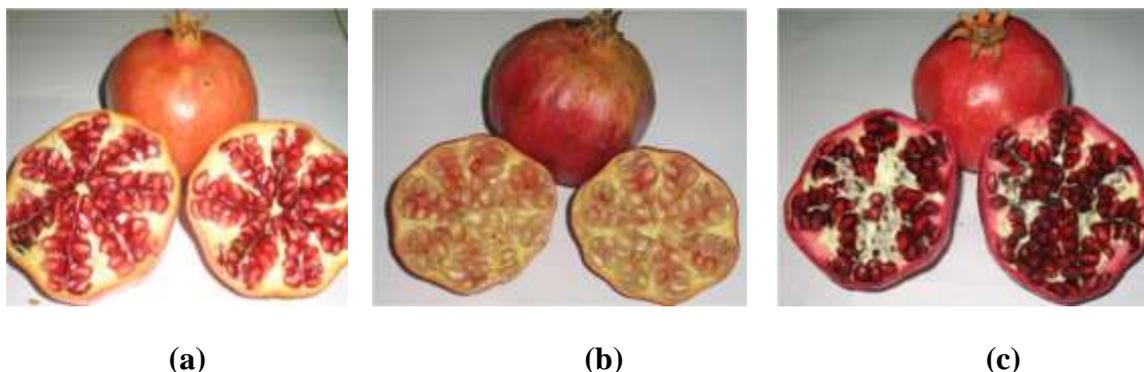


Figure 15: Photo de la coupe transversale du fruit du grenadier variété **Sefri** (a), variété **Kabylie** (b) et variété **Wonderful** (c) (Hmid, 2013).

En Algérie, deux variétés sont très répandues: **la variété "Kabylie" et la variété "Sefri"** (Fig.14) utilisées dans notre travail et qui sont à Gros fruit jaune (500g) et graine demi-tendre rose clair, juteuse et sucrée avec une Maturité en début octobre. Elle provient des vergers de Mostaganem -lieu dit "Willis" ($36^{\circ}07'08.2''N$ et $0^{\circ}16'11.3''E$; Alt.103m).

C. L'Ortie dioïque, (*Urtica dioica* L.) : (Fig. 15):

La plante étudiée a été choisit sur la base de ses multiples bienfaits et de son abondance en Algérie. L'Ortie dioïque, genre *Urtica*, espèce *dioica*, (du latin uro ou urere = « celle qui brûle », *dioica* = fleurs mâles et fleurs femelles sur des pieds séparés), (Delahaye, 2015) appartient a la famille des Urticacées qui compte environ 50 genres et 700 espèces. Elle a été récoltée à 05Km à l'ouest de Tiaret (vers la commune de Bouchékif) près de la station d'épuration (Latitude $35^{\circ}21'31.3''N$ et longitude $1^{\circ}23'39.2''E$; Altitude 944m. (Fig. 16):

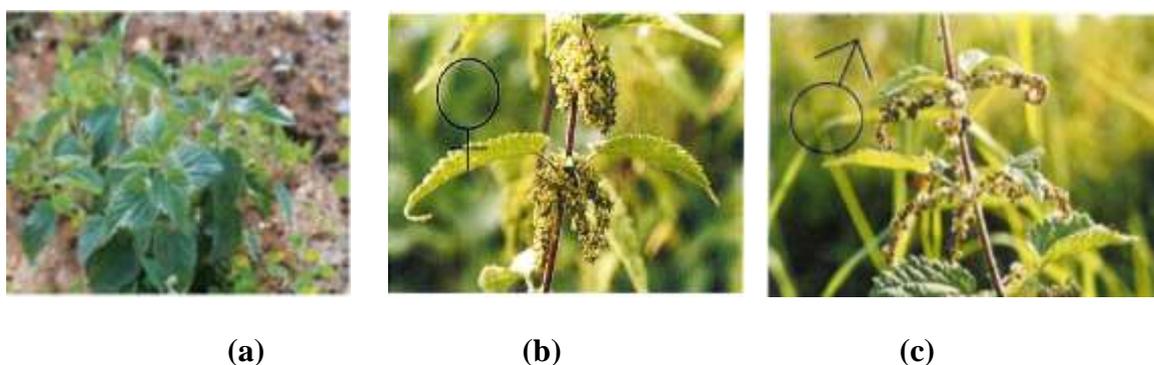


Figure 16: L'ortie dioïque: photo parties aériennes (a), fleurs femelles en grappes pendantes (b) et (c) fleurs mâles en épi ou en chatons, (Draghi, 2005; Fontaine, 2010).

a) Description botanique :

L'ortie dioïque est une plante herbacée vivace, vigoureuse et sa taille peut atteindre un mètre. Les feuilles vertes sont opposées, pétiolées, stipulées, dentées et velues sur les deux faces. Les tiges sont quadrangulaires et portent des poils urticants, (**Fontaine, 2010**). On distingue les Urticacées à poils urticants (genre *Urtica*) ou sans (genre *Parietaria*) (**Ghedira et al., 2009**).

b) Classification : Selon **Quezel et Santa (1963)**, *Urtica dioica* L. appartient au:

- **Règne:** Plantae (plantes).
- **Sous-règne:** Tracheobionta (plantes vasculaires).
- **Embranchement:** Magnoliophyta (phanérogames).
- **Sous-embranchement :** Magnoliophytina (angiospermes).
- **Classe:** Rosidaeae.
- **Ordre:** Rosales.
- **Famille:** Urticaceae.; **Genre:** *Urtica* L.; **Genre espèce:** *Urtica dioica* L.

c) Distribution géographique :

L'ortie pousse dans les régions tempérées du monde. Les jeunes pousses sont récoltées au printemps. Aujourd'hui, elle est naturalisée sur tous les continents où il y a des zones tempérées. Préférant un sol riche en azote et sa floraison, se produit de juin à septembre. Elle colonise volontiers les abords des lieux habités qui sont négligés (**Poirier, 2005; Langlade, 2010; Bhuwan et al. 2014**).

d) Propriétés de L'ortie dioïque:

Aussi, les différentes parties des orties sont indiquées en thérapie traditionnelle, contre l'anémie, le rhumatisme, l'eczéma, la rhinite allergique et rhumatoïde et les racines, en particulier sont utilisées pour le traitement de l'hyperplasie bénigne de la prostate et contre la lithiase. En Turquie, les populations utilisent l'ortie brûlante pour le traitement des maladies gastro-intestinales, le diabète et problèmes rénaux. De plus, l'extrait éthanolique de la partie aérienne d'*Urtica urens* possède une activité anti-inflammatoire significative (**Marrassini et al., 2010**). Au Maroc, les graines d'ortie à pilule (zerrîat-l-hurrîga) sont utilisées, trempées dans du lait contre la toux, le calcul rénal, l'oligurie et comme galactogène et mélangées à de l'huile d'olive, ils sont employées sur le corps contre la gale et le prurit (**Belakhdar, 1997**).

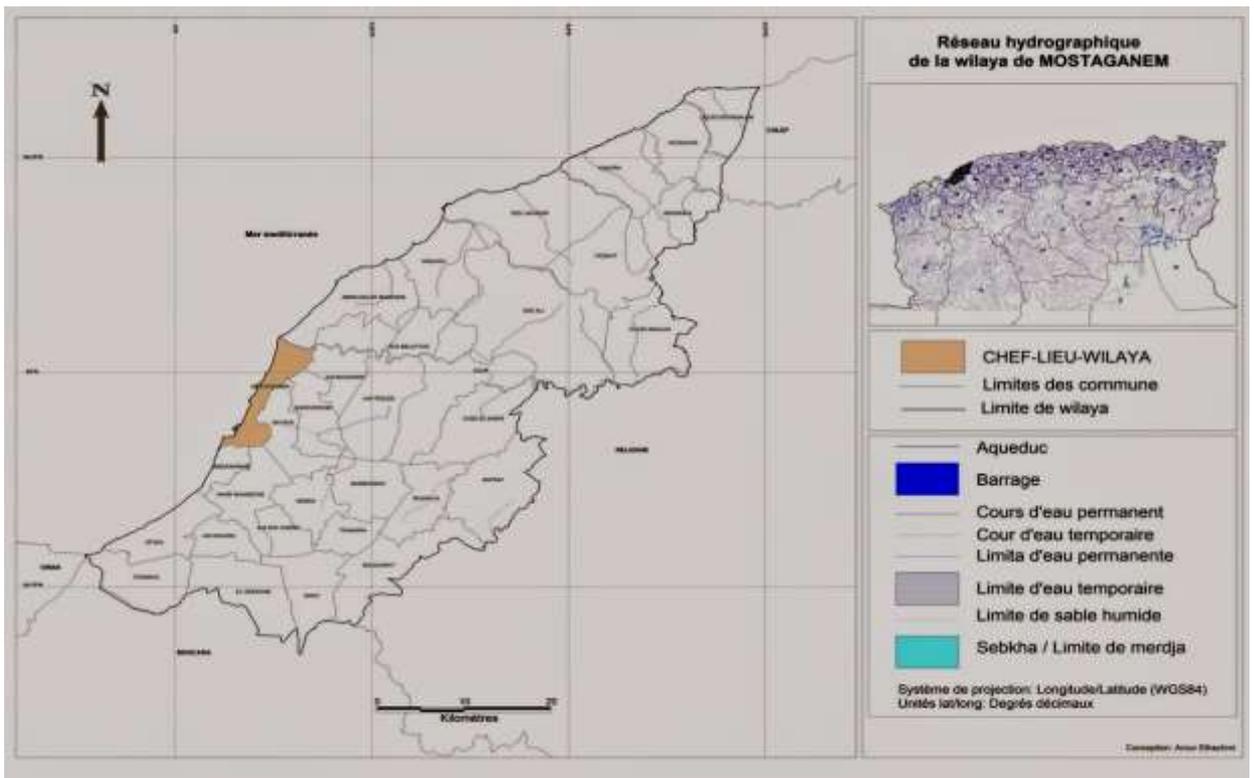
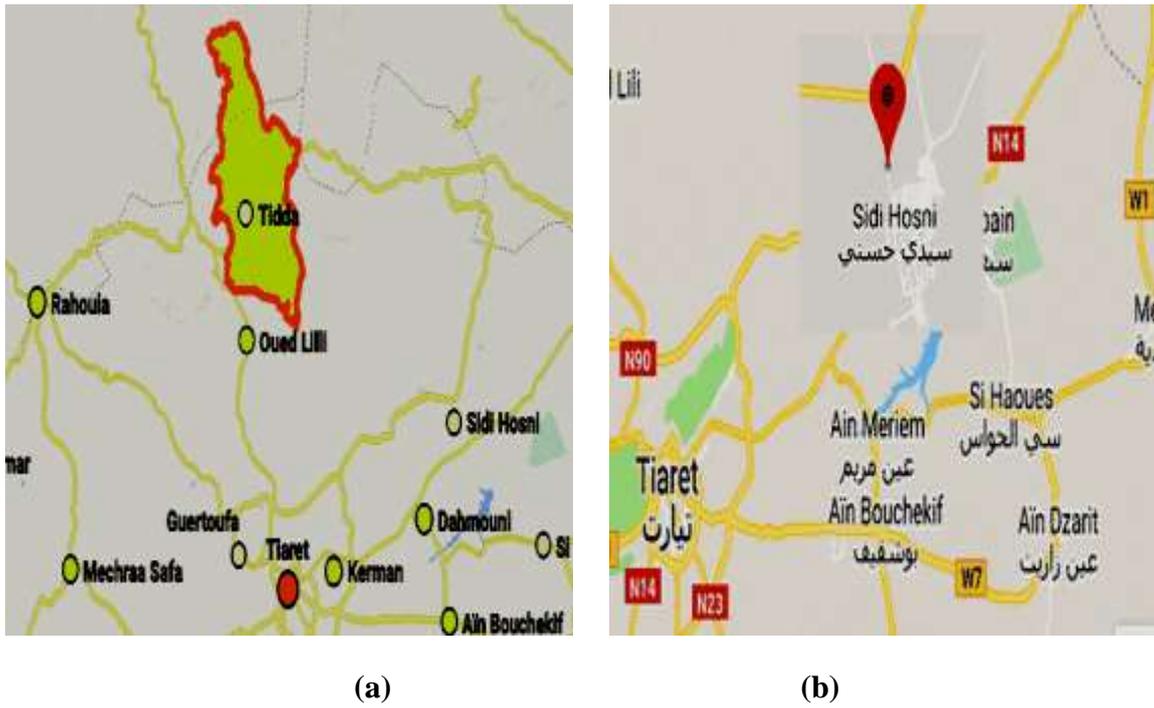


Figure 17: Zone géographique de récolte du matériel végétal: le Thym (a) [Tidda - Daïra de Oued Lili, W. de Tiaret], l'Ortie (b) [commune de Bouchékif, près de la station d'épuration,W. de Tiaret], le Grenadier (c) [lieu dit "Willis" Abdelmalek Ramdane (36°07'08.2"N et 0°16'11.3"E; Alt.103m, W. de Mostaganem)

2-2- Extraction des extraits végétaux

L'extraction a été réalisée au niveau des laboratoires de physiologie végétale et de technologie alimentaire de la Faculté des sciences de la Nature et de Vie de l'université Ibn khaldoun de Tiaret

- Extraction de l'huile essentielle; par hydro-distillation (dispositif de type **Clevenger**);
- Extrait aqueux et alcoolique : par Décoction, Macération ...
- Calcul du rendement: $Rdt \% = \frac{m_2 \cdot 100}{m_1}$ [masse végétal sec (m_1); masse HE (m_2)

2-2- 1- Extraction de l'huile essentielle du Thym: Par hydrodistillation

Dans un ballon en verre, on met 100g de matière végétale séchée et broyer avec 700 à 900 ml d'eau distillée. Puis, l'eau contenu dans le ballon est portée à ébullition, les vapeurs chargées de l'huile essentielle passe dans le rotavapeur (réfrigérant) et ce condense dans un récipient appelé "Essencier". On obtient ainsi 2 phases bien distinctes où l'huile surnage l'eau. Cette solution est mise dans une ampoule à décanter ou les deux phases se séparent suite à la différence de densité.

Les huiles obtenues sont conservées dans des tubes à essai recouverts de papier aluminium pour les protéger de la lumière et sont tenu au frais à une température de 4°C (Selmi et Sadok, 2008). (Fig.18). Le rendement d'extraction exprimé en pourcentage est le rapport entre le poids de l'huile essentielle et le poids de la matière végétale traitée, calculé par la formule de Carré, (1938)

$$R_{HE} (\%) = \frac{P_{HE}}{P_F} \times 100$$

Avec : P_{HE} : Poids de l'huile en g; P_F : Poids des feuilles sèches (g); $R_{HE} (\%)$: Rdt H.E.



Figure 18: dispositifs expérimentaux de l'hydrodistillation (extraction de l'HE). (Original)

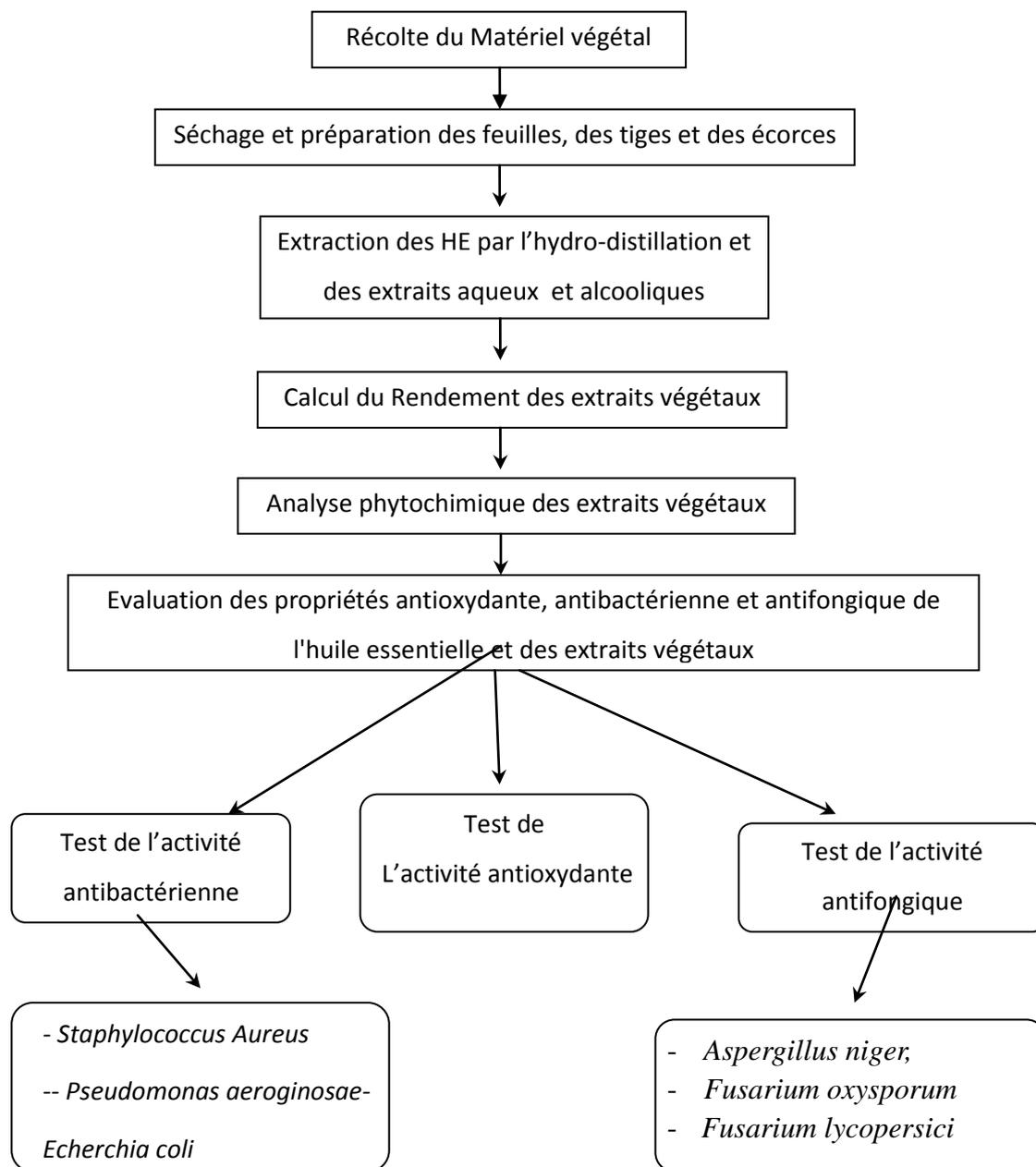
2-2-2- Extraction des extraits végétaux des feuilles d'Ortie (*Urtica dioica*) (Fig. 19)

Figure 19 : Organigramme des étapes d'étude des propriétés de l'huile essentielle du Thym des extraits végétaux de l'Ortie et de l'écorce de la Grenade

▪ **Récolte:**

De Février à Mai 2017, une prospection puis une récolte de l'ortie a été faite dans la région de Boucekif (à 10Km au sud de la ville de Tiaret) près de la station d'incinération des décharges ménagères.

▪ Séchage et broyage:

A température ambiante dans un endroit sec et à l'ombre pendant plusieurs jours (pour conserver les molécules sensibles à la chaleur de la lumière) puis broyage finement à l'aide d'un broyeur de graines et de paille de céréales (type FRITSCH, Germany).

Le broyage et tamisage de la plante nous donne une Poudre qui présente une plus grande surface de contact avec l'eau, permettant d'améliorer le rendement à l'extraction.



Figure 20: Etapes de préparation de l'extrait aqueux: plante séchée (a), poudre végétale (b), mélange poudre végétale + eau distillée (c) agitation magnétique du mélange (d)
(Original)

L'extraction a été réalisée au niveau des laboratoires de physiologie végétale et d'Ecologie de la faculté SNV de l'université Ibn Khaldoun de Tiaret

Préparation de l'extrait méthanolique: (Fig. 21)

L'extraction a été faite selon le protocole de **Matkowski et Piotrowska, (2006)** amélioré : 20g de poudre de feuille et de tige de la plante a été macérée dans 200ml de méthanol (solution hydro alcoolique: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}; 70/30; \text{V}/\text{V}$) a température ambiante sous agitation magnétique de 24H à 48H.

L'extrait méthanolique est filtré à l'aide de papier filtre ($0.5\mu\text{m}$). Puis, le filtrat est concentré au Rotavapor (type Buchi Rotavapeur R-210) à 40°C - 50°C pendant 30 mn pour éliminer le méthanol, permettant ainsi d'obtenir un résidu sec qui est conservé dans un récipient à l'ombre à 4°C jusqu'à son utilisation, (**Falleh et al., 2008**), sur les souches bactériennes et fongiques sélectionnées.

Par ailleurs, le rendement en g d'extrait par rapport à la masse du matériel végétal à traiter est calculé selon la formule: $Rdt = m / m^{\circ} \cdot 100$

- Rdt de l'extrait brut en %;
- m: masse de l'extrait brut obtenu en g;
- m°: masse du matériel végétal en g)

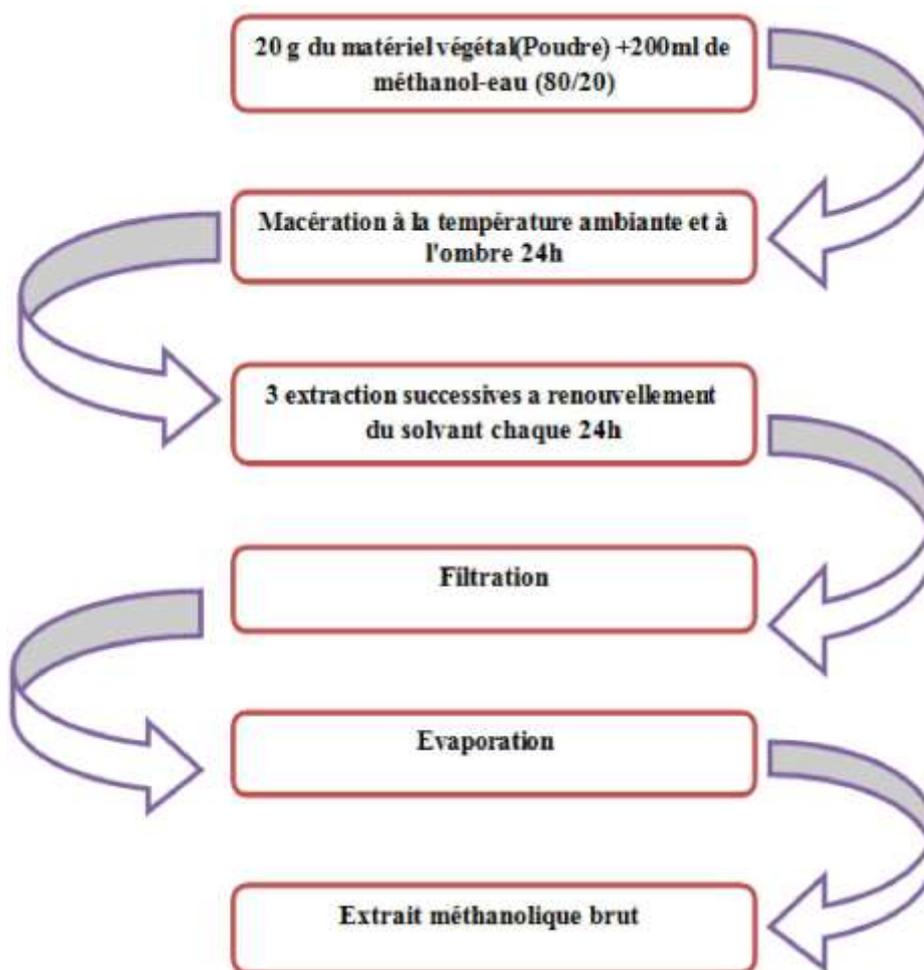


Figure 21. Protocole de préparation d'extrait méthanolique par macération

2-2-3-Extraction d'extraits végétaux d'Ecorce de Grenade (*Punica granatum*) (Fig. 22)

Ainsi pour valoriser l'écorce de fruit du grenadier (Etude des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes), on a procédé à la collecte de l'écorce du fruit de *Punica granatum* au mois de Novembre puis séchée et broyée. La poudre obtenue est conservée à l'abri de l'humidité et de la lumière. La préparation de l'extrait aqueux de l'écorce de *Punica granatum* a été effectuée par la méthode d'infusion.

Comme pour l'extrait méthanolique, on a suivi les mêmes étapes pour les extraits éthanolique et aqueux à savoir: filtré à l'aide de papier filtre (0.5µm). Puis, évaporation au Rotavapor (type Büchi Rotavapeur R-210) à 40°C- 60°C pendant 30 mn pour éliminer l'éthanol, permettant l'obtention du résidu sec conservé à l'ombre à 4°C jusqu'à son utilisation. (Chevallier, 2001).

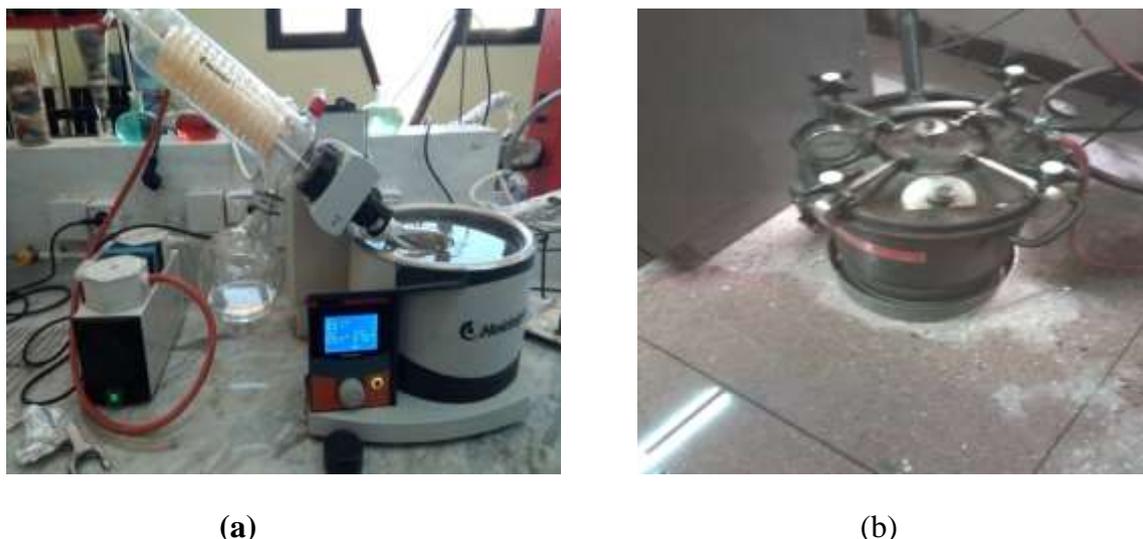


Figure 22. Photographies de l'évaporateur rotatif (type Büchi Rotavapor R- 200) (a) et de l'autoclave (stérilisateur) (b) (Original)

2-3- Le Matériel microbiologique:

Pour démontrer l'activité antibactérienne on a opté pour trois souches Bactéries de référence du laboratoire IPA d'Alger: (Tab.10)

- bactérie Gram négatif : *Echerchia coli* (ATCC : 10536)
- bactérie Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosae* (ATCC : 27853)
- bactérie Gram positif : *Staphylococcus aureus* (ATCC : 25922)

Trois souches fongiques obtenues auprès du labo de phytopathologie, faculté de Biologie de l'université Senia, Oran 1 ABB, qui sont maintenues en milieu PDA (Potato Dextrose Agar) et qui sont :

- *Aspergillus niger* (MNHN 963917),
- *Fusarium oxysporum solani*
- *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*
-

Tableau 10 : Caractéristiques des souches de *Fusarium* testées sur milieu PDA.

Genre, espèce et forme	type de colonie	Pigmentation de la colonie	Tissu végétal
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	Cotonneux rosâtre	Rose sombre	Tige
<i>Fusarium oxysporum solani</i>	Duveteux blanchâtre	Beige	Tige
<i>Aspergillus niger</i>	Duveteux sombre	Sombre	Bulbe d'oignon

2-4- Le Matériel de laboratoire (Les Réactifs)

a) Les réactifs chimiques utilisés dans cette étude sont :

- Le DPPH : 2,2'-diphényl-1-picryl hydrazyl)
- Le DMSO, l'acide trichloracétique (TCA), EDTA, thiocyanate de K (KCN), FeCl₃,
- Le réactif de Folin-Ciocalteu, l'acide gallique, l'acide tannique, la quercétine...
- Ferrosine [3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1, 2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid sodium salt],
β-carotène, Tween 20, Tween 40,

b) Les Solutions de travail

- L'acide gallique (200 µg/ml): préparé dans l'eau distillée.
- Carbonate de sodium Na₂ CO₃ (7,5 %) : préparé dans l'eau distillée.
- Réactif de Folin : dilué au 1/10 avec de l'eau distillée.
- La Quercétine (100 µg/ml) : préparée dans le méthanol.
- L'Acide tannique (2mg/ml) : préparé dans le méthanol.
- Solution de DPPH (0,1mM): préparée dans l'éthanol.
- EDTA (100 µg/ml) : préparé dans l'eau distillée.
- Thiocyanate de potassium (30%) : préparé dans l'eau distillée.
- FeCl₃ (0,1%) : préparé dans l'eau distillée.
- TCA (10%) : préparé dans le tampon PBS (0.2M, pH 6,6).

2-5- Etude des activités biologiques (Test d'efficacité des extraits végétaux)

La méthode de diffusion utilisée en microbiologie (antibiogramme et antifongigramme), repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide. Cela consiste à mettre la substance inhibitrice dans un puits tracé sur la gélose inoculée par la souche cible au préalable. La substance inhibitrice diffuse dans le milieu en provoquant un gradient de concentration décroissant autour du puits. Ainsi, la bactérie ou l'organisme fongique se développera si la concentration en antibiotique est inférieure à la concentration minimale inhibitrice d'où l'apparition d'une zone circulaire d'inhibition (halo) et, en fonction du diamètre d'inhibition, la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante, (Salehzadeh et al., 2014).

