



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: MOULAY Malika**

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"**

**THÈME :**

**Utilisation des métabolites secondaires contre certains  
bio-agresseurs des plantes cultivées**

**Soutenu le : 12 / 11 / 2020**

**Membres de jury :**

Présidente	Dr. MAKHLOUFI	Chahra	Université Ibn Khaldoun de Tiaret
Examinatrice	Dr. AYACHE	Abbassia	Université Dj. Liabes Sidi Belabbes
Examinatrice	Dr. BOUAMOUD	Fatma	Université Ibn Badis Mostaganem
Examineur	Dr. YEZLI	Wassim	Université Ibn Khaldoun de Tiaret
Directrice de Thèse	Pr. DJERBAOUI	Malika	Université Ibn Khaldoun de Tiaret
Co-Directrice de Thèse	Dr. LABDELLI	Fatiha	Université Ibn Khaldoun de Tiaret

**Année universitaire : 2019 – 2020**



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: MOULAY Malika**

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"**

**THÈME :**

**Utilisation des métabolites secondaires contre certains  
bio-agresseurs des plantes cultivées**

**Soutenu le : 12 / 11 / 2020**

**Membres de jury :**

Présidente	Dr. MAKHLOUFI	Chahra	Université Ibn Khaldoun de Tiaret
Examinatrice	Dr. AYACHE	Abbassia	Université Dj. Liabes Sidi Belabbes
Examinatrice	Dr. BOUAMOUD	Fatma	Université Ibn Badis Mostaganem
Examineur	Dr. YEZLI	Wassim	Université Ibn Khaldoun de Tiaret
Directrice de Thèse	Pr. DJERBAOUI	Malika	Université Ibn Khaldoun de Tiaret
Co-Directrice de Thèse	Dr. LABDELLI	Fatiha	Université Ibn Khaldoun de Tiaret

**Année universitaire : 2019 – 2020**

## Résumé

Dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles, des extraits méthanoliques, éthanolique et aqueux de trois plantes médicinales (*Eucalyptus obliqua* Hert., *Marrubium vulgare* L. et *Peganum harmala* L.) ont été testés pour leur teneur en polyphénols totaux, en flavonoides et en tanins condensés et aussi pour leur activité antioxydante, antibactérienne et antifongique.

L'extrait méthanolique d'*E. obliqua* Hert. a donné les plus fortes teneurs en polyphénols totaux, flavonoides et tanins condensés de l'ordre de  $231,58 \pm 0,40$  mg EAG/g MS,  $32,06 \pm 0,57$  mg EQ/g MS et  $38,57 \pm 0,00$  mg EC/g MS respectivement par rapport à l'extraits éthanolique et aqueux de cette espèce et à l'ensemble des extraits de *M. vulgare* L. et *P. harmala* L.

L'évaluation du pouvoir antioxydant *in vitro* a révélé des capacités antioxydantes chez tous les extraits. Les activités les plus potentielles par le mécanisme de piégeage direct des radicaux libres par la méthode de DPPH sont prouvées par l'extrait éthanolique de *M. vulgare* L. ( $IC_{50} = 10,86 \pm 0,005$  µg/ml).

D'autre part, les tests de l'activité antibactérienne a été effectuée par la méthode de diffusion sur disque et la méthode de micro-dilutions pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les résultats obtenus ont montré l'efficacité de certains extraits des plantes médicinales étudiées et leur pouvoir antiseptique. La plus part des extraits utilisés possède une activité bactériostatique.

Le test de l'activité antifongique *in vitro* a démontré que les extraits éthanoliques et méthanoliques se sont révélés les plus actifs contre les trois souches fongiques de *Fusarium* par rapport aux extraits aqueux chez l'ensemble des plantes étudiées. L'évaluation de l'efficacité *in vivo* des extraits hydroalcooliques d'*E. obliqua* Hert. contre *Fusarium culmorum*, a montré que l'extrait méthanolique (1,5% (p/p)) et l'extrait éthanolique (0,25% (p/p)) ont amélioré le développement des plantules et ont réduit la gravité de la maladie.

La caractérisation des composés bioactifs par chromatographie sur couche mince (CCM) et par chromatographie gazeuse couplée par spectrométrie de masse (CG-SM) ont décelé la richesse des espèces végétales étudiées en multiples molécules actives qui pourraient être l'origine de l'activité biologique de ces plantes.

**Mots-Clés:** plantes médicinales, extraits végétaux, activité antioxydante, activité antibactérienne, activité antifongique.

## Abstract

As part of the development of natural resources, methanolic, ethanolic and aqueous extracts of three medicinal plants (*Eucalyptus obliqua* Hert., *Marrubium vulgare* L. and *Peganumharmala* L.) were tested for their contents of total polyphenols, flavonoids and condensed tannins and also for their antioxidant, antibacterial and antifungal activities.

The methanolic extract of *E. obliqua* Hert. exhibited the highest contents of total polyphenols, flavonoids and condensed tannins of the order of  $231,58 \pm 0,40$  mg EAG / g DM,  $32,06 \pm 0,57$  mg EQ / g DM and  $38,57 \pm 0,00$  mg EC / g DM respectively relative to the ethanolic and aqueous extracts of this species and to all the extracts of *M. vulgare* L. and *P. harmala* L.

Evaluation of antioxidant activity *in vitro* revealed antioxidant capacities in all extracts. The most potential activities by the mechanism of direct free radical scavenging by the DPPH method are proven by the ethanolic extract of *M. vulgare* L. ( $IC_{50} = 10,86 \pm 0,005$   $\mu$ g / ml).

On the other hand, tests for antibacterial activity were realised by the disk diffusion method and micro-dilution method for the minimum inhibitory concentration (MIC). The results obtained showed the effectiveness of certain extracts of the medicinal plants studied and their antiseptic power. Most of the extracts used possessed bacteriostatic activity.

The *in vitro* antifungal activity test demonstrated that ethanolic and methanolic extracts were found to be the most active against the three fungal strains of *Fusarium* compared to aqueous extracts in all of the plants studied. The evaluation of the *in vivo* efficacy of hydroalcoholic extracts of *E. Obliqua* Hert. against *Fusarium culmorum*, showed that methanolic extract (1,5 % (w/w)) and ethanolic extract (0,25% (w/w)) improved seedling development and reduced disease severity.

The characterization of bioactive compounds by thin layer chromatography (TLC) and gas chromatography coupled by mass spectrometry (GC-MS) have detected the richness of the plant species studied in multiple active molecules which could be the origin of the biological activity of these plants.

**Keywords:** medicinal plants, plant extracts, antioxidant activity, antibacterial activity, antifungal activity.



## المخلص

في إطار تهمين الموارد الطبيعية ، تم اختبار المستخلصات الميثانولية والإيثانولية والمائية لثلاث نباتات طبية (*Eucalyptus obliqua* Hert. , *Marrubium vulgare* L. و *Peganum harmala* L.) لمعرفة محتواها من مادة البوليفينول الكلي ، الفلافونيدات و التانينات المكثفة وكذا نشاطها المضاد للأوكسدة و المضاد للبكتيريا والفطريات.

مستخلص الميثانوليك لنبات *E. obliqua* Hert. سجل أعلى قيمة من البوليفينول الكلي والفلافونيدات والتانينات المكثفة بقيمة  $238,57 \pm 0,00$  mg EAG/g MS ,  $32,06 \pm 0,57$  mg EQ/g MS و  $38,57 \pm 0,00$  mg EC/g MS على الترتيب مقارنة مع مستخلصات الميثانوليكية والمائية لنفس النبتة و مع بقية أنواع المستخلصات لنبات *P. harmala* L. و *M. vulgare* L.

الكشف عن القدرة المضادة للأوكسدة مخبريا أظهر قدرات مضادة للأوكسدة عند كل المستخلصات . النشاطات الأكثر فعالية بطريقة إرجاع المباشر للجذور الحرة DPPH أثبت من قبل المستخلص الإيثانوليكي لنبات *M. vulgare* L. ( $EC_{50} = 10,86 \pm 0,005$  µg/ml).

من جانب آخر , إختبارات النشاط المضاد للبكتيريا تم القيام بها بطريقة الإنتشار على القرص وكذا التركيز الأدنى للتثبيط (CMI) بواسطة طريقة التخفيف الدقيق. النتائج المحصل عليها أظهرت فعالية البعض من مستخلصات الأعشاب الطبية المدروسة و كذا قوتها المطهرة ، كما أن معظم المستخلصات المستخدمة لها نشاط كايح للبكتيريا.

أظهر اختبار النشاط المضاد للفطريات في المختبر أن المستخلصات الإيثانولية والميثانولية كانت الأكثر نشاطاً ضد السلالات الفطرية الثلاثة للفطر *Fusarium* مقارنة بالمستخلصات المائية في جميع النباتات المدروسة. وقد أظهر تقييم فعالية المستخلصات الهيدروكحولية لنبات *E. obliqua* Hert. ضد *Fusarium culmorum* أن المستخلص الميثانولي (1,5%) والمستخلص الإيثانولي (0,25%) يحسن نمو الشتلات ويقلل من شدة المرض.

كشفت توصيف المركبات النشطة بيولوجياً عن طريق كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) وكروماتوغرافيا الغاز إلى جانب قياس الطيف الكتلي (GC-MS) عن ثراء الأنواع النباتية المدروسة بالعديد من الجزيئات النشطة والتي يمكن أن تكون مصدر النشاط البيولوجي لهاته النباتات.

**الكلمات المفتاحية :** النباتات الطبية , المستخلصات النباتية , النشاط المضاد للأوكسدة , النشاط المضاد للبكتيريا , النشاط المضاد للفطريات.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉS.....	i
TABLE DES MATIÈRE.....	ii
Liste des tableaux.....	iii
Liste des figures.....	iv
Liste des abréviations.....	v
Introduction.....	01

### Chapitre I : Aperçu bibliographique des plantes médicinales

1.1 - Définition d'une plante médicinale.....	03
1.2 - Définition de la phytothérapie.....	03
1.3 - Métabolites secondaires.....	04
1.3.1 - Les composés phénoliques.....	05
1.3.1.1- Rôles des composés phénoliques.....	07
1.3.1.2 - Principales structures phénoliques.....	07
1.3.1.2.1 - Formes les plus simples.....	07
1.3.1.2.1.1 - Acides phénoliques.....	08
1.3.1.2.1.2 - Ensemble des flavonoïdes.....	08
1.3.1.2.2 - Formes condensées.....	08
1.3.1.2.2.1 – Tanins.....	08
1.3.1.2.2.2 - Lignines et subérines.....	09
1.3.2 – Alcaloïdes.....	10
1.3.3 - Terpénoïdes et stéroïdes.....	11
1.3.3.1 – Monoterpènes.....	12
1.3.3.2 – Sesquiterpènes.....	12
1.3.4 – Glucosides.....	13

### Chapitre II : Aperçu bibliographique sur les plantes étudiées

2.1. <i>Marrubium vulgare</i> L.....	14
2.1.1 - Description botanique.....	14
2.1.2 - Position systématique.....	14
2.1.3 - Utilisation en médecine traditionnelle.....	14
2.2 – <i>Peganum harmala</i> L.....	15
2.2.1- Position systématique.....	15
2.2.2 - Description botanique.....	15

2.2.3 - Utilisation en médecine traditionnelle.....	15
2.3 - <i>Eucalyptus obliqua</i> Hert.....	16
2.3.1- Position systématique.....	16
2.3.2 - Description botanique.....	16
2.3.3 - Utilisation en médecine traditionnelle.....	17

### **Chapitre III : Activités biologiques des plantes médicinales**

3.1 - Activité antioxydante.....	18
3.2 - Activité antifongique.....	19
3.2.1- Genre <i>Fusarium</i> .....	20
3.2.1.1 – Taxonomie.....	20
3.2.1.2 – Symptomatologie.....	20
3.2.1.3 - Cycle de développement de l’agent pathogène.....	22
3.2.1.4 - Moyens de lutte.....	23
3.2.1.4.1- Lutte culturale.....	23
3.2.1.4.2- Lutte chimique.....	23
3.2.1.4.3- Lutte génétique.....	24
3.2.1.4.4- Lutte biologique.....	24
3.2.1.4.5- Lutte intégrée.....	24
3.3 - Activité antibactérienne.....	25

### **Chapitre IV : Zone d’étude**

4.1- Localisation géographique des sites de prélèvement.....	29
4.2 - Données climatiques de la wilaya de Tissemsilt.....	31
4.2.1 -Diagramme Ombrothermique de Bagnouls et Gausse.....	31
4.2.2 -Quotient pluviothermique d’Emberger.....	32
4.3 - Données climatiques de la wilaya de Tiaret.....	33
4.3.1 - Diagramme Ombrothermique de Bagnouls et Gausse.....	33
4.3.2 - Quotient pluviothermique d’Emberger.....	33

### **Chapitre V : Matériel et méthodes**

5.1- Matériel végétal.....	35
5.1.1- Préparation du matériel végétal.....	35
5.2 - Analyses physicochimiques et biochimiques.....	36
5.2.1 - Détermination du pH.....	36
5.2.2 - Détermination de la teneur en eau.....	36

5.2.3 - Détermination de la conductivité électrique.....	37
5.2.4 - Détermination du taux des solides solubles.....	37
5.2.5 -Détermination de la teneur en sucres totaux.....	37
5.2.6 - Détermination de la teneur en lipides.....	38
5.2.7 – Détermination du taux de fibres totales.....	38
5.2.8 - Détermination du taux de cendres.....	38
5.2.9 - Détermination du taux de protéines.....	39
5.3- Etude phytochimique.....	39
5.3.1 - Préparation des extraits.....	39
5.3.2 - Rendement d'extraction.....	40
5.3.3 - Screening phytochimique des extraits des trois plantes étudiées.....	40
5.3.3.1 – Alcaloïdes.....	40
5.3.3.2 – Anthocyanes.....	40
5.3.3.3 – Flavonoïdes.....	40
5.3.3.4 - Glycosides cardiaques.....	40
5.3.3.5 – Mucilage.....	40
5.3.3.6 – Saponines.....	41
5.3.3.7 - Tanins galliques ou catéchiques.....	41
5.3.4 - Dosage des polyphénols totaux.....	41
5.3.5 - Dosage des flavonoïdes.....	41
5.3.6 - Dosage des tanins condensés.....	42
5.4. - Activités biologiques des extraits.....	42
5.4.1 - Activité antioxydante.....	42
5.4.2 - Activité antibactérienne.....	43
5.4.2.1 - Souches bactériennes utilisées.....	44
5.4.2.2 - Technique en milieu solide (méthode de la diffusion sur disque).....	44
5.4.2.3 - Détermination de la concentration inhibitrice minimale(CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB).....	44
5.4.3 - Activité antifongique.....	45
5.4.3.1 - Matériel fongique.....	45
5.4.3.2 - Purification des isolats de <i>Fusarium</i> sp.....	45
5.4.3.3 - Identification morphologique des isolats de <i>Fusarium</i> sp.....	46
5.4.3.4 - Conservation des isolats de <i>Fusarium</i> sp.....	46

5.4.3.5 - Test antifongique.....	46
5.4.4 - Effet des extraits des méthanolique et éthanolique d' <i>E. obliqua</i> sur la germination des graines du blé dur (var. vitron).....	47
5.4.5 - Test de l'activité antifongique de l'extrait méthanolique et éthanolique contre le <i>Fusarium culmorum in vivo</i> .....	48
5.4.5.1 – Semence.....	48
5.4.5.2 - Matériel fongique.....	48
5.4.5.3 – Fongicide.....	49
5.4.5.4 - Efficacité <i>in vivo</i> des deux extraits d' <i>E. obliqua</i> contre <i>F. culmorum</i> .....	50
5.4.5.5 - Préparation des extraits.....	51
5.4.5.6 - Préparation de l'inoculum.....	51
5.4.5.7 - Préparation du sol.....	52
5.4.5.8 - Préparation des graines.....	53
5.4.5.9 - Inoculation et traitement du sol.....	53
5.4.5.10 – Semis.....	53
5.4.5.11 - Notation des résultats.....	55
5.5 - Caractérisation des composés actifs au niveau des trois plantes.....	56
5.5.1 - Chromatographie sur Couche Mince (CCM).....	56
5.5.2 - Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM).....	57
5.6 - Analyses statistiques.....	59

## **Chapitre VI : Résultats et discussion**

6.1 - Résultats obtenus.....	60
6.1.1 - Analyses physicochimiques.....	60
6.1.2 - Analyses biochimiques.....	61
6.1.3 - Etude phytochimique.....	62
6.1.3.1 - Rendement des extraits.....	62
6.1.3.2 - Criblage phytochimique des métabolites secondaires.....	63
6.1.3.3 - Dosage des polyphénols totaux au niveau des trois extraits.....	65
6.1.3.4 - Teneur en flavonoïdes.....	67
6.1.3.5 -Tanins condensés.....	69
6.1.4 - Evaluation des activités biologiques.....	70
6.1.4.1 - Activité antioxydante par piégeage du radical libre DPPH.....	71
6.1.4.2 - Activité antibactérienne.....	74

6.1.4.2.1 - Effet des extraits sur les souches bactériennes.....	74
6.1.4.2.2 - Détermination des concentrations minimales inhibitrices(CMI) et concentrations minimales bactéricides (CMB).....	77
6.1.4.3 - Activité antifongique <i>in vitro</i> .....	78
6.1.4.3.1 - Identification morphologique des souches de <i>Fusarium sp</i> .....	78
6.1.4.3.1.1 – Souche 01 <i>Fusarium culmorum</i> .....	79
6.1.4.3.1.2 - Souche 02 <i>Fusarium oxysporum</i> .....	80
6.1.4.3.1.3 - Souche 03 <i>Fusarium roseum</i> .....	82
6.1.4.3.2 - Effet des extraits sur les souches <i>F. culmorum</i> , <i>F. oxysporum</i> et <i>F. roseum in vitro</i> .....	83
6.1.4.4 - Effet des extraits éthanoliques et méthanoliques d' <i>E. obliqua</i> Hert. sur la germination des graines du blé dur (var. vitron).....	86
6.1.4.5 - Test de l'activité antifongique de l'extrait méthanolique et éthanolique d' <i>E. obliqua</i> Hert. contre <i>Fusarium culmorum in vivo</i> .....	88
6.1.4.5.1 - Effet des extraits sur les paramètres de développement des plantules.....	88
6.1.4.5.2 - Effet des extraits sur l'indice de maladie.....	89
6.1.5 - Caractérisation des composés bioactifs par chromatographie sur couche mince (CCM).....	90
6.1.6 - Caractérisation des composés bioactifs par chromatographie gazeuse couplée par spectrométrie de masse (CG-SM).....	93
6.2 - Discussion des résultats.....	95
6.2.1 - Discussion des résultats des analyses physicochimiques et biochimiques.....	95
6.2.2 - Discussion des résultats de l'étude phytochimique.....	96
6.2.3 - Discussion des résultats de l'activité biologique des extraits.....	98
6.2.4 - Discussion des résultats de la caractérisation des composés bioactifs par chromatographie sur couche mince(CCM).....	100
6.2.5 - Discussion des résultats de la caractérisation des composés bioactifs par chromatographie gazeuse couplée par spectrométrie de masse (CG-SM).....	100
Conclusion.....	101
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	104
ANNEXES	