- Méthode de contact indirect aromatogramme

Les tests sont réalisés au niveau du laboratoire de microbiologie de la Faculté des sciences de la Nature et de Vie de l'université Ibn khaldoun.

L'étude de l'activité antibactérienne est réalisée *in vitro* selon la méthode aromatogramme, (Remmal, et al., 1993) qui se base sur le pouvoir migratoire des extraits végétaux sur la surface d'un milieu gélosé solide à base de Mueller-Hinton. La suspension bactérienne préparée à partir d'une culture jeune (18h), en milieu bouillon nutritif (BN), diluée dans de l'eau physiologique de manière à renfermer 10^8 germes/ml, est d'abord ensemencée en surface sur milieu gélosé en boîte de Pétri de 9 cm de diamètre. Puis, des disques en papier-filtre de 6 mm de diamètre sont imbibés d'huile essentielle pure à concentration de 20µl de chaque espèce sont déposés, sur un tapis bactérien sur milieu gélosé puis les boîtes de Pétri sont placées en étuve pour incubation de 72 h à 25°C.

Après incubation, un halo clair autour du disque, mesuré en mm (disque inclus) avec un pied à coulisse digital, indique l'inhibition du développement bactérien sous l'effet de l'extrait végétal (Fig.22). Chaque test est réalisé trois fois successives.

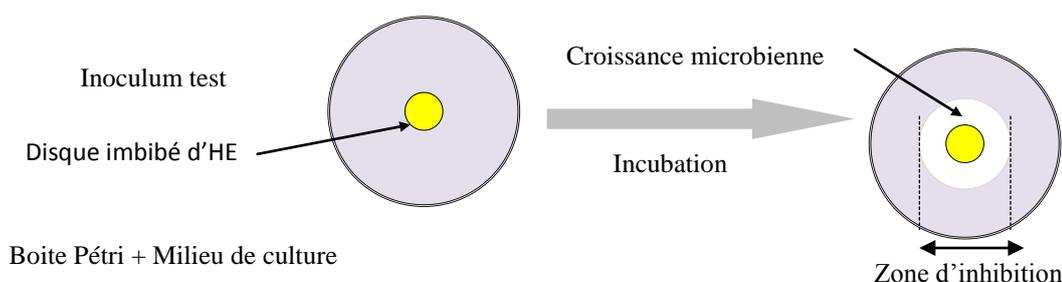


Figure 23 : Schémas de la méthode des aromatogrammes en boîte de Pétri.

2-5- 1- Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits:

Le test de susceptibilité est effectué selon la méthode de diffusion des disques décrite par **Parekh et Chanda, (2007)**. Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar réalisée dans une boîte de Pétri. Le contact se fait grâce à un disque en papier sur lequel on dépose l'extrait végétal. Pour démontrer l'activité antibactérienne on a opté pour trois souches de référence du laboratoire IPA d'Alger: bactérie Gram positif : *Staphylococcus aureus* (ATCC: 25923); bactérie Gram négatif: *Echerchia coli* (ATCC: 10536) et bactérie Gram négatif :*Pseudomonas aeroginosae* (ATCC : 27853).

a) Repiquage des espèces bactériennes :

Les souches bactériennes sont récupérées par la méthode des stries, puis incubées à 37°C afin d'obtenir des colonies isolées pour la préparation de l'inoculum. Une ou plusieurs colonies de chaque culture pure sont prélevées et transférées dans l'eau physiologique à une turbidité équivalente à 0,5 Mc Farland. (10^8 germes/ml),

b) Préparation de l'inoculum et des disques:

Des disques de 6mm de diamètre découpés sur papier Whatman n°1, stérilisés à 120°C pendant 15 min par autoclavage. A partir d'une culture pure de 18heures sur milieu gélosé et prélever à l'aide d'une anse stérile le somme de 3 à 5 colonies bien isolés et identiques puis décharger l'anse dans 5ml d'eau physiologique stérile à 0,9% et bien homogénéiser la suspension bactérienne.

Des témoins négatifs et positifs sont également utilisés (disques imprégnés d'eau distillée stérile et de solutions d'antibiotiques). Après incubation à 35°C pendant 24h, les zones d'inhibition formées autour des disques sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse digitale de marque "mututoyo" (**Dorman et al., 2000; Gupta et al., 2010**).

c) Préparation des milieux de culture et des extraits à tester :

Suivant un protocole standardisé selon l'OMS (**Rahal et al., 2003**). De la gélose de Muller Hinton stérile est coulée dans des boites de pétri stériles de 90mm de diamètre (l'épaisseur de la gélose de 4 mm répartie uniformément dans les boites) qui sont séchées pendant 30min à température ambiante, (**Fig. 24**). A partir des extraits réalisés, des solutions mères de 10 % sont préparées puis les extraits organiques sont dissous dans le DMSO (2%) et l'extrait aqueux dans l'eau distillée stérile. (**Daoudi et al., 2015**)

L'Ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne
- L'essorer en le tournant sur la paroi interne du tube afin de le décharger
- Frotter l'écouvillon sur la surface gélosée séché de haut en bas en stries serrées
- A l'aide d'une pince stérile, les disques de papier filtre contenant l'huile à tester sont déposés à la surface de la gélose inoculée au préalable.



(a)

(b)

(c)

Figure 24: Ensemencement des suspensions bactériennes standardisées (a) disque imprégné de microbicide (b) zone d'inhibition (c)

c) Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice est la plus faible concentration des extraits qui inhibe les bactéries testées. Elle est réalisée sur milieux solide pour permettre de tester plusieurs souches bactériennes dans la même boîte.

Elle consiste à réaliser des dilutions des décoctions et les incorporer dans le milieu gélosé fondu, ensuite ensemencer les souches bactériennes à étudier après refroidissement du milieu de culture. L'activité antimicrobienne est évaluée de manière quantitative par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), concentration minimale bactéricide (CMB) et concentration minimale fongicide (CMF) sur milieu solide.

Ainsi, pour déterminer les CMI, il faut effectuer une série de dilutions de l'huile essentielle dans le milieu gélosé solide Muller-Hinton pour les bactéries et PDA pour les champignons en utilisant du tween 80, les milieux de culture sont liquéfiés au bain marie ($95^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) puis refroidis à $40^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. Les dilutions préparées sont de 2%, 1%, 0,5%, 0,25%,

0,125%, 0,06%, 0,03% (v/v). Puis inoculer ces milieux avec les souches testées en utilisant des disques absorbants.

Grâce à ces dilutions nous pouvons déterminer la plus faible concentration d'huile essentielle inhibant la croissance microbienne. (**Fig.25**).

On poursuit l'expérimentation pour déterminer les CMB et CMF. Ensuite la plus faible concentration de l'huile essentielle, où aucune croissance microbienne n'est visible est déterminée après culture dans un milieu sans huile essentielle à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les champignons.

Tableau 11 : Diamètre des zones d'inhibition de la croissance microbienne en 5 classes

Classe	Diamètre de la zone d'inhibition	Effet inhibiteur
1	≤ 10mm	Peu ou non inhibitrice
2	entre 11-15mm.	- Modérément inhibitrice
3	➤ entre 16-20mm.	Légèrement inhibitrice
4	➤ entre 21-29mm.	Fortement inhibitrice,
5	supérieur a 30 mm	Très Fortement

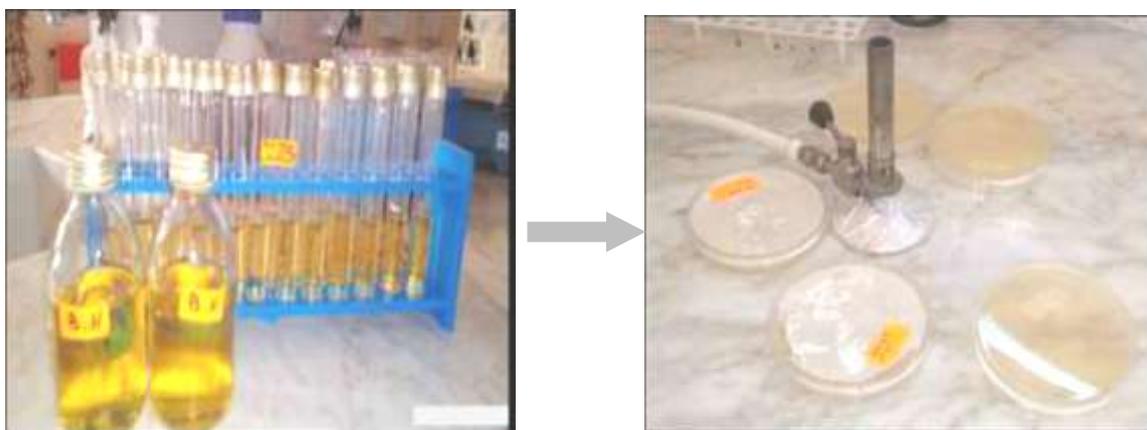


Figure 25 : Etapes du procédé de détermination de la CMB en boîte de Pétri.

L'estimation de l'activité antimicrobienne de l'HE en 5 classes selon l'échelle de Mutai et *al.* (2009)., (Tab.11).

2-5- 2- Test in vitro de l'activité antifongique : (Fig. 26).

Les tests sont réalisés au niveau du laboratoire de microbiologie de la Faculté des sciences de la Nature et de Vie de l'université Ibn khaldoun. Trois souches fongiques obtenues auprès du labo de phytopathologie, faculté des de Biologie de l'université Senia,

Oran 1 ABB, qui sont maintenues en milieu PDA (Potato Dextrose Agar) et qui sont: *aspergillus niger* (MNHN 963917), *Fusarium oxysporum* et *Fusarium lycopersici*. Les spores des jeunes cultures (3 jours) de chaque souche sont récupérées par un lavage des boîtes de Pétri et à partir de cette suspension mère, on prépare les différentes dilutions dans des tubes à essai avec 9 ml d'eau physiologique stérile (Belyagoubi, 2006).



Figure 26: Photo du Spectrophotmètre type "biochrom-libraS6" pour la DO des paramètres biochimiques

Après agitation pour homogénéiser les spores, on compte les spores au microscope avec cellule de Mallassez puis on évalue la DO de la suspension fongique à l'aide d'un spectrophotomètre type "biochrom-libraS6" (Fig.26) à 630 nm pour standardiser la suspension de spores à 107 spores/ml (D.O. de 0,04 équivalente à 107 spores/ml).

Ensemencement et Préparation des disques:

Etaler 100 μ l de la suspension/boîte de Pétri de 9 cm de diamètre, contenant le milieu gélosé PDA à partir des suspensions contenant 107 spores / ml, puis on les incube à 30 °C pendant 20 mn.

Des disques de papier Wattman de 6mm de diamètre sont stérilisés puis déposés sur la gélose séchée inoculée au préalable avec les suspensions fongiques, ensuite ces disques sont chargés d'extraits végétaux à tester (aqueux, méthanolique et éthanolique à 5% et 10%). Les boîtes de Pétri sont à 4°C pendant 2h avant de les incuber à 25°C pour 3j.

L'activité antifongique est déterminée en terme de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques après 24h d'incubation à 37° C, (Dorman *et al.*, 2000).

La lecture se fait par la mesure des diamètres d'inhibition avec un pied à coulisse digitale de marque **mututoyo** et pour chaque dose, 3 répétitions sont réalisés. En fonction du témoin, on calcule l'indice antifongique (% d'inhibition) qui est donnée par la formule (méthode de Fandohan (2004) :

$$IA = (1 - Da/Db) \times 100, \text{ (Wang, 2005; Belyagoubi, 2006).}$$

(**Da**: diamètre zone de croissance de l'essai et **Db**: diamètre zone de croissance du témoin).

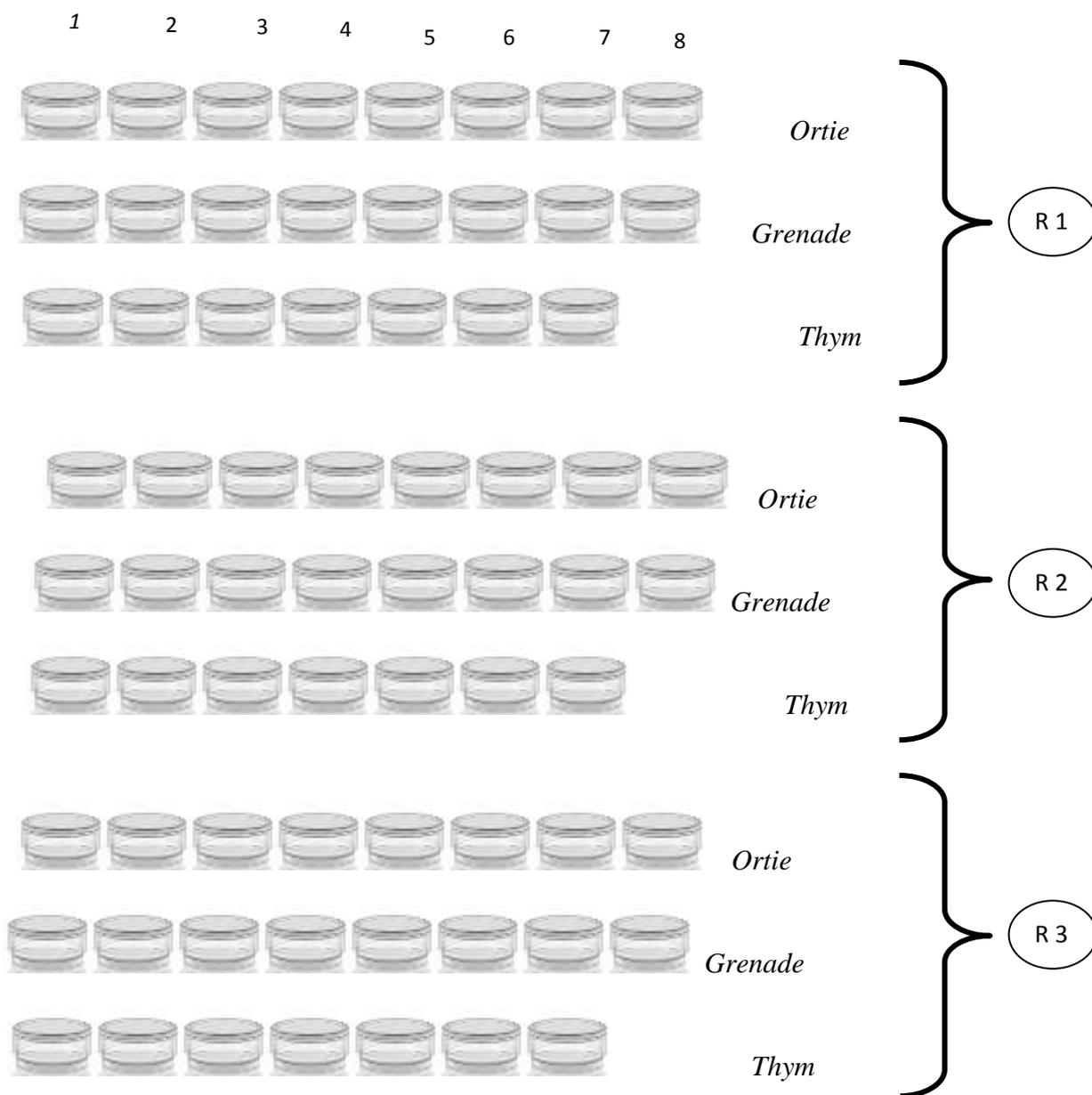
Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne est calculé selon la formule de Leroux et Credet,(1978) $Ti (\%) = (Do - Dc/Do) \times 100$

(avec Ti : taux d'inhibition en % ; D_0 : croissance diamétrale du témoin; D_C : croissance champignon traité par les HE).



Figure 27: Photo d'*aspergillus Niger* (a) et de *Fusarium oxysporum f. sp. radicle-lycopersici* (b)

c) Le dispositif expérimental (Fig. 28).



1-Témoin négatif, 2- Aqueux 5% 3- Aqueux 10%, 4- Ethan 5%
5- Ethan 10%, 6- Méthan 5% 7- Méthan 10% 8- Pesticide chimique

Figure 28 : Schéma du dispositif expérimental concernant le test d'efficacité antifongique et antibactérien des extraits aqueux et alcooliques de l'Ortie et de l'écorce de Grenade et de l'huile essentielle du Thym (05 doses)

2-6- Etude de l'activité antioxydante : deux méthodes : le test DPPH et le test de FRAP.

L'activité antioxydante des extraits est évaluée par deux techniques, la réduction du fer (Ferric reducing antioxidant power ou FRAP) et le piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH). (**Gheffour et al., 2015**).

2-6- 1- Test de DPPH

a) - Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH°) est un radical organique stable de couleur violette, qui absorbe à 517 nm. Sa stabilité est due au fait qu'il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. En présence d'agents antioxydants qui sont des donneurs d'hydrogène (AH), le composé est réduit en une forme non radicalaire DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) (**Fig. 29**) et vire au jaune (après réduction par l'agent antioxydant), ce qui entraîne une diminution de son absorbance (**Maataoui et al., 2006; Singh et al.,2011**).

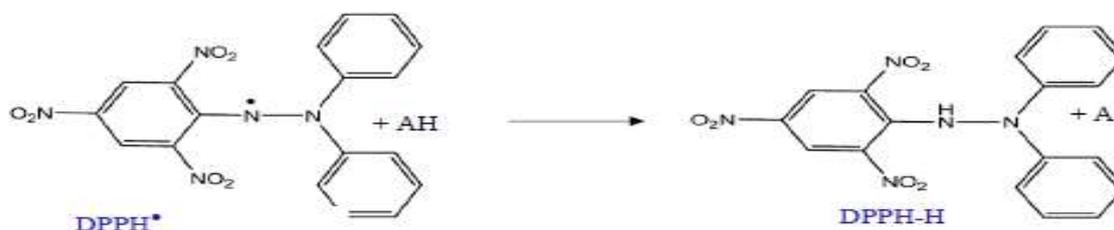


Figure 29: Mécanisme de réduction du radical libre DPPH par un antioxydant (**Molyneux, 2004**)

b) - Le Mode opératoire

L'activité anti-radicalaire de l'extrait a été étudiée selon la méthode basée sur la réduction de DPPH (diphénylpicrylhydrazyl) par les antioxydants selon le protocole décrit par (**Sanchez, 2002**). Après avoir solubilisé 5mg de DPPH dans 25ml d'éthanol absolu, 3 tubes ont été préparés séparément :

- Echantillon : 0,4 ml DPPH + 100µl d'extrait + 1.5ml éthanol absolu
- Contrôle négatif : 0,4ml DPPH + 1,6ml Ethanol
- Contrôle Blanc : 1.9 d'éthanol absolu seul.

Après agitation, les tubes ont été placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes., la réaction est colorimétrique changement de couleur (de violet intense au jaune clair), quand le DPPH est réduit.

La lecture a été effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont

l'absorbance est mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration le test est répété 3fois. Les résultats sont exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire en pourcentage d'inhibition (I%) selon la formule suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

(Où : At= absorbance de l'échantillon et Ac= absorbance du contrôle.)

La variation du pouvoir de réduction en fonction de la concentration de l'extrait végétal et de l'acide ascorbique, permet aussi de calculer le paramètre CE50 qui représente la « Concentration Efficace». Cette dernière est définie comme étant la concentration de l'extrait végétal ou de l'acide ascorbique capable de réduire 50% de l'activité de DPPH (Molyneux, 2004).

2-7- L'analyse phytochimique des extraits végétaux

2-7- 1. Le Screening phytochimique

a) *Dosage des phénols totaux*

Les dosages des polyphénols dans l'extrait méthanolique de *Punica granatum* et de *Urtica dioica* ainsi que dans l'huile essentielle du *Thym* sont réalisés par une analyse qualitative par chromatographie sur couche mince et une analyse quantitative par un dosage colorimétrique.

L'analyse chromatographique sur couche mince (CCM) de l'extrait a été effectuée par un système de séparation BAW (Butanol/Acide acétique/Eau: 60/15/35) ou l'acide gallique a été utilisé comme standard à une concentration de 20mg d'acide gallique/100ml (Marouf, 2002). En effet, 5 µl d'extrait et du standard, sont déposés et les plaques introduites dans la chambre de migration préalablement saturée par la vapeur de la phase mobile. Après migration, les plaques sont séchées, puis visualisées par un système de révélation physique sous UV à 254nm.

L'analyse quantitative est réalisée selon la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Boizot et Charpentier, (2006). Ainsi, 200µl de l'extrait est mélangée avec 1ml du réactif de Folin-Ciocalteu fraîchement préparé (10 fois dilué) puis 4 min après, ajoutez 800µl de carbonates de sodium à 7,5% (75 g/l Na₂ CO₃) et laissé réagir 2H. Enfin, la lecture des absorbances est faite à 765 nm. L'acide gallique (20-140 µg/ml) est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage qui est réalisé en utilisant une solution mère d'acide gallique

de 0,02mg /ml. Le résultat est exprimé en μg équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (μg EAG/mg d'extrait). (**Fig. 30**).

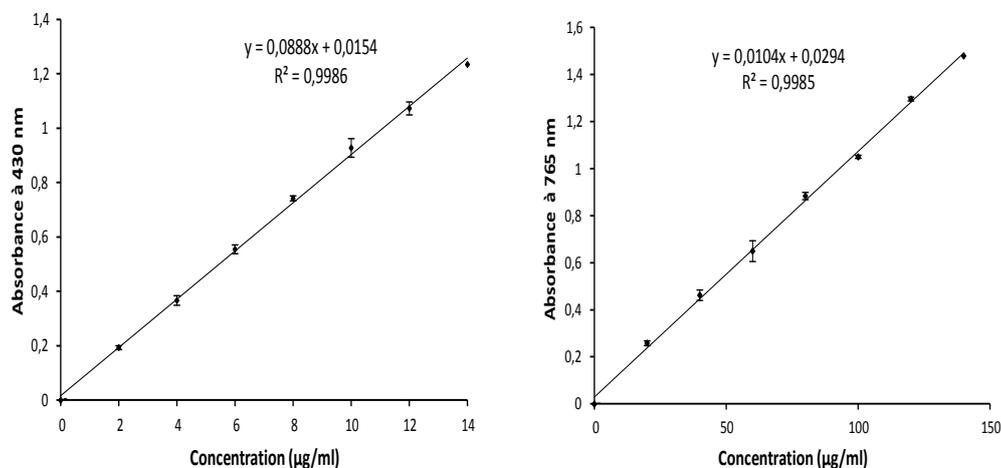


Figure 30. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (a) et de la quercétine (b)

b) Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium selon **Bahorun et al. (1996)** est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits aqueux et méthanolique. Un ml de la solution d' AlCl_3 (2%) est ajouté à 1 ml de la solution de l'échantillon. Le mélange est laissé réagir pendant 10 min puis la lecture est faite à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans les extraits est calculée à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (2-14 $\mu\text{g/ml}$) et exprimée en microgramme d'équivalents de quercétine par ml d'extrait (μg EQ/mg d'extrait) (**fig. 30b**).

c) Dosage des tanins

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide **qui** est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 550 nm, (Fig. 31). Un volume de 50 μl de l'extrait brut est ajouté à 1500 μl de la solution vanilline / méthanol (4%, m/v) puis mélangé à l'aide d'un vortex. Puis 750 μl d'acide chlorhydrique concentré est ajouté. Le mélange obtenu est laissé réagir à température ambiante pendant 20 min. L'absorbance est mesuré à 550 nm contre un blanc à l'aide d'un Spectrophotmètre **type "biochrom-libraS6"**. Une courbe d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la catéchine comme contrôle positif.

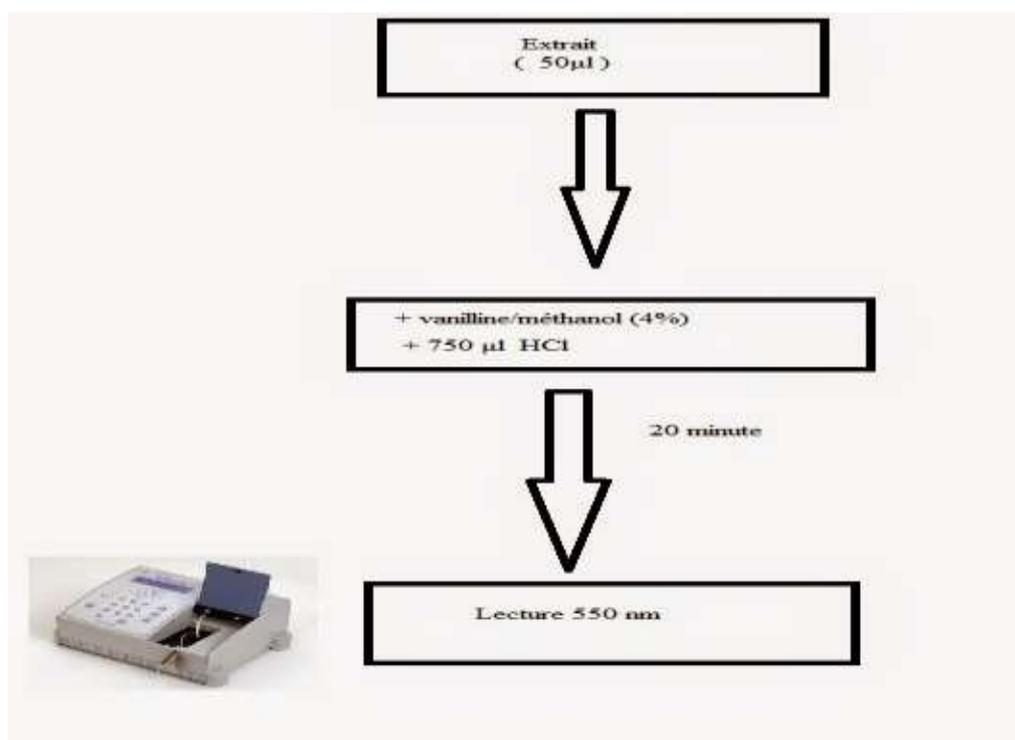


Figure 31. Méthode de la vanilline pour quantifier les tannins

2-7- 2. I.e profil spectrophotométrique) Par Utilisation de la Chromatographie en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (CPG/SM).

L'absorption lumineuse a pour origine l'interaction des photons de la source lumineuse d'un spectrophotomètre avec les ions ou molécules de l'échantillon (**Rouessac et al., 2004**). Les différents extraits végétaux sont soumis à une analyse par spectrophotométrie, afin d'obtenir les spectres d'absorption correspondants, pour avoir des informations supplémentaires sur les longueurs d'ondes maximales et les domaines d'absorption de chaque extrait végétal, et pour connaître aussi le comportement de ces extraits bruts sous l'influence d'une lumière UV-visible (**Velho-Pereira et al., 2012**).

La technique consiste à faire un balayage par spectrophotomètre UV-vis Shimadzu (UV-2401PC) qui est équipé de cuves de quartz de 1cm et relié à un ordinateur; les spectres sont enregistrés contre un blanc (l'eau distillée); les échantillons sont dilués dans de l'eau distillée au 1/10^{ème}, (**Benzeggouta, 2015**).

a- le principe:

Pour réaliser nos spectres, nous avons utilisé la chromatographie en phase gazeuse un appareil de type Hewlett-Packard (6890) couplé à un spectromètre de masse (CPG/SM), les analyses ont été effectuées au laboratoire de chimie analytique, département de

pharmacie, faculté de médecine, université d'Alger 1. Dont le principe est que lorsqu'une molécule est introduite dans le **spectrophotomètre de masse**, son ionisation produit plusieurs types d'ions. On obtient alors un spectre de **masse** qui est constitué des abondances de ces ions (en ordonnée), en fonction de leur rapport **masse/charge** (en abscisse).

L'appareil est équipé d'une colonne capillaire HP-5MS (30m × 0,25mm), avec épaisseur de film de 0,25 µm. La température de la colonne est programmée de 50 à 250 °C à raison de 4 °C/min. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1,5 mL/min. Le mode d'injection est du mode split, la fragmentation est effectuée par impact électronique à 70 eV. Aussi, l'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse NIST 98 et piloté par un logiciel « HP ChemStation » permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques, (Fig.32).

b- L'analyse:

L'analyse des **extraits de feuille de Thym et de l'Ortie et de l'écorce de Grenade** a été effectuée à l'aide d'un chromatographe MASTER GC DANI connecté à un spectromètre de masse TOFMS DANI (**Fig. 32a**) (CRAPC), situé à Tipasa-Alger. La séparation des composés a été effectuée sur une colonne capillaire HP-5MS de (30 × 0,25 mm) et 0,25 µm d'épaisseur de film. Les températures de la source ionique et de l'interface sont réglées à 230°C et 200°C. L'Hélium (He) est le gaz vecteur avec débit de 0.5 ml/min.

- 0.2 µl d'échantillon est injecté par le mode split à un rapport de division de 1/50. Le four a été programmé de 60 °C (pendant 8 min) à 240°C (pendant 10 min) à raison d'une montée de 2°C / min avec une énergie d'ionisation (IE) de 70 eV, un balayage sur une gamme de masse allant de 35 à 450 unités. Les spectres de masse ont été obtenus par un impact électronique.

En effet, dans la source d'ionisation, les molécules sont bombardées par des électrons générés par l'incandescence d'un filament de tungstène, conduisant ainsi à la formation des ions en phase gazeuse. Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil dont les types « le quadripôle » et « le piège à ions » (Marouf et Tremblin, 2015).

b- Identification des composés chimiques

L'identification des différents constituants des extraits végétaux (huile essentielle, extraits aqueux et méthanolique) a été faite sur la base de leurs indices de rétention et de leurs spectres de masse en utilisant le logiciel Thermo Xcalibur 1.2, en corrélant leurs

spectres de masse respectifs avec ceux des documents "NIST08, Wiley 8ème édition" (Adams, 2001). Les indices de rétention ont été déterminés selon Van Dool et Kratz 1963).