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau n°01</b>	Structure de base des principaux flavonoïdes	09
<b>Tableau n° 02</b>	Désignation, culture, année d'isolement et origines géographiques des isolats de <i>Fusarium</i> sp	45
<b>Tableau n° 03</b>	Caractéristiques du Tachigazole	50
<b>Tableau n° 04</b>	Résultats des tests physicochimiques	60
<b>Tableau n° 05</b>	Résultats des tests biochimiques des plantes étudiées	62
<b>Tableau n°06</b>	Résultats de screening phytochimique de <i>M. vulgare</i> L.	64
<b>Tableau n°07</b>	Résultats de screening phytochimique d' <i>E. obliqua</i> Hert.	64
<b>Tableau n°08</b>	Résultats de screening phytochimique de <i>P. harmala</i> L.	65
<b>Tableau n°09</b>	Valeurs des IC50 des différents extraits des plantes étudiées.	74
<b>Tableau n°10</b>	Activité antibactérienne des extraits de plantes étudiées sur milieu Mueller-Hinton (mm).	75
<b>Tableau n°11</b>	Activités antibactérienne des antibiotiques utilisés comme standards en mm	75
<b>Tableau n°12</b>	Concentrations minimales inhibitrices et concentrations minimales bactéricides des extraits.	78
<b>Tableau n°13</b>	Effet des extraits sur la longueur de la racine(LR), longueur de la partie aérienne (LA), poids frais (PF), poids sec (PS) et nombre de feuilles (NF).	89
<b>Tableau n°14</b>	Indices de maladie	90
<b>Tableau n°14</b>	Rapports frontaux calculés des extraits méthanoliques et éthanoliques pour <i>P. harmala</i> L.	92
<b>Tableau n°15</b>	Rapports frontaux calculés des extraits méthanoliques et éthanoliques pour <i>E. obliqua</i> Hert.	92
<b>Tableau n°16</b>	Rapports frontaux calculés des extraits méthanoliques et éthanoliques pour <i>M. vulgare</i> L.	93
<b>Tableau n° 17</b>	Composition chimique d' <i>E. obliqua</i> Hert.	94
<b>Tableau n° 18</b>	Composition chimique de <i>M. vulgare</i> L.	95

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure n°01</b>	Voies principales de synthèse des composés secondaires chez les plantes Supérieures.	05
<b>Figure n° 02</b>	Biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques.	06
<b>Figure n° 03</b>	Exemples de quelques monoterpènes	12
<b>Figure n° 04</b>	Exemples de quelques sesquiterpènes	13
<b>Figure n° 05</b>	Symptômes de la pourriture racinaire et de la fusariose de l'épi chez le blé.	21
<b>Figure n° 06</b>	Cycle biologique de <i>Fusarium</i> sur céréales	22
<b>Figure n° 07</b>	Localisation géographique de la zone d'étude (Commune de Lardjem, wilaya de Tissemsilt).	30
<b>Figure n° 08</b>	Localisation géographique de la zone d'étude (Commune de Sidi Abderrahmane, wilaya de Tiaret).	30
<b>Figure n° 09</b>	Diagramme Ombrothermique de Bagnouls et Gaussens de la région de Tissemsilt	31
<b>Figure n° 10</b>	Climagramme pluviothermique d'Emberger (Q2) de la wilaya de Tissemsilt.	32
<b>Figure n° 11</b>	Diagramme Ombrothermique de Bagnouls et Gaussens de la région de Tiaret.	33
<b>Figure n° 12</b>	Climagramme pluviothermique d'Emberger (Q2) de la wilaya de Tiaret	34
<b>Figure n°13</b>	Matériel végétal ; a: <i>Marrubium vulgre</i> L. ; b: <i>Peganum harmala</i> L. ; c: <i>Eucalyptus obliqua</i> Hert.	36
<b>Figure n°14</b>	Dillutions préparées et laissées réagir pour tracer les courbes d'étalonnage	42
<b>Figure n°15</b>	Dilutions préparées pour traçage de la courbe d'étalonnage d'acide ascorbique	43
<b>Figure n° 16</b>	Dispositif expérimental du test de l'effet de de l'extrait éthanolique d' <i>E. obliqua</i> sur germination	48
<b>Figure n° 17</b>	Fongicide utilisé en expérimentation	49
<b>Figure n° 18</b>	Résidus secs des extraits méthanolique et éthanolique d' <i>E. obliqua</i> .	51
<b>Figure n° 19</b>	Matériel utilisé en préparation d'inoculum	52
<b>Figure n° 20</b>	Mélange du sol au cours de préparation	52
<b>Figure n° 21</b>	Désinfection des graines du blé.	53
<b>Figure n° 22</b>	Incubation du sol inoculé et des sols traités avec le résidu sec.	54



<b>Figure n°23</b>	Dispositif expérimental au niveau de la serre.	55
<b>Figure n° 24</b>	Systèmes de migration utilisés au cours de la CCM avec révélation sous lampe UV.	57
<b>Figure n° 25</b>	Première révélation à 254 nm.	57
<b>Figure n°26</b>	Deuxième révélation à 365nm	57
<b>Figure n°27</b>	Dispositif de la CPG-SM au laboratoire	59
<b>Figure n°28</b>	Courbe d'étalonnage du glucose	61
<b>Figure n°29</b>	Courbe d'étalonnage du sérum d'albumine de bovine	61
<b>Figure n°30</b>	Rendements des différents extraits des plantes étudiées	63
<b>Figure n° 31</b>	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	66
<b>Figure n° 32</b>	Taux de polyphénols des extraits de plantes étudiées	66
<b>Figure n° 33</b>	Courbe d'étalonnage de la quercétine.	67
<b>Figure n° 34</b>	Taux de flavonoïdes des extraits des plantes étudiées	68
<b>Figure n° 35</b>	Courbe d'étalonnage du Catéthol	69
<b>Figure n° 36</b>	Taux de tanins condensés des extraits des plantes étudiées.	70
<b>Figure n° 37</b>	Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'acide ascorbique.	71
<b>Figure n° 38</b>	Pourcentages d'inhibition de DPPH par les extraits d' <i>E. obliqua</i>	72
<b>Figure n° 39</b>	Pourcentages d'inhibition de DPPH par les extraits de <i>P. harmala</i> .	72
<b>Figure n° 40</b>	Pourcentages d'inhibition de DPPH par les extraits de <i>M. vulgare</i> .	73
<b>Figure n° 41</b>	Effets des trois antibiotiques et des extraits méthanoliques et éthanoliques plantes sur la souche bactérienne <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.	76
<b>Figure n°42</b>	Colonie mycélienne de <i>F. culmorum</i> montrant une coloration orange pâle	79
<b>Figure n°43</b>	Macroconidies de <i>F. culmorum</i> sous microscope optique (10 x 40)	80
<b>Figure n°44</b>	Colonie mycélienne de <i>F. oxysporum</i> montrant une coloration violet pâle	80
<b>Figure n°45</b>	Macroconidies de <i>F. oxysporum</i> sous microscope optique (10 x 40)	81
<b>Figure n° 46</b>	Colonie mycélienne de <i>F. roseum</i> montrant une coloration rosée	82
<b>Figure n°47</b>	Macroconidies de <i>F. oxysporum</i> sous microscope optique (10 x 40)	83
<b>Figure n°48</b>	Effet des extraits sur la souche de <i>F. culmorum</i>	84
<b>Figure n°49</b>	Effet des extraits sur la souche de <i>F. oxysporum</i>	84
<b>Figure n°50</b>	Effet des extraits sur la souche de <i>Fusarium roseum</i>	85
<b>Figure n°51</b>	Pourcentages de germination des graines de blé traitées par l'extrait méthanolique et éthanolique d' <i>E. obliqua</i> Hert.	86

<b>Figure n° 52</b>	Test de germination des graines de blé traitées par l'extrait méthanolique et éthanolique d' <i>E. obliqua</i> Hert.	87
<b>Figure n° 53</b>	Test de germination des graines de blé non traitées (Témoin négatif).	87
<b>Figure n°54</b>	Résultats de quelques plaques CCM utilisées	91

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

- : Absence

+ : Présence

Aq: aqueux

ATCC : American Type Culture Collection

BS : *Bacillus subtilis*

BSA : Sérum d'albumine de bovin

CCLS : Coopérative Céréales et Légumes Secs.

CCM : Chromatographie sur couche mince

chloro : chloroforme

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

E. aq : Extrait aqueux

E. eth : Extrait éthanolique

E. meth : Extrait méthanolique

*E. obliqua* : *Eucalyptus obliqua*

EA : *Erwinia amylovora*.

EC : *Erwinia carotovora*

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

Eth ac : Ethyl acétates

Eth : éthanolique

*F. culmorum* : *Fusarium culmorum*

*F. oxysporum*: *Fusarium oxysporum*

*F. roseum*: *Fusarium roseum*

FeCl<sub>3</sub> : Chlorure de fer

FeCl<sub>3</sub> : Chlorure de Fer

FRAP: Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter

CG-SM : Chromatographie Gazeuse couplée par Spectrométrie de Masse

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : Acide sulfurique

HCL : Acide chlorhydrique

hex : hexane

IC<sub>50</sub> : Inhibitory Concentration 50 ou EC<sub>50</sub> : Efficient concentration 50 : Concentration inhibitrice 50

IM : Indice de Maladie

INPV : Institut National de Protection des Végétaux

ITMA : Institut de Technologie Moyen Agricole

KOH : Hydroxyde de potassium

LA : Longueur de partie aérienne

LR: Longueur de racine

*M. vulgare*: *Marrubium vulgare*

Meth : méthanolique

mg EAG/g MS: mg équivalent en acide gallique par gramme de matière sèche.

mg EC/g MS: mg équivalent en catéchol par gramme de matière sèche.

mg EQ/g MS: mg équivalent en quercétine par gramme de matière sèche.

ML : *Micrococcus luteus*

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : Carbonate de sodium

NF: Nombre de Feuilles

NH<sub>4</sub>OH : Ammoniaque

nm: nanomètre

ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity

*P. harmala*: *Peganum harmala*

P.A: *Pseudomonas aeruginosa*

p/p: poids par poids

PDA: Potato Dextrose Agar

PF: Poids Frais

PS: Poids Sec

R<sup>2</sup> : Coefficient de corrélation

ROO: Peroxyde

ROS: Reactive oxygen species

SNV : Sciences de la nature et de la vie

T : témoin

TIN : Témoin inoculé

TN : Témoin négatif

TP : Témoin positif

TRAP: Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter

UFC : Unité Formant Colonie

var.: variété

v/p : volume par poids

v/v : volume par volume

p/p : poids par poids

# INTRODUCTION

L'homme préhistorique, qui avait très peu de moyens, devait se nourrir des produits de cueillette et de chasse. En assimilant la flore locale, il a découvert les plantes utiles et indispensables pour survivre. Ce régime, essentiellement végétarien, a constitué le berceau de l'utilisation des produits naturels. A cette époque, les plantes médicinales ont été une source inépuisable de médicaments pour les tradipraticiens pour guérir certaines pathologies souvent mortelles sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques (**Djahra, 2014**).

Les plantes médicinales constituent un patrimoine précieux pour l'humanité, elles sont des usines chimiques naturelles, produisant des substances actives biochimiques : alcaloïdes, huiles essentielles, flavones, tanins,...etc. et les mettent à la disposition de l'homme qui peut en faire usage pour sa santé et satisfaire ses besoins vitaux (**Schauenberg et Paris, 1997**).

Ces plantes font partie de l'histoire de tous les continents : en Chine et en Inde, à travers les siècles, le savoir concernant les plantes s'est organisé, documenté et a été transmis de génération en génération. Aujourd'hui, le recours à la médecine par les plantes connaît un regain d'intérêt dans les pays occidentaux, particulièrement pour traiter les déséquilibres entraînés par la vie moderne. De ce fait, les industriels ont développé des procédés pour la fabrication des produits naturels à base des extraits et des principes actifs de plantes médicinales (**Benabdelkader, 2012**).

Parmi ces substances potentiellement intéressantes, les antioxydants naturels qui ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé (**Benabdelkader, 2012**). L'intérêt accru des antioxydants d'origine naturelle dans le but d'augmenter la conservation des aliments s'explique par le fait que certains antioxydants synthétiques présentent des risques de cancérogénicité.

Les plantes médicinales sont également utilisées pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques. Cependant, en tant que sources de médicaments, les plantes restent encore sous exploitées surtout dans le domaine de la microbiologie. Il est certain que la plupart des antibiotiques prescrits dérivent des microorganismes (**Mohammedi, 2013**). Ces dernières années, le potentiel thérapeutique des produits végétaux est reconsidéré et les études qui leurs sont consacrées abondant dans la littérature scientifique. Ceci est dû au phénomène de résistance développée par les souches microbiennes aux produits chimiques. Un grand nombre de ces composés naturels sont de très bons agents antifongiques et antibactériens. Les études *in vitro* ont démontré que les substances bioactives provenant de diverses espèces



végétales présentent un spectre large d'activité sur une gamme de flore fongique dont sont incluses les souches phytopathogènes.

Dans les domaines phytosanitaires et agroalimentaires, ces composés bioactifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires.

La richesse de la flore Algérienne n'est plus à démontrer, elle est représentée par plus de 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques (**Gaussen, 1982**).

Ce travail de thèse contribue à la valorisation des ressources naturelles pour une meilleure connaissance de la flore algérienne notamment les plantes médicinales et aromatiques. L'objectif principal de cette étude consiste dans la caractérisation physicochimique, phytochimique et biologique des extraits de trois espèces de plantes médicinales qui sont: *Eucalyptus obliqua* Hert., *Marrubium vulgare* L. et *Peganum harmala* L.

Ce manuscrit, se subdivise en six chapitres, le premier chapitre est un aperçu bibliographique sur les notions de plantes médicinales, phytothérapie et métabolites secondaires. Le second chapitre est une analyse bibliographique sur les trois plantes étudiées précisément leur description botanique, leur position systématique et leur utilisation en médecine traditionnelle. Le troisième chapitre traitera les activités biologiques des plantes médicinales. Le quatrième chapitre est une présentation de la zone d'étude. Le cinquième chapitre est consacré à la description du matériel et méthodes employées en analyses physicochimiques et phytochimiques des trois extraits des plantes étudiées et l'étude biologique qui met en évidence la valorisation de ces extraits pour leurs activités antioxydantes, antibactériennes et antifongiques. Le sixième chapitre présentera une synthèse des principaux résultats obtenus et leurs discussions.

Enfin nous récapitulons dans la conclusion tous les résultats essentiels de ce travail et nous abordons les perspectives de ce projet de recherche.

# **CHAPITRE I**

## **APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE DES PLANTES MÉDICINALES**

Ce chapitre présente une synthèse bibliographique permettant de définir les différents termes abordés dans ce sujet.

### 1.1 - Définition d'une plante médicinale

Une plante médicinale est définie par la pharmacopée française note 1 comme une « drogue végétale au sens la pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses ». L'expression drogue végétale ou, plus couramment, drogue, désigne donc une matière première naturelle servant à la fabrication des médicaments (**Mohammedi, 2013**).

Des plantes ayant des propriétés médicamenteuses peuvent avoir également des usages alimentaires ou condimentaires. Pour ces diverses utilisations, il s'agit soit des mêmes parties de plantes, soit des parties différentes.

### 1.2 - Définition de la phytothérapie

La médecine par les plantes dite phytothérapie qui est l'ensemble des soins thérapeutiques faisant directement appel aux drogues d'origine végétale (**Volák et Stodola, 1983**). C'est une partie de la thérapeutique médicamenteuse qui a été valorisée grâce aux connaissances nouvelles sur la fonction de l'organisme et des récentes découvertes sur les substances contenues dans les plantes.

Cette dernière est basée sur l'usage interne par absorption de substance thérapeutique sous forme de tisane ou du jus ou bien l'usage externe en applications d'alcools, compresse, bains...etc. (**Kresánek, 1981**).

De nos jours, une prise de conscience des nombreux effets secondaires et indésirables des médicaments chimiques, fait renaître une certaine réticence envers ces produits. (**Moussaoui, 2014**).

On distingue deux types de phytothérapies :

- ✓ La phytothérapie traditionnelle

C'est une thérapie de substitution qui a pour but de traiter les symptômes d'une affection. Ses origines peuvent parfois être très anciennes et elle se base sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Elles concernent notamment les pathologies saisonnières depuis les troubles psychosomatiques légers jusqu'aux symptômes hépatobiliaires, en passant par les atteintes digestives ou dermatologiques.

✓ La phytothérapie clinique

C'est une approche globale du patient et de son environnement est nécessaire pour déterminer le traitement, ainsi qu'un examen clinique complet. Son mode d'action est basé sur un traitement à long terme agissant sur le système neuro-végétatif. Dans ce type les indications sont liées à une thérapeutique de complémentarité. Elles viennent compléter ou renforcer l'efficacité d'un traitement allopathique classique pour certaines pathologies.

### 1.3 - Métabolites secondaires

Le terme «métabolite secondaire», qui a probablement été introduit par Albrecht Kossel en 1891, est utilisé pour décrire une vaste gamme de composés chimiques dans les plantes, qui sont responsables des fonctions périphérique indirectement essentielles à la vie des plantes, telles que la communication intercellulaire, la défense et la régulation des cycles catalytiques (**Bouque, 1997**).

Les métabolites secondaires sont présents dans toutes les plantes supérieures et elles constituent une classe extrêmement large de substance naturelle qui intervient de façon déterminante dans l'adaptation des plantes à leur environnement. En plus de leurs implications dans le fonctionnement des végétaux, ces molécules représentent une source importante de substances intéressantes pour l'Homme tel que les terpénoïdes, les composés phénoliques et les flavonoïdes mais elles sont produites en faible quantité. Leurs applications concernent des domaines aussi variés tels que les principes actifs pharmaceutiques, les produits cosmétiques et les additifs alimentaires.

De nos jours, le nombre de nouvelles molécules identifiées parmi ces composés ne cesse d'augmenter. Selon la voie de biosynthèse on peut les diviser en quatre groupes :

- (1) les composés phénoliques (comme les acides phénoliques, les flavonoïdes [incluant les tannins], les quinones) ;
- (2) les alcaloïdes ;
- (3) les terpénoïdes et stéroïdes (comme les monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes, les saponines, les limonoïdes, les cucurbitacines, les cardénolides, les caroténoïdes, les phytoecdystéroïdes) ;
- (4) les glucosides (incluant les glucosinolates et les glucosides cyanogéniques) (**Figure n° 01**).

Chacun de ces groupes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (Calatuyud *et al.*, 2013).

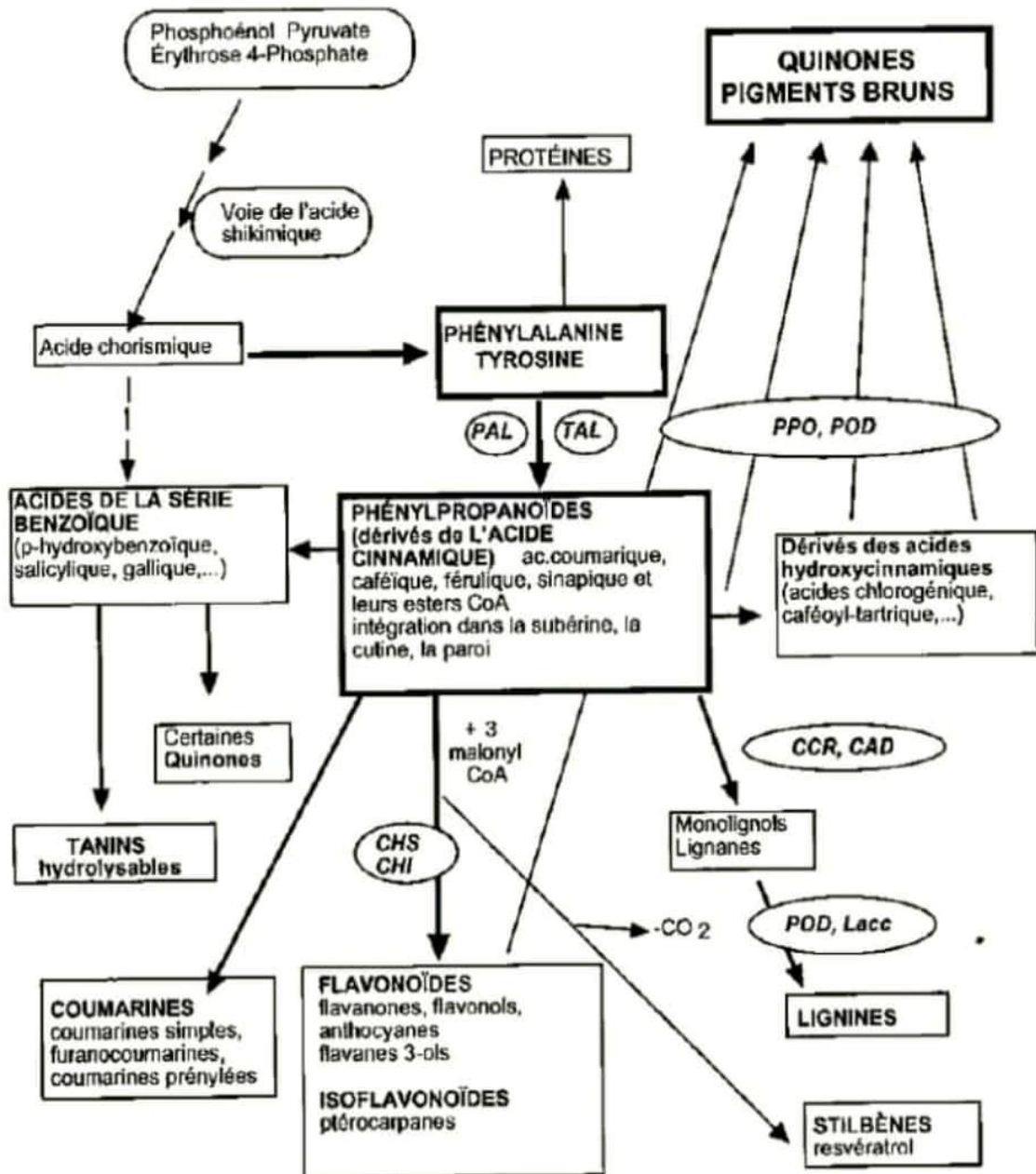


**Figure n° 01** -Voies principales de synthèse des composés secondaires chez les plantes supérieures (Schoonhoven *et al.*, 2005).

### 1.3.1 - Les composés phénoliques

Tous les végétaux contiennent des composés phénoliques mais, comme c'est le cas pour la plupart des substances naturelles qualifiées de métabolites secondaires, leur répartition qualitative et quantitative est inégale selon les espèces, les organes, les tissus et les stades physiologiques. Ils correspondent à une très large gamme de structures

chimiques et sont un bon témoin de l'extraordinaire capacité de biosynthèse des plantes (**Figure n° 02**), capacité qui permet à l'homme de les utiliser dans des domaines aussi variés que l'agroalimentaire ou la pharmacologie (**Sarni –Manchado et Cheyner, 2006**).



**Figure n° 02** - Biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques (**Macheix, 1996**).

PAL : phénylalanine amonialyase ; TAL : tyrosine amonialyase ;CCR : cinnamylCoA réductase ; CAD : cinnamyl alcoolaldéshydrogénase ;CHS : chalconesynthase ; CHI : chalone flavonone isomérase ; PPO : polyphénoloxydase ; POD : peroxydase ; Lacc :laccase.

### 1.3.1.1- Rôles des composés phénoliques

Selon **Macheix et al. (2005)**, le rôle des composés phénoliques est maintenant reconnu dans différents aspects de la vie de la plante et dans l'utilisation que fait l'homme des végétaux. Ils peuvent en effet intervenir :

- Dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites ...)
- Dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV), soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux ;
- Dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualité nutritionnelles...) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules ...) et des produits qui en dérivent par transformation ;
- Dans les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentées ...) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini ;
- Dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes.

### 1.3.1.2 - Principales structures phénoliques

Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui chez les végétaux. Ils ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles.

#### 1. 3.1.2.1 - Formes les plus simples

Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C6 aux flavonoïdes en C15 et à des molécules

proches. Ces molécules sont présentes sous forme soluble dans la vacuole. Ce groupe englobe les acides phénoliques et l'ensemble des flavonoïdes (Macheix et al., 2005).

#### 1.3.1.2.1.1 - Acides phénoliques

Ils appartiennent à deux groupes, les acides hydroxybenzoïques (exemple acide gallique, acide vanillique...etc) et les acides hydroxycinnamiques (exemple acide caféïque, acide sinapique...etc.) (Macheix et al., 2005).

#### 1.3.1.2.1.2 - Ensemble des flavonoïdes

Ce sont des molécules de très grande importance biologique et technologique comme les anthocynes, les flavonols (par exemple le kaempférol et la quercétine dont la répartition est très large), et les flavanes qui sont à l'origine des tanins condensés (**Tableau n° 01**).

Cet ensemble de composés chimique possède les propriétés et les effets pharmacologiques dont ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, vasculoprotectrices, antihépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et même antitumorales significatives (Ghedira, 2005).

#### 1.3.1.2.2 - Formes condensées

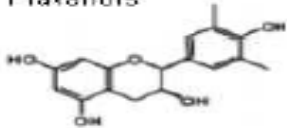
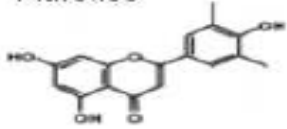
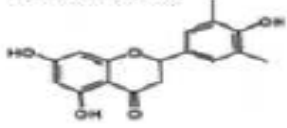
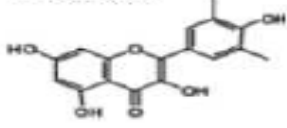
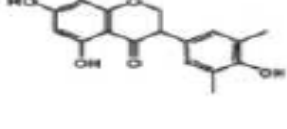
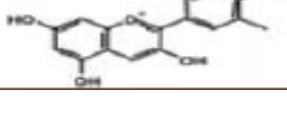
Ces molécules résultent de la condensation de certaines formes simples de composés phénoliques et parmi ces composés on cite :

##### 1.3.1.2.2.1 - Tanins

Les tanins peuvent être considérer comme des formes phénoliques condensées capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter. Ils sont responsables de l'astringence de nombreux fruits et légumes et de leurs produits dérivés. Ils sont classés selon leur réactivité chimique et leur composition en deux grands groupes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Macheix et al., 2005).



**Tableau n°01** - Structure de base des principaux flavonoïdes (Mohammedi, 2013).

Flavonoïdes Classe	Flavonoïdes (exemples)
Flavanols 	EGCG Epigallocatechine Catéchine Epicatechine
Flavones 	Luteoline Apigénine Chrysin
Flavanones 	Naringénine Hesperidine Eriodictyol
Flavonols 	Quercétine Myricétine Kaempférol Rutine
Isoflavonoïdes 	Genistéine Daidzéine
Anthocyanidines 	Pelargonidine Cyanidine Malvidine

### 1.3.1.2.2.2 - Lignines et subérines

Les lignines et les subérines sont des précurseurs de polymères pariétaux des plantes constituant des facteurs de défense contre les agents pathogènes (Jarrige *et al.*, 1995).

Les lignines sont présentes au niveau des vaisseaux conduisant la sève brute et elles sont responsables de la rigidité des fibres végétales. Elles résultent de la polymérisation tridimensionnelle de trois unités phénoliques de base dénommées monolignols.

Ces substances englobent de multiples propriétés physico-chimiques et applications qui sont :

- Les lignines constituent une véritable matière plastique naturelle, qui se dépose dans la plante par un processus qualifié d'imprégnation ou d'incrustation. À titre d'image, les lignines et les hémicelluloses sont le ciment dont l'armature est constituée par les microfibrilles de cellulose.
- les lignines sont des molécules hydrophobes. Cette propriété explique leurs qualités protectrices contre les bio-agresseurs et le fait que les cellules lignifiées soient des cellules mortes.
- Les lignines sont très résistantes à la compression. On les retrouve dans le sclérenchyme, qui assure la protection, le soutien et la conduction de la sève brute (xylène) et dans les tissus adultes.
- les lignines sont très résistantes à la dégradation. La dégradation « naturelle » de la lignocellulose résiduelle des cultures est généralement longue. Elle dépend surtout de la sensibilité des lignines aux UV (entre 300 et 400 à 500 nm), et des dégradations enzymatiques dues à des phénol-oxydases et des laccases que fabriquent certains champignons lignolytiques.

### 1.3.2 - Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques d'origine naturelle contenant un ou plusieurs atomes d'azote avec un caractère basique de degré plus ou moins fort (Hess, 2002).

La classification des alcaloïdes est basée sur deux paramètres distincts : la position de l'atome d'azote au sein de la structure, les différentes fonctions qui en découlent, et la famille de plantes dont ils sont extraits (90 % des alcaloïdes sont issus de plantes) (Dunet, 2009).

Ce groupe de métabolites secondaires a un intérêt particulier grâce à ces propriétés toxiques ou médicamenteuses. Ils comptent parmi les substances végétales particulièrement toxiques : nicotine, morphine, strychnine. Seul le médecin peut administrer ces alcaloïdes en tant que principe actif (Hensel, 2008).

Les alcaloïdes sont généralement classés en fonction de la nature du cycle qui prédomine dans la molécule. Cependant malgré leur structure extrêmement variée, les alcaloïdes proviennent d'un petit nombre de précurseurs simples (**Hopkins, 1995**). Il existe six classes d'alcaloïdes :

- Les tropanes caractéristiques des Solanacées (comme l'atropine, la scopolamine) et d'une autre famille végétale à laquelle appartient la plante de coca (comme la cocaïne).
- Les indoles qui se caractérisent par la possession d'un noyau indole (comme la strychnine, la quinine) et sont répulsifs envers de nombreuses espèces d'insectes ;
- Les pyrrolizidines sont des esters d'alcaloïdes dont la biosynthèse a été largement décrite chez les plantes du genre *Senecio* (*Asteraceae*) (comme la sénécionine) ;
- Les quinolizidines, dérivés de la lysine, encore appelés les alcaloïdes du lupin, car abondantes chez les plantes du genre *Lupinus* (*Fabaceae*) ; certains d'entre eux agissent souvent comme phago-répulsifs pour divers insectes,
- Les purines (comme la caféine), les dérivés de l'acide nicotinique, de l'acide anthranilique, des polyacétates et des terpènes (**Calatayud et al., 2013**).

Ce groupe de métabolites secondaires est caractérisé par les propriétés physico-chimiques suivantes :

- ✓ Les alcaloïdes sont des composés de masse moléculaires variant de 100 à environ 900. Leur saveur est amère.
- ✓ Les alcaloïdes nonoxygénés et de faible masse moléculaire sont des liquides entraînés à la vapeur d'eau.
- ✓ Certains dérivés sont acides comme l'acide picrique ;

De multiples réactifs peuvent de plus être utilisés pour mettre en évidence spécifiquement un groupe d'alcaloïdes particulier.

### 1.3.3 - Terpénoïdes et stéroïdes

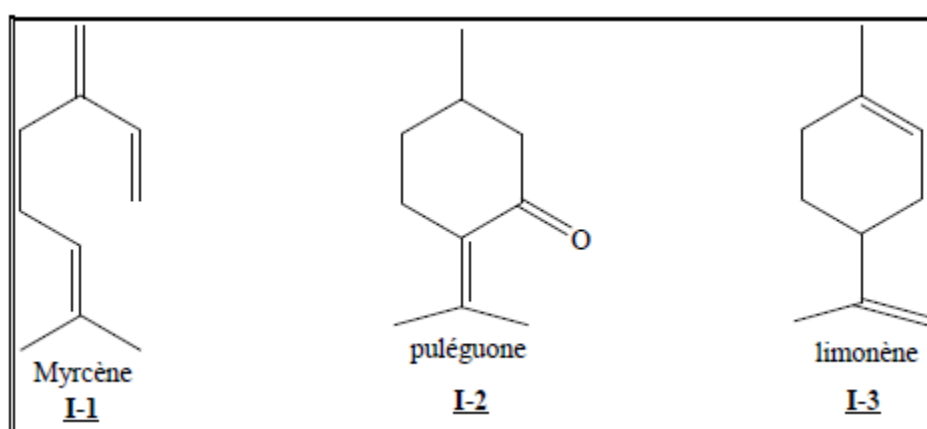
Les terpènes constituent un groupe important des produits naturels, comprenant environ 30000 composés (**Breitmaier, 2006**).

Ils sont décrits comme des composés qui sont essentiellement des constituants d'une huile essentielle et qui contiennent des atomes de carbone et d'hydrogène avec ou sans oxygène. Ils ont reçu un intérêt considérable pour l'administration dermique et transdermique de médicaments ayant un large éventail de propriétés physico-chimiques (**Pandit et al.,**

2015). Les terpénoïdes se classent en fonction du nombre d'unités d'isoprène qui les constituent. On peut distinguer deux principaux groupes qui sont :

### 1.3.3.1 - Monoterpènes

Les monoterpènes sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90%).<sup>17</sup> Ils comportent deux unités isoprène ( $C_5H_8$ ), selon le mode de couplage « tête-queue ». Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques (**Figure n° 03**). A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales.



**Figure n° 03** - Exemples de quelques monoterpènes

### 1.3.3.2 - Sesquiterpènes

Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en  $C_{15}H_{22}$  (assemblage de trois unités isoprènes). Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes qui se divisent en plusieurs catégories structurales, acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques, polycycliques (**Figure n° 04**). Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature.

Un certain nombre d'espèces végétales produisent des ecdysones ou des dérivés très ressemblants appelés phytoecdystéroïdes.

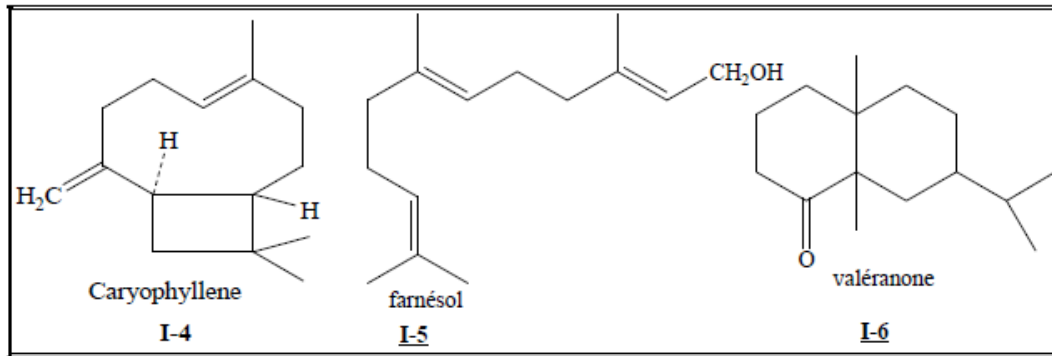


Figure n° 04 - Exemples de quelques sesquiterpènes

### 1.3.4 - Glucosides

Les glucosides sont des molécules constituées d'une fonction glucidique associée à divers autres types de molécules. Beaucoup de plantes stockent ces glucosides sous une forme inactive. Ces molécules sont constituées de 2 parties distinctes : le glycone, qui correspond au groupement glucidique (constitué d'une ou plusieurs fonctions glucidiques), et l'aglycone, qui est la partie non glucidique de la molécule. Les glucosides peuvent être classés selon la fonction chimique de la partie aglycone (**Calatayud et al., 2013**). On peut citer principalement les composés suivants :

- **Les glucosinolates** : qui se caractérisent par la présence d'atomes de soufre et d'azote. Ils peuvent être cycliques (comme la sinigrine) ou aromatiques (comme la sinalbine). Ils sont surtout présents chez les Crucifères. Lors du catabolisme cellulaire ou d'une destruction des tissus par un insecte phytophage, ils libèrent des isothiocyanates (huiles de moutarde), des nitriles et d'autres composés.
- **Les glucosides cyanogéniques** : qui sont issus de la synthèse de cyanures qui sont extrêmement toxiques et sont stockés dans la plante via une glycosylation, c'est-à-dire grâce à l'ajout d'une fonction glucidique. La destruction des tissus lors de la prise de nourriture d'un insecte phytophage entraîne l'hydrolyse de ces composés, libérant ainsi un composé très toxique, l'acide cyanhydrique (HCN). De ce fait, ces composés constituent un excellent système de défense des plantes contre les insectes herbivores.
- **Les cardénolides** : qui sont des molécules où la partie aglycone est constituée d'une fonction stéroïdique. Ce sont des inhibiteurs de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase qui sont présents dans beaucoup de plantes de la famille des Apocynacées (**Malcolm, 1991**).

## **CHAPITRE II**

# **APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES PLANTES MÉDICINALES ÉTUDIÉES**

L'Algérie, est l'un des pays méditerranéens qui a une longue tradition médicinale et un savoir-faire traditionnel à base des plantes médicinales, vue sa situation géographique, il possède une végétation riche et variée dans laquelle il existe de nombreuses plantes médicinales et aromatiques qui suscitent de grands intérêts ces dernières années. Ce chapitre présente une étude bibliographique des trois plantes étudiées.

## 2.1. *Marrubium vulgare* L.

### 2.1.1 - Description botanique

Plante herbacée pérenne, croissant par touffes, dotée de tige anguleuses qui porte les feuilles opposées, blanches et tomenteuses. Les inflorescences sont en glomérules verticillées. Les bractées sont linéaires aigues. Les fleurs sont blanches. Les fruits sont des tétrakènes (Volák et Stoloda, 1983).

### 2.1.2 - Position systématique

Selon Judd et al.(2002) la position systématique de l'espèce *Marrubium vulgare* est comme ci-dessous :

<b>Règne</b>	Végétale
<b>Embranchement</b>	Angiosperme.
<b>Classe</b>	Eudicotylédones.
<b>Sous-classe</b>	Gamopétale.
<b>Ordre</b>	Lamiales.
<b>Famille</b>	Lamiacées
<b>Genre</b>	<i>Marrubium</i> .
<b>Espèce</b>	<i>Marrubium vulgare</i> L.

Marrube est composé de deux mots hébreux: mar et rob, suc amer.

### 2.1.3 - Utilisation en médecine traditionnelle

Cette plante est utilisée comme infusion pour traiter contre les catarrhes des voies respiratoires supérieures, la toux, le rhume, l'asthme. Cette infusion expectorante et calmante stimule l'appétit, la sécrétion des sucs gastriques et tous les processus digestifs. Elle stimule également l'activité hépatique et la sécrétion biliaire. Elle est efficace pour

régulariser le rythme cardiaque et soulage les règles douloureuses. Elle est aussi employée pour traiter les plaies infectées (Volák et Stoloda, 1983).

## 2.2 - *Peganum harmala* L.

C'est une plante qui se développe sur les décombres, les bords des chemins et les parcours steppiques dégradés (Zeguerrou et al., 2013).

### 2.2.1- Position systématique

Selon Ozenda (1991), la classification de cette espèce est comme ci-dessous:

<b>Règne</b>	Plantes
<b>Embranchement</b>	Spermaphytes
<b>Sous embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Dicotylédones
<b>Sous classe</b>	Rosidae
<b>Ordre</b>	Sapindales
<b>Famille</b>	zygophyllacées
<b>Genre</b>	<i>Peganum</i>
<b>Espèce</b>	<i>Peganum harmala</i> L.

### 2.2.2 - Description botanique

C'est une plante herbacée vivace grâce à ces racines vigoureuses. Les feuilles sont alternes et fortement divisées. Les fleurs sont de couleur jaunâtre. Le fruit est une capsule globuleuse renfermant des graines brunâtres (Zeguerrou et al., 2010).