2-7-3- Utilisation du FTIR (de l'anglais *Fourier Transform InfraRed spectroscopy*)

La **spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier** ou **spectroscopie IRTF** (ou encore **FTIR**, de l'anglais *Fourier Transform InfraRed spectroscopy*) est une technique utilisée pour obtenir le spectre d'absorption. La résolution spectrale en nombre d'onde par cm est égale au réci-proque du maximum de retard (différence de marche) en cm. Ainsi, une résolution de 4 cm^{-1} sera donné par un retard 0,25 cm (**Fig. 32b**).

Ces spectres sont réalisés à partir d'échantillon (poudre végétale d'*Urtica dioïca* L) dispersé dans une poudre de KBr (Bromure de potassium) qui sont modelés en forme de pastille fine et transparente puis introduite dans le spectrophotomètre IR situé au niveau du Laboratoire de chimie des Matériaux de l'université d'Oran. Les spectres IR sont enregistrés sur un appareil FTIR-8201 PC Spectrometer. Les principales bandes d'absorption sont donnés en cm^{-1} .



(a)



(b)

Figure 32: Chromatographe Master GC Dani (a) et appareil de Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (type FTIR-8400) (b)

2-8- Analyses statistiques

Les comparaisons multiples sont faites par le test ANOVA univarié (logiciel Excel version 2016). Les différences sont statistiquement significatives au seuil de 0,05 (à un niveau $p < 0.05$). Les valeurs EC50 (concentration effective à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)].

Troisième partie

Résultats et discussion

Cette troisième partie de notre travail, consiste à interpréter tous les résultats obtenues durant notre expérimentation afin de déterminer certains métabolites secondaires ainsi que d'évaluer les effets bactéricide, antifongique et antioxydant des extraits de feuilles d'Ortie, de l'écorce de Grenade et de l'huile essentielle du Thym.

3-1- Interprétations des résultats

3-1-1- Rendements des extractions

Les résidus de chaque extraction sont pesés pour calculer le rendement qui varie en fonction de l'espèce végétale, de l'organe utilisé dans l'extraction, des conditions de séchage, de la richesse de la plante en métabolites et de la nature du solvant utilisé pour l'extraction.

Ainsi, les rendements d'extraits d'Ortie obtenus pour les trois types d'extraits: Aqueux, Ethanolique et Méthanolique sont respectivement de **12,52%**, **15.57%** et **17.01%**. Ces résultats (Tab.12) montrent que parmi les trois fractions, celle Méthanolique résiduelle représente le rendement le plus élevé suivit par la fraction Ethanolique et enfin la fraction Aqueuse. Il en de même pour les rendements d'extraits d'Ecorce de Grenade pour les trois types d'extraits avec pour l'extrait Aqueux **14,73%**, pour l'extrait Ethanolique **15,19%** et pour l'extrait Méthanolique **17.34%**. Néanmoins, les rendements d'extraits d'Ecorce de Grenade sont supérieurs a ceux d'Ortie, (Tab.12).

Tableau 12 : Rendement d'extraits végétaux d'Ecorce de Grenade et d'Ortie.

Le Type d'extrait	Aqueux	Ethanolique	Méthanolique
Rendement Ortie en (%)	12,52%	15.57%	17.01%
Rendement Grenade en (%)	14,73%	15.19%	17.34%

Concernant le Thym, le rendement moyen en huile essentielle est remarquable. En effet, les résultats démontrent un rendement élevé de 1,14% et ce paramètre est aussi influencé par le lieu de récolte, la période et le stade physiologique de la plante, (**Macheix et Fleuriet, 2005**).

Par ailleurs, la teneur moyenne des plantes en HE étant de 1 à 3% excepté pour le clou de Girofle (15%) ou noix de Muscade (8%). Chaque huile essentielle est caractérisée

par ses propriétés organoleptiques qui sont à la base du contrôle de son identité et de son originalité. (Tab.13).

Tableau 13 : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle du Thym

Caractéristiques		Huile essentielle du Thym
Organoleptiques	Rendement	1,14%
	Couleur	jaunâtre
	Odeur	piquante
	Consistance	Liquide
	pH	6,19

3-1-2- Interprétations des Résultats de l'effet fongicide des extraits végétaux testés

L'aromatogramme est une technique qualitative qui détermine la sensibilité des microorganismes vis-à-vis d'une substance réputée antimicrobienne, dans notre cas, c'est la sensibilité des souches fongiques (*aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* et *Fusarium lycopersici*) vis-à-vis d'extraits alcooliques et aqueux d'Ortie et d'Ecorce de Grenade ainsi que l'huile essentielle du Thym. Cet examen se fait tel qu'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par les substances à tester. Cette méthode, repose sur le pouvoir migratoire de ces substances sur milieu solide gélosé (milieu PDA).

a) L'effet fongicide des extraits d'Ortie

D'après les résultats du test antifongigramme (Tab.13) réalisé en utilisant les extraits végétaux de l'Ortie sur *aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* et *F. lycopersici*, on constate un effet fongicide remarquable. En effet, l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique à 10% sont les plus efficaces vis-à-vis des trois champignons.

Néanmoins, ils sont de moitié efficace que les fongicides chimiques qui sont à 40% (Artea) et à 42% pour "Bayer", (Fig. 33). Par ailleurs, il apparaît aussi que le genre *Fusarium* soit légèrement moins sensible aux extraits végétaux et aux antifongiques de synthèse que le genre *Aspergillus*.

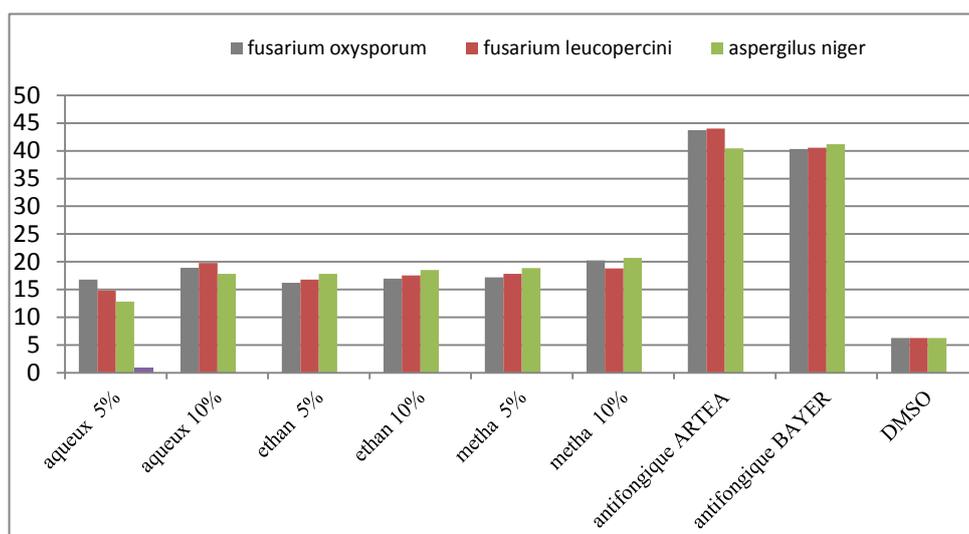


Figure 33: Comparaison de l'Effet des extraits de feuilles d'Ortie et celui des antifongiques de synthèse sur le Taux d'inhibition des champignons pathogènes (diamètre en mm)

b) L'effet fongicide des extraits de l'écorce de Grenade

Le tableau (Tab. 14) des résultats du test antifongigramme réalisé en utilisant les extraits végétaux de l'écorce de Grenade sur *aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* et *F. lycopersici*, affiche un effet fongicide très modéré. En effet, les extraits aqueux, éthanolique et méthanolique à 5% et 10% sont moins efficaces vis-à-vis des trois champignons comparé à l'effet des extraits d'Ortie. Or, *aspergillus niger* est le moins résistant face aux extraits méthanoliques d'Ortie.

Tableau 14: Effet des extraits des feuilles d'Ortie et de l'Ecorce de grenade sur le développement fongique (diamètre en mm)

	Ortie						grenade					
	aqueux		ethan		metha		aqueux		ethan		metha	
souche	5%	10%	5%	10%	5%	10%	5%	10%	5%	10%	5%	10%
<i>fusarium oxy</i>	25,57	38,95	27,62	40,53	26,32	40,82	16,82	18,95	16,22	16,98	17,22	20,25
<i>fusarium leuco</i>	35,62	52,82	27,57	35,54	29,89	49,74	14,82	19,82	16,82	17,54	17,82	18,82
<i>aspergillus niger</i>	14,62	30,32	21,12	39,75	33,20	49,02	16,82	18,95	16,22	16,98	17,22	20,25

La figure 34, démontre un effet fongicide très modéré avec des résultats très fluctuants. En effet, les extraits aqueux, éthanolique et méthanolique à 5% et 10% affichent une faible efficacité vis-à-vis des trois champignons.

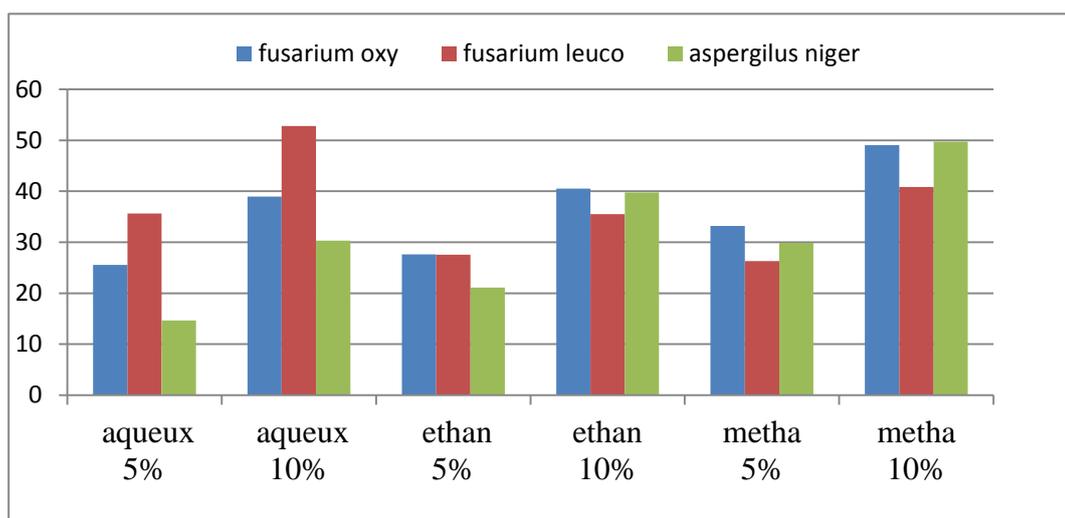


Figure 34: Comparaison de l'Effet des extraits de l'écorce de Grenade sur le Taux d'inhibition des champignons pathogènes (diamètre en mm)

c) L'effet fongicide de l'huile essentielle du Thym

L'huile essentielle du Thym possède un effet antifongique croissant avec l'augmentation de sa concentration dans le milieu. En effet, les résultats obtenus sont significatifs de l'effet antifongique (**Fig.35**) car le contact direct des HE sur *aspergillus Niger* est inhibiteur de la croissance du champignon parasite. L'huile essentielle du Thym s'est avérée fongicide à partir de 10 μ l. En effet, le degré d'inhibition de la croissance fongique augmente proportionnellement avec la concentration croissante de l'huile.

Tableau 15: Effet de l'huile essentielle du Thym sur la croissance fongique (diamètre mm)

	HE 10 μ l	HE 15 μ l	HE 30 μ l	Témoin ARTEA	TEMOIN BAYER
<i>fusarium oxy</i>	37	49	86	44,7	41,02
<i>fusarium lyco</i>	49,12	60,02	86	38,4	46,51
<i>aspergillus</i>	48	60	86	28	33

Par ailleurs, selon ces mêmes résultats (tab.15), *Fusarium oxysporum* est le moins sensible à l'huile du Thym utilisé à 10 μ l et à 15 μ l (37mm et 49mm) comparé à *Fusarium lycopersici* (49mm et 60mm) et *A. Niger*. (48mm et 60mm) dont les diamètres d'inhibition sont supérieurs à 30mm. Cependant, à la concentration de 30 μ l, tous les diamètres sont égaux avec 86mm soit une inhibition quasi totale de la croissance fongique des trois

champignons testés. En outre, on constate que l'huile du Thym utilisée à 15 μ l est plus efficace que les antifongiques de synthèse.

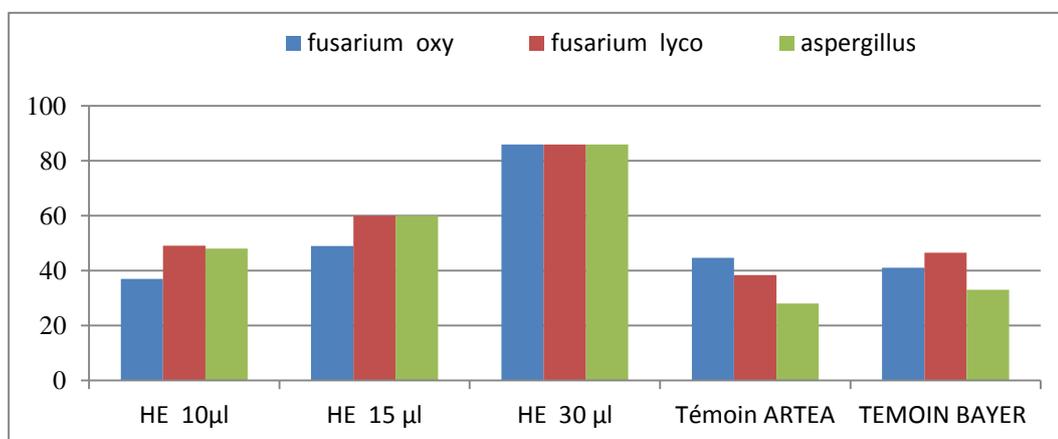


Figure 35: Histogramme comparatif des % d'inhibition de l'HE du Thym sur, *Fusarium oxysporum*, *F. lycopersici* et *aspergillus niger* à doses croissantes (10,15,30 μ l et les Témoins)

Contrairement, pour les antifongiques de synthèse, ce sont les *fusariums* qui sont les plus sensibles comparé à l'*Aspergillus* (**Fig.36**). Néanmoins, l'huile du Thym exerce un effet fongicide remarquable sur les trois souches fongiques qui est bien supérieur à celui des fongicide de synthèse "Bayer" et "Arthéa".

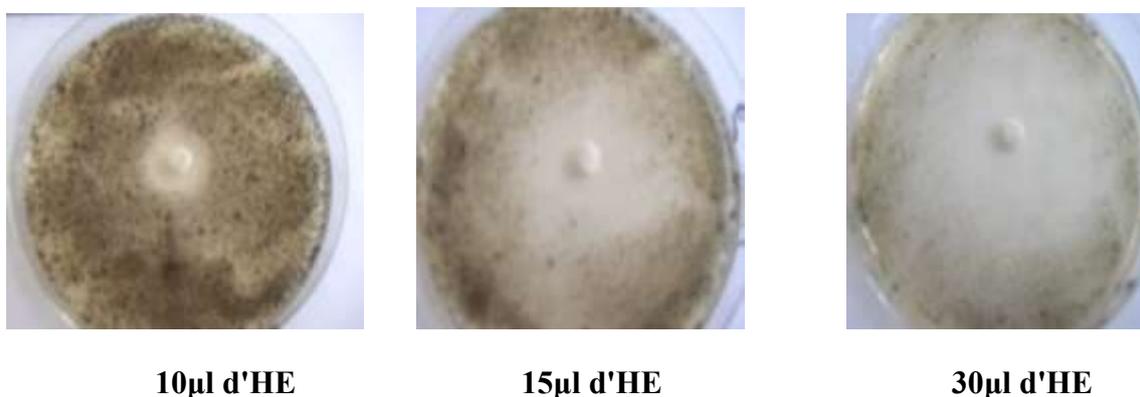


Figure 36: Photos montrant les zones d'inhibition provoquées par l'huile essentielle du Thym à doses croissantes sur l'*Aspergillus niger* (10 μ l, 15 μ l, et 30 μ l)

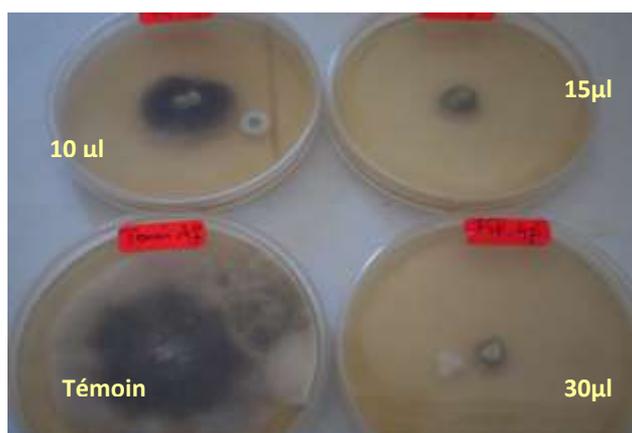


Figure 37: inhibition du développement de *Fusarium oxysporum* sous l'effet de l'huile essentielle du Thym à doses croissantes (10µl, 15µl, et 30µl)

Tableau 16: Les valeurs de CMI et CMF de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sur les souches fongiques. Testées

	CMI(%)	CMF(%)	CMF/CMI	Interprétation
<i>fusarium oxysporum</i>	0,06	0,125	2,08	Fongicide
<i>fusarium lycopersici</i>	0,03	0,06	2,00	Fongicide
<i>Aspergillus niger</i>	0,06	0,125	2,08	Fongicide

3-1-3- Interprétations des Résultats de l'effet bactéricide des extraits végétaux testés

a) L'effet bactéricide des extraits d'Ortie

D'après les résultats du test antibiogramme (Tab.17) réalisé en utilisant les extraits végétaux de l'Ortie sur *Staphylococcus aureus* (Gram+), *Echerchia coli* et *pseudomonas aeruginosae* (Gram-), on constate un effet bactéricide **faible**, en particulier pour les extraits ethanoliques et methanoliques. Nous remarquons que l'extrait aqueux et ethanologique de l'ortie n'exerce aucun effet antibactérien sur les trois souches étudiées (Figure 38). L'extrait methanologique est peu inhibiteur. Néanmoins, pour l'écorce de la grenade, on constate que les trois extraits préparés induisent une inhibition modéré. Cependant, la lenteur de l'effet bactéricide de l'ortie la prédispose plus à un usage prophylactique que curatif (Hadizadeh et al, 2009; Darah et al. 2011).

Tableau 17: Taux d'inhibition du développement bactérien (diamètre en mm) des extraits des feuilles d'Ortie et de l'Ecorce de grenade

Extrait	Ortie						grenade					
	aqueux		ethan		metha		aqueux		ethan		metha	
souche	5%	10%	5%	10%	5%	10%	5%	10%	5%	10%	5%	10%
E.Coli	6,82	6,82	6,22	6,98	9,22	13,25	14,32	17,88	14,00	20,86	15,30	19,75
Staph Aureus	6,82	6,82	6,82	7,5	8,89	11,74	14,93	17,33	11,63	17,89	16,82	20,93
Pseudo	6,82	6,82	7,4	8,7	7,4	11,02	14,82	16,73	13,05	16,66	13,67	17,32

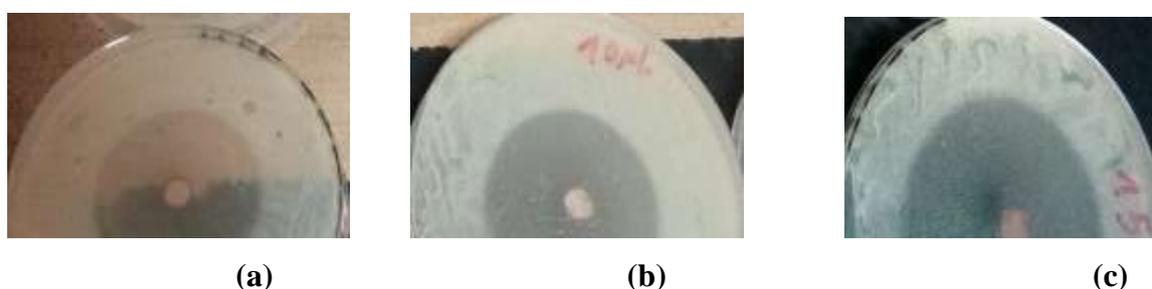


Figure 38: Résultats de l'effet bactericide de l'extrait methanolique à 10% de l'Ortie, sur *Pseudomonas* (a) *Staph aureus* (b) *E.Coli* (c) (photo originale)

Ceci est du a la présence des flavonoïdes qui ont des propriétés antibactériennes, (Gülçin *et al.* 2004; Parekh et Chanda, 2007). Chez le témoin, il n'y a pas de halo, ce qui signifie qu'il n'y a pas d'inhibition car il n'y a pas de substance inhibitrice.

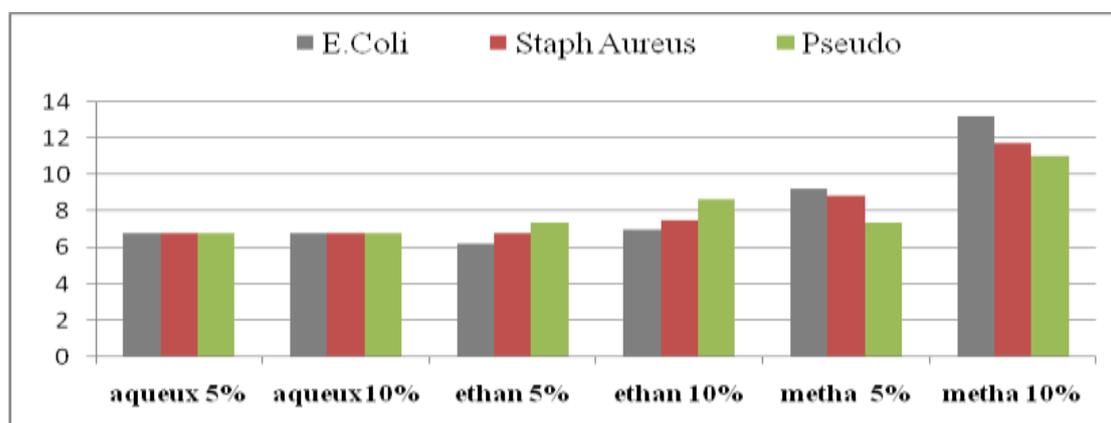


Figure 39: Taux d'inhibition des Bactéries traitées par les extraits végétaux (en mm)

Cependant, pour l'extrait aqueux à 5 et 10% le halo est peu développé (sensibilité

faible à moyenne), pour l'extrait ethanologique à 5 et 10% le halo est moyennement développé (sensibilité moyenne à forte), et enfin pour l'extrait methanologique à 5 et 10%, le halo est très développé (sensibilité très forte et forte inhibition), Par ailleurs, les antibiotiques de synthèse affichent sensiblement la même efficacité que les extraits végétaux testés. Néanmoins, *Pseudomonas aeruginosa* montre une grande sensibilité vis à vis de ces pesticides chimiques (Fig.40).

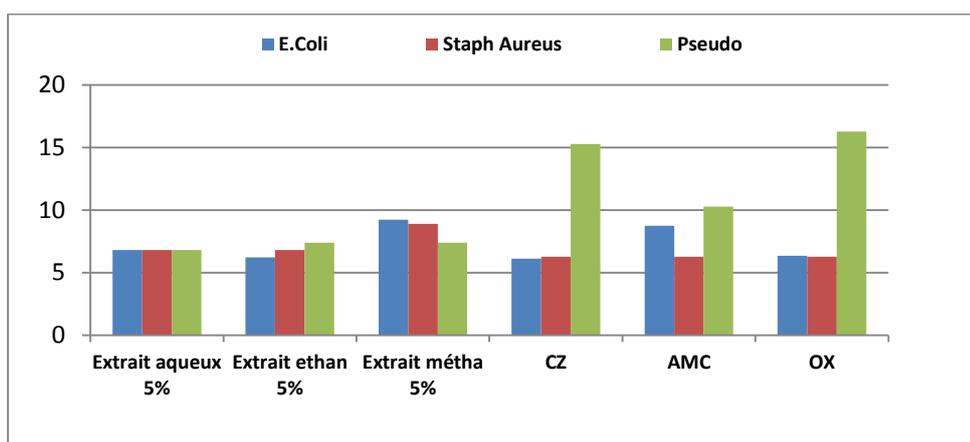


Figure 40: Taux d'inhibition des Bactéries traitées par les extraits végétaux et par les antibiotiques de synthèse (diamètre en mm)

D'autre part, des études ont démontrés les propriétés antimicrobiennes des feuilles d'*Urtica dioïca*, en particulier contre *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* et *Escherichia coli*.

b) L'effet bactéricide des extraits de grenade

Les résultats du Tableau 17, montrent que l'activité inhibitrice des germes est proportionnelle à l'augmentation de la concentration utilisée. En effet, les zones d'inhibition augmentent en fonction de l'augmentation de la concentration des extraits, Les diamètres des zones d'inhibitions varient de $14.32 \pm 0,05\text{mm}$ à $20.93 \pm 0,40\text{mm}$.

D'après les résultats obtenus, il apparaît que l'extrait aqueux de *Punica granatum* a un effet antimicrobien sur les bactéries testées, les bactéries Gram+ (*S.aureus*) sont les plus susceptibles par comparaison avec les bactéries Gram- (*E.coli* et *Pseudomonas aeruginosa*), (Fig.41). Ceci peut être attribué à la différence de la structure entre les bactéries Gram+ et les bactéries Gram-.

Ces résultats corroborent ceux de Reddy et al., (2007) qui ont démontré que des extraits de grenade présentent une activité antimicrobienne significative contre *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, et *S.aureus*.

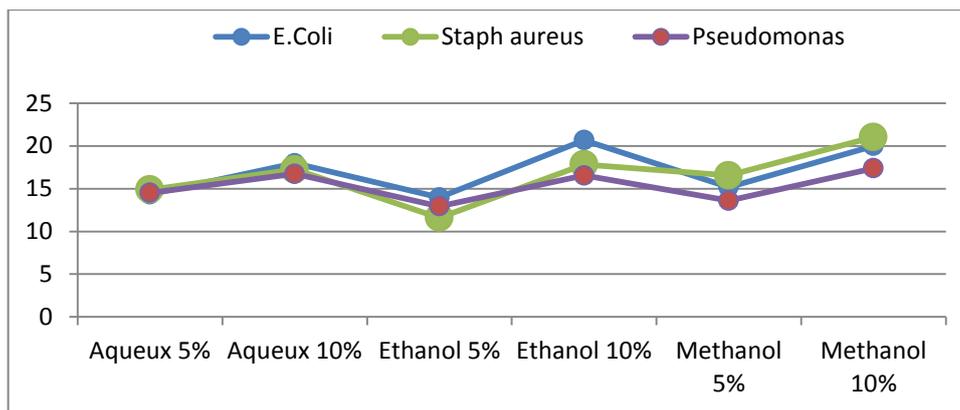


Figure 41: Effet de l'extrait de Grenade sur la croissance bactérienne (diamètre en mm)

De même que ceux **Al-Zoreky (2009)** qui a montré que les extraits de l'écorce de grenade constituent un puissant inhibiteur de la croissance de *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* et *Yersinia enterocolitica*, Cette activité antimicrobienne de cet extrait est due, au moins partiellement, à la présence des polyphénols.



(a)



(b)

Figure 42: Inhibition de la croissance d'*E.coli* (a) et de *Pseudomonas aeruginosa* (b) sous l'effet d'extraits aqueux et alcooliques de l'écorce de Grenade

Par contre, pour les traitements d'extraits végétaux alcooliques les diamètres des zones d'inhibition révèlent qu'*Escherichia coli* apparaît plus sensible vis-à-vis des deux autres bactéries car elle affiche des zones d'inhibition plus importantes (20.86 et 19.75) comparées à celles de *Staphylococcus aureus* dont le diamètre des zones d'inhibition est de 17,89 et 20,93 mm alors que pour *Pseudomonas* les diamètres varient de 16,66 et 17,32 mm (Fig. 42 et 43). En outre, on constate que les concentrations à 10% sont plus efficaces que, les concentrations à 5%,

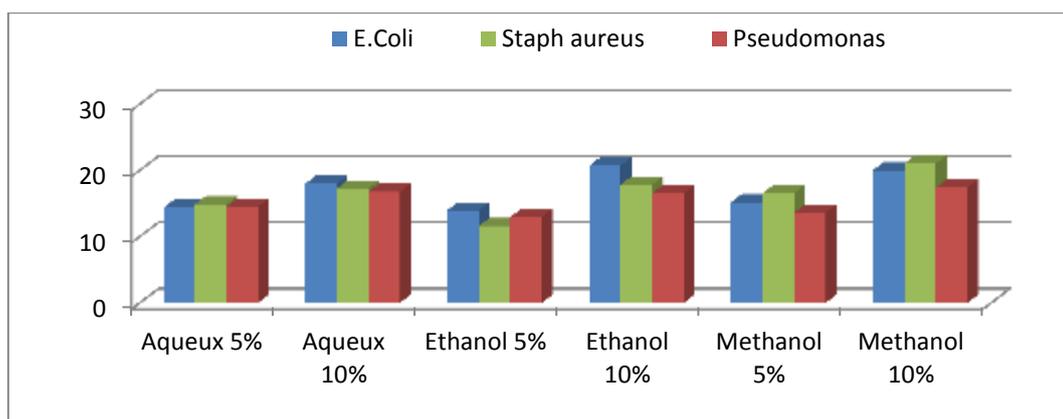


Figure 43: Histogrammes comparatifs de l'effet des extraits de Grenade sur l'inhibition des bactéries (diamètre en mm)

c) L'effet bactéricide de l'huile essentielle du Thym

D'après les résultats du test d'antibiogramme (aromatogramme) (figure 44), réalisé en utilisant l'huile essentielle du Thym sur *Escherichia coli* et *Staphylocoques aureus*, on constate un effet bactéricide remarquable.