### 2.2.3 - Utilisation en médecine traditionnelle

La médecine populaire de la région méditerranéenne l'employait lors de troubles gastriques, comme analgésique et antispasmodique (Hensel, 2008).

*Peganum harmala* L. Harmel a été utilisé pour traiter le Rhumatisme, douleurs dentaires, vermifuge, anxiété, douleurs des règles, hémorroïdes (Madani, 2015)



### 2.3 - *Eucalyptus obliqua* Hert.

L'eucalyptus est un arbre originaire d'Australie, sa production commerciale a commencé en 1860 dans l'état de Victoria. Il fut introduit en Europe à la fin du 18<sup>e</sup> siècle (**Moussaoui, 2014**). Un grand nombre d'espèces d'eucalyptus ont été introduites en Algérie, notamment par Cordier de 1864 à 1876 (**Trabut, 1914**).

Les Eucalyptus sont de grands arbres dont certaines espèces peuvent atteindre 100 mètres de hauteur. Ils ont été rapidement plantés dans les régions subtropicales de l'Asie et du bassin méditerranéen.

#### 2.3.1- Position systématique

Selon **Guignard (1983)**, la position systématique de l'eucalyptus est comme ci-dessous :

**Règne :** Plantae

**Division :** Magnoliophyta

**Classe :** Magnoliopsida - Dicotylédones

**Sous –classe :** Rosidae

**Ordre :** Myrtales

**Famille :** Myrtaceae

**Genre :** *Eucalyptus*

**Espèce :** *Eucalyptus obliqua* Hert.

#### 2.3.2 - Description botanique

La plupart des Eucalyptus ont des feuilles persistantes. Comme les autres membres de la famille des myrtacées, les feuilles d'Eucalyptus sont couvertes de glandes à huile. L'abondante production d'huile est une caractéristique importante de ce genre.

Les feuilles, bleutées, ont une curieuse caractéristique: sur les jeunes arbres, elles sont opposées, sessiles, ovales et glauques, et quand l'arbre grandit, elles deviennent alternes,

pétiolées, très allongées, parfois un peu courbées comme des lames de faux, et d'un vert luisant.

Les fleurs forment une petite boîte s'ouvrant par un couvercle : les étamines sont enfermées dans un étui fermé par un opercule (d'où le nom d'Eucalyptus du grec eu = bien et kaluptos = couvert) formé par la fusion des pétales et/ou des sépales (**Daroui-Mokaddem, 2012**).

Les fleurs sont très variées. Elles ont de très nombreuses étamines qui peuvent être de couleur blanche, crème, jaune, rose ou rouge. Les fruits à maturité ont la forme d'un cône, ils sont secs, et de couleur brune.

### **2.3.3 - Utilisation en médecine traditionnelle**

La médecine des aborigènes (habitants originaux pour ne pas oublier) utilise l'eucalyptus comme fébrifuge (fièvre) et anti-inflammatoire. Cet arbre étant arrivé en Europe seulement au XIX<sup>e</sup> siècle, la tradition populaire n'y a pas eu recours. Son huile est antispasmodique et antibactérienne ; elle sert en usage externe et interne en cas de refroidissements, d'asthme et de rhumatismes (**Hensel, 2008**).

**CHAPITRE III**

**ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES**

**PLANTES MÉDICINALES**

L'aromathérapie constitue parfois une alternative aux traitements proposés en médecine conventionnelle. Elle est de plus en plus utilisée car il y a une prise de conscience des individus. Ils souhaitent limiter l'usage des médicaments et avoir recours « au naturel ». De ce fait, les chercheurs ont donné une importance à l'étude des activités des plantes médicinales et de leurs extraits et donc, tenter de plus en plus de sélectionner les plantes en fonction de leur activité biologique, ensuite se préoccuper de garantir à l'utilisateur une source permanente et suffisante de principes actifs, sans détruire les gîtes naturels productifs. Dans ce chapitre, on va récapituler les principales activités biologiques des plantes médicinales.

### 3.1 - Activité antioxydante

Le métabolisme normal de l'organisme (Respiration, Alimentation) mais aussi le stress et la pollution génèrent à chaque instant dans l'organisme des molécules qu'on appelle espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces ERO peuvent être des radicaux libres ou donner naissance à des radicaux libres par interaction avec des molécules biologiques (Protéines, ADN, Lipides). Les ERO et les radicaux libres sont des intermédiaires indispensables à l'organisme où ils sont impliqués dans des processus physiologiques à des faibles quantités. Cependant, l'excès de la production des ERO peut devenir toxique pour les composants majeurs de la cellule, les lipides, les protéines et les acides nucléiques, et donne lieu au stress oxydatif qui sera impliqué dans diverses pathologies à savoir les maladies neuro-dégénératives (Alzheimer, Parkinson), le diabète, les cancers, les maladies inflammatoires, le vieillissement. (Djahra, 2014).

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes pour éliminer ou minimiser le dommage oxydatif. En 2004, Vansant a défini les antioxydants comme 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 ERO.

Selon le type, les antioxydants peuvent agir en réduisant ou en dismutant les ERO, en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant les métaux de transition libres ou en générant des molécules biologiques antioxydantes d'importance. Sous certaines conditions, ces systèmes antioxydants ne peuvent pas fonctionner efficacement.

Cependant, la dysfonction antioxydante qui en résulte peut être manipulée par la supplémentation en antioxydants exogènes alimentaires, soit naturels ou de synthèse.

L'utilisation de ces derniers est restreinte en raison des effets indésirables sur la santé humaine. En effet, l'utilisation des antioxydants synthétiques tels que l'hydroxytoluènebutilé (BHT), ainsi que l'hydroxyanisolebutilé (BHA) est suspectée à long terme d'effets mutagènes et cancérigènes.

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques a accru considérablement. Les antioxydants les plus connus sont le  $\beta$ -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques (**Mohammedi, 2011**). Les antioxydants d'origines naturelles sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures et sont en générales des composés phénoliques.

Ils agissent par la désactivation des radicaux par création d'addition covalente, la réduction des métaux ou de peroxydes, la complexation d'ions et de métaux de transition et le captage de l'oxygène singulet.

Plusieurs recherches épidémiologiques ont prouvé qu'il y a un rapport inverse entre la prise d'aliments riches en polyphénols (Fruits et Légumes) et le risque des maladies reliées à l'âge comme les maladies neuro-dégénératives (**Hu, 2003, Bubonja-Sonje et al., 2011**).

### 3.2 - Activité antifongique

Au cours des vingt dernières années, une forte progression de maladies fongiques, qui touchent un éventail d'hôtes très large a été constatée. Ces maladies sont causées par un nombre étonnamment élevé d'espèces fongiques (**Bitar et al., 2013**). Elles provoquent des dégâts importants sur l'homme ainsi que sur des espèces végétales (**Dorrance et al., 2004**).

Les extraits de plusieurs plantes ont des propriétés antifongiques et sont fréquemment utilisés pour traiter diverses affections fongiques. La multi résistance fongique pose de grands problèmes au niveau de la protection des plantes. En effet, il ne reste que peu de produits antifongiques efficaces contre certains agents multi résistants. Les scientifiques sont donc à la recherche de nouveaux produits d'origine naturelle, présentant moins de danger pour la santé, palliant aux effets secondaires des fongicides tels les métabolites secondaires des plantes médicinales et présentant une activité antimicrobienne.

### 3.2.1- Genre *Fusarium*

Ces dernières années, l'apparition de maladies causées par des champignons pathogènes du genre *Fusarium* avait augmenté. Leur effet nocif se présente dans la réduction de la germination, de la détérioration de la qualité et de la quantité du rendement qui peut diminuer jusqu'à 70%, ainsi que la production des mycotoxines qui peuvent constituer une grande menace (**Haidukowski et al., 2005 ; Kotowicz et al., 2014 ; Covarelli et al., 2014** ). **Windels (2000)** et **Osman et al. (2015)** ont déclaré l'impact économique des pertes dues au *Fusarium* spp., qui sont de grande importance dans le monde entier.

La culture du blé est souvent affectée par le complexe fongique pourriture racinaire et fusariose de l'épi. Cette maladie d'importance mondiale, est provoquée par plusieurs espèces pathogènes appartenant principalement au genre *Fusarium* touchant l'épi, le collet ainsi que les racines et la tige (**Alconada Magliano et al., 2013 ; Moya-Elizondo, 2013 ; Kotowicz et al., 2014**).

#### 3.2.1.1 - Taxonomie

Le genre anamorphe *Fusarium* appartient au groupe artificiel des « Deutéromycètes ». La plupart des espèces téléomorphes associées avec le genre *Fusarium* sont membres des Hypocreales (Sordariomycetes, Ascomycota) et sont pour la plupart rattachées au genre *Gibberella*. (**Gräfenhan et al., 2011 ; Moretti 2009**).

Selon **Kotowicz et al. (2014)**, le genre *Fusarium* contient 70 espèces cosmopolites, qui peuvent être rencontrées dans différentes régions du monde.

#### 3.2.1.2 - Symptomatologie

**Sur tige, racines et collet** : Les symptômes de la maladie sur le collet consistent en un brunissement de la partie supérieure des racines, de la base de la tige et des lésions nécrotiques du collet (**Figure n° 05**) (**Agrios, 2005 ; Hysing et Wiik, 2014**). Sur les plants plus anciens, l'infection par *Fusarium* peut générer un véritable pourridié ; la base de la tige devient brune et pourrie, ce qui entraîne une verse et la formation d'épis argentés.

**Sur feuilles** : les symptômes sur feuilles sont rares, ils se présentent principalement par un jaunissement accompagné soit de petites taches blanches, claires au centre avec une

bordure brune, ou des taches plus larges, ovales, verdâtres à brunâtres, assez humides sur lesquelles se produit une abondante sporulation. En cas d'attaque grave, les taches se rejoignent induisant la déchirure de la feuille dans le sens de la longueur (Caron, 2000 ; Clavel, 2006).

**Sur épi et grain :** la fusariose cause un échaudage, un blanchissement prématuré, un rabougrissement, et une coloration rosâtre des épillets. Les infections plus tardives peuvent provoquer l'infection des grains, sans blanchiment notable des épis. Les grains de blé affectés sont petits, légers, froissés, et parfois couverts de rose ou de blanc et ont un pouvoir germinatif réduit (Kotowicz et al., 2014) (Figure n° 05) .

La phase de blanchiment des épis peut provoquer une perte de rendement, mais la principale préoccupation est la production potentielle de mycotoxines dans les grains.



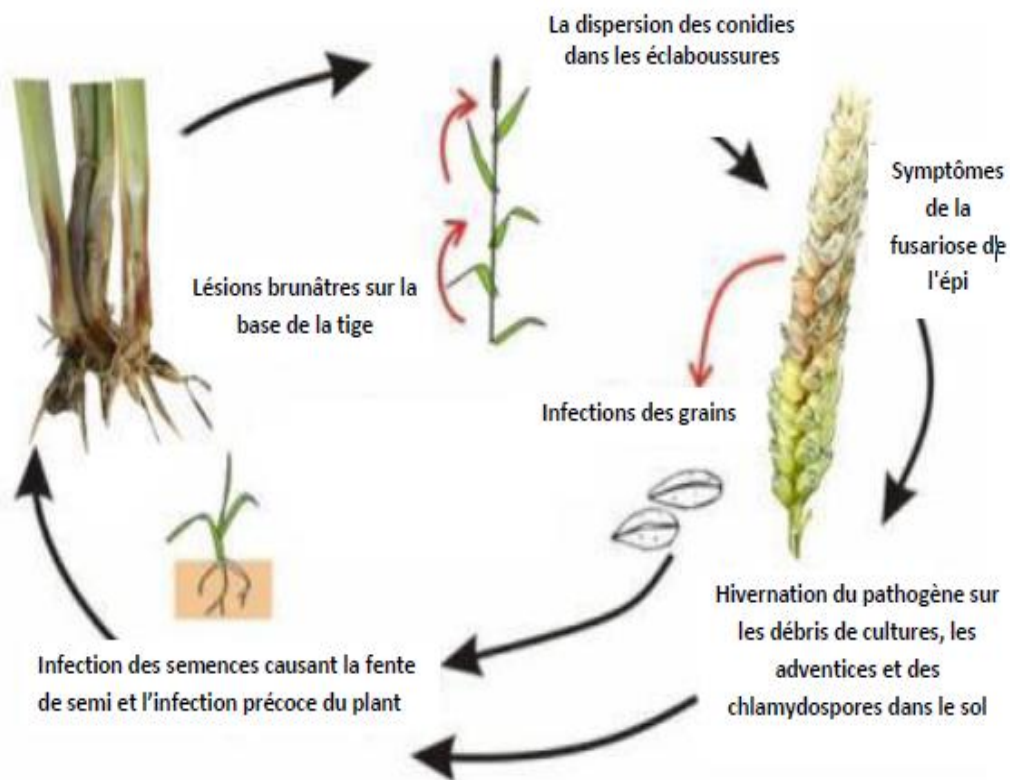
**Figure n° 05** - Symptômes de la pourriture racinaire et de la fusariose de l'épi chez le blé. **A** : Symptômes de la fusariose en plein champs, **B** : Symptômes de la fusariose sur épi, **C** : brunissement de la base de la tige (Wolf et al., 2011). **D** : Grains froissés et couverts de coloration rose (Jellis et al., 2010).



### 3.2.1.3 - Cycle de développement de l'agent pathogène

Les agents pathogènes peuvent se conserver au niveau de la semence ou dans le sol ou / et sur les débris végétaux, sous forme de conidies ou de chlamydo-spores ou sous forme de mycélium. Pendant l'hiver l'agent pathogène subit une période de dormance sur les résidus infectés (**Figure n° 06**).

Au printemps, l'infection débute sur le système racinaire et le collet de la plante à n'importe quel stade de leur développement. Les zones de pénétration les plus sensibles semblent être les parties les plus différenciées des racines. L'invasion se fait entre et à l'intérieur des cellules, et l'invasion horizontale semble être moins rapide que l'invasion verticale. On trouve cet agent pathogène au niveau des cellules corticales mais il peut se généraliser au cylindre central lorsque l'attaque est sévère. La maladie est favorisée par les sols secs et les températures élevées. Le contact racinaire entre plants assure la propagation de la maladie.



**Figure n° 06** - Cycle biologique de *Fusarium* sur céréales (D'après Jellis *et al.*, 2010 ).



### 3.2.1.4 - Moyens de lutte

Les moyens de lutte ont pour but de réduire le réservoir d'inoculum, de freiner la dispersion des propagules et de prévenir l'infection de l'épi. Ainsi, plusieurs moyens de lutte peuvent être envisagés (**Kammoun-Gargouri, 2010**).

#### 3.2.1.4.1- Lutte culturale

Cette lutte comprend plusieurs méthodes telles que :

- Le labour profond qui est conseillé pour la diminution du développement de la maladie (**Guo et al., 2010**).
- L'utilisation de semences saines certifiées (**Scherm et al., 2013**)
- Le semis précoce, pour que la céréale atteigne le stade épiaison avant que l'inoculum du *Fusarium* ne soit prêt (**Pageau et Filion, 2012**).
- L'élimination des résidus de cultures contaminées par incinération ou enfouissement profond (**Dill Macky et al., 2000 ; Paulitz et al., 2010**).
- La réalisation des rotations d'au moins deux ans en dehors des céréales (surtout le maïs) (**Gilbert et Tekauz, 2000**).
- Éviter l'irrigation lors de la floraison, car l'humidité à ce stade aggrave la maladie (**Kotowicz et al., 2014**).

#### 3.2.1.4.2- Lutte chimique

L'utilisation des fongicides pour la lutte contre les fusarioses est d'une efficacité variable (**Müllenborn et al., 2008**). Parmi les raisons des effets variables des fongicides sur cette maladie sont probablement la résistance des cultivars, l'efficacité du fongicide, le temps et la fréquence des applications, la variabilité naturelle de l'agressivité des pathogènes et leur épidémiologie différente (**Mesterhazy et al., 2003**). L'application au stade floraison semble être le meilleur moment pour la réduction des risques d'infection par les fusarioses (**Chala et al., 2003**).

Divers groupes de fongicides sont utilisés pour le traitement des céréales contre les *Fusarium*, tels que, les imidazols, les benzimidazoles, les triazoles (propiconazole, prothioconazole, tebuconazole et metconazole), les morpholines ou les stribulirines (**Mateo et al., 2011**).

#### 3.2.1.4.3- Lutte génétique

L'amélioration de la résistance génétique de l'hôte est considérée comme essentielle à la réalisation d'une lutte fiable (Anderson, 2007 ; Bonin et Kolb, 2009). Ceci est considéré en tant que la stratégie la plus importante, car l'hôte peut exprimer une défense très forte par les déterminants génétiques de la résistance contre la maladie. En identifiant les sources de résistance génétique, les chercheurs tentent de transférer cette résistance aux variétés cultivées (Gilbert et Haber, 2013 ; Osman et al., 2015).

#### 3.2.1.4.4- Lutte biologique

La gestion des maladies fongiques par les agents de lutte biologique ou les biopesticides a été fréquemment utilisée comme méthode de contrôle. Un grand nombre d'espèces avait été déjà identifiées comme antagonistes des espèces de *Fusarium*. Les bactéries prédominent parmi de tels antagonistes, mais des champignons et des levures ont été également identifiés (Cawoy et al., 2011; Nourozian et al., 2006).

Beaucoup d'espèces bactériennes appartenant aux genres : *Bacillus*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* et *Clonostachys* ont été rapportées comme antagonistes (Cawoy et al., 2011; Nourozian et al., 2006; Crane et al., 2013; Cawoy et al., 2011; Jung et al., 2013; Xue et al., 2014) ).

Concernant les champignons antagonistes, les espèces du genre *Trichoderma* sont parmi les champignons les plus efficaces comme agent de lutte biologique à l'égard de beaucoup d'espèces fusariennes pathogènes (Palazzini et al., 2007). Les espèces des genres *Alternaria*, *Botrytis*, *Phoma*, *Gliocladium* et *Penicillium* sont aussi utilisées (Scherm et al., 2013).

Comparées aux champignons et aux bactéries, il y a peu de levures qui ont été identifiées comme agents de lutte biologique contre les espèces du genre *Fusarium*. On peut citer les genres *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* et *cryptococcus* qui ont montré une réduction de la sévérité de la maladie jusqu'à 50-60% (Khan et al., 2004).

#### 3.2.1.4.5- Lutte intégrée

Il est reconnu que l'utilisation d'une seule stratégie de lutte à part n'est plus efficace contre la fusariose. La combinaison de diverses méthodes telles que : l'utilisation de divers variétés, l'évaluation et la prévention des risques de la maladie, les pratiques

culturelles, l'application de fongicides, y compris le type du labour et de la rotation, aide pour lutter contre la maladie (**Gilbert et al., 2013**). Ainsi, beaucoup d'études ont conclu que les agents de lutte biologique (BCA) peuvent être utilisés efficacement dans un programme de gestion intégrée pour réduire, plutôt que remplacer complètement, la charge chimique des fongicides sur l'environnement (**Palazzini et al., 2007 ; Zhang et al., 2007; Xue et al., 2009**).

Ce qui est aussi d'importance majeure pour l'intervention et la lutte contre les fusarioses c'est la compréhension des détails du cycle du pathogène et comment il produit et exploite ses mycotoxines provoquant ainsi les dégâts les plus graves sur le blé (**Gilbert et Haber, 2013**). Dans les dernières années, la stricte réglementation des pesticides et l'évolution des tendances de consommation la demande pour la recherche de méthodes de contrôle sans pesticides.