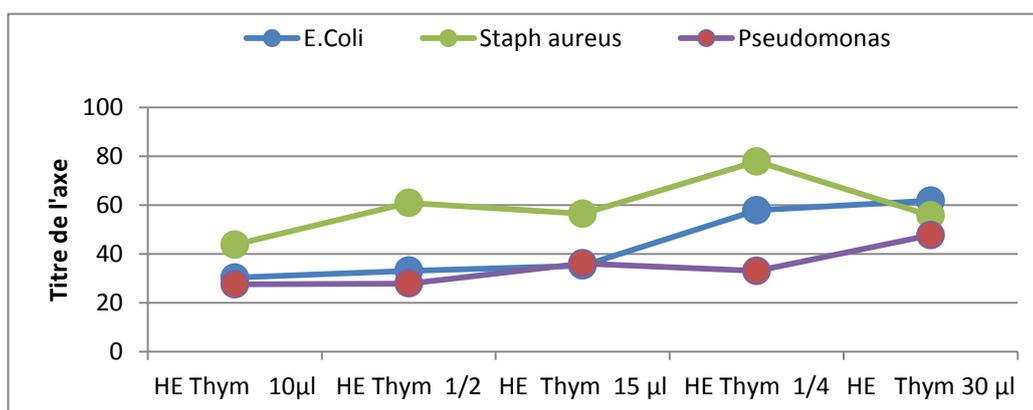


Figure 44: Effet de l'HE du Thym sur les bactéries testées à doses croissantes (10, 15 et 30 µl d'HE)

En effet les diamètres des zones d'inhibition révèlent qu'*Escherichia coli* apparaît plus sensible vis-à-vis de l'huile essentielle du Thym testé et elle développe des zones d'inhibition plus importantes comparées à celles de *Pseudomonas aeruginosa* dont le diamètre des zones d'inhibition croit de **27,51** à **47,69**mm alors que pour *Escherichia coli* les diamètres varient de 30.27 à 61.80mm (Fig. 45). Néanmoins pour *Staphylococcus aureus* les valeurs sont trop fluctuantes et peu significatives.

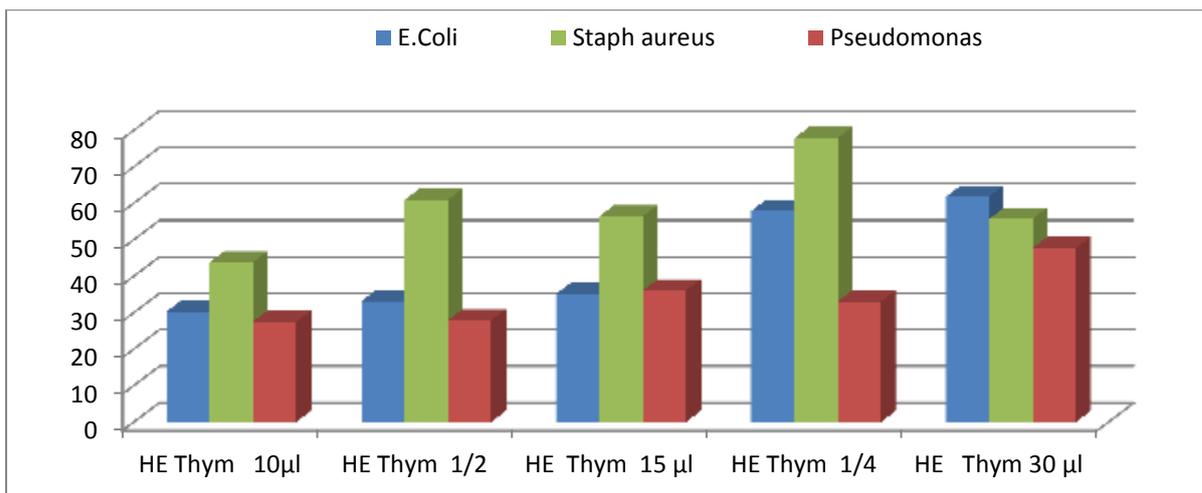


Figure 45: Effet de l'HE du Thym sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* à doses croissantes (10, 15, et 30 µl d'HE)

Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés et comparés avec celle de l'échelle de **Mutai et al. (2009)**. De bons résultats ont été obtenus qui démontrent que l'huile essentielle de *Thym* a fortement inhibé la croissance de toutes les bactéries (et champignons testés, Tableau 15).

Par ailleurs, la zone d'inhibition la plus élevée est celle de *Staphylococcus aureus* qui est de $(70,00 \pm 2,00 \text{ mm})$, ce qui est très important pour la thérapie contre les infections contre ce microorganisme pathogène pour l'homme. La plus faible valeur est celle de $(26,00 \pm 0,00 \text{ mm})$, qui n'est pas négligeable pour un microorganisme très résistant à tout agent antimicrobien et antibiotique.

Chez le témoin, (Fig.46), il n'y a pas de halo, ce qui signifie qu'il n'y a pas d'inhibition car il n'y a pas de substance inhibitrice tel que l'huile de Thym.

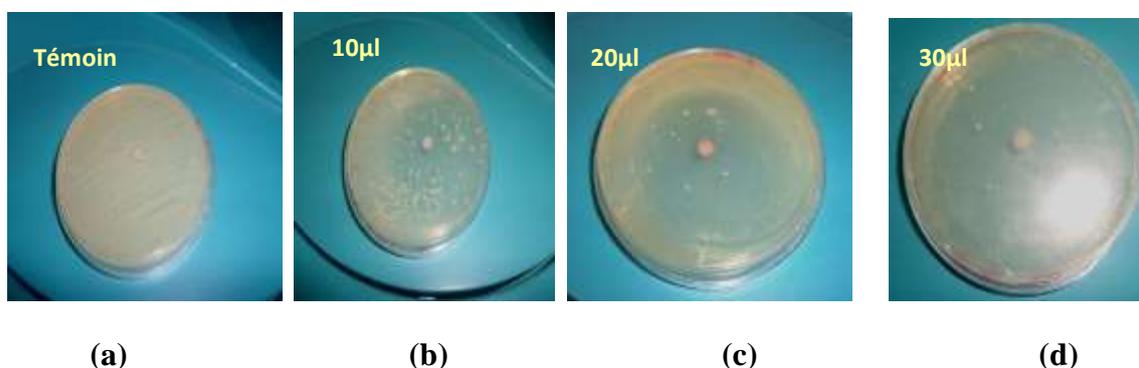


Figure 46: Photographies originales du Témoin (a) de l'effet de l'HE du Thym sur *E.coli* à doses croissantes (10, 20 et 30 µl d'HE) qui sont respectivement (b), (c) et (d).

d) Résultats des tests d'antibiogramme comparatif avec antibiotiques de synthèse

D'après les résultats du test d'antibiogramme comparatif qui a été réalisé en utilisant les antibiotiques suivants: **Amoxicilline, Cefazolin, Rifampicine, Gentamycine et Erytromycine**, on peut déterminer l'effet bactéricide d'une substance supposée anti bactérienne.

En effet, l'inhibition bactérienne apparaît en forme de halo qui est une zone claire montrant la destruction ou l'inhibition des germes pathogènes qui représente l'activité antibactérienne, (**Fig.47**).

Cette activité antibactérienne ou inhibition bactérienne de l'huile utilisée peut être évaluée selon trois niveaux de sensibilité (faible, moyenne ou forte) ou encore par la formule suivante du calcul du pourcentage d'inhibition qui est : $I \% = (Di / Db) \times 100$

(Di = zone d'inhibition autour du disque; Db = diamètre de la boîte de pétri utilisé)

Tableau 18: Taux d'inhibition du développement bactérien (diamètre en mm) sous l'effet des antibiotiques de synthèse

Souche	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)				
	Amoxicilline	Cefazolin	Rifampicine	Gentamicine	Erytromycine
E.Coli	7.44±0.05	6.23±0.06	10.30±0.08	13.25±0.09	20.05±0.05
Staph. aureus	10.68±0.04	15.98±0.02	33.65±0.05	28.90±0.07	24.88±0.07
Pseudomonas	27±0.03	6.28±0.08	6.28±0.06	6.28±0.05	22.12±0.08

À la lecture des résultats obtenus lors de ce test antibactérien par aromatogramme (tab. 18), il apparaît clairement que tous les antibiotiques de synthèse utilisés exercent une activité antibactérienne vis à vis des souches bactériennes utilisées.

Cette activité est, par ailleurs, variable d'un antibiotique à l'autre et la souche bactérienne *Staphiloccocus aureus* s'est avérée la plus sensible à l'action inhibitrice des antibiotiques de synthèse avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 10.68±0.04 mm (traité à l'Amoxicilline) et 33.65±0.05 mm (traité à la Rifampicine) suivi par *E.Coli* avec des diamètres d'inhibition de 6.23±0.06 (traité à la Cefazolin) à 20.05±0.05 (traité à la Gentamicine).

Alors que *Pseudomonas* affiche une certaine résistance car l'effet antibactérien des produits chimiques est modérée à faible égale à 6.28 ± 0.08 mm pour quatre produits (Cefazolin, Rifampicine, Erythromicin). Néanmoins, l'inhibition est importante soit pour Amoxicilline (27 ± 0.03 mm) que pour Gentamycine (22.12 ± 0.08 mm).

La croissance de *Staphylococcus aureus* a été fortement inhibée par l'huile essentielle avec ($45,00 \pm 1,00$ mm). Ce résultat paraît intéressant surtout que cette bactérie est pathogène pour l'homme et qu'elle est à l'origine de dangereuses intoxications alimentaires.

Notons que la valeur citée est plus élevée que celle rapportée par **Zeghib et al. (2017)** chez *Thymus guyonii* de Ghardaia ($30,0 \pm 1,5$ mm), qui a été citée comme la plus haute zone d'inhibition des souches étudiées. Suivi de *Micrococcus luteus* et *Enterococcus faecium* avec des halos d'inhibition respectivement ($34,66 \pm 1,53$ mm) et ($32,33 \pm 2,08$ mm).

Tableau 19: Valeurs de CMI et CMB de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sur les souches bactériennes testées.

	ATCC	Gram	CMI(%)	CMB(%)	CMB/CMI	Interprétation
<i>Staphylococcus aureus</i>	25922	+	0,06	0,125	2,08	Bactéricide
<i>Escherichia coli</i>	10536	-	0,125	0,125	1,00	Bactéricide
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27 853	-	0,25	0,5	2,00	Bactéricide

Parmi les bactéries Gram-, l'huile essentielle de *Thymus guyonii* a inhibé fortement la croissance de *Klebsiella pneumoniae* (qui est aussi une bactérie pathogène pour l'homme) avec une zone d'inhibition de ($46,00 \pm 2,00$ mm), suivi de *Escherichia coli* ($31,00 \pm 0,00$ mm), ensuite *Pseudomonas aeruginosa* ($22,00 \pm 0,00$ mm) la plus résistante des microorganismes étudiés, cette valeur est à prendre en considération, car cette bactérie a été citée par plusieurs auteurs, comme étant très résistante à tout agent antimicrobien et antibiotique .



Figure 47: Photographie de l'effet des antibiotiques de synthèse (**Amoxicilline, Cefazolin, Rifampicin, Erythromicin et Gentamycine**), utilisés sur *Escherichia coli* (a) et *staphylococcus aureus* (b)

Les résultats des CMI et CMB ou CMF varient d'un microorganisme à un autre, dans certains cas elles sont égales comme nos résultats (Tableau 19). Ce qui indique une forte action bactéricide et ou fongicide. Car, lorsque le rapport CMB/CMI et ou CMF/CMI ≥ 4 , l'huile essentielle est dite bactériostatique et ou fongistatique.

Mais, lorsque le rapport CMB/CMI et ou CMF/CMI < 4 , on dit que l'huile essentielle est bactéricide et ou fongicide. Le tableau 19 indique que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a un effet bactéricide et fongicide sur toutes les bactéries et champignons testées.

3-1- 4- Activité antioxydante

Dans ce test, le DPPH de couleur violette se réduit en un composé jaune, le diphenyl picryl-hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité réductrice des antioxydants présents dans le milieu (**Sanchez- Moreno, 2002**).

L'activité antioxydante des extraits est évaluée selon la technique du DPPH qui consiste en un piégeage du radical libre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, (**Gheffour et al., 2015**).

Cette activité antiradicalaire est exprimée en % de réduction de la solution de DPPH, (**Molyneux, 2004**), Cette technique du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est l'une des méthodes les plus utilisées. Elle est rapide, facile à pratiquer et s'effectue à température ambiante, ce qui permet l'élimination de tous risques de dégradation thermique des molécules testées (**Katalinic et al., 2006**). Une diminution de l'absorbance pour un

mélange est due à la décoloration des réactifs impliqués dans la réaction en indiquant une activité élevée de l'effet scavenger du radical DPPH par les antioxydants mis en réaction.

Par ailleurs, l'efficacité d'un antioxydant peut être définie comme sa capacité à fixer des radicaux libres, donc à arrêter la propagation de la réaction en chaîne et prévenir le stress oxydatif (Molyneux, 2004).

Dans la présente étude, (Tab. 20) il apparaît que les extraits d'*Urtica dioica* L. possèdent de faibles capacités à céder des atomes d'hydrogène pour agir comme antioxydants. La figure 48 indique une légère augmentation des pourcentages d'inhibition (PI) de l'absorbance de la solution de DPPH en fonction des concentrations de l'extrait végétal. A la plus faible concentration de 10µg/ml, l'extrait végétal a présenté un PI de 0,89%, tandis qu'à concentration plus élevée de 60µg/ml, le PI a atteint 23.55%.

En parallèle, le pouvoir anti radicalaire de l'acide ascorbique a été évalué comme témoin comparatif. Pour cet antioxydant standard, la réduction de l'absorbance du DPPH est la plus importante en comparaison avec les extraits végétaux testés à 10µg/ml, le PI est de 35,85%, et 60µg/ml, le PI a atteint 80,31%.

D'autre part, l'huile de thym présente un pouvoir antioxydant très appréciable, presque aussi important que celui de l'acide ascorbique avec à 10µg/ml, un PI est de 9,82%, et à 60µg/ml, le PI a atteint 57,15% et en troisième position se situe l'extrait de l'écorce de grenade (1,78%, et 35,9%.

Tableau 20: pourcentages d'inhibition (PI) de l'absorbance de la solution de DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique et des extraits végétaux utilisés

	Acide ascorbique	HE Thym	Extrait methan Grenade	Extrait methan Ortie
05 µg/ml	6,25	2,67	1,78	0,89
10 µg/ml	35,85	9,82	2,67	1,78
20 µg/ml	54,06	20,5	8,05	6,25
30 µg/ml	69,6	44,25	18,75	16,07
40 µg/ml	74,1	57,1	25,85	19,64
50 µg/ml	80,18	57,85	35,7	23,15
60 µg/ml	80,31	57,15	35,9	23,55

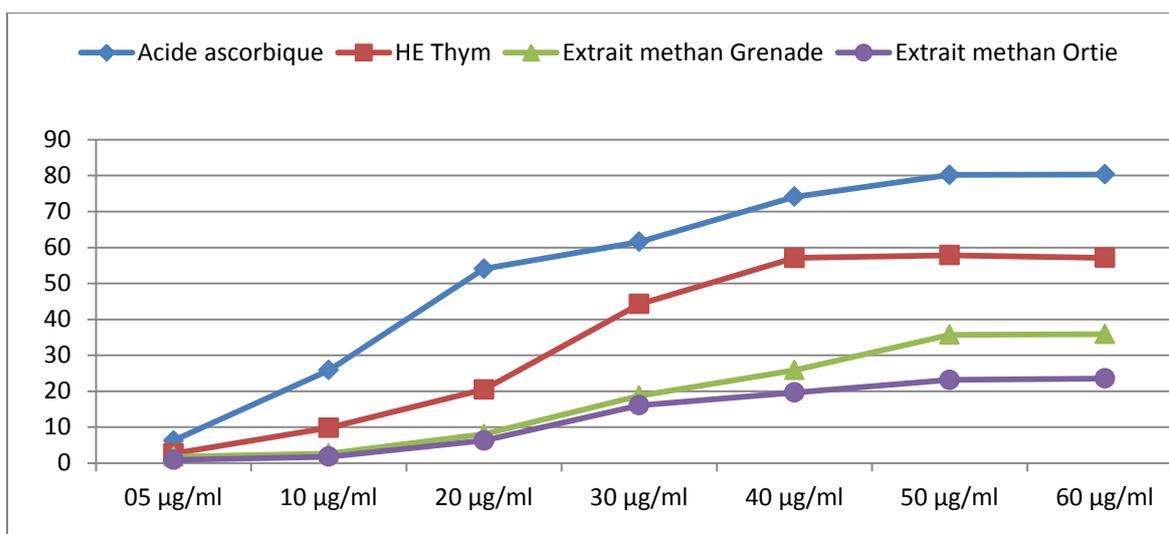


Figure 48: Profil d'activité antioxydante (AA) de l'acide ascorbique et des extraits végétaux des plantes testées

. Des résultats meilleurs (98,35%) sont présentés par **Kataki et al. (2012)** et cette différence est peut être due à la différence de la méthode d'extraction utilisé (Soxhlet) et la polarité du solvant utilisé (méthanol 100%). En effet, La faible activité antiradicalaire de l'extrait aqueux peut être expliquée par le fait que ce solvant ne soit pas adéquat pour l'extraction des composés qui ont une bonne activité antiradicalaire d'*Urtica dioica* L, ceci confirme que la polarité du solvant affecte sa capacité à dissoudre un groupe de composés antioxydants et influence ainsi l'estimation de l'activité antioxydante. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par **Kukrića et al. (2012)**.

Par ailleurs, la CE50 exprime la quantité d'antioxydant capable de réduire 50% de la concentration du radical libre. Elle est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante d'un composé. Selon **Gourine et al., (2009)**, la valeur de la CE50 des huiles des feuilles de Thym est plus élevée (CE50 = 14.25 µg /ml) que celle de l'acide ascorbique (CE50 = 8.44 µg /ml) et plus la valeur de CE50 est basse et plus l'activité antioxydante est grande.

Ainsi, les résultats obtenus nous ont permis de constater que l'huile essentielle du thym à un pouvoir antioxydant élevé de l'ordre de 57% avec 0,04mg/ml ce qui témoignent d'un pouvoir antioxydant in vitro très intéressant riches en phénols (thymol et carvacrol). En effet, ces deux derniers constituants phénoliques ont déjà prouvé leur fort pouvoir antioxydant (**Kulisic et al., 2004 ; Amarti et al, 2011**).

La forte activité de cette essence a été également signalée par **Akrouit *et al.* (2010)**, et **Bounatirou *et al.* (2007)**. Ces derniers ont précisés que cette huile essentielle récoltée pendant et après la floraison possède plus de pouvoir antioxydant en comparaison avec celle de la période végétative. De même pour **Benhamou *et al.*, (2006)**, qui ont fait même constat que cette huile reste faible (CE50 = 15.63 mg/ml) comparé à l'Acide Ascorbique (l'antioxydant de référence) (CE50 = 0.50 mg/ml).

Pour la grenade, nos résultats révèlent que l'extrait de l'écorce de fruit de ***Punica granatum*** possède une activité antiradicalaire de l'ordre de 35,9% ce qui indique que cette écorce possède une importante activité antioxydante, qui est attribuée à sa richesse en composés phénoliques. Ce pouvoir réducteur est dû à la présence de groupement hydroxyle des composés phénoliques qui servent de donneurs d'électrons. En effet, comme pour **Kang *et al.*, (2003)** qui ont suggéré que les molécules polaires poly phénoliques présentes dans l'extrait végétal contribuent à l'augmentation de l'activité antiradicalaire et ceux de **Seeram *et al.*, (2006)** ont démontré que les tiges et l'écorce du grenadier possèdent des propriétés antioxydantes très importantes.

3-1-5- Interprétations des résultats de l'Analyse phytochimique

3-1-5-1- Interprétations de l'Analyse phytochimique par FTIR:

a) Analyse phytochimique de la poudre des feuilles et tiges de l'Ortie

Ces spectres sont réalisés à partir d'échantillon (poudre végétale d'*Urtica dioïca* L) dispersé dans une poudre de KBr (Bromure de potassium) qui sont modelés en forme de pastille fine et transparente puis introduite dans le spectrophotomètre IR situé au niveau du Laboratoire de chimie des Matériaux de l'université d'Oran. Les spectres IR sont enregistrés sur un appareil FTIR-8201 PC Spectrometer. Les principales bandes d'absorption sont donnés en cm^{-1} .

L'analyse phytochimique de la poudre des feuilles et tiges *d'Urtica dioïca* par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ou spectroscopie FTIR a révélé la présence de différentes familles de composés chimiques tels que les phénols (les composés cycliques) existant dans les extraits végétaux de l'Ortie (**OH Ar-OH, C₆H₆, C-O-C ether oxyde, C-N, C-O phénol et C=O**). En effet, selon la figure 50, on note la présence de certains acides phénoliques dans les extraits végétaux tels que *p*-acide coumarique, l'acide

ferulique, et *o*-acide coumarique situés dans les fréquences entre 3200 et 3600, (Wave number (cm⁻¹)). (Medic-caric et al, 2004).

Tableau 21: spectre phytochimique de la poudre des feuilles et tiges d'*Urtica dioica* réalisé par FTIR

S/N	Peak (Wave number cm ⁻¹)	Intensity	Bond	Functional group assignment	Group frequency
1	470.6	31,65	C-N	nitrile	500- 575
2	563.2	22,54	C-H	Alkenes	575-995
3	1073.31	15,46	Esters C-H	Alcohols, Carboxlic acids,	1050-1300
4	1384.80	26,54	Esters C-H	Alcohols, Carboxlic acids,	1050-1400
5	1635.5	25,14	C=O	fonction aldéhyde	1500-1600
6	1736.82	23,36	C=O	fonction aldéhyde	1600-1800
6	2686.84	29.92	O-H	Carboxylic acids	2500- 2700
7	2850.55	21,88	C=C	fonction alcyne	2850-2970
8	2923.91	20,48	CH	fonction alcène	2900-2970
9	3417.66	8,98	O-H	Alcohols, Phenols	3200-3600

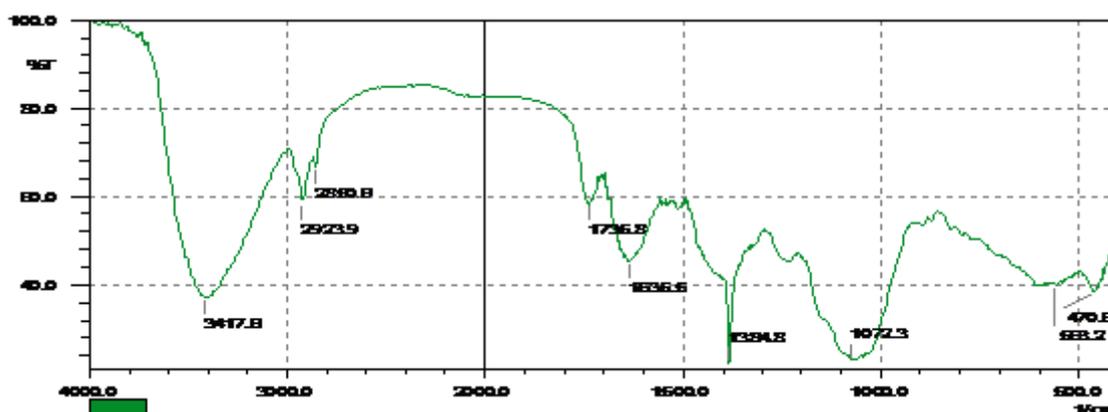


Figure 49. Analyse phytochimique de la poudre des feuilles d'*Urtica dioica* par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (*Uncal - ORTIE -10%-G2-HE12_07_201808_44 - Detector B*)

Par ailleurs, selon la même **figure 49** et le tableau 21, de l'analyse par infra-rouge (FTIR) de la **poudre des feuilles et tiges** d'*U. dioica* L., on constate plusieurs liaisons à fonctions variées. En effet, les bandes autour de 1100 cm⁻¹ sont attribuées à la liaison C-H

(fonction ester); les bandes autour de 1600 correspondent à la liaison C=O (fonction aldéhyde) ; les bandes étroites autour de 2600cm^{-1} correspondent à la liaison O-H (fonction acide); les bandes étroites autour de 2900cm^{-1} correspondent à la liaison CH (fonction alcène) et enfin, les bandes larges autour de 3300 cm^{-1} sont associées à la vibration d'élongation de la liaison OH (fonction phénol).

Des résultats similaires ont été obtenus par **Laoufi (2017)**, qui a noté la présence des groupements O-H ($3306,30\text{ cm}^{-1}$), C=C ($1636,52\text{ cm}^{-1}$) et une élongation de la liaison C=O. L'analyse FTIR des feuilles de *U. dioica* a prouvé la présence d'anneaux aromatiques, d'alkenes, de fluoro aliphatique, d'alcools, d'éthers, d'acides carboxliques, d'esters, de composés nitro, d'alcools liés à l'hydrogène et de phénols.

Il contient des constituants chimiques qui peuvent être utiles pour diverses formulations à base de plantes comme anti-inflammatoire, analgésique, antipyrétique, tonique cardiaque et antiasthmatique.

Les résultats d'analyse obtenus montrent l'existence de 05 bandes correspondant aux groupements fonctionnels alcyne, nitrile, ester et amide appartenant au groupe d'alcaloïdes tropaniques comme l'atropine, cocaïne, isocyanine, et scopolamine.

Les fonctions C=O révélées dans l'Ortie peuvent être expliquées par la présence de certains composés tels que : L-ornithine, Cuscohygrine, et l'hygrine appartenant au groupe alcaloïdique pyrrolidinique.

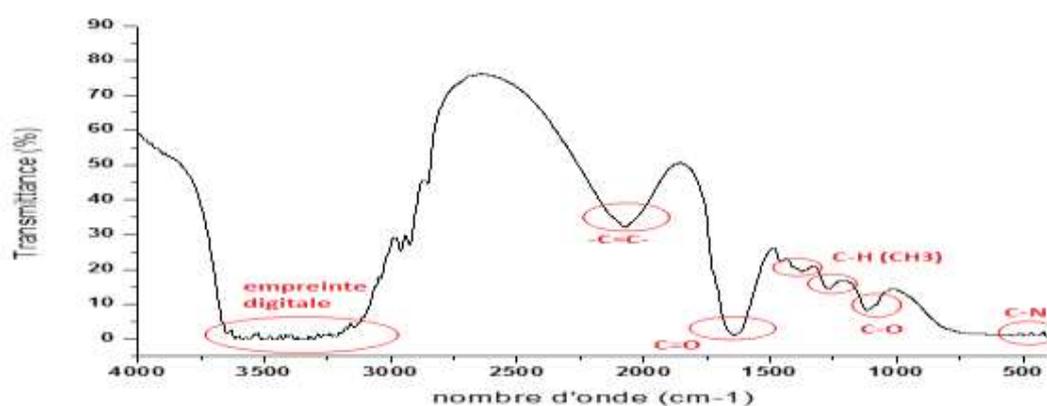


Figure 50. Analyse phytochimique des feuilles d'*Urtica dioica* par spectroscopie infrarouge

b) Analyse phytochimique des extraits de l'écorce de Grenade

Selon la figure 51 de l'analyse par infra-rouge (FTIR) de la poudre d'écorce de Grenade, on constate plusieurs liaisons à fonctions variées.

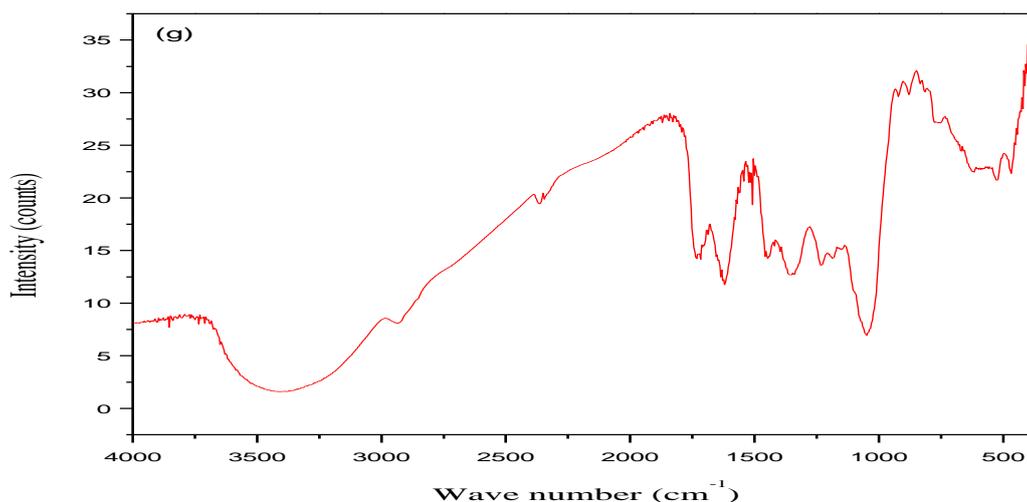


Figure 51. Analyse phytochimique de l'écorce de Grenade (*Punica granatum*) par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

En effet, les bandes autour de 1100 cm^{-1} sont attribuées à la liaison C-H (fonction ester); les bandes autour de 1600 correspondent à la liaison C=O (fonction aldéhyde) ; les bandes étroites autour de 2900cm^{-1} correspondent à la liaison CH (fonction alcène); et enfin, les bandes larges autour de 3300 cm^{-1} sont dues à la vibration d'élongation de la liaison OH (fonction phénol), (**Tab.22**).

Des résultats assez semblables ont été obtenus par **Kavtaradze *et al.* (2001)** qui a constaté la présence de cinq groupements fonctionnels : 3400 cm^{-1} (OH), 2940 cm^{-1} (OCH), $2840\text{-}2805\text{ cm}^{-1}$ (O-CH-), $1630\text{-}1520\text{ cm}^{-1}$ (aromatique), 1253 cm^{-1} (furane), $280, 1235, 1035\text{ cm}^{-1}$ (lignane).