Certains extraits de plantes et d'algues ont également été explorés pour leurs capacités pour supprimer la pourriture sèche fusarienne. Par exemple, *Datura metal* et *Inula spp.* les extraits de feuilles et de fleurs se sont révélés efficaces pour réduire la croissance mycélienne de *Fusarium* (**Ammar et al., 2017**). Les extraits aqueux de fleurs et méthanolique de feuilles de *Nicotiana glauca* a supprimé la croissance mycélienne des agents pathogènes d'ici 24,40 et 21,04%, respectivement (**Rinez et al., 2013**).

### 3.3 - Activité antibactérienne

La maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale. Suite à cette préoccupation concernant les effets indésirables des molécules synthétiques destinées à la lutte contre les infections bactériennes, il semble donc important de trouver une alternative à l'utilisation des antibiotiques classiques.

Les remèdes à base de plantes constituent une alternative dans les systèmes de soins primaires et donc, une voie prometteuse pour le développement des médicaments traditionnellement améliorés (**Djahra, 2014**). L'étude de l'activité antibactérienne des extraits des plantes médicinales a fait l'objet de plusieurs travaux, il a été constaté que

cette activité n'est pas attribuée à un mécanisme unique mais à différents sites d'action au niveau cellulaire ceci est dû à leur composition.

Les souches bactériennes peuvent attaquer le corps humain, les plantes et mêmes les animaux. Parmi les souches qui peuvent présenter un risque pour l'homme on peut citer :

➤ *Pseudomonas aeruginosa*

C'est un pathogène humain opportuniste de plus en plus répandu. La bactérie est à Gram négatif et la plus courante dans les infections nosocomiales. *P. aeruginosa* est responsable de 16% des cas de pneumonie nosocomiale (**Wiblin, 1997**), 12% des infections urinaires nosocomiales (**Pollack, 1995**), 8% des infections des plaies chirurgicales (**Wenzel, 1997**) et 10% des infections du sang (**Gordon et al., 1998**).

➤ *Micrococcus luteus*

Les bactéries du genre *Micrococcus* sont des cocci Gram positive et des membres de la famille des Micrococcacées. Ce sont des habitants normaux de la peau humaine (**Kloos et al., 1974**) et n'ont été que très rarement impliqués comme pathogènes chez l'homme. Les maladies infectieuses attribuées à ces organismes comprenaient l'arthrite septique (**Wharton et al., 1986**), la méningite (**Fosse et al., 1985**) et endocardite. La plupart des rapports antérieurs d'endocardite infectieuse due aux microcoques ne fournissent pas suffisamment de données microbiologiques pour identifier sans ambiguïté le pathogène étiologique comme *Micrococcus spp.* selon la taxonomie actuelle.

➤ *Bacillus subtilis*

C'est une bactérie à Gram positive. Il s'agit en fait d'une espèce aérobie facultative qui croît en utilisant du nitrate ou du nitrite comme accepteur d'électrons, ou par fermentation. Elle peut donc survivre à des changements de niveaux d'oxygène dans son environnement (**Michiko et al., 1998**). Elle n'est pas considérée comme pathogène pour l'homme, mais elle peut contaminer des aliments et peut exceptionnellement provoquer une intoxication alimentaire.

Les bactéries phytopathogènes peuvent causer des dégâts pour les cultures et une baisse des rendements du point de vue quantitative et qualitative. Parmi lesquelles on peut citer :

➤ *Erwinia amylovora*

Cet agent pathogène responsable de la maladie du feu bactérien de nombreuses plantes rosacées, est classée parmi les pathogènes bactériens les plus destructeurs des plantes (**Mansfield et al., 2012**). Cet organisme de quarantaine, inscrit sur la liste A2 de l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (OEPP), appartient aux entérobactéries qui comprennent les bactéries aéro-anaérobies facultatives à Gram négatif, mobiles (**OEPP, 2013**).

*E. amylovora* pénètre dans les hôtes principalement par les nectarthodes des fleurs et établit des infections systémiques (**Norelli et al., 2003**). L'agent pathogène se déplace dans les espaces intercellulaires du parenchyme, puis le long des vaisseaux du xylème, et provoque la nécrose (**Dellagi et al., 1998; Piqué et al., 2015**). Les symptômes comprennent le dépérissement et la brûlure des inflorescences, des pousses, des feuilles, des fruits, des troncs ainsi que la production d'exsudat bactérien (**Van der Zwet et Beer 1995**). Des symptômes s'apparentant à ceux du feu bactérien ont été observés dans plusieurs vergers de poiriers de différentes provinces du nord de l'Algérie et la présence d'*E. Amylovora* dans ces vergers a été confirmée en 2011 par les services officiels nationaux de contrôle (Le ministère de l'Agriculture et l'Institut national de la protection des végétaux INPV). Des mesures phytosanitaires ont été introduites pour contrôler la maladie dans ces zones (**Laala et al., 2012**).

Le traitement des plantes avec des antibiotiques pourrait être utilisé pour lutter contre le feu bactérien, mais leur utilisation dans la protection des végétaux au sein de l'Union européenne n'a été autorisée qu'en cas d'urgence et dans des conditions strictement limitées (**Fried et al., 2013**). En Algérie, les antibiotiques sont également interdits. Leur utilisation est liée à un risque accru de sélection de souches résistantes d'*E. Amylovora* et d'autres bactéries vivant dans les vergers et à un impact négatif possible sur l'environnement.

En raison de ces limites, l'intérêt de la recherche pour trouver de nouvelles solutions de lutte contre le feu bactérien a augmenté, y compris l'utilisation d'agents de lutte biologique bactériens (**Mikiciński et al., 2016**). D'après **Tafifet et al. (2020)**, les souches de *Pseudomonas brassicaceaurum* ont démontré leur efficacité pour le traitement préventif des poiriers, conduisant à une réduction de la nécrose allant jusqu'à 90%.

➤ *Erwinia carotovora*

C'est une bactérie à Gram négatif qui provoque une maladie de la pourriture molle d'importance économique. Ce pathogène est une maladie répandue et économiquement importante de pomme de terre, qui provoque la pourriture molle de la tige et des tubercules avant et après la récolte, et réduit considérablement les rendements (**Doolotkeldieva et al., 2016**).

De nos jours, *E. carotovora* est un problème en Algérie, en raison des conditions environnementales. Ainsi, la température et la disponibilité de l'eau sont deux des principaux impacts sur le développement de cette maladie bactérienne (**Moh et al., 2012**). La maladie a également un impact négatif sur le potentiel de stockage d'une culture, qui constitue la principale source d'inoculum primaire dans les cultures de pommes de terre et un site où l'agent pathogène peut rester latent. La maladie est liée au niveau de contamination des semences par la bactérie dans des conditions favorables (**Benada et al., 2018**).

La plantation de tubercules de semence contaminés par *Erwinia* peut entraîner une émergence réduite, une réduction du couvert végétal et la pourriture des tubercules au champ, ce qui peut entraîner des pertes de rendement importantes (**Latour et al., 2008**). Les bactéries pénètrent dans les tissus végétaux principalement dans les plaies. Elles se propagent et se multiplient dans les espaces intercellulaires des tissus subérisés ou parenchymateux. Les parois cellulaires végétales sont dégradées et les tissus sont macérés par les enzymes pectolytiques libérées par les bactéries. Les tissus macérés sont humides, de couleur crème à beige, avec une consistance molle et légèrement granuleuse (**Benada et al., 2018**).

# **CHAPITRE IV**

## **ZONE D'ÉTUDE**

Les échantillons des plantes ont été prélevés à partir de deux sites. Le marrube blanc et l'eucalyptus ont été récoltés à partir de la Daïra de Lardjem située à 35° 44' 58" Nord, 1° 32' 54" Est. Le harmal a été récolté de la Daïra de Aïn kermes ; commune de Sidi abderrahmane située à 34° 47' 55" Nord, 1° 7' 49" Est. (<https://fr.db-city.com/>).

#### 4.1- Localisation géographique des sites de prélèvement

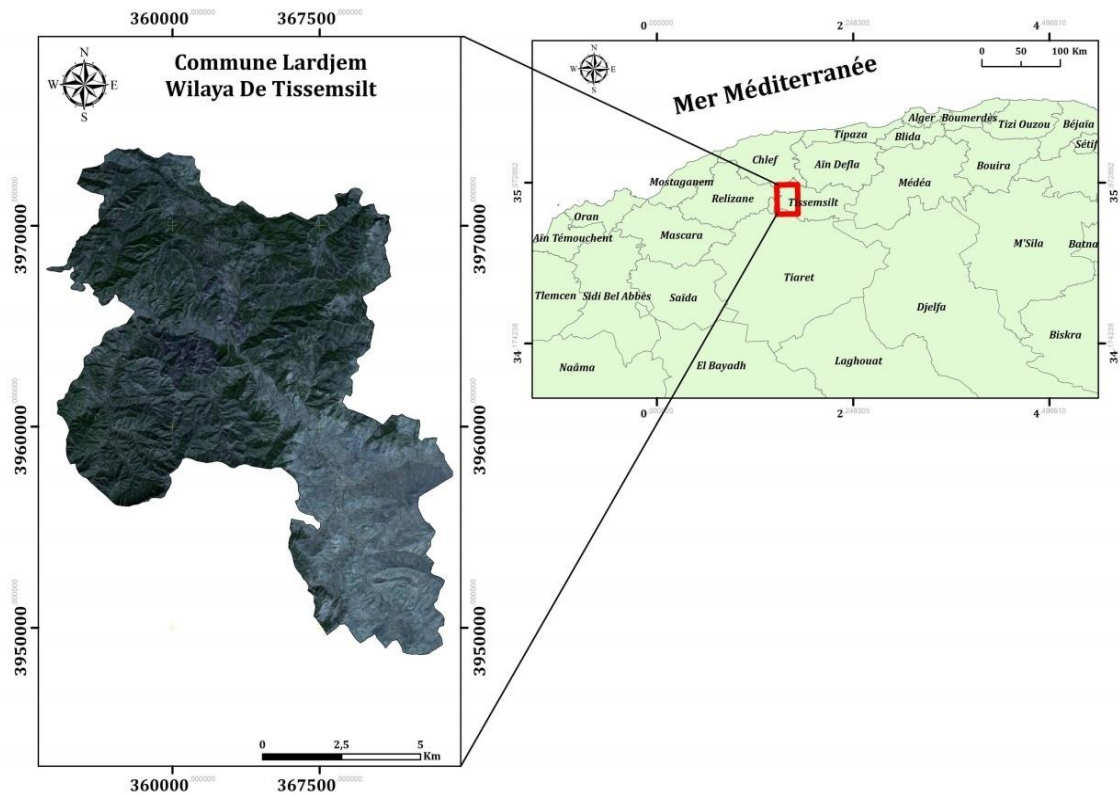
Les sites de prélèvement du matériel végétal utilisé au cours de l'expérimentation sont éparpillés sur deux wilayas qui sont Tissemsilt et Tiaret.

Le premier site correspond à Lardjem qui appartient à la wilaya de Tissemsilt. Cette wilaya se situe à l'ouest du pays dans la région des hauts plateaux. Elle est délimitée par la wilaya de Aïn Defla au nord, par la wilaya de Relizane et wilaya de Chlef à l'ouest, par la wilaya de Médéa à l'est et par la wilaya de Tiaret et de Djelfa au sud (**Figure n° 07**).

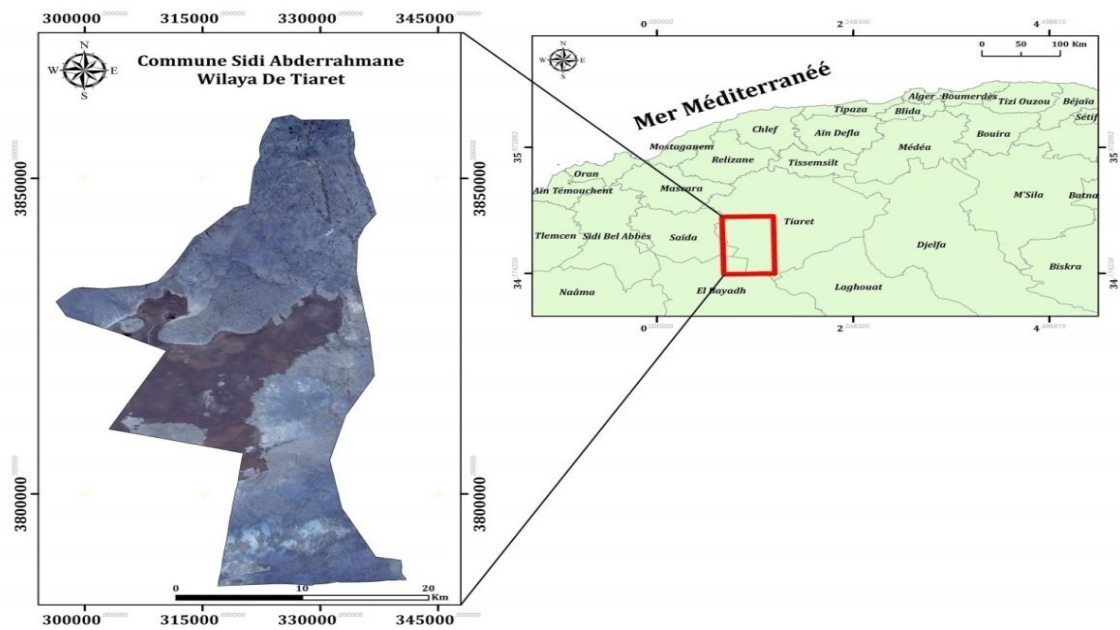
Quant au deuxième site correspond à la commune de Sidi abderrahmane, il fait partie de la wilaya de Tiaret. Cette wilaya se situe à l'ouest de l'Algérie, elle est délimitée au nord, par les wilayas de Tissemsilt et de Relizane ; au sud, par les wilayas de Laghouat et de El Bayadh ; à l'ouest, par les wilayas de Mascara et de Saïda ; à l'est, par la wilaya de Djelfa (**Figure n° 08**).

La localisation géographique des sites de prélèvement est présentée dans les deux cartes ci-dessous :





**Figure n° 07** - Localisation géographique de la zone d'étude (Commune de Lardjem, wilaya de Tissemsilt).



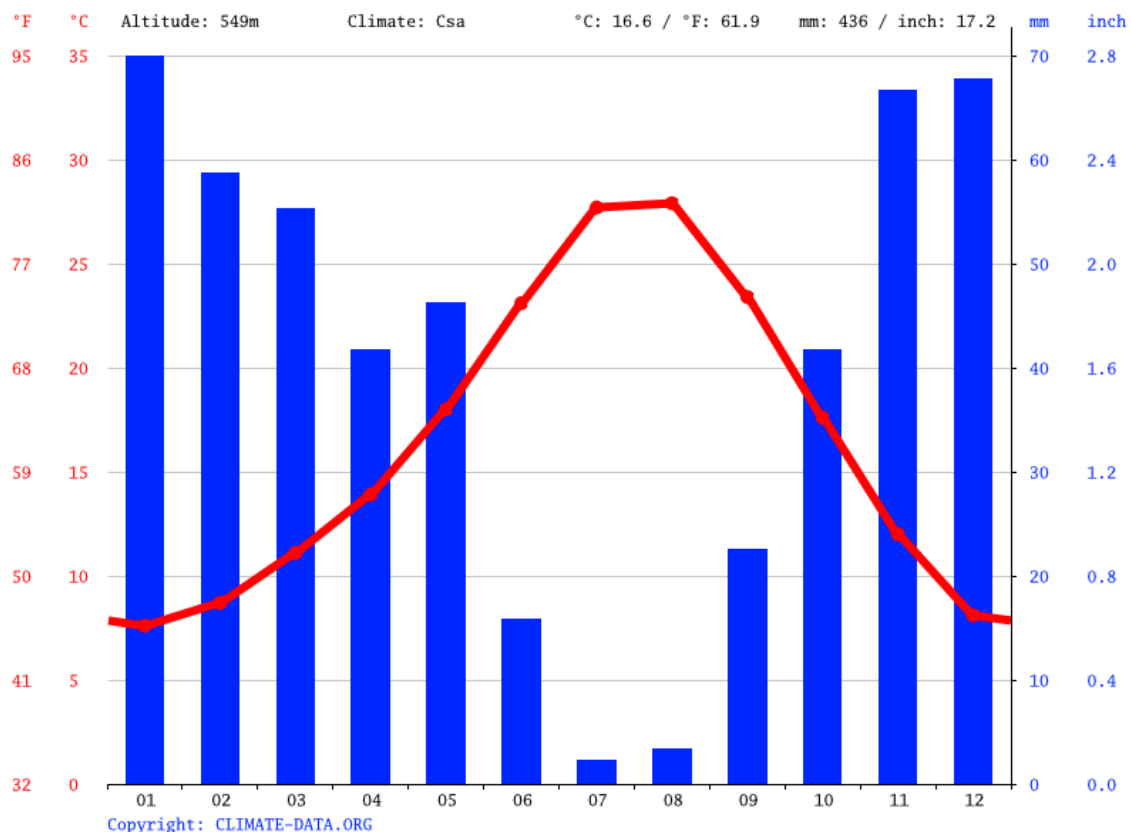
**Figure n° 08** - Localisation géographique de la zone d'étude (Commune de Sidi Abderrahmane, wilaya de Tiaret).

## 4.2 - Données climatiques de la wilaya de Tissemsilt

### 4.2.1 -Diagramme Ombrothermique de Bagnouls et Gausсен

Ils ont établi un diagramme qui permet de dégager la durée de la période sèche en s'appuyant sur la comparaison des moyennes mensuelles des températures en °C avec celles des précipitations en mm ;on admettant que le mois est sec lorsque «P est inférieur ou égal à 2T ».

Le diagramme ombrothermique de la wilaya de Tissemsilt est présenté par la **figure 09**. L'histogramme représente les précipitations moyennes mensuelles en mm et en pouce (inch) et la courbe représente la température moyenne mensuelle en degré Celsius (C°) et en degré Fahrenheit (F). L'analyse du diagramme montre que Tissemsilt se trouve à 549 m d'altitude. L'hiver à Tissemsilt se caractérise par des précipitations bien plus importantes qu'en été. Cette région connaît une période pluvieuse qui s'étend de début d'Octobre à la fin de Mai. Les mois de Juin, Juillet et Août sont les mois les plus secs.



**Figure n° 09** - Diagramme Ombrothermique de **Bagnouls** et **Gausсен** de la région de Tissemsilt. ([http : Climate-Data.org](http://Climate-Data.org)).

#### 4. 2.2 -Quotient pluviothermique d'Emberger

Il a établi un quotient pluviothermique « Q2 » qui est spécifique au climat méditerranéen. Il est le plus utilisé en Afrique du Nord. Le diagramme correspondant permet de déterminer la position de chaque station météorologique et de délimiter l'aire bioclimatique d'une espèce ou d'un groupe végétale. Ce quotient a été formulé de la façon suivante :

$$Q = \frac{1000 Pa}{(M+m) (M-m) \cdot 2}$$

- Q : Quotient pluviométrique
- Pa : la moyenne annuelle des précipitations en mm.
- M : la moyenne des températures maximales du mois le plus chaud en °K (°K = °C + 273 °C).
- m : la moyenne des températures minimales du mois le plus froid en °K (°K = °C + 273 °C).

Sur le climagramme d'Emberger (Figure n° 10), le quotient pluviométrique de la région de Tissemsilt est équivalent à 62,52. A cet effet, nous remarquons que l'étage bioclimatique de cette région appartient au subhumide à hiver frais.

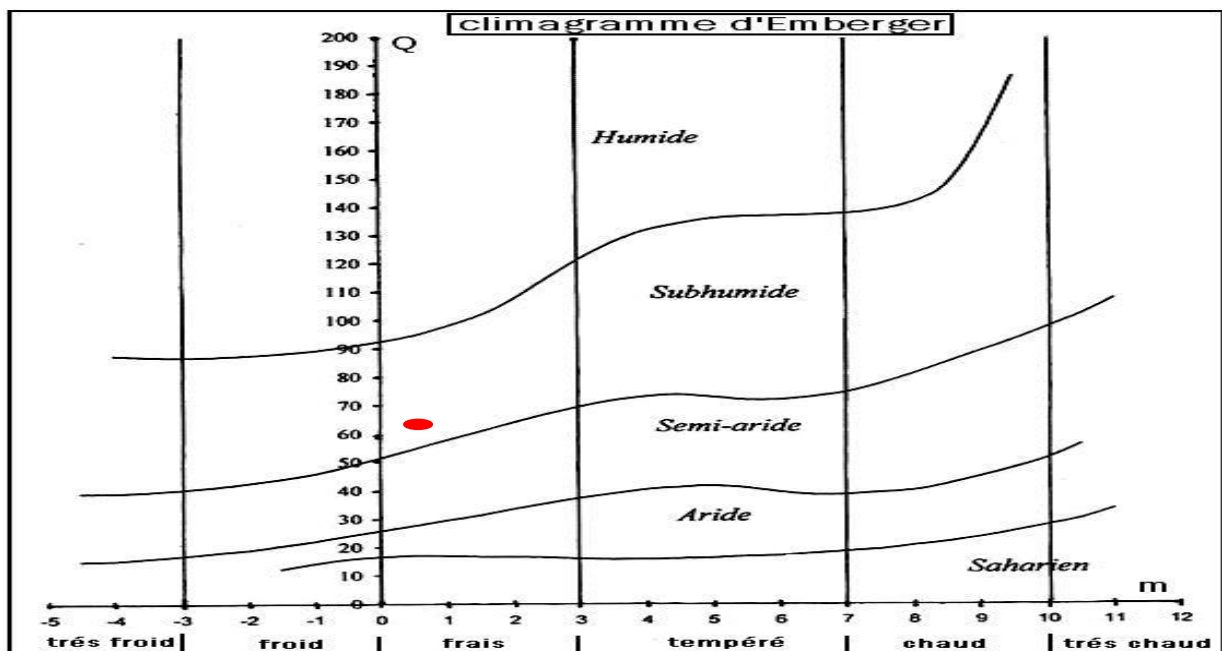
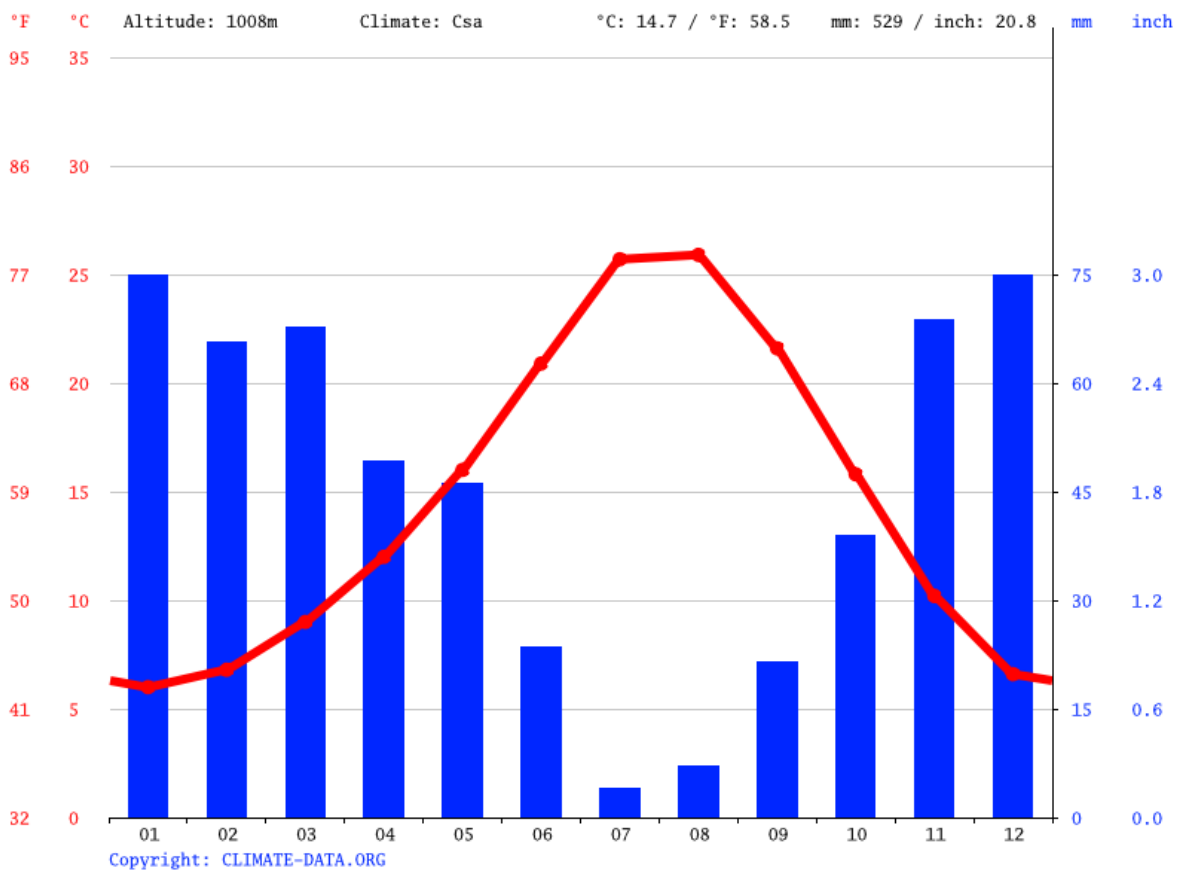


Figure n° 10 - Climagramme pluviothermique d'Emberger (Q2) de la wilaya de Tissemsilt.

### 4.3 - Données climatiques de la wilaya de Tiaret

#### 4.3.1 - Diagramme Ombrothermique de Bagnouls et Gausсен

L'analyse du diagramme (**Figure n° 11**) montre que Tiaret se trouve à 1008m d'altitude. L'hiver à Tiaret se caractérise par des précipitations bien plus importantes qu'en été. Cette région connaît une période pluvieuse qui s'étend de début d'Octobre au début de Mai. Les mois de Juin, Juillet et Août demeurent les mois les plus secs.



**Figure n° 11** - Diagramme Ombrothermique de **Bagnouls** et **Gausсен** de la région de Tiaret.

([http : Climate-Data.org](http://Climate-Data.org)).

#### 4.3.2 - Quotient pluviothermique d'Emberger

Sur le climagramme d'**Emberger** (**Figure n° 12**), le quotient pluviométrique de la région de Tiaret est équivalent à 35,52. A cet effet, nous remarquons que l'étage bioclimatique de la région de Tiaret appartient au semi-aride à hiver frais.

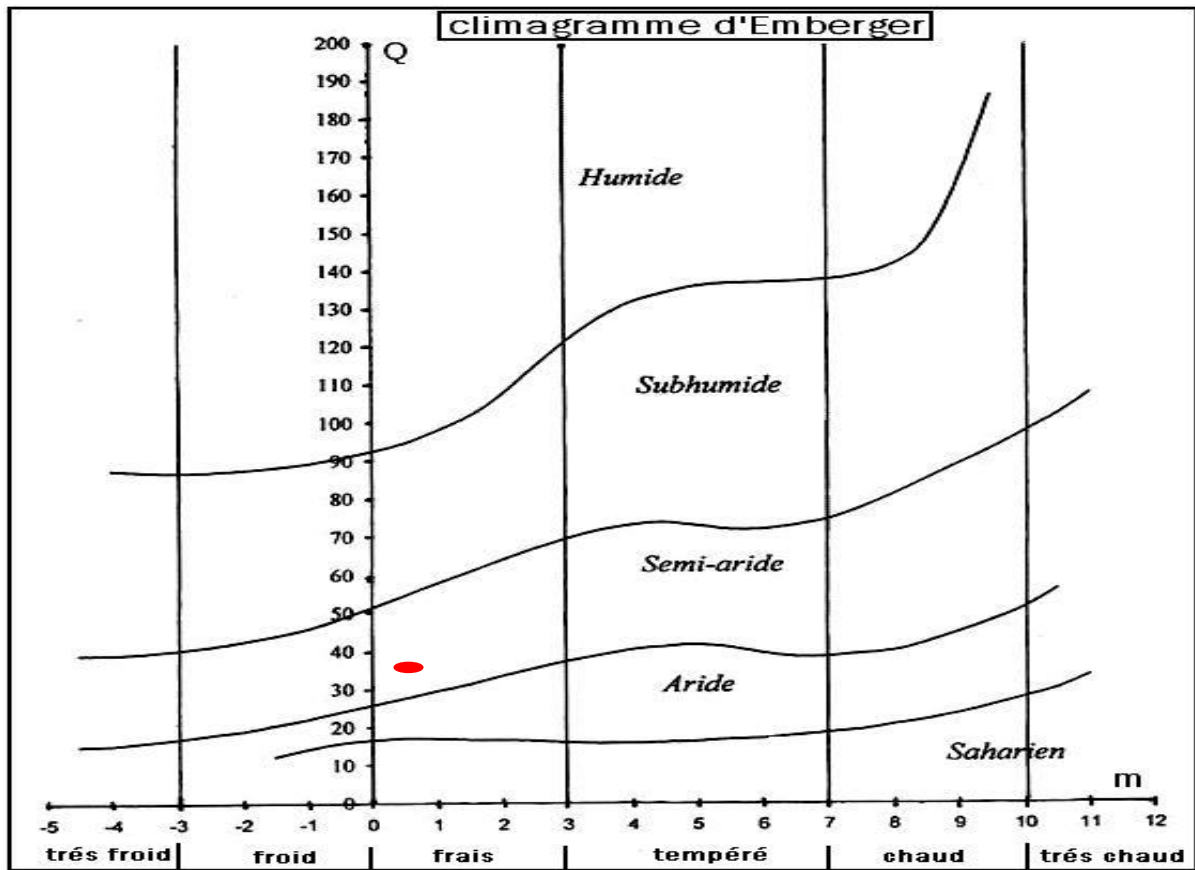


Figure n° 12 - Climagramme pluviothermique d'Emberger (Q2) de la wilaya de Tiaret.

# CHAPITRE V

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cette étude a été portée sur une étude physicochimique et phytochimique de trois plantes médicinales (*Marrubium vulgare* L., *Peganum harmala* L. et *Eucalyptus obliqua* Hert.) et de tester leurs activités. Pour cela, cette partie expérimentale a été réalisée au sein des laboratoires suivants :

- Laboratoire de biochimie. Faculté SNV. université Ibn Khaldoun. Tiaret
- Laboratoire de recherche « Agrobiotechnologie et nutrition en zone semi-aride ». Faculté SNV. Université Ibn Khaldoun. Tiaret. Algérie.
- Laboratoire d'Hygiènes et pathologie animale. ITMA. Université Ibn Khaldoun. Tiaret. Algérie
- Laboratoire de reproduction des animaux de la ferme. ITMA. Université Ibn Khaldoun. Tiaret. Algérie.
- Laboratoire de Microbiologie. Faculté SNV. Université Ibn Khaldoun. Tiaret. Algérie
- Laboratoire de protection des végétaux. SNV. Université Ibn Khaldoun. Tiaret. Algérie.
- Laboratoire de plantes médicinales et aromatiques. Université de Kilis7 Aralik. Kilis. Turquie.
- Laboratoire de chromathographie. Université de Kilis7 Aralik. Kilis. Turquie.

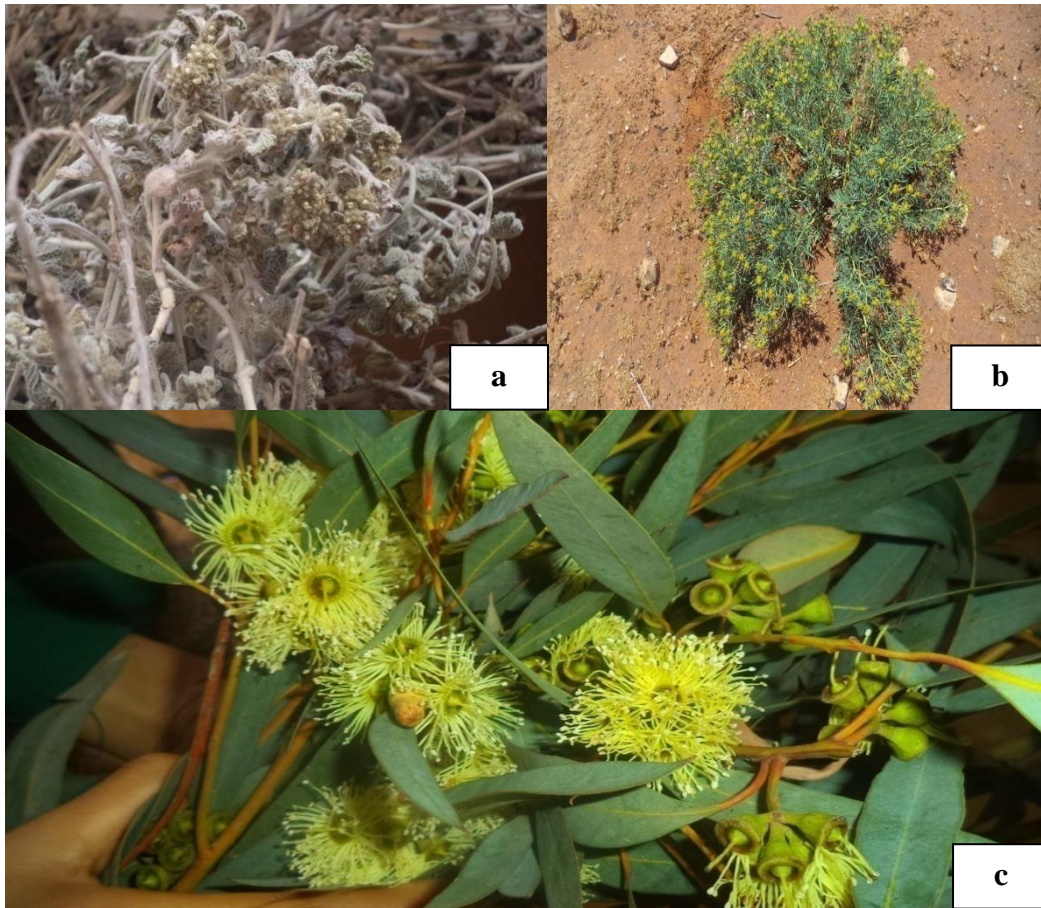
## 5.1- Matériel végétal

Le choix des trois plantes médicinales s'est porté sur *Marrubium vulgare* L., *Peganum harmala* L. et *Eucalyptus obliqua* Hert. (**Figure n° 13**). Ces plantes ont été privilégiées pour leurs intérêts médicaux et leur disponibilité dans la région centre-ouest de l'Algérie. L'identification botanique de ces espèces végétales a été réalisée par Mr. AIT HAMMOU (Enseignant au niveau de la faculté de SNV. Université Ibn Khaldoun. Tiaret).

### 5.1.1- Préparation du matériel végétal

La partie aérienne de ces trois plantes a été récoltée, séchée à l'air libre et broyée à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre obtenue a été tamisée et conservée dans des bocaux en verre fermés hermétiquement, à température ambiante et à l'abri de l'humidité et de la lumière. Afin de décrire le profil physicochimique, biochimique et phytochimique de ces plantes, de multiples analyses ont été réalisées.





**Figure n° 13** - Matériel végétal ; a: *Marrubium vulgare* L. ; b: *Peganum harmala* L. ;  
c: *Eucalyptus obliqua* Hert. (Moulay, 2016).

## 5.2 - Analyses physicochimiques et biochimiques

Ces analyses ont été portées sur la mesure des paramètres suivants : pH, teneur en eau, conductivité électrique, taux de solides solubles, taux des sucres totaux, taux de lipide, taux de fibres totales, taux de cendre et taux de protéines.

### 5.2.1 - Détermination du pH

La mesure a été réalisée en plongeant l'électrode du pH mètre dans la solution de chaque plante (Sahpaz et al., 2012).

### 5.2.2 - Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau est mesurée en déterminant la perte de poids de l'échantillon (5g) après son séchage à 105° pour 4 heures. La teneur en eau est calculée par la formule établie par Kurbatova et al.(2013) :



$$TE = [P_1 - P_2 / P_0] \times 100$$

**TE**: Teneur en eau (%);

**P<sub>0</sub>** : Poids de la prise d'essai (g);

**P<sub>1</sub>** : Poids du creuset plus échantillon avant étuvage (g);

**P<sub>2</sub>** : Poids du creuset plus échantillon après étuvage (g).

### 5.2.3 - Détermination de la conductivité électrique

L'électrode de conductimètre a été plongée dans une solution à 20 % de matière sèche (Nawwar *et al.*, 1989).

### 5.2.4 - Détermination du taux des solides solubles

Le taux de solides solubles (TSS) exprimé en degré Brix est déterminé à l'aide d'un réfractomètre (Kurbatova *et al.*, 2013).

### 5.2.5 - Détermination de la teneur en sucres totaux

Dans un tube à essai, 1ml de phénol (5%) et 5 ml d'acide sulfurique concentré (96%) ont été ajoutés à 1ml de la solution à analyser. Après 10 minutes, le mélange a été placé dans un bain marie pendant 20 minutes à 25-30°C. La lecture de l'absorbance a été faite à 490 nm et la concentration en sucres totaux a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage le glucose (Dubois, 1956). La quantité des sucres totaux est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage par la formule suivante (AOAC, 2012):

$$ST = [(X \cdot V \cdot D) / P] \cdot 100$$

Dont :

**ST** : Taux de sucres totaux (%);

**X** : Quantité de sucres calculée à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

**D** : Facteur de dilution ;

**V** : Volume de la solution analysée (ml);

**P** : Poids de la prise d'essai (g).

### 5.2.6 - Détermination de la teneur en lipides

Une quantité de 10g de l'échantillon a été pesée et versée dans une cartouche qui a été fermée par un morceau de coton et placée dans l'extracteur « Soxhlet » ou le solvant utilisé est l'hexane. Après 6 heures d'extraction, la totalité du solvant a été récupéré par un rotavapeur (AOAC , 2000) et le résidu a été placé dans une étuve à 105°C afin d'éliminer les traces du solvant. Selon Amellal (2008), le taux des lipides est calculé par la formule suivante:

$$TL = [P_2 - P_1 / P_0] \times 100$$

Dont : **TL** : Taux de lipides (%) ;

**P<sub>0</sub>** : Poids de la prise d'essai (g);

**P<sub>1</sub>** : Poids du ballon vide (g) ;

**P<sub>2</sub>** : Poids du ballon + matière grasse (g).

### 5. 2.7 - Détermination du taux de fibres totales

Les fibres sont déterminées par la méthode de Weende (1967) citée par Amellal (2008) qui consiste en une double hydrolyse acide par sulfurique (1,25%) suivie par une hydrolyse alcaline ou basique par 150 ml de KOH (1,25%) de 1g de l'échantillon. Par la suite, le résidu a été séché par étuvage à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Après étuvage, Le résidu a été calciné dans un four à moufle pendant 3 heures à 550°C puis repesé après refroidissement dans un dessiccateur (Kurbatova et al., 2013). La teneur en fibres est calculée selon la formule suivante :

$$FB = [P_1 - P_2 / P_0] \times 100$$

Dont: **FB** : Fibre brute (%) ;

**P<sub>0</sub>**: Prise d'essai (g) ;

**P<sub>1</sub>**: Poids du creuset après étuvage (g) ;

**P<sub>2</sub>**: Poids du creuset après incinération (g).

### 5.2.8 - Détermination du taux de cendres

Une quantité de 10 g de notre échantillon a été mise dans des creusets et incinérés dans un four à moufle à haute température (600°C) pendant cinq heures jusqu'à l'obtention de cendres blanchâtres à poids constant (Sadasivam et al., 1996). Le taux de cendres est calculé

par la différence de poids avant et après incinération par la formule établie par **Kurbatova (2013)**:

$$TC = [P_2 - P_1 / P_0] \times 100$$

**TC** : Taux de cendre (%) ;

**P<sub>0</sub>** : Poids de la prise d'essai (g);

**P<sub>1</sub>** : Poids des creusets vide (g) ;

**P<sub>2</sub>** : Poids des échantillons après incinération (g).

### 5.2.9 - Détermination du taux de protéines

Le dosage des protéines est effectué selon la technique de **Bradford (1976)** qui repose sur le principe qu'une solution d'acide de bleu de Coomassie est absorbée en maximum à 595 nm, lorsqu'elle fixe des protéines. Cette technique est rapide et reproductible.