Tableau 22: spectre phytochimique de la poudre de l'écorce de Grenade, réalisé par FTIR

S/N	Peak (Wave number cm^{-1})	Intensity	Bond	Functional group assignment	Group frequency
1	595.85	3,25		-Unknown	
2	613.12	3,05	C-H	Alkenes	575-995
3	732.21	16,24	C-H	Alkenes	575-995
4	985.63	02,69	C-H	Alkenes	575-995
5	1515.45	10,35	Esters C-H	Alcohols, Carboxlic acids,	1050-1500
6	1634.35	06,50	C=O	fonction aldéhyde	1500-1600
7	2835.45	13,80	CH	fonction alcène	2850-2970

8	2902.22	09,53	CH	fonction alcène	2900-2970
9	3643.33	02,35	O-H	Alcohols, Phenols	3200-3600

c) Analyse phytochimique de l'huile essentielle du Thym

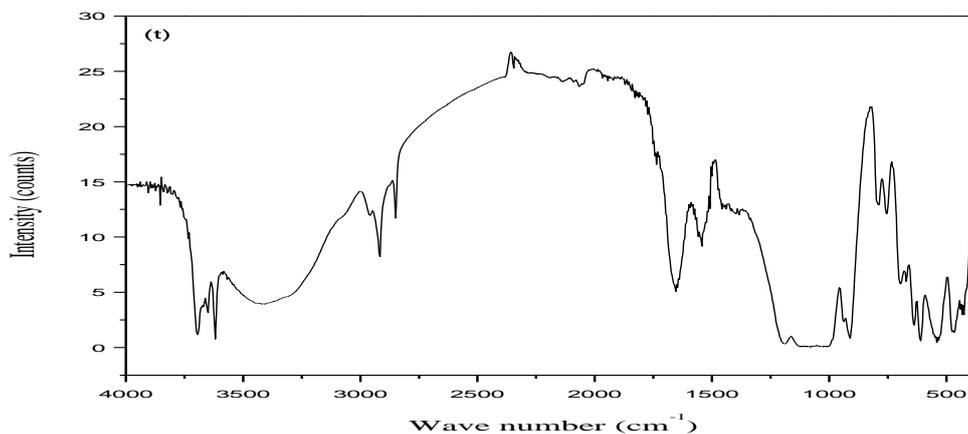


Figure 52. Analyse phytochimique de la poudre des feuilles et tiges du *Thym* (*Thymus vulgaris*) par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La **figure 52** et le tableau 22, démontre plusieurs liaisons à fonctions variées situées dans les bandes autour de 500 à 900 cm^{-1} attribuées à la liaison C-H (Alcènes); dans les bandes autour de 1500 à 1600 correspondent à la liaison C=O (fonction aldéhyde) ; les bandes étroites autour de 2800 cm^{-1} à 3000 correspondent à la liaison CH (fonction alcène); et de 3200 à 3600 cm^{-1} associées à la vibration d'élongation de la liaison OH (fonction phénol).

Par ailleurs, une dizaine de composés ont été caractérisés dont les plus abondants sont le thymol (40 à 50%), le p-cymène (10 à 15%), le carvacrol et le linalol (4 à 6%). Par ailleurs, la caractéristique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est sa teneur élevée en thymol.

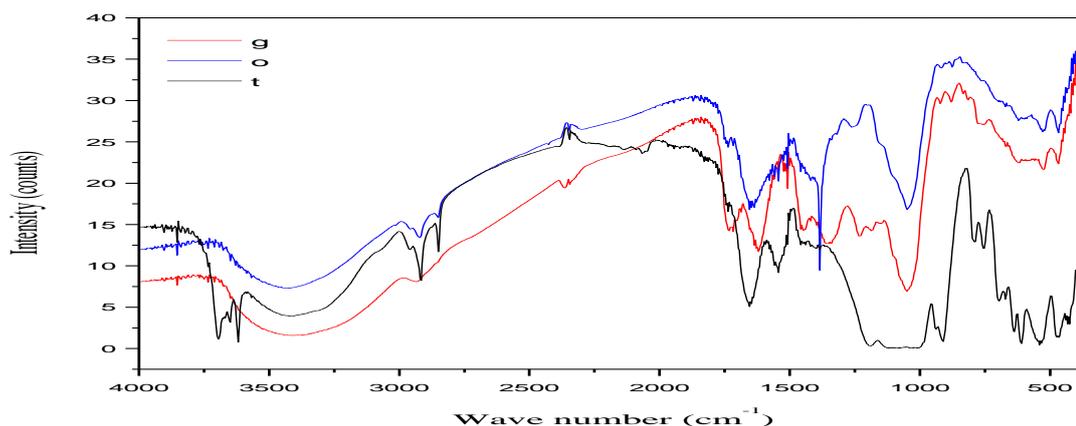


Figure 53. Analyse phytochimique par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) des poudres des trois espèces végétales testées

3-1-5-2- Interprétations de l'Analyse phytochimique par CG/SM

Les analyses ont été effectuées au laboratoire de chimie analytique, centre de recherche scientifique et technique en analyses physico- chimiques L'appareil est équipé d'une colonne capillaire HP-5MS (30 m x 0,25mm), avec épaisseur de film de 0,25 μm . La température de la colonne est de 50 à 250 °C à raison de 4 °C/min. Le gaz utilisé est l'hélium avec un de 1,5ml/min. L'injection est en mode split (1/70), la fragmentation est effectuée à 70 eV. L'appareil est relié à un réseau informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse NIST 98 dirigé par un logiciel « HP Chem Station » pour les variations chromatographiques.

L'Analyse chimique des trois extraits végétaux testés par CPG/SM démontre qu'ils sont riches en composés phénoliques qui ont d'ailleurs des propriétés antibactérienne, antifongique et antioxydante, (**Tab.22**)

Par ailleurs, les acides phénoliques présents dans la feuille de thym : acide caféique, acide chlorogénique, acide rosmarinique, et leurs dérivés sont d'importants antioxydants. Ils possèdent aussi d'autres potentialités intéressantes : ce sont des inhibiteurs enzymatiques (ex : anti-inflammatoire ou anti-allergique), antiviraux et cytostatiques.

Par ailleurs, la variabilité du thym est influencée par des facteurs climatiques, pédologiques et topographiques (T°, lumière, sol et altitude) et par conséquent selon le composant chimique dominant, on distingue plusieurs **chénotypes** (thymol,

carvacrol, linalol, thuyanol entre le linalol et le géraniol, géraniol, paracymène précurseur du carvacrol et du thymol et enfin le chémotype à alpha terpinéol).

L'analyse par GC et GC-MS de l'huile essentielle du Thym (*Thymus vulgaris*) obtenues par hydrodistillation a permis l'identification d'un dizaine de composés appartenant surtout aux monoterpènes, tel que le thymol (42,38%) suivi par le p-cymène avec une forte teneur (13,57%) et faible teneur pour linalol (5,46%) et carvacrol (3,4%).(Tab.23)

Globalement, dans les différentes huiles essentielles du Thym, les principaux constituants sont le Thymol (en moyenne 33 %), d'o-cymène (en moyenne 32 %) et du β -E-ocimène (en moyenne 12 %), accompagnés d'autres composés à des teneurs relativement faibles : linalol (3,99 %), carvacrol (2,69 %), β -pinène (2,08 %), bornéol (1,56 %), E-caryophyllène (1,51 %), 1,4-cinéole (1,49 %) et tricyclène (1,34 %). (Figure 54).

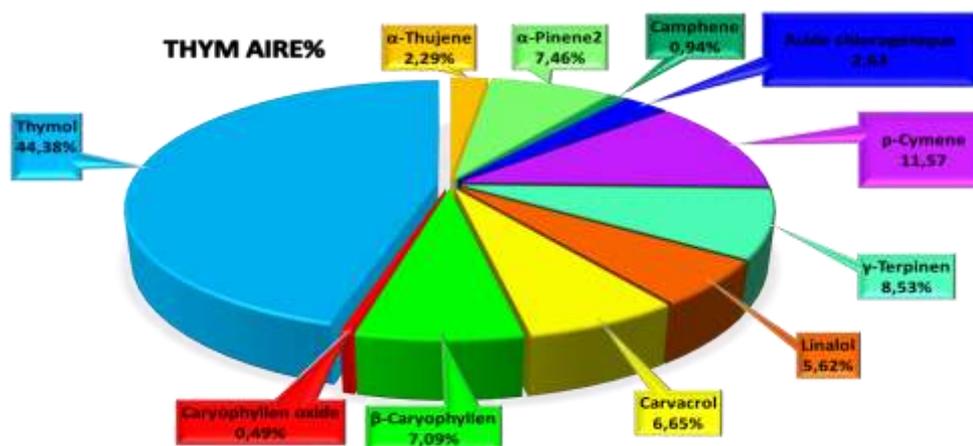


Figure 54. Composition chimique de l'huile essentielle du Thym obtenus par (CG / SM).

Les feuilles de l'ortie sont riches en flavonoïdes, ainsi qu'en composés phénoliques ainsi qu'en acides organiques. L'Ortie contient principalement le kaempferol, isorhamnetin, quercétine, isoquercitrin, astragaline, rutin qui pourrait être utile dans le développement dans les industries pharmacologique et agroalimentaires en raison de leur propriété antioxydante puissante. (Figure 55).

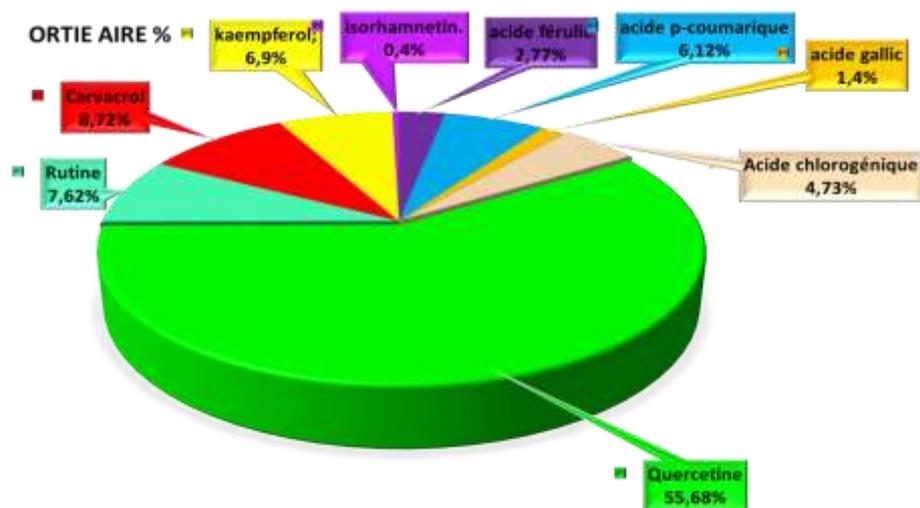


Figure 55. Composition chimique des extraits végétaux d'Ortie obtenus par (CG / SM).

D'après le tableau 20, et la Figure 56, les résultats des tests phytochimiques démontrent que l'écorce du fruit de l'espèce de Grenadier *Punica granatum* est composée principalement de polyphénols et de flavonoïdes. Néanmoins, elle contient aussi des traces de stérols et de polyterpènes alors que les alcaloïdes sont absents. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Bhandary et al, (2012).

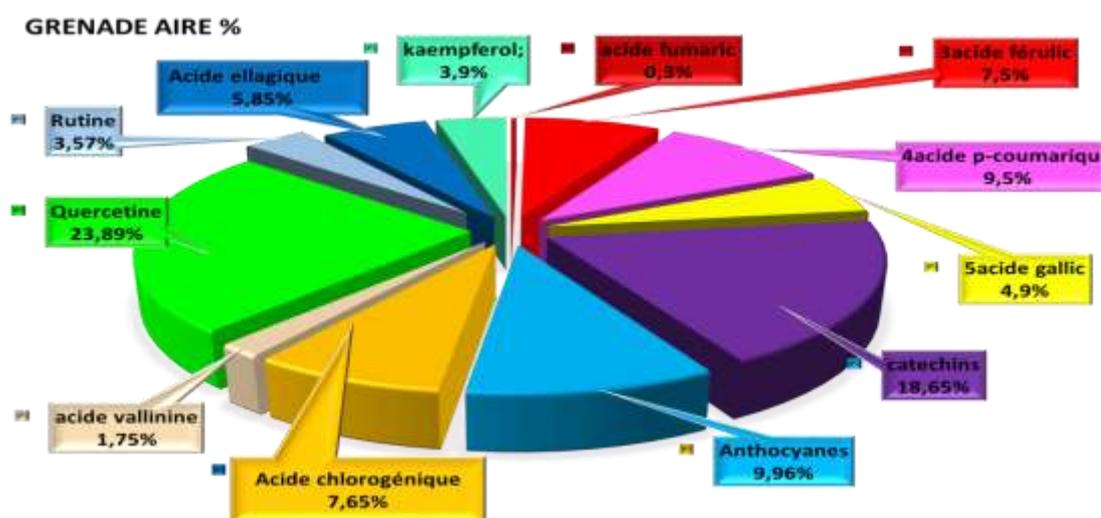


Figure 56. Composition chimique des extraits végétaux de l'écorce de Grenade obtenus par (CG / SM).

La quercétine est la plus active des flavonoïdes. Elle a une forte action antioxydante et anti-inflammatoire. En outre, Les tanins, l'acide caféique, l'acide férulique et les coumarines possèdent aussi une activité anti-oxydante.

Tableau 23. Résultats de l'analyse chimique par Chromatography gas/Mass Spectrometry (CG / SM) de l'huile essentielle du Thym et des extraits végétaux d'Ortie et de grenade

			Thym	Ortie	Grenade
N°	Molécule	RT (min)	Aire (%)	Aire (%)	Aire (%)
01	acide fumaric	3,24	--	--	0,3
02	acide salysilic	3,66	--		0,0
03	acide férulic	47,18	--	2,77	7,5
04	acide p-coumarique	3,66	--	6,12	9,5
05	acide gallic	3,82	--	1,4	4,90
06	catechins	4,30	--	0,0	18,65
07	Anthocyanes	4,50	--	--	9,96
08	α -Thujene	4,8	2,29	--	--
09	α -Pinene	5,04	7,46	--	--
10	Camphene	5,67	0,94	--	--
11	Acide chlorogénique	8,87	2,63	4,73	7,65
12	p-Cymene	09,18	11,57	--	--
13	1,8-cineole	09,81	--	--	--
14	γ -Terpinen	10,33	8,53	--	--
10	acide vallinine	13,61	--	--	1,75
11	Linalol	15,63	5,62	--	--
12	Quercetine	65,45	--	55,68	23,89
13	Rutine	57,15	--	7,62	3,57
14	Carvacrol	19,73	6,65	8,72	--
15	β -Caryophyllen	19,89	7,09	--	--
16	Acide ellagique	20,17	--	--	5,85
17	β -Cadinene, (-)-	20,62	--		
18	Caryophyllen oxide	21,57	0,49	--	--
19	Thymol	24,88	44,38	--	--
20	kaempferol;	67,54	--	6,9	3,9
21	isorhamnetin.	97,94	--	0,4	--
	Total		97,65	94,35	97,52

3-1- 7- Discussion

On tient à rappeler que le présent travail à un double objectif qui est d'un coté remplacer les pesticides de synthèse par des bioprotectants et de l'autre coté valoriser les plantes spontanées locales ainsi que les déchets des fruits tels que l'écorce de Grenade par l'utilisation de certaines de leurs substances végétales.

Pour contribuer à cela, nous nous sommes intéressés d'abord à l'évaluation des activités biologiques (antibactérienne, antifongique et antioxydante) d'extraits végétaux issus de trois espèces végétales locales et très utilisés dans l'alimentation et en médecine traditionnelle puis à l'étude de leur composition chimique.

Ainsi, les rendements d'extraits d'Ortie obtenus pour les trois types d'extraits: Aqueux, Ethanolique et Méthanolique démontrent que le méthanol est un bon solvant pour extraire les métabolites secondaires car la fraction Méthanolique représente le rendement le plus élevé suivit par la fraction Ethanolique et enfin la fraction Aqueuse. Il en de même pour les rendements d'extraits d'Ecorce de Grenade pour les trois types d'extraits.

Pour le Thym, le rendement moyen en huile essentielle est calculé en fonction de la matière Végétale sèche de la partie aérienne de la plante. Ce rendement moyen obtenu par hydrodistillation est remarquable (1,14%) et il est proche de celui rencontré en bibliographie, (**Eberhad et al, 2005**). D'autre part, **Saidj, (2007)**, a démontré que l'extraction par hydrodistillation donne entre 0.32 et 1.25% alors que l'extraction par entraînement à la vapeur donne des rendements plus élevés avec environ de 1.34 à 2.06%.

Ces derniers auteurs ont montré que le rendement en HE atteint son maximum pendant la phase de floraison (0,9–1,4%) et son minimum pendant la période de dormance (0,15%). Cependant, un taux plus élevé en HE (3%) a été retrouvé par Sotomayor et Sotomayor et al. (2002) pour *Thymus zygis* ssp. *Gracilis*. (In Amarti et al, 2011).

Les extraits d'Ortie sont fortement antimicrobiens en particulier très fongicide mais peu bactéricide. A cet effet, l'ajout d'échantillons de plantes vertes tel que l'Ortie dans les silos de stockages des semences des grains de riz est une pratique courante des peuples africains pour repousser certains bio agresseurs des denrées stockées (**Delahaye, 2015**).

Par ailleurs, la flore fongique parasite des cultures destinées à l'alimentation de l'Homme peut engendrer de graves conséquences sur la santé humaine (**Mishra and**

Dubey, 1994). Ce développement fongique est favorisé par une humidité élevée dans le champ et lors du stockage de longue période. La dominance du genre *Aspergillus* dans la flore contaminante des céréales est citée dans plusieurs travaux avec *Aspergillus fumigatus* qui est l'espèce la plus fréquente suivit de *A. flavus* et *A. Niger*. (**Pibiri, 2005**). D'autres souches appartenant à d'autres genres sont naturellement présentes dans les cultures au niveau des plantes et dans le sol, (**Molinie et Pfohl-Leszkowczh., 2003**).

Ainsi, sous l'effet des extraits végétaux, la croissance des organismes mycéliens est réduite voire inhibée à la concentration de l'extrait aqueux à 10% et de l'extrait méthanolique à la même concentration. Néanmoins, ils sont de moitié efficace comparés aux fongicides de synthèse, (Artea et Bayer). L'action dépressive des métabolites secondaires (**Macheix et Fleuriet, 2005**) de l'Ortie conduit, en particulier à une grande sensibilité surtout pour le genre fusarium en comparaison avec les genres *Aspergillus flavus* et *niger*. (**Mishra and Dubey, 1994; Macheix et Fleuriet, 2005**). L'effet réducteur du traitement par les extraits aqueux et alcooliques a été également rapporté par plusieurs auteurs chez d'autres espèces de plantes telles que *la lavande* (**Ouraini et al, 2005**).

De nombreux chercheurs (**Oussalah, et al., 2007**) ont montré que les huiles essentielles possèdent un très grand potentiel microbicide envers les bactéries et les champignons, mais ce spectre antimicrobien s'étend également vers les virus, les mycoplasmes, les protozoaires, et les insectes.

Ces résultats nous confirment que l'huile essentielle du Thym testée est un puissant antimicrobien, par sa forte teneur en thymol (44,38%), qui est un composé mono terpène phénolique connu pour avoir une grande action antiseptique et antimicrobienne.

A forte concentration, il est responsable d'une action bactéricide rapide car il traverse la paroi bactérienne et dénature les protéines membranaires et autres. Et a faible dose, il est bactériostatique **Mebarki, (2010)**. D'autres travaux ont suggéré aussi que ce composé volatil est responsable de l'inactivation d'enzymes, y compris ceux impliqués dans la production d'énergie et la synthèse des constituants de structure des bactéries et levures

L'effet antimicrobien est du essentiellement aux alcools terpéniques des huiles essentielles qui sont particulièrement actifs contre les cellules microbiennes car solubles dans les milieux aqueux. Ils provoquent d'importants dégâts sur les parois cellulaires des microorganismes (**Eberhard et al, 2005**). Les alcools possèdent une activité microbicide plutôt que microbiostatique (**Fouché et al, 2000**).

D'autre part, l'huile essentielle du Thym s'est avéré fongicide par contact direct, avec 100% d'inhibition cela pour les trois souches des champignons utilisés (*fusarium et Aspergillus*) à la concentration de 30µl

Le spectre d'action des alcools est très étendu, ils agissent contre un large éventail de micro-organismes pathogènes, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Ce constat, nous permet de conclure que ces propriétés sont liées à la composition chimique des HE et des extraits aqueux et alcooliques qui reste assez complexe, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques...) et à leurs effets synergiques.

Néanmoins, ces effets synergiques peuvent aussi concerner les composés minoritaires et par conséquent, la valeur d'une huile essentielle dépend de l'ensemble de ses constituants. Contre les champignons, les alcools et les sesquiterpéniques sont d'excellents inhibiteurs, ils peuvent émaner de la cannelle, clou de girofle, eucalyptus, géranium rosat et romarin

Concernant l'effet antibactérien de nos extraits utilisés, il est significatif et il est proportionnel à l'augmentation de la concentration pratiquée. L'évaluation de l'effet inhibiteur des extraits vis-à-vis *E. coli* permet d'obtenir les résultats présentés dans le tableau 02 qui montrent un effet inhibiteur de la croissance bactérienne. D'autre part, pour **Bakkali et al, (2008)**, l'activité antibactérienne est due à la cytotoxicité des composés végétaux qui peuvent endommager la membrane cellulaire des bactéries lorsqu'elles passent à travers leur paroi cellulaire et leur membrane cytoplasmique (déstructuration de la membrane et ses polysaccharides).

Enfin, d'après nos résultats, *E.coli* est la plus sensible car le taux d'inhibition est de 32,22% et 87,77% alors que celui de *S. aureus*, il est de 27,77% à 73,33 %. Toutefois, il faut souligner qu'il existe une sensibilité différentielle des deux bactéries Gram+ et Gram-testées. Cette différence d'effet peut être expliquée par la différence de la composition de la paroi cellulaire et le type de Gram. Plusieurs études ont montré que les bactéries Gram- sont plus résistantes que les Gram+ vis-à-vis des HE.

Les propriétés antibactériennes des différents extraits d'*Urtica dioica* vis-à-vis des souches bactériennes ont été mises en évidence par plusieurs travaux. Dans une étude réalisée sur neuf bactéries dont *Escherichia coli* et *Pseudomona aeruginosa*, l'extrait aqueux des parties aériennes a inhibé la croissance de ces bactéries sauf certaines souches

de *Pseudomonas aeruginosa* (Gulcin et al., 2004). Une autre étude effectuée sur 38 microorganismes a apporté l'évidence de l'effet bactéricide des extraits organiques des parties aériennes de l'ortie. Ces extraits ont inhibé la croissance, entre autre de *Bacillus subtilis*, *Erwinia* sp., *Escherichia coli*, *staphylococcus aureus* résistant à la méthicelline (MRSA).

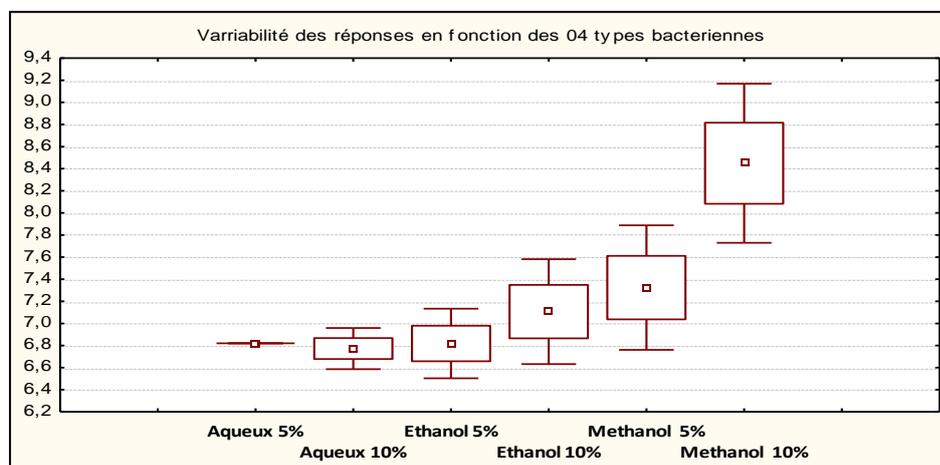


Figure 57 : Analyse de sensibilité selon les "Box splot" ("boites à moustaches") des 03 souches bactériennes en fonction des concentrations d'extraits d'Ortie

L'examen de la **figure 57** démontre une variabilité sensorielle des trois souches bactériennes testées en fonction des différentes concentrations d'extraits d'Ortie.

En effet, une moyenne de sensibilité de $6,82 \pm 0,00\text{mm}$ comme valeur initiale de sensibilité, ou première classe de sensibilité affichée pour *Pseudomonas*, la deuxième classe de sensibilité est marquée par $6,81 \pm 0,16\text{mm}$ jusqu'à $7,10 \pm 0,24\text{mm}$ (*E. coli*) et la troisième classe se situe à $7,32 \pm 0,28\text{mm}$ jusqu'à $8,44 \pm 0,36\text{mm}$ (*Staph. Aureus*).

Il apparaît clairement que la variable "Inhibition" est différente en fonction des espèces. On observe une valeur extrême dans la catégorie 3.

Les composés phénoliques présents dans l'ortie seraient responsables de cet effet antibactérien (Modarresi-Chahardehi et al., 2012). D'autre part, les polyphénols sont reconnus pour leur toxicité vis-à-vis des microorganismes et cela pour leur inhibition des enzymes hydrolytiques (protéases et carbohydrase) ou à l'inactivation des multiplications microbiennes (Fouché et al., 2000).

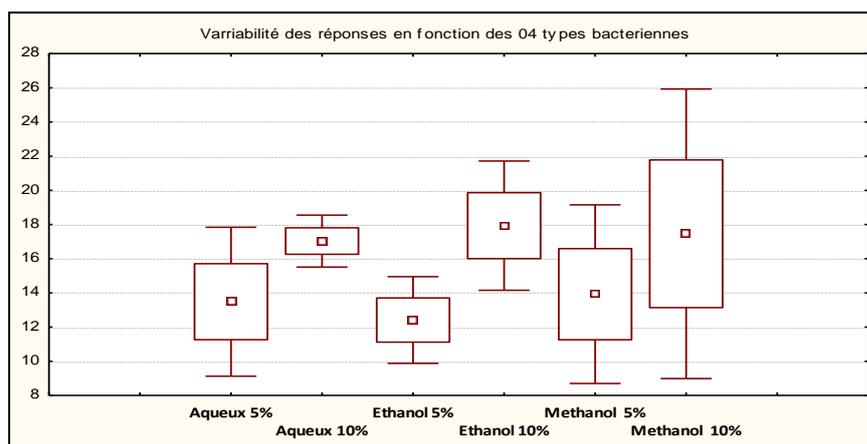


Figure 58 : Analyse de sensibilité ("boites à moustaches") ou "Box plot" des 03 souches bactériennes en fonction des concentrations d'extraits de grenade

Le classement des 03 souches bactériennes inhibées en fonction des concentrations d'extraits de grenade est similaire à l'effet de l'ortie. En effet, la **figure 58** montre une valeur initiale de sensibilité noté chez *Pseudomonas* de $13,48 \pm 07,30$ mm puis comme deuxième classe de sensibilité est marquée chez *E. coli* avec $12,41 \pm 1,29$ mm jusqu'à $17,93 \pm 1,90$ mm et enfin la troisième classe se situe à $13,92 \pm 2,66$ mm jusqu'à $17,45 \pm 4,32$ mm affichée par *Staph.Aureus*. Ainsi, nos résultats ont montré que l'ensemble des extraits ont été actifs à divers degrés et ont manifesté une activité antibactérienne en inhibant la croissance *in vitro* des germes bactériens selon une relation concentration-réaction.

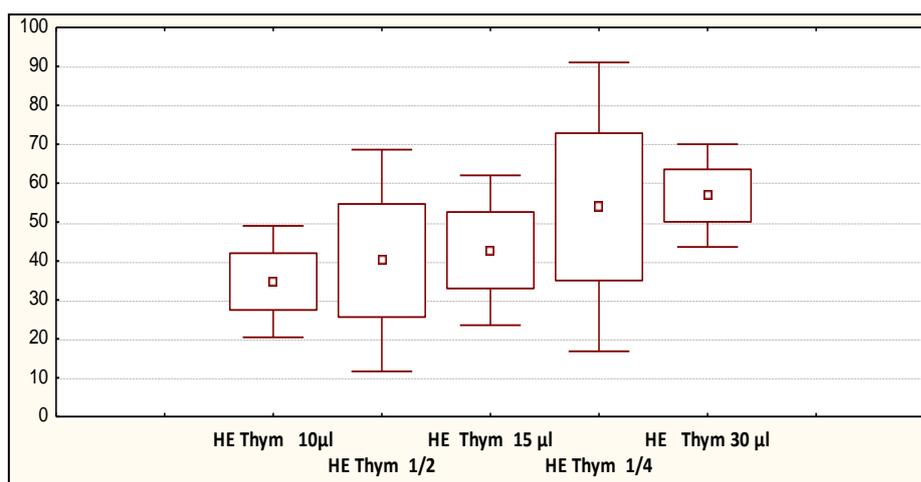


Figure 59 : Analyse de sensibilité ("boites à moustaches") des 03 souches bactériennes en fonction des concentrations d'HE du Thym

D'autre part, l'examen de la **figure 59** montre une analyse préliminaire de la variabilité sensorielle des souches bactériennes testées en fonction des différentes

concentrations de l'huile de thym. Une moyenne de sensibilité de $34,69 \pm 07,30$ mm comme valeur initiale de sensibilité, ou première classe de sensibilité (*Pseudomonas*). La deuxième classe de sensibilité est marquée par $40,11 \pm 14,53$ mm jusqu'à $42,75 \pm 09,82$ mm (*E. coli*) et la troisième se situe à $53,90 \pm 18,93$ mm jusqu'à $56,79 \pm 06,73$ mm (*Staphylococcus Aureus*).