Un volume de 5ml du réactif du Bradford (dilué 5 fois) selon le rapport a été ajouté à un volume de 1 ml des différents extraits de chaque plante étudiée. Le mélange a été incubé à l'obscurité pendant 15 minutes. La lecture de l'absorbance a été faite à 595 nm en utilisant un spectrophotomètre UV. Les teneurs en protéines sont exprimées en mg/g de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalonnage établie par le sérum albumine bovine (BSA).

## 5.3- Etude phytochimique

La révélation des divers métabolites secondaires présents au niveau des plantes étudiées, a été réalisée en préparant des extraits par la méthode citée ci-dessous.

### 5.3.1 - Préparation des extraits

Les extraits hydroalcoliques ont été préparés par macération de 5g de poudre avec 100 ml du méthanol et d'éthanol (7 /3). Pour l'extrait aqueux, le matériel végétal a été macéré avec 100 ml de l'eau distillée. L'ensemble des extraits a été agité à température ambiante pendant une nuit. Après décantation, les trois extraits ont été filtrés sur papier-filtre et ils ont été séchés dans un rotavapeur jusqu'à l'élimination des solvants puis ils ont été lyophilisés jusqu'à l'obtention d'un résidu sec. Le processus de lyophilisation a été réalisé au niveau du laboratoire des plantes aromatiques et médicinales à l'université de Kilis7 aralik en Turquie. Les résidus secs ont été conservés dans des épindorfs à l'abri de lumière et d'humidité à - 20°C.

### 5.3.2 - Rendement d'extraction

Le rendement a été calculé selon la formule donnée par **Parekh et Chanda (2007)** comme suit:

$$\text{Rendement (\%)} = (\text{Poids du résidu sec} / \text{poids de matériel végétal}) \times 100$$

### 5.3.3 - Screening phytochimique des extraits des trois plantes étudiées

Les différents tests phytochimiques réalisés sur les extraits des plantes sont :

#### 5.3.3.1 - Alcaloïdes

0,5 à 0,6 g du résidu a été ajouté à 8 ml de HCl (1%) et chauffé pendant 2 minutes dans un bain d'eau, puis le mélange a été filtré. Quelques gouttes de réactif de Wagner ou de réactif Bouchardât ont été ajoutées à 2 ml de filtrat. La formation de turbidité ou précipité indique la présence d'alcaloïdes. (**Anjali et Sheetal, 2013 ; Bagre et al., 2007**).

#### 5.3.3.2 - Anthocyanes

1 ml de chaque extrait a été ajouté à 3 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10%) et 1 ml de NH<sub>4</sub>OH (10%). une coloration bleue indique la présence sur ces composés.

#### 5.3.3.3 - Flavonoïdes

Ce groupe de métabolites secondaires a été révélé par un test à l'acétate de plomb. Un précipité de couleur jaune s'est formé pour indiquer la positivité de ce test (**Tiwari et al., 2011**).

#### 5.3.3.4 - Glucosides cardiaques

5 ml de chaque extrait ont été mélangés avec 2 ml d'acide acétique glacial et une goutte de FeCl<sub>3</sub> puis 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré a été ajouté. L'apparition d'un anneau brun marron, violet ou vert à l'interphase a révélé la présence de ces molécules (**Anjali et Sheetal, 2013**).

#### 5.3.3.5 - Mucilage

1 ml d'extrait a été mélangé avec 5 ml d'éthanol absolu. Un précipité floconneux est apparu (**Noudogbessi et al., 2013**).

### 5.3.3.6 - Saponines

10 ml de chacun des extraits ont été agités pendant 15 secondes et laissés au repos pendant 15 minutes. Une hauteur persistante de mousse, supérieure à 1 cm est apparue (**Bidie et al., 2011**).

### 5.3.3.7 - Tanins galliques ou catéchiques

Quelques gouttes de  $\text{FeCl}_3$  (1%) ont été ajoutées à 2 ml de chaque extrait. Une coloration bleu noire indique la présence de tanins galliques ou une coloration brune verdâtre indique la présence de tanins catéchiques (**Harborne, 1998**).

### 5.3.3.8 – Terpénoïdes

0,2g du résidu sec a été mélangé avec 2ml de chloroforme puis 3ml d'acide sulfurique concentré ont été rajoutés (**Mujeeb et al., 2014**).

### 5.3.4 - Dosage des polyphénols totaux

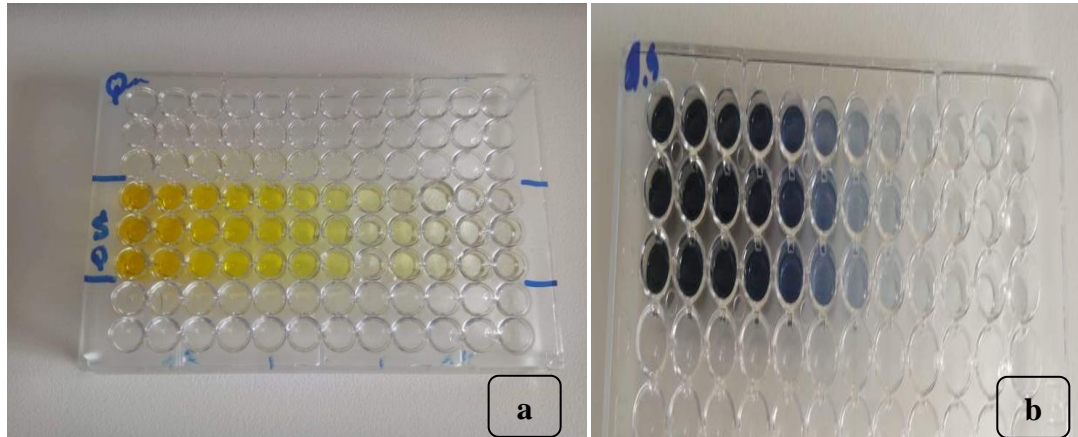
Le dosage des polyphénols totaux est réalisé selon la méthode colorimétrique décrite par **Singleton et Rossi (1965)**. Une prise de 2,5ml du réactif Folin Ciocalteu a été ajoutée à 0,5 ml de chaque extrait suivi par l'ajout de 1ml de carbonate de sodium (20%). Le mélange a été incubé pendant 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance a été mesurée à 760 nm et les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg E AG /g MS) en se référant à la courbe d'étalonnage d'acide gallique.

La courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (0 à 1000  $\mu\text{g/ml}$ ).

### 5.3.5 - Dosage des flavonoïdes

La détermination des flavonoïdes totaux a été effectuée selon la méthode décrite par **Dehpeur et al. (2009)** : une prise de 1500  $\mu\text{l}$  de méthanol à 95 % est ajoutée à 500  $\mu\text{l}$  de chaque extrait à analyser puis une prise de 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{AlCl}_3$  à 10 % (m/v), 100  $\mu\text{l}$  d'acétate de sodium 1 M et 2,8 ml d'eau distillée sont additionnées respectivement. Après agitation, le mélange est incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 min. La lecture de l'absorbance a été faite à 415 nm en utilisant un spectrophotomètre UV. Différentes

concentrations comprises entre 0 et 1000  $\mu\text{g/ml}$  préparées à partir d'une solution mère de la catéchine, permettront de tracer la courbe d'étalonnage (**Figure n° 14**). Les teneurs en flavonoïdes sont exprimés en mg équivalent quercétine/g de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine.



**Figure n° 14** - Dilutions préparées et laissées réagir pour tracer les courbes d'étalonnage  
 a. Quercétine                      b. Acide gallique      (**Moulay,2017**).

### 5.3.6 - Dosage des tanins condensés

La teneur en tanins condensés a été déterminée par la méthode de vanilline décrite par (**Julkunen-Titto, 1985**). Un volume de 50  $\mu\text{l}$  de chaque extrait a été ajouté à 1500  $\mu\text{l}$  de la solution vanilline/méthanol à 4 %, puis mélangé vigoureusement. Ensuite, un volume de 750  $\mu\text{l}$  de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) a été additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à température ambiante pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à **550 nm** contre un blanc. Différentes concentrations comprises entre 0 et 1000  $\mu\text{g/ml}$  préparées à partir d'une solution mère de la catéchine, permettront de tracer la courbe d'étalonnage.

## 5.4. - Activités biologiques des extraits

### 5.4.1 - Activité antioxydante

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), les peroxydes ROO. par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) (**Ricardo et al., 1991**); les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) (**Benzie et Strain, 1996**).

Dans notre cas, les tests d'évaluation du pouvoir antioxydant ont porté le piégeage du radical libre par le DPPH en présence de trois extraits des différentes plantes étudiées. Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical synthétique présentant, à l'état oxydé, une intense coloration violette. La couche électronique de ce radical est saturée en contact d'antioxydants, ce qui explique la disparition de sa coloration (**Ghazghazi et al., 2014**) (**Figure n° 15**).

Cette activité est mesurée par la méthode de **Braca et al. (2002)**. Des dilutions méthanoliques des différents extraits ont été ajoutées à un volume équivalent de DPPH fraîchement préparé dans le méthanol (0.004% m/v) puis le mélange est agité vigoureusement et incubé à l'obscurité pendant 30 mn. L'absorbance est mesurée à 517 nm à l'aide d'un lecteur Elisa.

Cette activité est estimée en pourcentage d'inhibition grâce à la formule suivante :

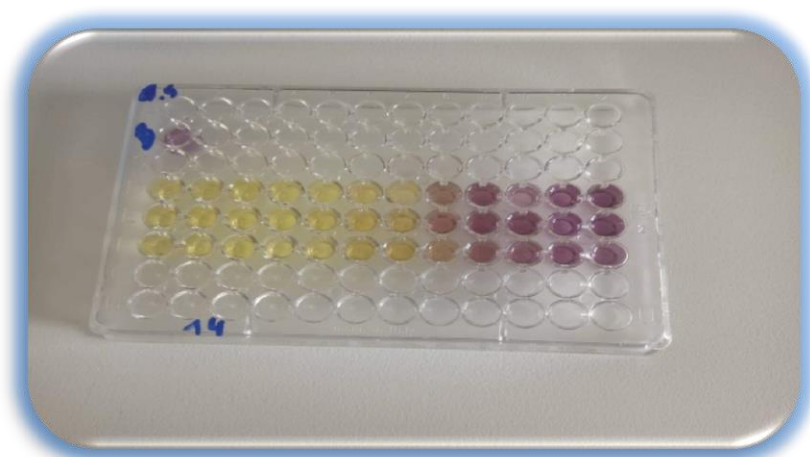
$$PI = (DO \text{ témoin} - DO \text{ extrait} / DO \text{ témoin}) * 100$$

**PI:** Pourcentage d'inhibition.

**DO témoin:** absorbance de témoin négatif.

**DO extrait :** absorbance de la solution d'extrait.

La concentration des extraits qui provoque 50 % d'inhibition (IC50) est déterminée graphiquement à partir de la courbe antiradicalaire réalisée en fonction de différentes concentrations des extraits et à partir de la courbe d'acide ascorbique qui a été utilisé comme référence.



**Figure n°15** - Dilutions préparées pour traçage de la courbe d'étalonnage d'acide ascorbique. (Moulay,2017).

#### 5.4.2 - Activité antibactérienne

Les différentes souches bactériennes sont repiquées par la méthode des stries sur gélose Mueller Hinton, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures. A partir de ces cultures jeunes, des colonies pures sont isolées pour préparer l'inoculum bactérien.

#### 5.4.2.1 - Souches bactériennes utilisées

Les différents extraits ont été testés contre cinq souches bactériennes: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 14452, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ; parvenues du laboratoire : Hygiène et pathologie animale de l'université Ibn Khaldoun de Tiaret et deux souches phytopathogènes (*Erwinia carotovora* et *Erwinia amylovora*) provenant de l'INPV d'Alger.

#### 5.4.2.2 - Technique en milieu solide (méthode de la diffusion sur disque)

La méthode de diffusion sur disque a été utilisée pour la détermination de l'activité antibactérienne des extraits en question. Des disques en papier whatman (diamètre 6 mm) ont été imprégnés de 15 µl de l'extrait (50 mg/ml) dissout dans du DMSO et déposés sur le milieu Mueller-Hinton coulé dans les boîtes de Pétri, qui avait été inoculée en surface avec 0,1 ml de suspension bactérienne ajustée à 10<sup>8</sup> UFC/ml pour toutes les souches (**Joffin et Leyral, 2001 ; Pessini et al., 2003 ; Careaga et al., 2003**). Des disques imprégnés dans l'eau distillée ont été utilisés comme contrôles négatifs. Avant incubation, toutes les boîtes de Pétri ont été conservées dans l'obscurité à 4 °C pour 1 h, pour permettre la diffusion des extraits du disque au support sans croissance microbienne (**Krimat et al., 2014**).

Les antibiotiques standards: l'Oxalline (1 µg/disque), Doxycycline (30 µg/disque) et Nitroxoline (20 µg/disque) ont été utilisés comme témoins positifs. Après incubation à 37 ± 1°C pendant 24 h, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés en millimètres par un pied à coulisse. Les essais ont été réalisés en trois répétitions. Selon **Biyiti et al. (2004)**, un extrait est considéré comme actif s'il produit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10 mm. Une zone d'inhibition supérieure à 14 mm correspond à une activité antibactérienne très significative (**Ramzi et al., 2010**).

#### 5.4.2.3 - Détermination de la concentration inhibitrice minimale (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB)



La CMI est la concentration la plus faible d'une substance empêchant la croissance visible d'une bactérie. Ce test a été réalisé en utilisant la méthode de macrodilution en bouillon. Différentes concentrations des extraits (50; 25; 12,5; 6,250 et 3,125 mg / mL) ont été testées contre les cinq souches étudiées. Le même volume de chaque extrait avec des concentrations différentes a été mélangé avec du bouillon Mueller Hinton dans des tubes pour constituer 1 mL de solution puis 1 mL de suspension bactérienne ( $10^6$  UFC / ml) a été ajouté.

Tous les tubes ont été incubés à 37 ° C pendant 18–24 h. Deux tubes témoins ont été préparés avec l'un contenant l'extrait sans micro-organisme et le second contenant le milieu de croissance avec l'inoculum. CMB est la concentration qui a entraîné la mort microbienne. En d'autres termes, c'est la dilution la plus élevée qui n'a donné aucune colonie bactérienne.

### 5.4.3 - Activité antifongique

#### 5.4.3.1 - Matériel fongique

Trois souches du genre *Fusarium* provenant de l'INPV d'Oran. La désignation de ces isolats, l'année de leur isolement, leurs origines géographiques ainsi que la variété à partir de laquelle ils ont été isolés sont indiquées dans le **tableau n° 02**.

**Tableau n° 02** - Désignation, culture, année d'isolement et origines géographiques des isolats de *Fusarium* sp.

Désignation	Culture	Année d'isolement	Origine géographique
FBD	Blé dur	04/04/2017	Oran
FPDT	Pomme de terre	28 /02 /2017	Oran
FOT	Tomate	28 /02 /2017	Oran

#### 5.4.3.2 - Purification des isolats de *Fusarium* sp.

Des explants de mycélium sont prélevés à partir de culture des trois isolats et repiqués dans des boîtes de Pétri contenant un milieu PDA dont la composition est indiquée ci-dessous :

Pomme de terre	200 g
Glucose (Dextrose)	20 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

Les cultures sont ensuite incubées à l'obscurité à une température ambiante de 25°C. Des repiquages successifs ont été ensuite réalisés afin d'éliminer les bactéries ou les champignons qui contaminent les cultures de *Fusarium sp.*

#### 5.4.3.3 - Identification morphologique des isolats de *Fusarium sp.*

L'identification morphologique a été basée principalement sur l'observation macroscopique et microscopique des isolats. Elle est basée principalement sur les critères établis par **Toussoun et Nelson (1976)** et en se basant aussi sur la description des espèces du genre *Fusarium* établie par **Leslie et Summerell (2006)** qui sont :

- L'aspect et la coloration du mycélium sur milieu PDA.
- La taille et la forme des macroconidies.
- La présence ou l'absence des microconidies.
- La présence ou l'absence des chlamydozoospores

#### 5.4.3.4 - Conservation des isolats de *Fusarium sp.*

Après purification des cultures, les différents isolats sont repiqués dans des tubes à essai contenant un milieu PDA. Ces tubes sont ensuite conservés dans un frigo à une température de 4°C.

#### 5.4.3.5 - Test antifongique

L'activité antifongique des différents extraits a été testée *in vitro* par la méthode de contact direct (**Rongai et al., 2016**), sur les trois souches de *Fusarium*. L'activité antifongique a été effectuée comme suit:

une quantité de 5 ;7,5 ou 15mg du résidu sec de chaque extrait (méthanolique, éthanolique, aqueux) est incorporée séparément dans des tubes contenant 10ml du milieu PDA maintenu en surfusion de sorte que la concentration correspond à 0,5 ; 0,75, et 1,5 % (poids / volume) respectivement. Chaque tube est homogénéisé et immédiatement coulé dans une boîte de pétri de 85mm. Après solidification du milieu, la boîte est inoculée par un disque mycélien de 6mm de diamètre prélevé de la culture jeune du mycète. Les boîtes sont incubées à (25±2) °C pendant 5 jours. Parallèlement, les souches fongiques en absence des extraits ont servi de témoins négatifs. Les boîtes de pétri renfermant le fongicide Tachigazole (300g/l) à une concentration de 0,15% (v/v) ont servi de témoins positifs.