La comparaison des résultats des deux tests (antibactérienne et antifongique) nous a permis de déduire qu'il existe des différences dans le classement basé sur les valeurs des activités antimicrobiennes entre les espèces étudiées.

Ainsi **Haddouchi et al (2009)** dont leur étude sur l'activité antimicrobienne de l'HE de *T. fontanesii*, ont obtenus une inhibition de 31 mm sur une bactérie Gram+ (*S. aureus*) et de 9 mm sur une bactérie Gram- (*P. aeruginosa*). La résistance des bactéries Gram- est due à la présence d'une seconde membrane lipopolysaccharidique jouant un rôle de barrière. On outre, elle est plus riche en protéines que celle des Gram+ ce qui les rend plus hydrophiles empêchant ainsi les composés hydrophobes d'être antimicrobienne (**Alvesalo et al., 2008**).

Pour **Ncube et al., (2008)**, l'absence d'effet bactériostatique ou bactéricide sur les différentes souches testées pourrait être du soit à la résistance de celles-ci ou bien à l'insuffisance des polyphénols car le screening phytochimique et le dosage de l'extrait végétal ont montré une teneur faible en composés phénoliques pour les trois orties étudiées d'où la résistance des germes phytopathogènes. Mais aussi, l'activité d'un extrait est probablement due à la présence de synergie entre un nombre de composants, qui lorsqu'ils sont séparés deviendraient inactifs individuellement (**Rios and Recio, 2005**). De même que la méthode d'extraction et les solvants utilisés pour l'extraction pourraient être à l'origine de ces résultats (**Hayouni et al., 2007**).

Ces résultats sont proches de ceux obtenus par **Selmi et Sadok, (2008)**. D'autre part, dans une étude de la composition chimique de l'huile essentielle *Thymus spinulosus* avec réalisation de tests biologiques sur son activité antibactérienne, ont constatés que ce sont les monoterpènes (thymol) qui sont inhibiteur des bactéries.

Pour préciser le caractère bactériostatique ou bactéricide des différents extraits végétaux sélectionnés, des tests de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) ont été réalisés. Ce qui permet

aussi de déterminer les différents paramètres antibactériens à savoir la concentration minimale inhibitrice (CMI), la concentration minimale bactéricide (CMB) et le rapport CMB/CMI. Les résultats des CMI et CMB ou CMF varient d'un microorganisme à un autre

À l'issue de l'analyse de ce rapport, on constate que les extraits végétaux testés dans cette étude sont bactéricides. En ce qui concerne l'activité antifongique, les résultats des analyses ont montré qu'ils sont aussi actifs vis-à-vis la souche fongique *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* et moins face aux autres champignons.

Cependant, les plus actifs sont ceux de *Thymus et punica granatum*. Par contre le moins efficace est celui de l'Ortie qui n'est que bactériostatique et fongistatique mais il est puissant antioxydant.

D'après **Bekhechi et al., (2008)**, la sensibilité des micro -organismes aux extraits végétaux peut varier en fonction de divers paramètres tels que la composition chimique et la concentration relative de chacun des constituants de l'huile essentielle. Cette activité est, par ailleurs, variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche à l'autre. Elles peuvent être biocides contre certaines souches, biostatiques envers d'autres, ou n'avoir aucun effet.

Les études sur les mécanismes d'action des huiles essentielles sont peu nombreuses et ne constituent que des hypothèses (**Bakkali, et al., 2008**). De plus, la complexité de leur composition chimique laisse supposer que ce mode d'action est difficile à cerner du point de vue moléculaire.

Les raisons de cette variabilité peuvent être principalement dues à la différence des facteurs écologiques et à la croissance des plantes, au génotype, au climat, à la géographie, à la saison de récolte, à l'organe étudié de la plante, au mode de séchage et au mode d'extraction.

Par ailleurs, les interactions entre les produits chimiques composants des extraits végétaux sont à considérer. La synergie et l'antagonisme entre les composants influencent les activités, ce qui suggère que les composants mineurs peuvent présenter un effet bioactif significatif (**Xavier, et al., 2012**).

L'huile essentielle du thym est fortement antimicrobienne. Tous les chimiotypes sont actifs, mais l'activité bactéricide est plus marquée, (**Haddouchi et al, 2009**).

Concernant l'effet antibactérien de notre huile utilisée et on comparant les résultats de l'effet de l'HE avec l'antibiogramme réalisé, notre constat est que l'effet antibactérien est aussi remarquable et il est proportionnel à l'augmentation de la concentration en HE.

L'activité antibactérienne de notre huile du Thym est estimée en diamètre d'inhibition autour des disques imbibés d'HE à tester vis-à-vis des trois germes pathogènes (*E. coli*, *P.aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*) après 24 heures d'incubation à 37°C. Les résultats des zones d'inhibition révèlent qu'*E. coli* apparaît sensible vis-à-vis de l'HE testée (29-79) mm par rapport à *Staphylococcus aureus* (25-66).

Par ailleurs, les activités antimicrobienne et antioxydante de l'écorce de fruit de *Punica granatum* laissent à penser à l'utilisation de ce dernier comme agent de conservation naturelle dans plusieurs applications agroalimentaires.

En effet **Navarro et al.,(2011)**, **Viuda-Martos et al.,(2009)** ont démontré que l'utilisation de l'extrait de l'écorce de fruit de *Punica granatum* comme condiment alimentaire améliore la qualité organoleptique et hygiénique des produits agroalimentaires par son effet antioxydant et inhibiteur des microorganismes nuisibles.

Ainsi, selon notre étude, on a constaté que le fruit du grenadier qui contient une quantité notable de polyphénols et de flavonoïdes, peut jouer un rôle majeur dans l'activité antioxydante et qu'il peut être utilisé comme source naturelle d'antioxydant.

De même pour l'huile du Thym dont l'activité antioxydante déterminée par le test DPPH lui a démontré un fort potentiel antioxydant avec l'IC 50 = 75,97 ± 0,86 µg/ml, en comparaison à d'autres espèces de thym de la littérature.

Par ailleurs, selon **Amarti al, (2011)**, les huiles essentielles de *T. capitatus* et *T. ciliatus* affichent un pouvoir antioxydant remarquable comparés à *T. algeriensis* qui présente un faible effet antioxydant.

Cette forte capacité réductrice des radicaux libres des deux essences est due à leurs profils chimiques, riches en phénols (thymol et carvacrol) par contre la faible activité antioxydante de *T. algeriensis* est expliquée par sa faible teneur en thymol (0,15%) et l'absence du carvacrol.

Cependant, d'autres auteurs (**Cosentino et al., 1999**) ont trouvé que l'huile essentielle de *T. ciliatus* est composée principalement de thymol (44,2%), de β -E-ocimène (25,8%) et d' α -terpinène (12,3%) accompagnés d'autres constituants à des teneurs relativement faibles : linalol (3,24%), δ -3-carene (3,1%), 1,8-cinéole (2,63%) et carvacrol (2,4%) totalisant environ 93,67%.

Cette bio activité est due à la richesse de cette essence en thymol connu pour son efficacité contre les agents microbiens (**Amarti et al, 2011**). Néanmoins, l'activité antioxydante des composés majoritaires testés séparément donne des résultats inférieurs comparés à l'activité de la totalité de l'huile essentielle.

Les interactions synergiques entre les différents constituants d'une huile essentielle sont à l'origine d'un pouvoir antioxydant beaucoup plus important.

En effet, certains composés autres que les composés phénoliques tels que le γ -terpinène possèdent aussi une forte activité antioxydante (**Amarti et al, 2011**).

Conclusion Générale

Conclusion Générale

Conclusion générale

En Agriculture et dans l'industrie agro-alimentaire, la lutte contre les ravageurs et bioagresseurs (fongiques et bactériens, en particulier) repose principalement sur l'utilisation de pesticides chimiques qui, malheureusement, perdent de leur efficacité face à des parasites qui développent de plus de plus de résistance à leur rencontre suite aux applications répétées de ces pesticides chimiques. En effet, les produits de synthèse à l'image des antibiotiques ne sont plus aussi efficaces qu'avant car dans la mesure où le pesticide n'est constitué d'une seule molécule, il est aisé pour un micro organisme telle une bactérie de synthétiser une enzyme, ou une autre molécule, le rendant inactif. Or, Cela ne peut se produire avec les traitements aromatiques car l'extrême diversité de leurs composants empêche les microbes d'organiser leur résistance, surtout lorsqu'elles sont associées entre elles.

En effet, les végétaux qui sont en permanence menacés par des facteurs altérogènes susceptibles de déprécier leurs productions agricoles en quantité et en qualité ont dû lutter pendant des millions d'années pour survivre en diversifiant leurs stratégies de résistance et en l'occurrence elles ont développé des stratégies de lutte en synthétisant de nombreuses molécules servant à les défendre contre de multiples et divers agresseurs.

Dans cette optique, cette étude a ciblé la mise en valeur des extraits végétaux issus de plantes aromatiques locales et spontanées en l'occurrence *Thymus vulgaris*, *Urtica dioica* et *Punica granatum*, susceptibles d'être exploitées dans le domaine phytosanitaire comme composés naturels bioactifs. Par ailleurs, ces plantes sont connues et utilisées depuis l'antiquité, pour leurs vertus thérapeutiques.

Les différents travaux, réalisés au cours de cette thèse, ont permis de mettre en avant les propriétés antibactériennes et antifongiques des extraits végétaux des trois espèces végétales à l'égard de microorganismes bactériens (*Staphylococcus Aureus*- *Pseudomonas aeruginosa*- *Echerchia coli*) et fongiques (*Fusarium oxysporum* - *Fusarium lycopersici* et *Aspergillus niger*). Ainsi que la propriété antioxydante et la composition chimique des extraits végétaux des trois espèces végétales.

Notre étude au laboratoire a débuté par l'extraction de l'huile essentielle par hydro distillation du thym et l'extraction d'extraits éthanoliques, méthanoliques et aqueux issus respectivement des feuilles et des tiges d'Ortie (*Urtica dioica* L.), puis de l'écorce de

Conclusion Générale

grenade (*Punica granatum*), qui sont des procédés peu onéreux, pratiques, simples et qui permettent d'obtenir des extraits appréciables en quantité et en qualité.

Ainsi, le rendement moyen obtenu pour l'huile de Thym est de 1,14% du poids frais, pour les extraits d'Ortie, on a eu **12,52%, 15,57% et 17,01%** respectivement **pour les extraits Aqueux, Ethanolique et Méthanolique** et pour l'Ecorce de Grenade, les rendements obtenus sont **14,73%** pour l'extrait Aqueux, **15,19%** pour l'extrait Ethanolique et pour l'extrait Méthanolique **17.34%**.

D'autre part, l'activité antibactérienne est estimée en diamètre de la zone d'inhibition autour des disques imbibés des extraits à tester vis-à-vis de souches microbiennes testées. Ainsi, les résultats des diamètres des zones d'inhibition révèlent qu'*Escherichia coli* apparait sensible vis-à-vis de l'HE du Thym testée par rapport à *Pseudomonas aeruginosa*. En effet, les diamètres des zones d'inhibition varient entre 27,51 à 47,69mm pour *Pseudomonas aeruginosa* et de 30.27 à 61.80mm pour *Escherichia coli*,

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition révèlent qu'*Escherichia coli* apparait sensible par rapport à *Staphylococcus aureus* sous l'effet des extraits végétaux mais face aux antibiotiques de synthèse *Staphylococcus aureus* qui est Gram+ est plus résistant que *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. L'effet antimicrobien est du probablement aux alcools terpéniques de nos extraits végétaux qui sont particulièrement actifs contre les cellules microbiennes car solubles dans les milieux aqueux et qui provoquent d'importants dégâts sur les parois cellulaires des microorganismes.

D'un autre coté, les moisissures sont toujours présentes sur les graines en champ de culture ou au stockage et les extraits d'Ortie utilisés ont montrés un effet antifongique important à de faibles concentrations mais cet effet est variable d'une plante à une autre. Les tests fongistatique/fongicide ont démontrés que les extraits d'Ortie sont dotés d'une forte action antifongique sur toutes les moisissures testées.

D'autre part, l'HE du Thym s'est avéré fongicide par contact direct, avec 100% d'inhibition cela pour les trois souches de champignons utilisés à la concentration de 30µl.

L'effet antimicrobien est du essentiellement aux alcools terpéniques qui sont particulièrement actifs contre les cellules microbiennes car solubles dans les milieux aqueux. Ils provoquent d'importants dégâts sur les parois cellulaires des microorganismes. Les alcools ont un effet microbicide plutôt que microbiostatique.

Conclusion Générale

Par ailleurs, l'étude de l'activité antioxydante des extraits végétaux testés selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH a montré que les extraits éthanoliques, méthanoliques et aqueux possèdent une activité antioxydante modérée mais satisfaisante globalement permettant à nos extraits de remplacer certains additifs synthétiques.

Cette activité est nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique, mais il s'agit d'extraits bruts qui pourraient être purifiés et devenir un agent oxydant d'égale valeur à celle de la l'acide ascorbique. Des recherches complémentaires sont nécessaires pour identifier, isoler et purifier les constituants des extraits végétaux.

Ces conclusions permettent de suggérer la possibilité d'utiliser les extraits végétaux de ces plantes comme alternative intéressante aux composés de synthèse, dans le domaine de la protection des cultures comme antioxydants dans le secteur agro-alimentaire.

D'autre part, le recours au plantes médicinales pour la lutte contre les agents de détérioration des cultures nous semble adéquat tant pour l'intérêt économique de l'opération que pour son intérêt écologique.

En effet, l'utilisation de formulations volatiles à base de plantes aromatiques et médicinales peut présenter de nombreux avantages par rapport aux produits de synthèses actuels car les formulations à base de phytométabolites secondaires ne sont ni polluantes ni toxiques pour l'environnement et peuvent avoir une activité biocide élevée.

Par ailleurs, de telles plantes ont rôle un majeur dans la vie humaine. car elles sont la principale source d'alimentation d'une part et d'autre part, elles sont largement utilisées dans le traitement et la prévention des maladies, en particulier sur le continent africain et asiatique. L'analyse chimique de ces plantes confirme leur richesse en molécules actifs tels que les phénols ainsi qu'en flavonoïdes et anthocyanines qui ont de forts pouvoirs antioxydants. Ceci nous amène à dire que les plantes étudiées sont prometteuses comme source de Bio pesticides et se prêtent bien à des investigations dans le domaine de la lutte biologique **en particulier l'Ortie** qui est une plante trop marginalisée.

En effet, le recours aux plantes médicinales est doublement bénéfique dans la lutte contre les agents de détérioration des cultures: **intérêt économique** et **intérêt écologique**.

Perspectives

Perspectives

L'importance indiscutable des plantes aromatiques, leur contenu en HE et la nature chimique de leurs constituants, leur confèrent de grandes perspectives d'application. Ainsi, à la fin de ce travail qui n'est qu'une contribution à la recherche scientifique dont **les résultats obtenus restent incomplets**, nous espérons que notre modeste contribution dans ce thème sera complétée par d'autres travaux qui porteront sur :

✦ le choix du biocide naturel qui devra se baser sur un ravageur précis à combattre car **il a été prouvé que la réponse à l'intensité de la toxicité d'un produit est spécifique au ravageur.**

✦ La recherche de la méthode d'extraction la plus rentable.

✦ La recherche d'une formulation de biopesticide à base d'ortie ou d'écorce de grenade (broyage - extraction - méthode technico-économique pour standardiser la préparation des émulsions stables avec leur pouvoir biocide pour une agriculture sans pesticides chimiques dans l'avenir)

✦ La recherche d'une méthode adéquate pour l'utilisation de l'HE du Thym dans le traitement des grains stockés.

✦ D'élargir l'échantillonnage sur tout le territoire national et d'augmenter le nombre d'échantillons de la plante étudiée afin de mettre en exergue sa nature chimique par rapport à son origine géographique.

✦ De valoriser l'utilisation de l'Ortie dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique.

References Bibliographiques

Références bibliographiques

- Adam, K.L. 2005.** Lavender Production, Products, Markets, and Entertainment Farms. A Publication of ATTRA - National Sustainable Agriculture Information Service
- Adem, (1978)** Ma méthode d'apiculture. Ed. le courrier du livre. Paris. pp : 45-47.
- Afaq, F., Malik, A., Syed, D. (2005)** Pomegranate Fruit Extract Modulates V-B – mediated Phosphorylation of Mitogen-activated Protein Kinases and Activation of Nuclear Factor Kappa B in Normal ... *Photochem Photobiol*; 818-45.
- Afnor (2000).** Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 1. Echantillonnage et méthodes d'analyse. AFNOR, Paris, 440 p.
- Akrout A., A. El Jani, S. Amouri & M. Neffati, 2010.-** Screening of antiradical and antibacterial activities of essentials oils of *Artemisia herba-alba* Asso and *Thymus capitatus* Hoff. & Link growing wild in the Southern of Tunisia. *Rec. Res. Sci.Tech.*, **2** (1). 29-39.
- Akshatha S., Anbarasu K., and Vijayalashim G. (2015).**Resveratrol content and antioxidant properties of underutilized fruits. *Food Science Technology* 52:383-390.).
- Alvesalo J., Vuorela H., Tammela P., Leinonen M., Saikku P.,Vuorela P.(2006).** Inhibitory effect of dietary phenolic compounds on *Chlamydia pneumoniae* in cell cultures; *Biochem Pharmacol* 71:735-741.
- Al-Zoreky, N.S. (2009) .** *International Journal of Food Microbiology*; 134 .244–248.
- Amarti F., El Ajjouri M., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Farah A. et Chaouch A. (2008).** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytothérapie*
- Amarti F., B. Satrani, M. Ghanmi , A. Aafi, A. Farah, L. Aarab, M. El Ajjouri, A. Guedira et A. Chaouch, 2011.** Activité antioxydante et composition chimique des huiles essentielles de quatre espèces de thym du Maroc .*Acta Bot. Gallica*, **158 (4)**, 513-523, 2011.
- Anton R. & LOBSTEIN A. (2005).** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris, 522 p.
- Aouni M., Pelen F. et Soulimani R. (2013).** Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et dom.d'application. *Phytothérapie*, **11**, 225 – 236.

Références Bibliographiques

- Ayala-Zavala ,JF., Wang, SY., Wang ,CY y., González-Aguilar ,GA. (2008)** Bio-preservation of fresh-cut tomatoes using natural antimicrobials *Eur Food Res Tech* **221** - 731-738.
- Bachelot, C., BLAISE A., CORBEL T. et LE GUERNIC A.** 2006. Les huiles essentielles extraction et comparaison. Thèse biologie U.C.O Bretagne Nord pp 5-9.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008).** Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*. **46**, 446-475.
- Bazylko A. et Strezeckla H.** 2007. A HPTLC densitometric determination of luteolin in *Thymus vulgaris* and its extracts. *Fitoterapia.*, **78** : 391-395.
- Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F., & Abdelouahid, D. (2008).** Composition et activités antibacterienne des huiles essentielles d'origanum glandulosum d'Algerie. (Springer, Ed.) *Phytothérapie* , 6 (3), 153–159.
- Bahorun, T, Gressier, B, Trotin, F., Brunete, C., Gazin, J.C., Luycky, M., Gazin, M., 1996.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim. Forsch.* 46 :1086-1089.
- Bellakhdar J, 1997.** La pharmacopée marocaine traditionnelle : Médecine arabe et savoirs populaires. Éditions le Fennec. Ibis Press, Casablanca, Morocco.
- Belyagoubi L, 2006 :** Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détériorations céréales. These Magister. *Univ Abou Bekr Belkaid Faculté SNV Dpt de Biologie, Labo de Recherche : Produits Naturels Tlemcen. 94pages*
- Benayad Nisrin 2008** Les HE extraites des plantes medicinales marocaines moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées, université Med V, Rabat Agdal 63pages
- Benzeggouta Faïrouz. 2015.** Evaluation des Effets Biologiques des Extraits Aqueux de Plantes Médicinales Seules et Combinées Thèse Doctorat en Sciences Option : Pharmaco-Chimie Université Mentouri Constantine
- Bhuwan CJ, Minky M, Ajudhia NK. 2014;** Pharmacognostical review of *Urtica dioica* L. *Int J Green Pharm* 2014;8:201-9.
- Binet P. et Brunell J.-P.;** *Physiologie Végétale. Tome II. Edit., Doin.*
- Boizot, N et Charpentier, JP (2006).***Le cahier des techniques de l'INRA*, n°spécial 2006, 79-82.

Références Bibliographiques

- Bonnier G. et Douin R., 1990.** La grande Flore en Couleurs de Gaston Bonnier, Éd Belin, réédition de la Flore Complète Illustrée en Couleurs de France, Suisse et Belgique .PP 112;
- Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y, Nasri M. 2009.** Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. Food Chem. 2009;114:1198–1205.
- Boufares K., Hassani A. and Alem Aicha Somia, 2019.** Essential oil composition and antimicrobial activities of some *Cupressaceae* species from Algeria against two phytopathogenic microorganisms. *J. Crop Prot.* 2019, 8 (2): 223-234
- Braga, L.C ., Leite , A.A.,Xavier,K.G., Jakahashi,J.A.,Bemguerrer,P .P., Chartone-Souza,E., and Nascimentho,A.M. (2005)** Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus* *Candian Journal of Microbiology* 51 541-547.
- Bruneton J, 1999:** Pharmacognosie- Phytochimie -Plantes médicinales. 3^{ème} édition Technique&Documentation. l'avoisier, paris.1120 p.
- Bounatirou S, Smiti S, Miguel MG. Ralciro L, Costa MM, Pedro LG. 2007.** Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian thymus capitatus hoff et link. Food chemistry J. vol (105), Issue (1) pp 146-155
- Chavagnat, A. et B. JEUDY. 1980.** Étude de la germination des semences de Calendula au laboratoire. Seed Science and Technology, 8(4):603-614.
- Clevenger J.F .. 1928.-.** « Apparatus for volatile oil determination, Description of New Type ». American Perfumer & Essential Oil Review, 1928, 467-503.
- Charles, DJ. 2013.** Antioxidant proprieties of spices herbs and other sources. Library of Congress Control Number 201246741. pp 3-39.
- Cosentino S., C.I.G. Tuberoso, B. Pisanol, M. Satta, V. Mascial, E. Arzedil & F. Palmas, 1999.-** *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Lett. Appl. Microbiol.*, 29 (2), 130-135.
- Couic-Marinier, A. Touboul. Le guide terre vivante des huiles essentielles. Terre vivante, 2017.**
- Dacosta Y. (2003).** Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. 317p.
- Daoudi Amine, M. Sabiri, Med Bammou, T. Zair, J. Ibijbijen et L. Nassiri. 2015.** Valorisation des extraits de trois espèces du genre *Urtica* : *Urtica urens* L.,*Urtica*

Références Bibliographiques

- membranacea Poiret et Urtica pilulifera L. Journal of Applied Biosciences, 87:8094–8104
- Darah, I., C.L. Lim, Z. Shaida. 2011.** Effects of methanolic extract of a soft sponge, Haliclona sp. on bacterial cells: structural degeneration study. Int. J. Comprehensive Pharm.2: 1- 6
- Delahaye J. (2015)** Thèse de doctorat, Utilisations de l'ortie Urtica dioica, Université de Rouen 227p.
- DSA, 2016:** Conservation des forêts de Tiaret, bilan annuel 2016
- Descoins, G. 1991.** Les étapes prévisibles de l'évolution des techniques de la protection des plantes. In: Bye, P. (Ed.), Phytosanitaires, Protection des plantes, biopesticides. INRA. Pp: 107-110.
- Deshayes, A. 1991.** Les transferts des capacités phytosanitaires aux plantes elles-mêmes. In INRA (Ed.), *Phytosanitaires, Protection des plantes Biopesticides* (pp. 113-117). Paris: Éditions Points.
- Dorman H.J.D. and Deans S.G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol, **88**, 308–317
- Draghi F. 2005.** Thèse doctorat, Ortie dioïque: étude bibliographique, Univ. H.Poincaré Nancy; 89p.
- Chevallier, A. 2013.** Les plantes médicinales. Ed. Gründ. 150 Pages
- Eberhard T, R. ANTON et A. LOBSTEIN, 2005,** plantes aromatiques, épices, aromates, condiments et huiles essentielles ., Paris, Ed. Lavoisier, 235pages
- El idrissi M, Elhourri M, Amechrouq A, Boughdad A, 2014:** Étude de l'activité insecticide de l'huile essentielle de *Dysphania ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) sur *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (4) pp 989-994 ; ISSN : 2028-2508
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., et Abdelly C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Compte Rendu de Biologie.* 331, 372-379.
- Favier A. 2003.** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, **17**: 501– 512.
- Fandohan P, Gbenou J and Gnonlofin B , 2004,** Effects of the essentials oils on the growth of *Fusarium verticilloides* , *J agric Chemistry*, Volume 52; pp 6824 - 6829.

Références Bibliographiques

- Faucon, A. Lobstein. 2015.** Traité d'aromathérapie scientifique et médicale. Sang de la Terre,
- Fontaine, Luc 2010.** Urtica dioica, Guide de production sous régie biologique, Bibliothèque et Archives nationales du Québec, février 2010.
- Fouché J.G, Marquet, A. Hambuckers, A, (2000)** Les plantes médicinales : de la plante au médicament; Observatoire du Monde des Plantes; Sart-Tilman, B77. B-4000 Liège
- Franchomme, R. Jollois, D. Pénéol. 2001** L'aromathérapie exactement. Roger Jollois,
- Franchomme. R. 2015.** La science des huiles essentielles médicinales. Guy Trédaniel éditeur,
- Gharzouli K, S Khennouf, S Amira et A Gharzouli, 1999.** Effects of aqueous extracts from *Quercus ilex* l. root bark, *Punica granatum* l. fruit peel and *Artemisia herba-alba* Asso leaves on ethanol-induced gastric damage in rats .*Phytotherapy research vol 13 Issue 1* , 42 - 45 Copyright © 1999 John Wiley & Sons, Ltd.
- Gheffour K., Boucherit K., Boucherit-Otmani Z. 2015.** Phytochemical study and evaluation of the antioxidant activity of extracts of *Echinops spinosus* .*Phytothérapie*, vol. 13, pp 288–294
- Ghedira, K, P Goetz, et R Le Jeune. 2009.** « Urtica dioica L ». *Phytothérapie*. Springer 2009 DOI 10.1007/s 10298-009-0408-5
- Guignard, J.-L. (2004).** Biochimie végétale (éd. 2e). (Dunod, Éd.) Paris, France. P274.
- Gulçin, İ., İ. Küfrevioğlu, M. Oktay & M.E. Büyükkuroğlu. 2004.** Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J. Ethnopharmacol.* 90: (2-3): 205-215. doi:10.1016/j.jep.2003.09.028.
- Gupta V. K., Roy A., Nigam V. K., Mukherjee K. 2010** Antimicrobial activity of *Spondias pinnata* resin. *J Med Plants Res.* 4: 1656-1661.
- Hadizadeh, I., B. Peivastegan, et M. Kolahi. 2009.** Antifungal activity of nettle (*Urtica dioica* L.), colocynth (*Citrullus colocynthis* L. Schrad), oleander (*Nerium oleander* L.) and konar (*Ziziphus spina-christi* L.) extracts on plants pathogenic fungi. ». *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS* 12 (1): 58-63.
- Hans W. K. 2007:** 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition. p6-7.

Références Bibliographiques

- Hayouni EA, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M, 2007.** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry* 105:1126-1134.
- Hill, D. S., (1990)** : Pests of stored products and their control 274 p. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA.
- Hmid Ilham. 2013** Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*Punica Granatum* L.) : Caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. Alimentation et Nutrition. **Thèse Doctorat**-Université d'Angers.
- Hossein S. R., et Lytle M. 2005** Les Antioxydants. Traducteur : Alain Boutilier. Catié Feuillet d'information..35pages
- Hostesttman K., Marston. A., Ndjoko. K., Wolfender. J. L., 2000:** The potential of Africa plants as a source of drugs. *Current Organic Chemistry.*, vol. 4, pp. 973-1010.
- Haddouchi, F. Hamadi. A., Meziane A et Benmansour. A, 2009.** Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique SCIENCE 05(2) pp) 246 - 259*
- Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., Bloth J. et Botrel A. 2001.** Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Ed Larousse. p10-12.
- Jafri, M, Aslam, M, Javed K, Singh, S. (2000)** Effect of *Punica granatum* Linn.(flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats *J. of ethnopharmacology.* 70. 309-314.
- Jimenez-Arellanes A., Martinez R., Garcia R., León-Díaz R., Molina-Salinas G. Fernández S. 2006.** *Thymus vulgaris* as a potential source of antituberculosis compounds. *Pharmacologyonline.*, **3** : 569-574.
- Jouany J-P et Yiannikouris A. 2002:** les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leurs devenir et effets chez l'animal. INRA Production Animales, pp. 3-16. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 4438-4445.
- Jean-François, M.-G., Roger, P., Isabelle, B.-C., Frédéric, G., & Marc, J. (2017).** Biologie végétale : croissance et développement (éd. 3e). (Dunod, Éd.) Paris, France. P272.
- Kataki M.S., Murugamani V., Rajkumari A., Mehra P.S., Awasthi D., and Yadav R.S. (2012).** Antioxidant, Hepatoprotective, and Anthelmintic Activities of Methanol Extract of *Urtica dioica* L. Leaves, *Pharmaceutical Crops* 3: 38-46.

Références Bibliographiques

- Katalinic V., Milos M., Kulisic T., and Jukic M. (2006)** . Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*.94: 550-557.
- Kim D.O., Chun O.K., Kim Y. J., Moon H.Y., et Lee C.Y. (2003)** Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51(22), 6509-6515.
- Kukrića Z, Topalić L, Kukavicab B, Matoša S, Pavičića S, Borojab M, Savića A. (2012)**. Charactisation of antioxydant and antimicrobienne activitis of nettle leaves (*Urtica dioica* L.), *APTEFF* 43: 1-342.
- Kumar, D. ; Marimuthu, K. ; Haniffa, M. A. ; Sethuramalingam, T. A., 2010**. Optimum dietary protein requirement of striped murrel *Channa striatus* fry. *Malay. J. Sci.*, 29 (1): 52-61
- Lairini S., R. Bouslamti, F. Zerrouq et A. Farah. (2014)** Valorisation de l'extrait aqueux de l'écorce de fruit de *Punica granatum* par l'étude de ses activités antimicrobienne et antioxydante *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (S1) 2314-2318 ISSN : 2028-2508
- Lamberth C, Jeanmart S, Luksch T, Plant A. (2013)** *Current challenges and trends in the discovery of agrochemicals. Science*, vol. 341, n° 6147, 13 août 2013, p. 742-746.
- Langlade, Valérie, 2010**. L'Ortie dioïque, *Urtica Dioica* L., Etude bibliographique, Thèse de doctorat en Pharmacie, Université de Nante- France, 3 mai 2010.
- Laoufi, R. (2017)**. Caractérisation physico-chimique et biologique des extraits d'une plante médicinale de la famille des Urticaceae Thèse de Doctorat, Univ Boumerdès, Algérie, 146p.
- Larpent, JP 1990**. *Eléments de microbiologie*, Ed. Hermann : Paris. 366 Pages
- Leyral et Vierling (2001)**. *Microbiologie et toxicologie des aliments, hygiène et sécurité alimentaires*, 3° édition.
- Lucchesi M. E. (2006)**. *Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles*. Thèse de doctorat. Université de la Réunion. 143.
- Macheix J, Fleuriet A, 2005**: les composés phénoliques des végétaux, exemple de métabolites secondaires d'importance économique, presse AURELI, presses polytechniques et universitaires romandes, pp167-162.

Références Bibliographiques

- Majhenic L., Kerget M.S., et Knez Z. (2007)** Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*. 104, 1258–1268.
- Malon N. 1991;** 10^{ème} Journées Internationales HE, Digne-Les-Bains 5-6-7 Sept. 1991 ; pp. 28.
- Marouf . A.,** Analyse instrumentale à l’usage des biologistes (2002). 2eme éd. Dar el Gharb . Oran 17 – 24.
- Mebarki N. (2010).** Extraction de l’huile essentielle de *Thymus fontanessi* et application à la formulation d’une forme médicamenteuse-antimicrobienne. Thèse de Magistère en Génie des procédés chimiques et pharmaceutiques option Industrie Pharmaceutique, Université M’hamed Bougara, Faculté des Hydrocarbures et de la Chimie, Boumerdes 185p.
- Medic-caric, M, I. Jasprica, A. Smolcic-Bubalo, and A. Mornar, 2004 .** Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids, *Croatica Chemica Acta*, CCACAA 77 (1-2) 361-366.
- Millogo H., Guisson I. P. et Traore A. S. 2005.** Savoir traditionnel et médicaments traditionnels améliorés. Colloque 9 déc. Centre européen de santé humaine –Lyon.
- Mishra A, Dubey N. 1994.** Evaluation of Some Essential Oils for Their Toxicity against Fungi Causing Deterioration of Stored Food Commodities. *Applied and Environmental Microbiology* 60(4), pp 1101-1105.
- Mockuté D., Beritiene G. et Judzentiene A. 2003:** The β -ocimene chemotype of essential oils of the inflorescences and the leaves with stems from *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* growing wild in Lithuania. *Biochemical systematics and ecology* 31:3, (2003) pp 269-278
- Modarresi-Chahardehi A, Ibrahim D, Sulaiman SF, Mousavi L. 2012.** Screening antimicrobial activity of various extracts of *Urtica dioica*. *Revista Biologia Tropicana*; 60 (4):1567- 1576
- Molinie A. et Pfohl-Leszkowczh A. 2003.** Les mycotoxines dans les céréales : les points importants de contrôle de la production au stockage, le devenir dans les produits dérivés. Laboratoire de Toxicologie et sécurité alimentaire- Auzerville - Toulouse. Note de l’ASEDIS-SO N° spécial Mycotoxines , 9p.
- Molyneux P., (2004) .** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarinn Journal of Science.Technologie* 26: 211-219.

Références Bibliographiques

- Monfared M., Kamkar A., Khaligh S.G., Javan A.J., Asadi F., and Basti A.A. (2011).** Antioxidative effects of Iranian *Urtica dioica* L. extracts on the oxidation of sunflower oil. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 4438-4445.
- Mueller, D. K., (1990)** Fumigation, Handbook of Pest Control, Franzak and Foster Co., Cleveland, Ohio. pp: 901-939
- Multon JL 1982**-Conservation et stockage des grains et grains et produits derives céréales oléagineuses. protéagineux, aliments pour animaux .Ed: Lavoisier, Paris, tome 1et tome 2.576p.
- Mutai C., Bii C., Vagias C., Abatis D. et Roussis V. (2009).** Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *Journal of Ethnopharmacology*, 123: 143-148
- Navarro, P., Nicolas, TS., Gabaldon, JA., Mercader-Ros, MT., Calín-Sánchez, Á., Carbonell-Barrachina, ÁA y., Pérez-López, AJ. (2011)** Valorisation de l'extrait aqueux de l'écorce de fruit de *Punica granatum* par l'étude de ses activités antimicrobienne et antioxydante *Food Sci* 76(5) 319-332.
- N'guessan Koffi, Beugré Kadja, Guédé N. Zihiri, Dossahoua Traoré et Laurent Aké assi, 2009 .** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire) *Sciences & Nature* Vol. 6 (1):1-15
- Ncube N, Afolayan A, Okoh A, 2008.** Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African journal of biotechnology* 7:12.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., et Lacroix, M. (2007).** Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(5), 414-420.
- Ouraini D., Agoumi, A, Ismaïli-Alaoui, M, Alaoui, K, and Cherrah, Y. 2005:** Study of the activity on the various stages of development of dermatophytes of essential oils from aromatic Plants with antifungal properties; *Journal phytothérapie*; Paris Vol.3, N°4, pp 147-157
- Özcan M. et Chalcha J. C. 2004.** Aroma profile of *Thymus vulgaris* L growing wild in Turkey. *Bulgarian journal of plant physiology.*, 30 (3-4) : 68-73.
- Padrini F et Luchroni N. (1996).** Le grand livre des huiles essentielles, médecine douce, bien être. Edition de VECCHIS-A. 206.
- Parekh J. et Chanda S. V. 2007.** *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plant. *Turkish journal of biology.*, 31 : 53-58.
- Pibiri, MC, 2005.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse EPFL, Ecole polytechnique de lausanne. N°3311. .

Références Bibliographiques

Quezel P. et Santa S., 1963. Nouvelle flore d'Algérie et régions désertiques méridionales. Tome II.

Poirier, G, M. 2005 Les Produits Gervol : Ortie (*Urtica dioica*), Caplan (Québec) GOC1EO (418) 388 -398

Raquel, G.-F., & Jesus V, J.-N. (2011). Contribution of Proteomics to the Study of Plant Pathogenic Fungi. *American Chemical Society*, 11(1), 13-16. doi:10.1021/pr200873p

Reddy , MK., Gupta, SK., Jacob ,MR., Khan ,SI y., Ferreira, D (2007). *Planta Med* 73 461–467.

Richard H. et Multon J.L., 1992 - Les arômes alimentaires, collection sciences et techniques agro-alimentaire, techniques et Documentations, Lavoisier, 438 p.

Richard, D., Chevalet, P., Fournel, S., & Giraud, N. (2018). *Biologie le cours* (éd. 4e). Dunod. P768.

Rios J. and Recio M, 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of ethnopharmacology* 100: 80-84.

Remmal, A. Bouchikhi, T. and Rhayour, K. (1993). Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *Journal of Essential Oil Research*, 5(2): 179-184.

Saidj faiza, (2007). Extraction de l'huile essentielle du Thym: *Thymus numidica kabylica*, these de Magister, faculté de chimie, université Boumerdes

Salehzadeh A., L. Asadpour, A.S. Naeemi, et E. Houshmand. 2014. « Antimicrobial Activity of Methanolic Extracts of *Sambucus Ebulus* and *Urtica Dioica* against Clinical Isolates of Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* ». *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines: AJTCAM / African Networks on Ethnomedicines* 11 (5): 38-40.

Sanchez, A, Ysunza, F, Beltran-Garcia, MJ, Esqueda, M, 2002. Biodegradation of viticulture wastes by *Pleurotus*: a source of microbial and human food and its potential use in animal feeding. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (9): 2537-2542

Sarfaraz, S., Afaq, F., Adhami, VM, Malik, A. & Mukhtar, H. (2005) an nabinoid receptor agonist induced apoptosis of human prostate cancer cells LNCaP *Proc Natl Acad Sci USA*. 102 (2005) 1413–1418.

Références Bibliographiques

- Sehari, M., Kouadria, M., Amirat, M., Sehari, N., Hassani, A. (2019).** Phytochemistry and antifungal activity of plant extracts from Nettle (*Urtica dioica* L.). *Ukrainian Journal of Ecology*, 10 (1), 1-6.
- Selmi S. et Sadok S.** 2008. The effect of natural antioxidant (*Thymus vulgaris* L.) on flesh quality of tuna (*Thymus Linnaeus*) during chilled storage. *Pan-American Journal of aquatic sciences.*, 3 (1):36-45.
- Singleton V.L. et Rossi J.A. (1965)** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Technology and Viticulture*. 16, 144-153.
- Svoboda K.P. & J.B. Hampson, 1999.-** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. *Plant Biology Department, Scotland, U.K.*, 17p.
- Singh R., Muftah A.M., Belkheir, A. (2015):** Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*, 8: 322–328.
- Sauvion, N., Calatayud, P.-A., Thiéry, D., and Marion-Pol, F. (2013).** Interactions insectes-plantés. (éd. 1ère). IRD Éditions, Éditions Quae, 749 pages
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Sendra, E y Pérez-Álvarez JA. 2011.** Antioxydant properties of pomegranate (*punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Res Int* 44 1217-1223.
- Takeuchi H., Lu Z. G. et Fujita T. 2004.** New monoterpene glycoside from the aerial parts of Thyme (*Thymus vulgaris* L). *Bioscience, biotechnology and biochemistry.*, 68 (5) : 1113-1134.
- Wang J., Zhu F., Zhou X., Niu C.Y. and Lei C.L., 2006-**Repellent and fumigant activity of essential oil from *Artemisia vulgaris* to *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera : Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research* N° 42, pp339-347
- Willem J.P. (2004),** *Les huiles essentielles, médecine d'avenir*, 318 p.
- Xavier, F., et Farid, C. (2012).** La chimie des huiles essentielles Tradition et innovation. (Vuibert, Éd.) Paris, France: Vuibert. P284.
- Zeghad N. 2009.** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*T. vulgaris*, *R. officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Thèse de magister biologique de l'université Mentouri Constantine. 149 Pages.
- Zeghib A., Kabouche A., Laggoune S., Calliste C.-A., Simon A., Duroux J.-L. and Kabouche Z. (2017).** Antibacterial, Antiviral, Antioxidant and Antiproliferative Activities of *Thymus guyonii* Essential Oil. *Natural Product Communications*, 12 (10) : 1651 - 1654

Annexes

ANNEXES



Figure 60: Photo de la croissance fongique sous l'effet de l'HE du Thym

Tableau 01: Effet des extraits de feuilles d'Ortie sur la croissance fongique (diamètre en mm)

	aqueux 5%	aqueux 10%	ethan 5%	ethan 10%	metha 5%	metha 10%	antifongique ARTEA	antifongique BAYER	DMSO
fusarium oxysporum	16,82	18,95	16,22	16,98	17,22	20,25	43,7	40,32	6,25
fusarium leucopersici	14,82	19,82	16,82	17,54	17,82	18,82	44,01	40,53	6,25
aspergillus niger	12,82	17,82	17,82	18,5	18,89	20,74	40,41	41,17	6,25

Annexes

Tableau 02: Taux d'inhibition du développement bactérien (diamètre en mm)

	aqueux 5%	aqueux 10%	ethan 5%	ethan 10%	metha 5%	metha 10%
E.Coli	6,82	6,82	6,22	6,98	9,22	13,25
Staph Aureus	6,82	6,82	6,82	7,5	8,89	11,74
Pseudo	6,82	6,82	7,4	8,7	7,4	11,02

Tableau 03: Effet de l'extrait de Grenade sur le Taux d'inhibition du développement bactérien (diamètre en mm)

Extrait Grenade	aqueux 5%	aqueux 10%	Ethanol 5%	Ethanol 10%	Methanol 5%	Methanol 10%
E.Coli	14.32	17.88	14.00	20.86	15.30	19.75
Staph Aureus	14.93	17.33	11.63	17.89	16.82	20.93
Pseudomonas	14.82	16.73	13.05	16.66	13.67	17.32

Tableau 04: Résultats de l'effet bactéricide de l'HE du Thym sur E.coli et Staph. aureus,

HE Thym	10µl	15 µl	20 µl	25 µl	30 µl
E.Coli	30,27	33,12	35,17	57,89	61,80
Staph aureus	43,78	60,92	56,44	77,86	55,69
Pseudomonas	27,51	27,88	36,09	33,04	47,69

Tableau 05: composition phytochimique l'HE du Thym, réalisé par FTIR

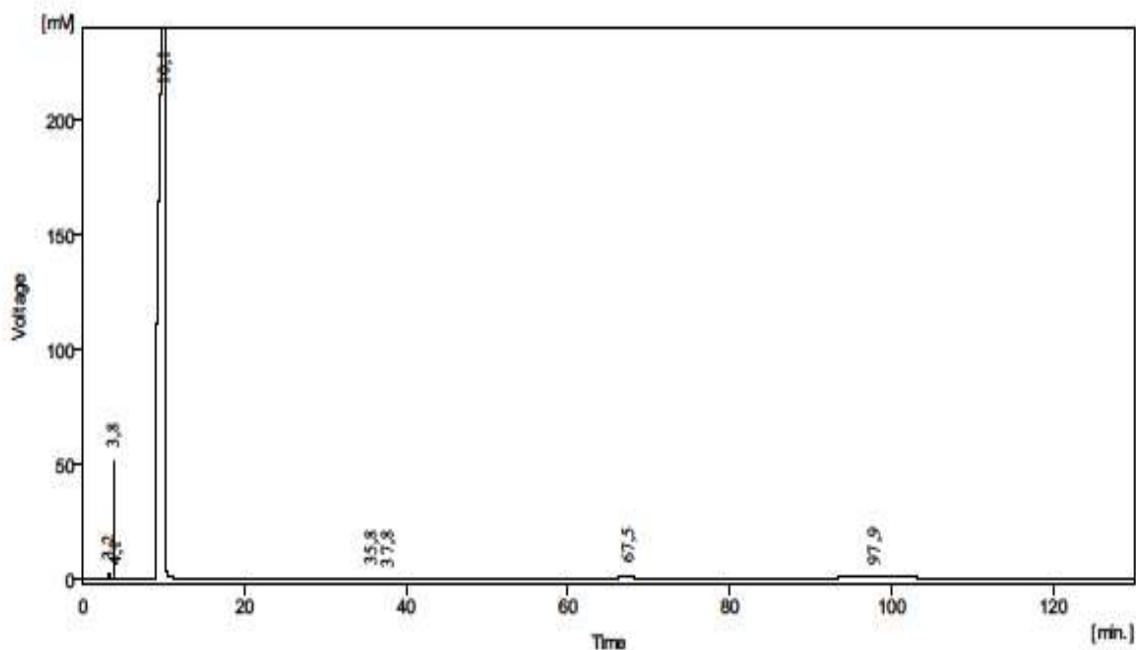
S/N	Peak (Wave number cm ⁻¹)	Intensity	Bond	Functional group assignment	Group frequency
1	489.45	23,45		-Unknown	
2	523.75	21,95		-Unknown	
3	756.50	26,74	C-H	Alkenes	575-995
4	1148.63	07,46	Esters C-H	Alcohols, Carboxlic acids,	1050-1300
5	1322.15	12,35	Esters C-H	Alcohols, Carboxlic acids,	1050-1400
6	1537.90	10,60	C=O	fonction aldéhyde	1500-1600
7	1675.62	15,36	C=O	fonction aldéhyde	1600-1800
8	2356.55	20,85	CH	fonction alcène	2850-2970
9	2918.66	09,10	CH	fonction alcène	2900-2970
10	3686.17	8,35	O-H	Alcohols, Phenols	3200-3600

Tableau 06: Densités optiques en fonction des concentrations de l'acide ascorbique et des extraits végétaux utilisés

concentration	Abs/Acide ascorbique	Abs/HE Thym	Abs/Extrait methan Ortie	Abs/Extrait methan Grenade
05 µg/ml	1.05	1,09	1,11	1,10
10 µg/ml	0.83	1,01	1,10	1,09
20 µg/ml	0.52	0.89	1,05	1,03
30 µg/ml	0.43	0.62	0.94	0.91
40 µg/ml	0.29	0.48	0.89	0.83
50 µg/ml	0.22	0.47	0.86	0.72
60 µg/ml	0.32	0.48	0.86	0.72

Tableau 07 : Analyse de sensibilité des 03 souches bactériennes en fonction des concentrations d'HE du Thym

	N Actifs	Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type
HE Thym 10 µl	4	34,69	27,51	43,78	7,30
HE Thym 1/2 (15µl)	4	40,11	27,88	60,92	14,53
HE Thym 20 µl	4	42,75	35,17	56,44	9,82
HE Thym 1/4(25µl)	4	53,90	33,04	77,86	18,93
HE Thym 30 µl	4	56,79	47,69	61,98	6,73



Chromatogram Info:

File Name : C:\Clarity\Work\DATA\ORTIE -10%-G2-HE12_07_201808_44.PRM File Created : 12/07/2018 11:23:06
 Origin : Acquired, Acquisition started 12/07/2018 08:44:11 Acquired Date : 12/07/2018 11:23:06
 Project : C:\Clarity\Projects\Work\PRJ By : rladmed

Printed Version Info:

Printed Version : Modified Printed Date : 12/07/2018 11:59:06
 Report Style : C:\Clarity\Common\Samed\07.05.2016.sty By : rladmed
 Calibration File : None

Sample Info:

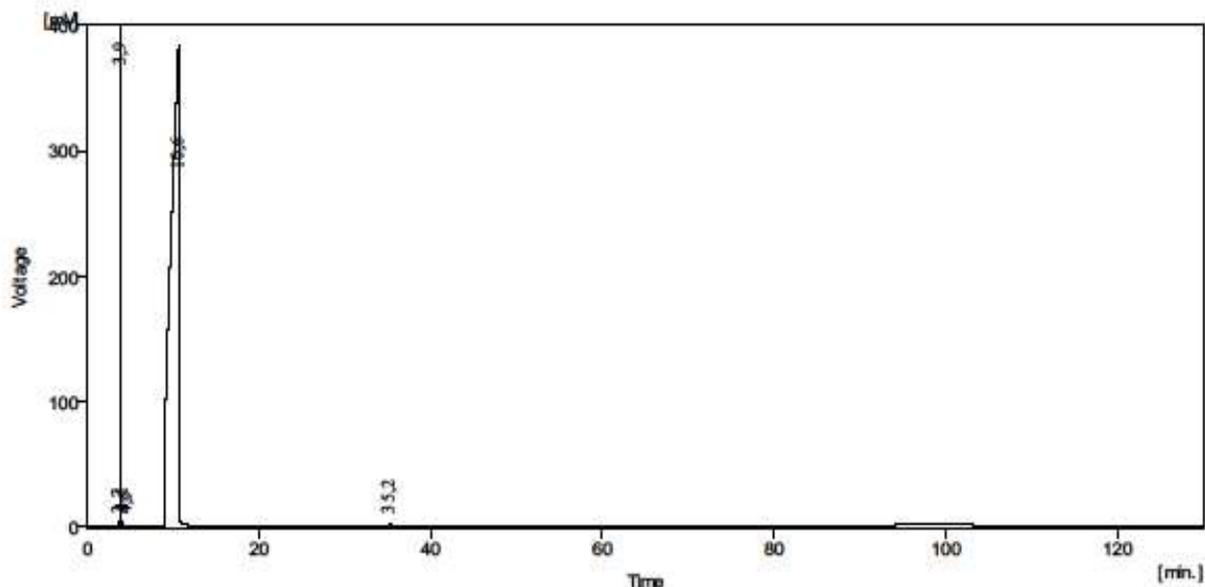
Sample ID : ORTIE -10%-G2-HE Amount : 0
 Sample : BOUHAFS Khaled ISTD Amount : 0
 Inj. Volume [mL] : 0,8 Dilution : 1

Result Table (Uncal - ORTIE -10%-G2-HE12_07_201808_44 - Detector B)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]
1	3,247	37,265	3,009	0,3	0,8
2	3,823	202,354	51,741	1,4	14,4
3	4,100	2,466	0,448	0,0	0,1
4	10,107	13700,253	302,394	96,8	84,0
5	35,750	8,983	0,373	0,1	0,1
6	37,763	1,837	0,220	0,0	0,1
7	67,543	133,576	1,514	0,9	0,4
8	97,943	60,872	0,275	0,4	0,1
	Total	14147,607	359,974	100,0	100,0

Tableau 08: composition phytochimique de la Grenade réalisé par HPLC (CG /MS)

CRAPC



Chromatogram Info:

File Name : C:\Clarity\WORK1\DATA\fenade 10%-G1-HE 11_07_201814_56.PRM File Created : 12/07/2018 08:37:02
 Origin : Acquired, Acquisition started 11/07/2018 14:56:39 Acquired Date : 12/07/2018 08:37:00
 Project : C:\Clarity\Projects\Work1.PRJ By : radmed

Printed Version Info:

Printed Version : Modified Printed Date : 12/07/2018 11:59:55
 Report Style : C:\Clarity\Common\Samed1 07.05.2016.sty By : radmed
 Calibration File : None

Sample Info:

Sample ID : fenade -10%-G1-HE Amount : 0
 Sample : BOUHAFS Khaled ISTD Amount : 0
 Inj. Volume [mL] : 0,8 Dilution : 1

Result Table (Uncal - fenade 10%-G1-HE 11_07_201814_56 - Detector B)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]
1	3,667	7,248	1,916	0,0	0,2
2	3,853	1501,953	631,181	6,0	61,7
3	4,130	10,729	3,746	0,0	0,4
4	4,503	1,378	0,465	0,0	0,0
5	10,610	23467,515	383,250	93,7	37,5
6	35,153	55,528	2,222	0,2	0,2
	Total	25034,351	1022,778	100,0	100,0

Tableau 09: composition phytochimique du Thym réalisé par HPLC (CG /MS)

Annexes

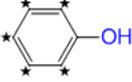
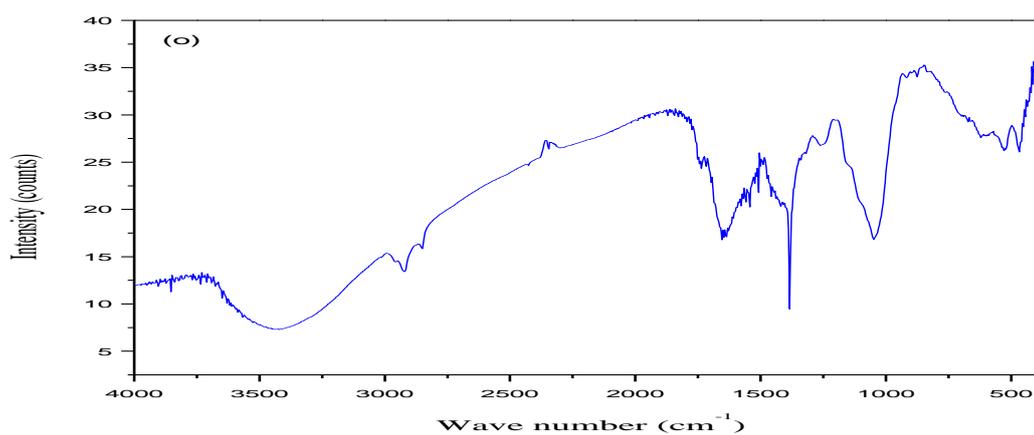
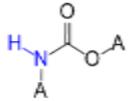
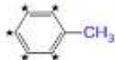
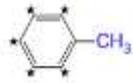
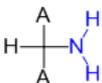
	 <p>* – Tout attachement</p>
1230.50	<p>C-O stretching</p>  <p>* – Tout attachement</p>
1049.20	<p>C-O stretching</p>  <p>A – Tout élément sauf H</p>
524.60	<p>O-H deformation (solvent Impurit water vapor H₂O)</p> 
466.74	<p>O-H deformation (solvent Impurit water vapor H₂O)</p> 

Tableau 11: Attributions IR (o) poudre végétale d'ortie :



Annexes

Nombre d'ondes (cm ⁻¹)	Attributions
3421.48	N-H asymmetric stretching  A – Tout élément sauf H
2920.03	C-H asymmetric stretching  * – Tout attachement
2850.59	C-H symmetric stretching  * – Tout attachement
1735.81	C=O stretching  * – Tout attachement
1654.81	C=O stretching tertiary amide
1635.52	NH ₂ deformation  A – Tout élément sauf H
1384.87	O-H deformation  * – Tout attachement
1261.36	C-O stretching

Annexes

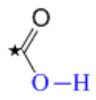
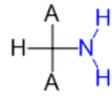
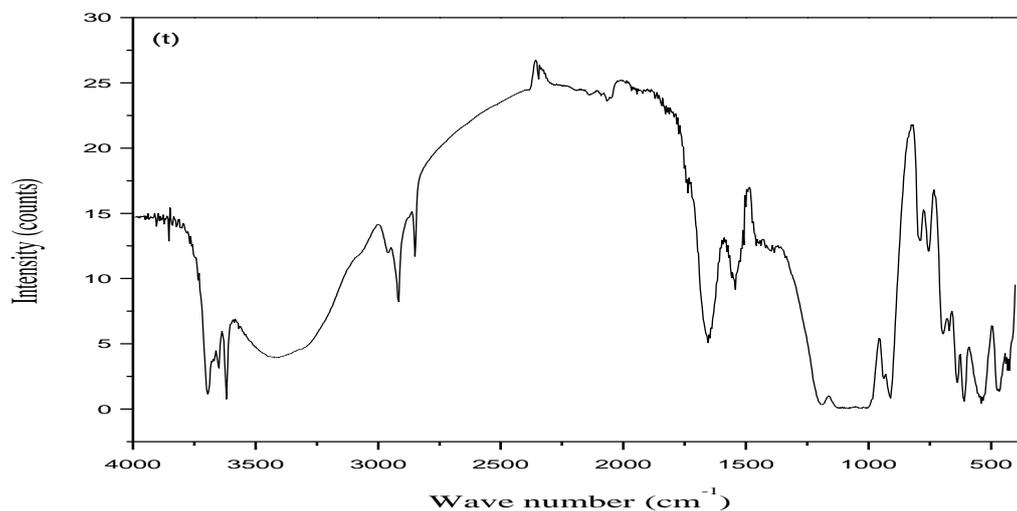
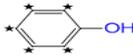
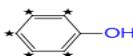
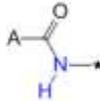
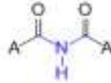
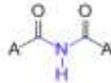
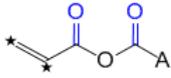
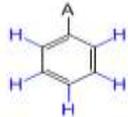
	 <p>* – Tout attachement</p>
1049.20	C-N stretching  <p>A – Tout élément sauf H</p>
528.46	O-H deformation (solvent Impurit water vapor H ₂ O) 
466.74	O-H deformation (solvent Impurit water vapor H ₂ O) 

Tableau 12: Attributions IR (t) poudre de Thym

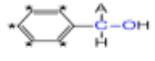
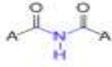
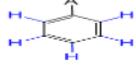
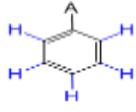


Nombre d'ondes (cm ⁻¹)	Attributions
3695.36	O-H Stretching hydrogen bonded  * – Tout attachement
3618.21	O-H Stretching hydrogen bonded  * – Tout attachement
3421.48	N-H asymmetric stretching and C=O stretching  A – Tout élément sauf H * – Tout attachement
2916.17	C-H Asymmetric stretching

Annexes

		 <p>A – Tout élément sauf H</p>
2850.59	C-H symmetric stretching	 <p>A – Tout élément sauf H</p>
1654.81	C=O stretching amide	 <p>A – Tout élément sauf H * – Tout attachement</p>
1542.95	C-N-H deformation amide	 <p>A – Tout élément sauf H</p>
1188.07	C-N stretching	 <p>A – Tout élément sauf H</p>
1110.92	C-O-C stretching	 <p>A – Tout élément sauf H * – Tout attachement</p>
1080.06	Bending in plane H bending	 <p>A – Tout élément sauf H</p>
1018.34	C-O stretching	

Annexes

	<p>A = Tout élément sauf H</p>  <p>* = Tout attachement</p>
910.34	<p>C-H deformation</p>  <p>A = Tout élément sauf H</p>
790.76	<p>N-H deformation</p>  <p>A = Tout élément sauf H</p>
756.04	<p>Deformation 6 adjacent H out of plane deformation</p>  <p>A = Tout élément sauf H</p>
694.33	<p>Bending out of plane ring bending</p>  <p>A = Tout élément sauf H</p>
609.46	<p>O-H deformation (solvent Impurit water vapor H₂O)</p> 
540.03	<p>O-H deformation (solvent Impurit water vapor H₂O)</p> 
466.74	<p>O-H deformation (solvent Impurit water vapor H₂O)</p> 

Phytochemistry and antifungal activity of plant extracts from Nettle (*Urtica dioica* L.)

M. Sehari¹, M. Kouadria¹, M. Amirat², N. Sehari¹, A. Hassani¹

¹University of Tiaret, Faculty of Life Sciences and Nature, Laboratory of Agro-Biotechnology and Nutrition in Semi-Arid Areas, of Tiaret, Algeria

²University of Tiaret, Veterinary Institute, Laboratory of Agro-Biotechnology and Nutrition in Semi-Arid Areas, of Tiaret, Algeria

E-mail: kouadria61@yahoo.fr, amiratmokhtar@yahoo.fr, nadia_sehari@yahoo.com, abdelhass61@gmail.com

Received 01.01.2020, Accepted 16.01.2020

The biological properties of essential oils, including pest control, antibacterial and antifungal oils, are currently the subject of a great deal of research around the world to meet the requirements of organic farming, such as the development of biopesticides based on natural plant molecules and effective against the bioaggressors in crops and stored commodities. Fungicide control is mainly based on the use of chemical pesticides which, unfortunately, lose their effectiveness in the face of pathogenic microorganisms that develop more resistance against them. This chemical control thus becomes ineffective, expensive and dangerous for humans, their agricultural products and the environment. The problems of the resistance and harmfulness of these synthetic products have led to the need to find alternatives as effective but healthier. Thus, to reduce the use of chemical pesticides and enhance the value of Algerian flora, we are interested in a marginalized plant species, namely the Nettle (*Urtica dioica* L.) of the family Urticaceae. Indeed, the extracts of certain plants such as Medicinal and Aromatic Plants "MAP" and their constituents have long been recognized as antimicrobial agents, yet their use in pest control of crops has been very little reported. In this perspective, this study focuses on obtaining aqueous extracts, methanolic and ethanolic plant extracts of their effectiveness in the fight against pests crops (especially fungi). In addition, the efficacy tests were conducted as a fungicide on *Aspergillus* and *Fusarium*. Our results were very remarkable for both efficacy tests. In fact, the inhibition of the fungi tested was proportional to the concentration applied. In conclusion, we can say that the yield of aqueous extract obtained from the leaves of the tested plant is interesting and its inhibitory effects indicate a certain effect in biological control against the bio-aggressors of the crops and stored foodstuffs.

Key words: Organic aggressors; Fungi; *Urtica dioica*; Crops; Stored commodities

Introduction

In the world, between 5 and 15% of the total weight of cereals and legumes is lost each year after harvest (Hill, 1990). Cereal production (wheat, barley, etc.) must be stored because it is carried out by a single annual harvest while the consumption period is extended throughout the year. Microorganisms such as mold from crops and stored foods that reduce yields and devalue nutritional value, alter organoleptic appearance and cause economic problems due to grain detoxification costs.

Due to their efficiency and easy and practical application, the use of chemical pesticides (fungicides, insecticides, etc.) is one of the components of the fabulous increase in yields observed in recent decades, especially in intensive agriculture. However, despite their effectiveness, the excessive use of these products is currently a problem and their impact has certainly been insufficiently estimated, as the most direct consequences include the depletion of useful auxiliary fauna, leading to serious disturbances in bioceanic equilibrium, the emergence of resistance, and finally environmental contamination with the appearance of toxic residues in harvested foodstuffs or their processing products. Finally, they are expensive and dangerous for human health and animals.

Indeed, in plant protection, control of fungal and bactericide is mainly based on the use of chemical pesticides, which, unfortunately, lose their effectiveness in the face of bio-aggressors or pests that develop more resistance to them as a result of their repeated application (Lamberth et al., 2013). In addition, stored foods also suffer losses of between 5 and 15 per cent of the total weight of grains, legumes and oilseeds worldwide (Hill, 1990), due to the proliferation of many deterioration agents such as rodents and insects, as well as microorganisms such as bacteria and mold (Mishra and Dubey, 1994).

Thus, these problems of resistance and harmfulness of synthetic pesticides have led to the need for more effective and healthier alternatives (El Idrissi et al., 2014) and in this context plants have, by natural selection during their evolution, developed mechanisms for adapting to the various environmental conditions, in particular the bioactive natural substances (Zeghad, 2009) which make up secondary metabolism (Deshayes, 1991; Mohammedi, 2006). Recent discoveries of antimicrobial activities, essential oils, are currently a very important database for the rigorous scientific development inherent in biological control through the use of these natural substances. To this end, we tested and evaluated antifungal activity of ethanolic, methanolic, and aqueous extracts prepared from leaves and stems of Nettle (*Urtica dioica* L.), (Quezel and Santa, 1963) to develop new natural bioactive products in place of chemical pesticides to protect crops and preserve human health and the environment.

Materials and Methods

Plant materials

Nettle (*Urtica dioica* L.) is a herbaceous perennial that has been used for centuries in folk medicine. The Genus *Urtica* belongs to family Urticaceae with about 80 species throughout the world. genus *Urtica*, species *dioica*, (Latin *uro* or *urere*="the one that burns", *dioica* comes from *dioc*=male and female flowers on separate feet), (Delahaye, 2015). Urticaceae with hairs (genus *Urtica*) or without hairs (genera *Parietaria* and *Boehmeria*) are distinguished (APGII, 2003]. The plant has been reported to have various pharmacological activities such as antioxidant, antibacterial, antimicrobial, antifungal (Gulcin et al., 2004; Hadizadeh et al., 2009) (Figure 1).

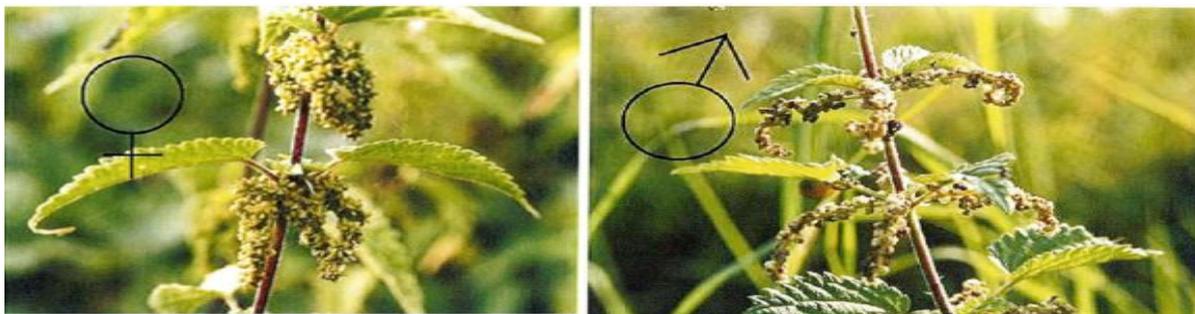


Figure 1. Female Nettle (a) and Male Nettle (b) (Draghi, 2005).

Preparation of plant extracts

The Extraction was done according to the protocol of Laoufi, (2017) improved: 20g leaf and stem powder of the plant obtained by finely grinding with a grain grinder and straw (type FRITSCH, Germany) was macerated in distilled water (aqueous extract), 200ml methanol (methanolic extract) and 200ml ethanol (ethanolic extract) for 24 hours at room temperature and then the three extracts are retrieved using filter paper (0.5µm). Then, the filtrate is concentrated in Rotavapor (Buchi Rotavapor type R-210) at 40°C for 30 minutes to remove the solvent, allowing obtaining a dry residue that is kept in a container in the shade at 4°C until it is used.

Phytochemical analysis of *Urtica dioica* leaves extract

a) Chromatographic analyzes

These were performed on a Hewlett-Packard gas phase chromatograph (6890) coupled with a Mass Spectrometer (GIC/SM) at the Analytical Chemistry Laboratory, Faculty of Medicine, University of Algiers1. The apparatus is equipped with an HP-5MS hair column (30 m × 0.25 mm), with a film thickness of 0.25 µg m. The temperature of the column is programmed from 50°C to 250°C at 4°C. min⁻¹. The vector gas is the helium with a flow rate of 1,5 ml. min⁻¹. Injection mode is split mode (leakage ratio: 1/70), fragmentation is carried out by electronic impact at 70 eV. The device is connected to a computer system that manages a NIST 98 mass spectrum library and is driven by HP ChemStation software to monitor the evolution of chromatographic analyzes.

b) Fourier Transform InfraRed spectroscopy (FTIR)

This is a technique used to obtain the absorption spectrum. The spectral resolution in the number of waves per cm is equal to the reciprocal of the maximum delay (difference of step) in cm. Thus, a resolution of 4 cm⁻¹ will be given by a delay of 0.25 cm. These spectra are made from a sample of vegetable powder of *Urtica dioica* L. scattered in a powder of KBr (Potassium bromide) which are modeled in the shape of a fine and transparent pastille and then introduced into the IR spectrophotometer located at the University of Oran's Laboratory of Materials Chemistry (Algeria). IR spectra are recorded on a FTIR-8201 PC Spectrometer. The main absorption bands are given in cm⁻¹.

Antifungal activity of plant extracts

Three fungal strains obtained from the Phytopathology Lab, Faculty of Biology, Oran University, are maintained in PDA (Potato Dextrose Agar) medium and are: *Aspergillus niger* (MNHN 963917), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (responsible for rotting). The antifungal activity of plant extract was evaluated *in vitro* by the solid dilution method to determine inhibition rates. Different concentrations of plant extracts (5 and 10%) are prepared and incorporated into PDA-based culture medium. Then the mixture is poured into Petri boxes for sowing by the deposit of 5mm diameter fragments in the center of the petri dish, taken from a 7-day culture mycelial carpet. Finally, incubation occurs in darkness at 25 ± 2°C. Mycelial growth of colonies was estimated after 7 days of incubation by the average of two perpendicular diameters. The control is carried out under the same conditions, without addition of plant extracts. The rate of inhibition of mycelial growth is calculated according to Wang et al., (2006) formula:

$$\text{Anti-fungal Index } (1-Da/Db) \times 100$$

(with Db=diametric growth of control and Da=diametric growth of treated fungus:

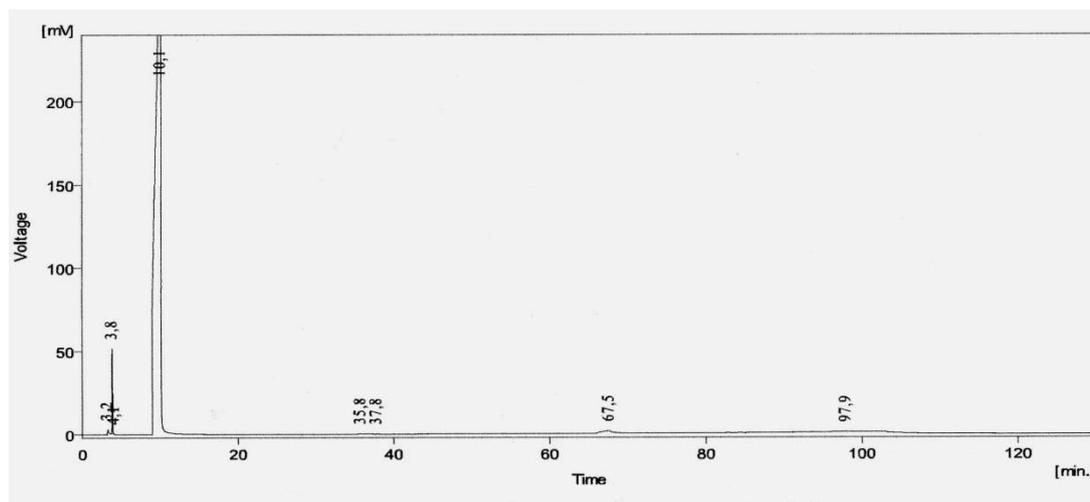
Results

Plant extract yield

The Residues of each extraction are weighed to calculate the yield that varies depending on the plant species, the organ used in the extraction, the drying conditions, the wealthy metabolite plant and the nature of the solvent used for the extraction. Thus, the yields of plant extracts obtained for the three types of extracts: Aqueous, Ethanolic and Methanolic are 12.52%, 15.57% and 17.01%, respectively. These results (Table 1) show that among the three fractions, the residual Methanolic represents the highest yield.

Table 1. The yield of the vegetable extracts of the plants used.

Extract type	Aqueous	Ethanolic	Methanolic
Yield of the vegetable extracts (%)	12,52%	15.57%	17.01%

**Figure 2.** Phytochemical analysis of the leaves extract of *Urtica dioica* determined by Chromatography gas-Mass Spectrometry (CPG/SM).

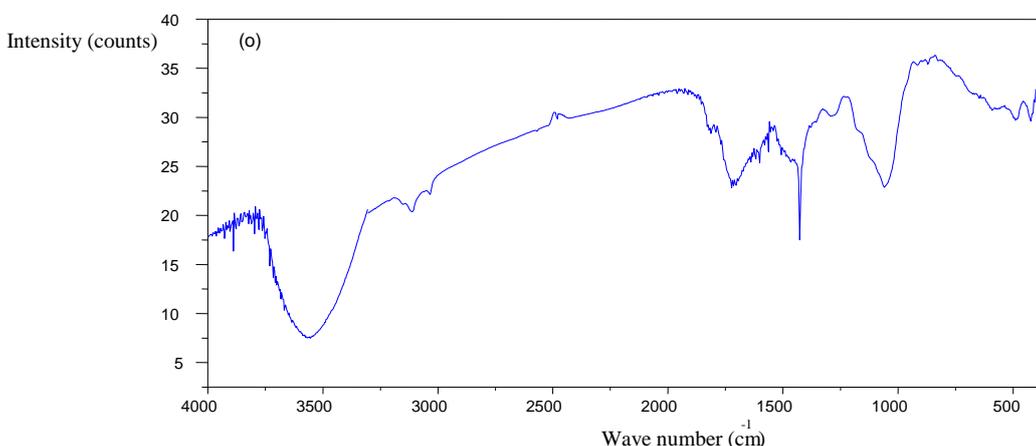
Analysis of the chemical composition of plant extracts

Phytochemicals are chemical compounds formed during the plants normal metabolic processes. These chemicals are often referred to as secondary metabolites. The objective of this research was to Determine the chemical composition of leaves extract. The phytochemical compound screened by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method. Eight bioactive phytochemical compounds were identified in the methanolic extract of *Urtica dioica*. The identification of phytochemical compounds is based on the peak area and retention time molecular weight (Table 2), (Huda et al., 2015).

Table 2. Results of Phytochemical analysis of leaves of *Urtica dioica* by Chromatography gas-Mass Spectrometry (CPG/SM).

	Reten. Time[min]	Area [mV.s]	Height[mV]	Area[%]	Height [%]	composé
1	3,247		3,009	0,3	0,8	fumaric acid;
2	3,823	202,354	51,741	1,4	14,4	gallic acid
3	4,100	2,466	0,448	0,0	0,1	catechins
4	10,107	13700,253	302,394	96,8	84,0	rutin
5	35,750	8,983	0,373	0,1	0,1	myricetin
6	37,763	1,837	0,220	0,0	0,1	quercetin;
7	67,543	133,576	1,514	0,9	0,4	kaempferol;
8	97,943	60,872	0,275	0,4	0,1	isorhamnetin.
	Total	14147,607	359,974	100,0	100,0	

According to Figure 2 of the infra-red analysis (FTIR) of the methanolic leaf extract of *Urtica dioica* L., there are several links with various functions. The FTIR analysis of *U. dioica* leaves proved the presence of aromatic rings, alkenes, aliphatic fluoro, alcohols, ethers, carboxylic acids, esters, nitro compounds, hydrogen bonded alcohols and phenols (Figure 3).

**Figure 3.** Phytochemical analysis of leaves of *Urtica dioica* by Fourier transform infrared spectroscopy (Uncal - ORTIA -10%-G2-LE12_07_201808_44 - Detector B).

Indeed, the bands around 1100 cm^{-1} are assigned to the C-H link (ester function); the bands around 1600 correspond to the C=O bond (aldehyde function); the narrow bands around 2900 cm^{-1} correspond to the CH-link (alkene function); and finally, the wide bands around 3300 cm^{-1} are associated with the elongation vibration of the OH (phenol function) bond (Table 3).

Table 3. Results of Phytochemical analysis of leaves of *Urtica dioica* by Fourier transform infrared spectroscopy.

S/N	Peak (Wave number cm ⁻¹)	Intensit y	Bond	Functional assignment	group	Group frequency
1	471.11	31,65		-Unknown		
2	991.31	22,54	C-H	Alkenes		675-995
3	1241.65	15,46	Esters C-H	Alcohols, Carboxylic acids,		1050-1300
4	1522.32	26,54	C=O	fonction aldéhyde		1500-1600
5	1588.05	25,14	C=O	fonction aldéhyde		1500-1600
6	1649.72	23,36	C=O	fonction aldéhyde		1500-1600
7	2850.55	21,88	CH	fonction alcène		2850-2970
8	3246.20	20,48	O-H	Alcohols, Phenols		3200-3600
9	3363.58	19,33	O-H	Alcohols, Phenols		3200-3600
10	3603.66	8,98	O-H	Alcohols, Phenols		3200-3600

Similar results were obtained by Laoufi (2017), which noted the presence of O-H groups (3306.30 cm^{-1}), C=C (1636.52 cm^{-1}) and an extension of the C=O bond. Similarly, Kavtaradze et al. (2001), which found five functional clusters: 3400 cm^{-1} (OH), 2940 cm^{-1} (OCH), 28402805 cm^{-1} (OCH), 16301520 cm^{-1} (aromatic), 1253 cm^{-1} (furan), $280, 1235, 1035\text{ cm}^{-1}$ (lignan). The compounds which are reported from the plant are beta sitosterol, trans ferulic acid, dotriacotane, erucic acid, ursolic acid, scopoletin, rutin, quercetin and p hydroxybenzalcohol. (Ji et al. 2007). The Table 3 shows the presence of certain phenolic acids in plant extracts such as p-coumaric acid, ferulic acid, and o-coumaric acid in frequencies between 3200 and 3600 (Wave number cm^{-1}). (Medic-caric et al., 2004).

Results of the fungicidal effect of the plant extracts tested.

Aromatogram is a qualitative technique that determines the sensitivity of microorganisms to a substance known as antimicrobial, in our case it is the sensitivity of fungal strains (*Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium lycopersici*) to alcoholic extracts of Nettle. This examination is such that an antibiotic is replaced by the substances to be tested. This method is based on the migratory power of these substances on solid agar medium (PDA medium = Potato Dextrose Agar). Based on the results of the antifungigram test made using the vegetable extracts of the Nettle on *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* and *F. lycopersici* has a remarkable fungicide effect (Table 4).

Table 4. Effect of leaves extracts of Nettle on rate of inhibition of fungal development (diameter in mm).

Extract type	Aqueous 5%	Aqueous 10%	etha n 5%	etha n 10%	meth a 5%	meth a 10%	antifongi c ARTEA	antifongi c BAYER	DMS O
fusarium oxysporum	16,82	18,95	16,22	16,98	17,22	20,25	43,7	40,32	6,25
fusarium leuopercisi	14,82	19,82	16,82	17,54	17,82	18,82	44,01	40,53	6,25
aspergillus niger	12,82	17,82	17,82	18,5	18,89	20,74	40,41	41,17	6,25

In fact, 10% aqueous extract and 10% methanolic extract are the most effective compared to the three fungi. However, they are half (20%) effective than chemical fungicides (40% to 42%), (Artea and Bayer), (Figures 4 and 5).

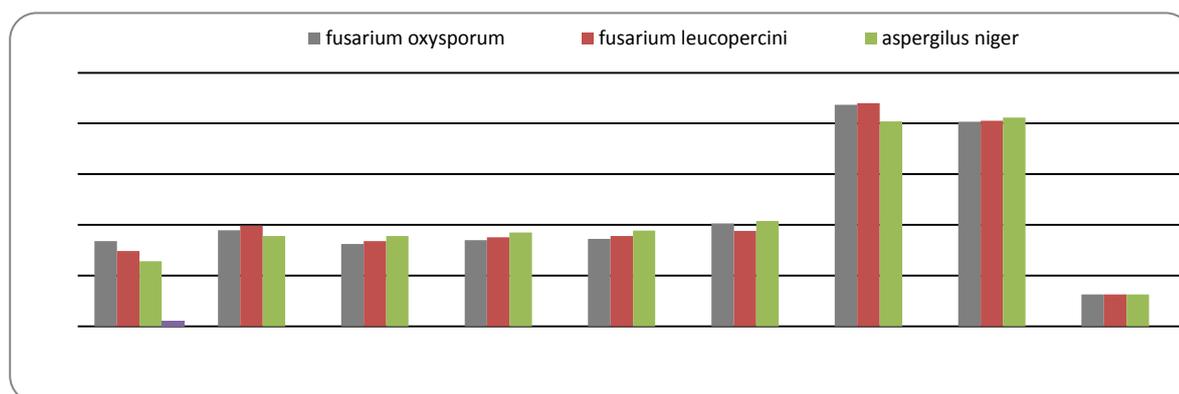


Figure 4. Comparison of the effect of leaf extract and synthetic antifungal on pathogen inhibition rate (diameter in mm).

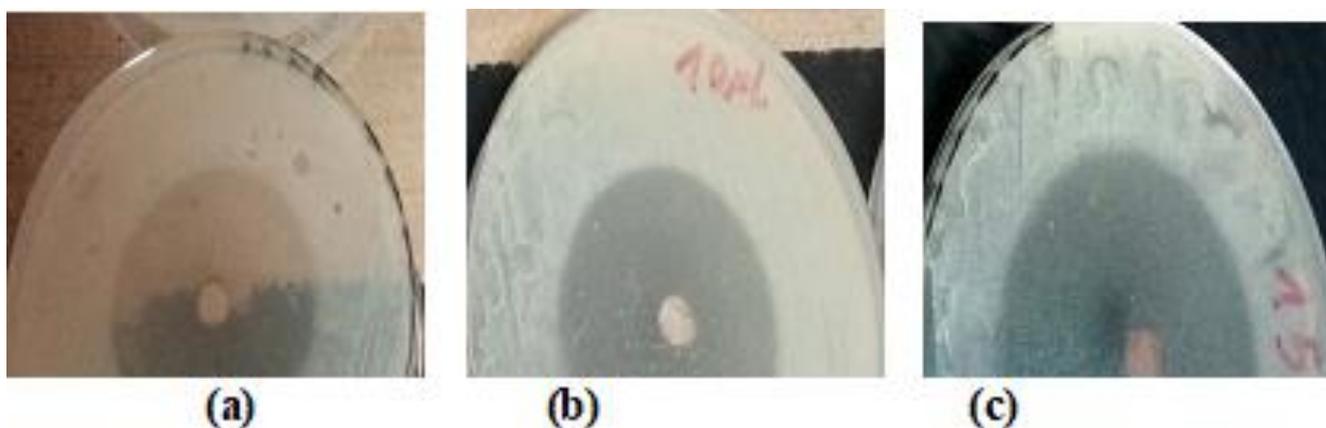


Figure 5. Results of the Antifungal effect of plant Leaf Extract tested, *Fusarium oxysporum* (a) *Fusarium lycopersici* (b) *Aspergillus niger* (c).

Discussion

Ortie extracts are highly antimicrobial. Furthermore, the addition of samples of green plants to the storage silos of rice grain seed is a common practice of African peoples to repel certain aggressive bios from the stored commodities (Delahaye, 2015). In addition, fungal flora is a parasite of crops intended for human consumption and can have serious consequences for human health (Mishra and Dubey, 1994). This fungal development is supported by high humidity in the field and during long-term storage. The dominance of the genus *Aspergillus* in the contaminating flora of cereals is cited in several works with *Aspergillus fumigatus*, the most common species followed by *A. flavus* and *A. Niger* (Pibiri, 2005).

Other strains of other genera are naturally present in crops at the plant level and in soil (Molinie and Pfohl-Leszkowcz, 2003). Thus, as a result of plant extracts, the growth of mycelial organisms is reduced or even inhibited at the concentration of the aqueous extract at 10% and the methanoic extract at the same concentration (10%). Nevertheless, they are half effective compared to the synthetic fungicides (Artea and Bayer) while the methanolic extract is more effective than the other two extracts (Figure 5). The depressive action of the secondary metabolites (Macheix and Fleuriet, 2005) of Nettle leads, in particular to a high sensitivity especially for the genus *Fusarium* compared to the genera *Aspergillus flavus* and *niger* (Mishra and Dubey, 1994; Macheix and Fleuriet, 2005). The reducing effect of treatment with aqueous and alcoholic extracts was also reported by several authors in other species such as lavender, (Ouraini et al., 2005). For Ncube et al., (2008), the absence of Antifungal effect on the different strains tested could be due either to the resistance of the strains or to the insufficiency of polyphenols because the plant screening and the determination of the vegetal extract showed a low phenolic compounds content for the three outputs studied, which would explain the resistance of the germs. But also, the activity of an extract is likely due to the existence of synergy between a number of components, which would become inactive individually (Rios and Recio, 2005). Similarly, the extraction method and the solvents used for extraction could be the source of these results (Hayouni et al., 2007).

Conclusion

The antimicrobial effect is likely primarily due to terpenic alcohols that are particularly active against microbial cells because soluble in aqueous media. They cause significant damage to the cell walls of microorganisms. Alcohols have fungicide effect rather than fungistatic. On the other hand, mould is still present on field seeds or on storage and the Nettle extracts used have shown a significant antifungal effect at low concentrations, but this effect varies from one plant to another. The fungistatic/fungicide tests demonstrated that the Ortie extracts have a strong antifungal effect on all mold tested. In addition, methanolic extract at the same concentration is more effective than the other two extracts than aqueous extract at 10% and ethanolic extract at 10%. Finally, the use of medicinal plants for the control of crop deterioration agents seems to us to be appropriate both for the economic interest of the operation and for its ecological interest. The use of volatile formulations based on aromatic and medicinal plants can have many advantages over current syntheses products because secondary phytometabolite formulations are neither polluting nor toxic to the environment and can have a high biocidal activity.

Acknowledgements

Thanks to the colleagues of the University of Oran, in particular the heads of Phytopathology Laboratory, Faculty of Biology, and Laboratory of Materials Chemistry University of Oran (Algeria).

References

- Delahaye J. (2015). These de doctorat, Utilisations de l'ortie *Urtica dioica*, Université de Rouen 227.
- Deshayes, A. (1991). Les transferts des capacités phytosanitaires aux plantes elles-mêmes. In: Bye, P. (Ed.), Phytosanitaires, Protection des Plantes, Biopesticides. INRA, 113-117.
- Draghi F. (2005). Thèse doctorat, Ortie dioïque: étude bibliographique, Univ. Henri Poincaré Nancy; 89.
- El idrissi M, Elhourri M, Amechrouq A, Boughdad A, (2014). Etude de l'activité insecticide de l'huile essentielle de *Dysphania ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) sur *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) J. Mater. Environ. Sci. 5 (4), 989-994.
- Gulçin, İ., Küfrevioğlu, İ., Oktay, M., M.E. Büyükkuroğlu. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). J. Ethnopharmacol.90: (2-3):205-215.
- Hadizadeh, I., B. Peivastegan, et M. Kolahi. (2009). Antifungal activity of nettle (*Urtica dioica* L.), *Citrullus colocynthis* L. Schrad, oleander (*Nerium oleander* L.) and konar (*Ziziphus spina-christi* L.) extracts on plants pathogenic fungi. Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS 12 (1): 58-63.

- Hayouni EA, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M, (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. Food Chemistry 105:1126-1134.
- Hill, D. S. (1990). Pests of stored products and their control 274 p. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA,
- Huda Jasim Al-Tameme, Mohammed Yahya Hadi and Imad Hadi Hameed. (2015). Phytochemical analysis of *Urtica dioica* leaves by fourier-transform infrared spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry J. Pharmacognosy Phytother Vol. 7 (10), pp. 238-252,
- Ji, TF., Liu, CH., Wang, AG., Yang, JB., Su, YL., Yuan, L., (2007). Studies on the chemical constituents of *Urtica dioica* L. grown in Tibet Autonomous Region. Zhong Yao Cai 2007; 30:662 4
- Kavtaradze, N. S., Alaniya, M. D., et Aneli, J. N. (2001). Chemical components of *Urtica dioica* growing in Georgia. Chemistry of natural compounds, 37 (3), 287-297.
- Lamberth, C., Jeanmart, S., Luksch, T., Plant, A. (2013). Current challenges and trends in the discovery of agrochemicals. Science 341: 742-746
- Laoufi, R. (2017). Caractérisation physico-chimique et biologique des extraits d'une plante médicinale algérienne de la famille des Urticaceae en vue d'une application biotechnologique. Thèse de Doctorat en biochimie- immunologie, Université M'hamed Bougara Boumerdès, Algérie, 146.
- Macheix J, Fleuriet A, (2005). Les composés phénoliques des végétaux, exemple de métabolites secondaires d'importance économique, presse AURELI, presses polytechniques et universitaires romandes, 167-162.
- Medic-caric, M., Jasprica, I., Smolcic-Bubalo, A., Mornar, A. (2004). Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids, Croatica Chemica Acta, CCACAA 77 (1-2) 361-366.
- Mishra, A., Dubey, N. (1994). Evaluation of Some Essential Oils for Their Toxicity against Fungi Causing Deterioration of Stored Food Commodities. Applied and Environmental Microbio 60 (4), 1101-1105.
- Mohammedi, Z. (2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelque plantes de la région de Tlemcen. Thèse de Magistère en Biologie option Produits Naturelles et Synthèse, Université de Tlemcen, 105p.
- Molinie, A., et Pfohl-Leszkowczh, A. (2003). Les mycotoxines dans les céréales: points de contrôle de la production au stockage. Labo Toxicité-sécurité alimentaire- Toulouse; N, 9.
- Ouraini, D., Agoumi, A., Ismaili-Alaoui, M., Alaoui, K., Cherrah, Y. (2005). Study of the activity on the various stages of development of dermatophytes of essential oils from aromatic Plants with antifungal properties; Journal phytothérapie; Paris Vol.3, N°4,147-157
- Pibiri, M. C. (2005). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse EPFL, Ecole polytechnique de lausanne. N°3311.
- Quezel, P., Santa, S. (1963). Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II.
- Rios, J., Recio, M. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. J of ethnopharmacology 100: 80-84.
- Wang, J., Zhu, F., Zhou, X., Niu, C.Y., Lei, C.L. (2006). Repellent and fumigant activity of essential oil from *Artemisia vulgaris* to *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). Journal of Stored Products Research 42, 339-347.

Citation:

Sehari, M., Kouadria, M., Amirat, M., Sehari, N., Hassani, A. (2019). Phytochemistry and antifungal activity of plant extracts from Nettle (*Urtica dioica* L.). *Ukrainian Journal of Ecology*, 10 (1), 1-6.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0. License