L'effet antifongique des extraits sur la croissance mycélienne est déterminé par la mesure du taux d'inhibition selon **Bajpai et Kang (2010)** comme suit :

$$\text{PI}(\%) = [(A-B)/A] \times 100$$

**PI(%)** : Taux d'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage

**A**: Diamètre de la colonie fongique du témoin (en mm)

**B**: Diamètre de la colonie fongique en présence de l'extrait (en mm).

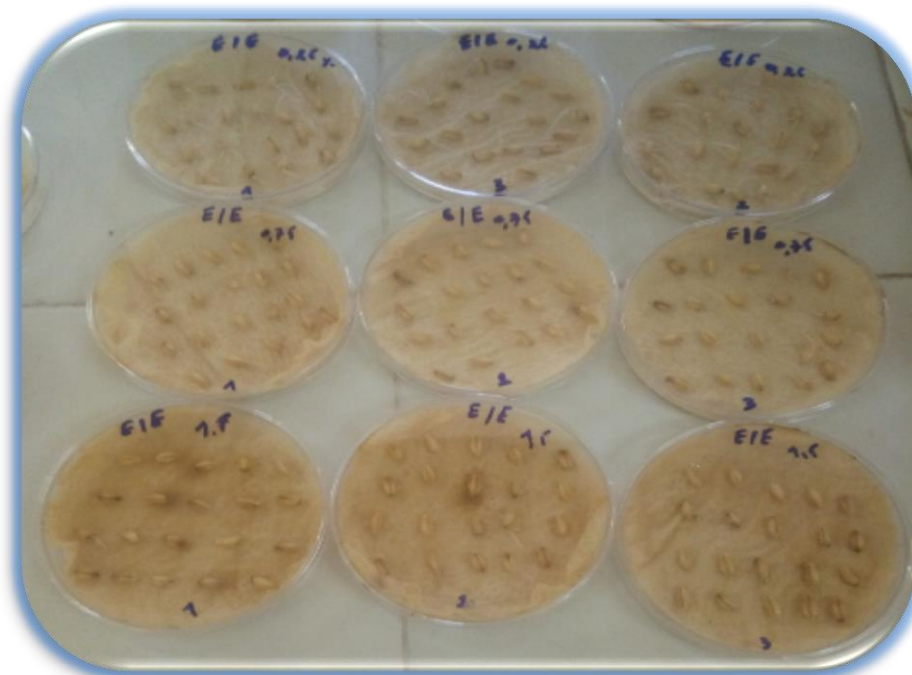
#### **5.4.4 - Effet des extraits des méthanolique et éthanolique d'*E. obliqua* Hert.**

##### **sur la germination des graines du blé dur (var. vitron)**

La germination des graines du blé dur a été évalué dans des boîtes de Pétri (85mm de diamètre) sous des conditions aseptiques avec trois répétitions (**Figure n°16**). Chaque boîte contenait trois couches de papier imbibées par 5 ml de chaque extrait à une concentration de 0,25 ; 0,75 et 1,5 (p /v) ou 5 mL d'eau distillée stérile comme témoin négatif (**Rongai et al., 2016**). Vingt graines préalablement désinfectées et rincées ont été placées Au niveau de chaque boîte sur leurs faces embryonnaires. Les pourcentages de germination ont été mesurés trois jours après le début de l'expérience.

Pour éliminer les saprophytes et les bactéries on a utilisé la méthode suivante :

- Mettre les graines du blé dans l'hypochlorite du sodium (eau de javel) à 2% pendant 5min.
- Rinçages à l'eau distillée stérile trois fois pendant 5min.
- Séchage des graines sur papier absorbant.



**Figure n° 16** - Dispositif expérimental du test de l'effet de de l'extrait éthanolique d'*E. obliqua* Hert. sur la germination (Moulay, 2019).

#### 5.4.5 - Test de l'activité antifongique de l'extrait méthanolique et éthanolique d'*E. obliqua* Hert. contre le *Fusarium culmorum* *in vivo*

##### 5.4.5.1 - Semence

Une semence de blé dur appartenant à la variété Vitron a été utilisée pour tester et comparer l'efficacité *in vivo* de deux extraits d'eucalyptus et un fongicide commercialisé Tachigazole® vis-à-vis d'un isolat de *F. culmorum*. La semence du blé dur nous a été fournie par le CCLS de Tiaret. Cette variété a été choisie en raison de sa sensibilité à l'égard du *Fusarium* sp. (Laraba, 2018). Cette variété est connue localement sous l'appellation Hoggar, originaire du Mexique, et introduite en Algérie à partir de l'Espagne en 1986.

##### 5.4.5.2 - Matériel fongique

Pour l'inoculation du sol, nous avons utilisé une souche de *F. culmorum*. Cette souche a été isolée en 04/04/2017 à partir du collet du blé dur.

### 5.4.5.3 - Fongicide

Le fongicide utilisé pour tester l'efficacité *in vivo* à l'égard de la fusariose de blé dur est le Tachigazole (**Figure n° 17**).

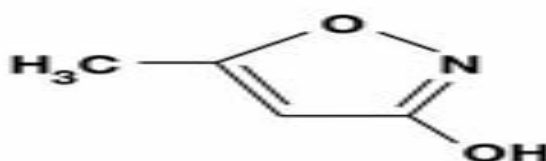


**Figure n° 17** - Fongicide utilisé en expérimentation (Moulay, 2019).

Il a été choisi en raison de son efficacité contre *le Fusarium* de blé. Sa matière active est Hymexazole. Elle est habituellement utilisée pour lutter contre le *Pytium* et le *Fusarium* soit en végétation ou en traitement du sol et il est produit par la firme Vapco (**Index des produits phytosanitaires à usage agricole, 2017**). La dose préconisée en plein champs est 1L/ha. Les caractéristiques de cette matière active sont indiquées dans le **tableau n° 03**.

Tableau n° 03 - Caractéristiques du Tachigazole. (<http://qzhchem.com/>)

<b>Nom commun :</b>	Tachigazole
<b>Famille chimique :</b>	Isoxazole
<b>Nom chimique :</b>	5-methylisoxazol-3-ol.
<b>Formule brute :</b>	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>
<b>Formule développée :</b>	



<b>Noms commerciaux</b>	Tachigazole
<b>Propriétés physico-chimiques :</b>	<p>Forme : cristaux incolores.</p> <p>Poids moléculaire : 99,1 g/mol</p> <p>Solubilité dans l'eau : 65.1 g/l</p> <p>Soluble dans la plupart des solvants organiques</p>

**Utilisation :** Lutte contre les maladies transmises par le sol causées par *Fusarium*, *Aphanomyces*, *Pythium*, *Corticium* et *Typhulaspp*.... Etc.

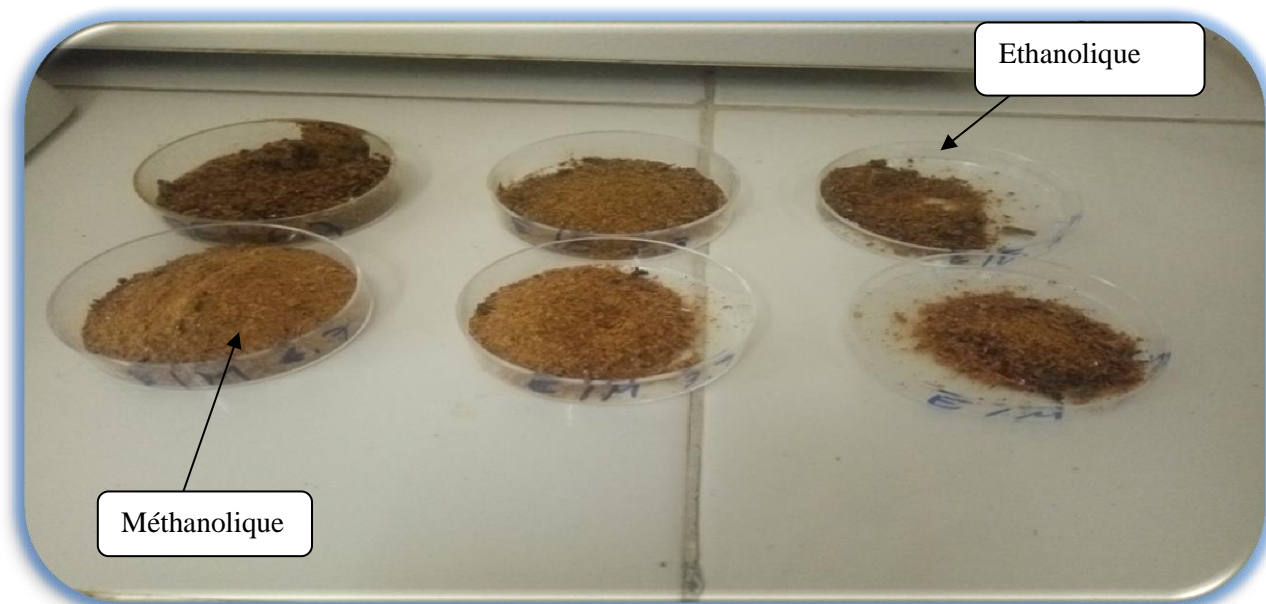
<b>Mode d'action</b>	Fongicide systémique
<b>Toxicité</b>	<p>Toxicité aiguë par voie orale :</p> <p>DL<sub>50</sub> (rat) = &gt; 4678 mg/kg</p>

#### 5.4.5.4 - Efficacité *in vivo* des deux extraits d'*E. obliqua* Hert. contre *F. culmorum*

L'essai d'efficacité *in vivo* des deux extraits d'eucalyptus a été réalisé sous serre au niveau de l'ITMA (Tiaret). Cet essai a pour objectif l'évaluation de l'efficacité des extraits sur les paramètres de la sévérité de la maladie qui sont : la longueur de la partie aérienne, la longueur de la partie racinaire, le poids frais des plants, le poids sec des plants, le nombre de feuilles par plant et l'indice de la sévérité de la maladie.

#### 5.4.5.5 - Préparation des extraits

Les extraits méthanoliques et éthanoliques ont été préparés de la même manière citée et indiquée précédemment (**Figure n° 18**).

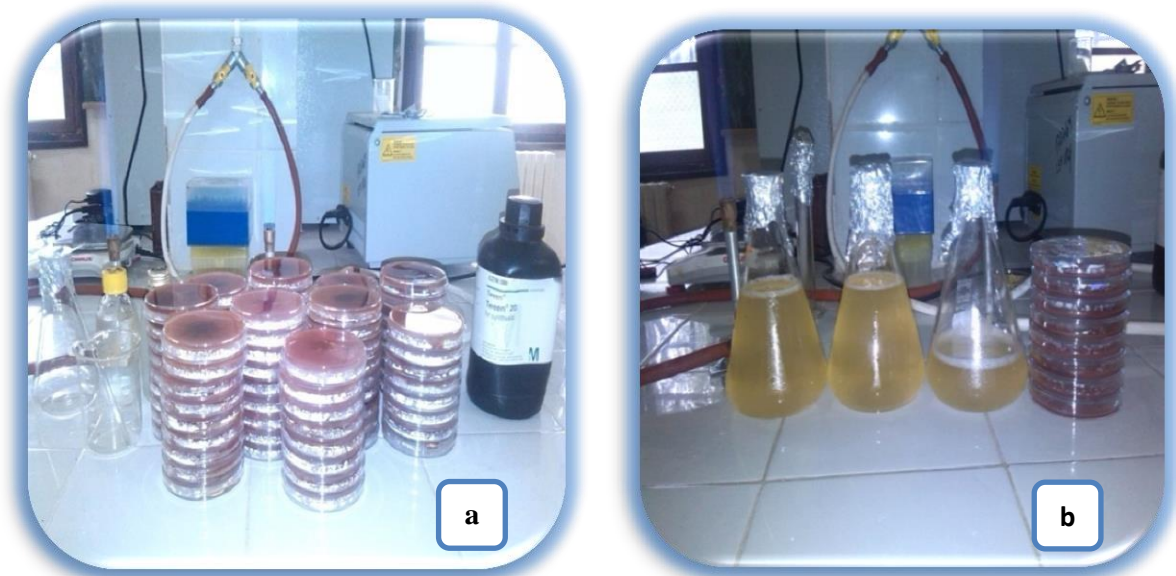


**Figure n° 18** -Résidus secs des extraits méthanolique et éthanolique d'*E. obliqua* Hert. (Moulay, 2019).

#### 5.4.5.6 - Préparation de l'inoculum

Un repiquage de fragments de *Fusarium culmorum* a été réalisé sur milieu PDA et incubé pendant 7 à 10 jours jusqu'à ce que la sporulation soit complète. Ensuite, une suspension de spores a été préparée, et ce en versant en dessus de la boîte de pétrie 10 ml d'eau distillée stérile (**Figure n° 19**). Après raclage à l'aide d'une pipete pasteur, la suspension de spores du champignon en question est récupérée dans une fiole préalablement autoclavée, à laquelle on a rajouté quelques gouttes de Tween20 pour disperser les spores et on procède au comptage à l'aide d'une cellule de Malassez. Le comptage permet d'avoir le même nombre de spores au niveau de la fiole, ainsi la suspension est ajustée à raison de  $10^6$  spores/ml.





**Figure n° 19** -Matériel utilisé en préparation d'inoculum.

a. Souche fongique    b. Inoculum préparé (Moulay, 2019).

#### 5.4.5.7 - Préparation du sol

Le sol est constitué d'un mélange de 1/3 du sol et 1/3 du sable préalablement tamisé et stérilisé à 120 °C pendant 48 h dans une étuve, et 1/3 de terreau commercialisé (Figure n° 20).

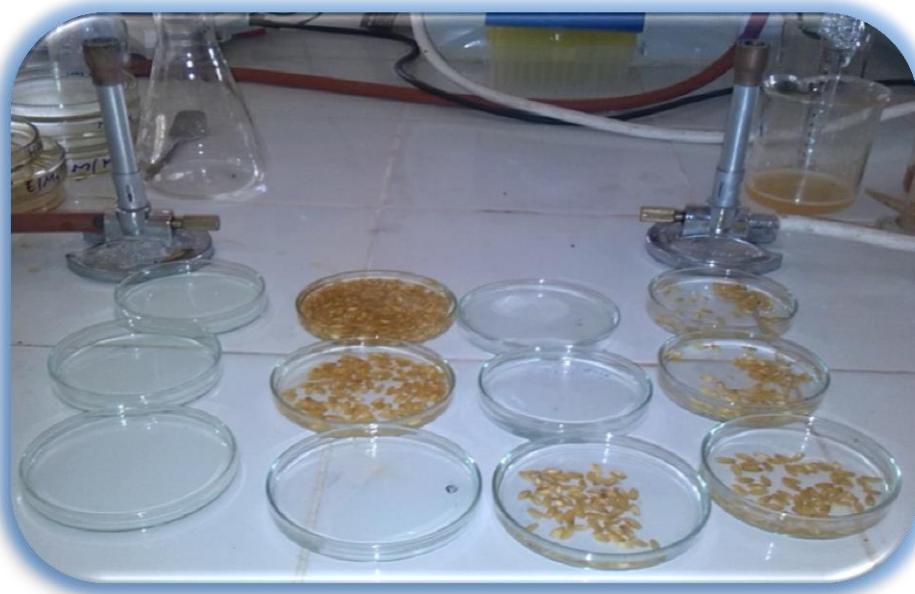


**Figure n° 20** - Mélange du sol au cours de préparation (Moulay, 2019).



#### 5.4.5.8 - Préparation des graines

Les graines de blé préalablement désinfectées par l'hypochlorite de sodium à 2% et rincées trois fois avec de l'eau distillée stérile. Ensuite, les graines ont été mises dans des boîtes de pétri contenant trois couches de papier imbibées avec de l'eau distillée stérile puis incubées pendant trois jours pour subir une prégermination (**Figure n° 21**).



**Figure n° 21** - Désinfection des graines du blé (**Moulay, 2019**).

#### 5.4.5.9 -Inoculation et traitement du sol

Une suspension de conidies (15 ml) a été mélangée à 150 g du sol. Après une période d'incubation de 7 jours, le sol a été traité en incorporant le résidu sec des deux extraits d'eucalyptus à trois concentrations de 0,25 ; 0,75 et 1,5 % (p/p) (**Figure n° 22**). Pour le témoin positif, le sol a été traité par le fongicide Tachigazole (300g/l) à une concentration de 0,15% (v/p).Après sept jours supplémentaires d'incubation, le sol de chaque traitement a été placé dans des pots en plastique de 10 cm de diamètre (**Figure n° 23**).

#### 5.4.5.10 - Semis

Le semis a été effectué le 04 juin 2019 au niveau de la serre de l'ITMA. Les jeunes pousses du blé ont été semées à raison de 3 germes par pot. Une couche du sol inoculé a été déposée au-dessus des germes et recouverte par le sol (**Figure n° 23**).

Les pots ont été placés au hasard sur une table de serre ( $28 \pm 2$  ° C, 70–80% d'humidité relative et une photopériode de 12 h) et ont été arrosés à volonté.

Les traitements ont été réalisés en trois répétitions et inclus:

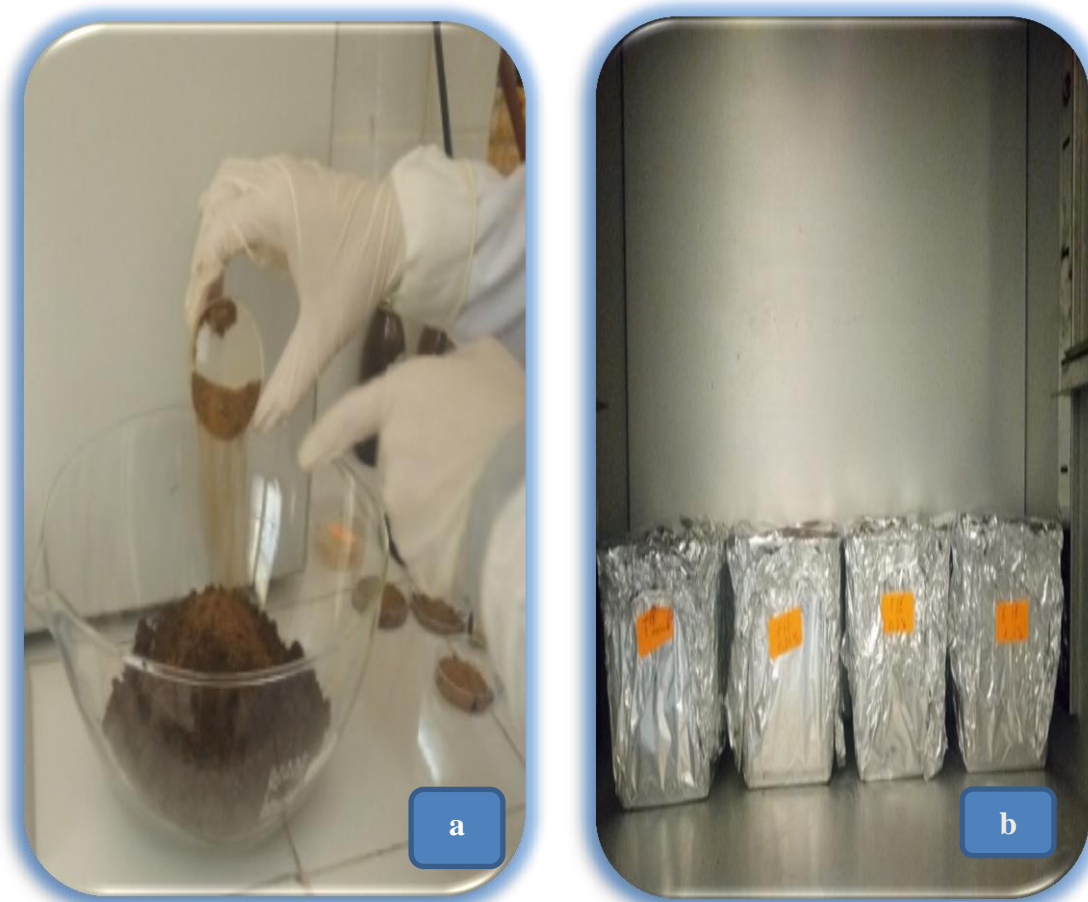
**T<sub>1</sub>** = Témoin négatif : Germes plantés en sol non inoculé et non traité.

**T<sub>2</sub>** = Témoins positif: Germes plantés en sol inoculé par l'isolat du *F. culmorum*.

**T<sub>3</sub>** = Germes plantés en sol inoculé par l'isolat du *F. culmorum* et traité par le Tachigazole.

**T<sub>4</sub>**= Germes plantés en sol inoculé par l'isolat du *F. culmorum*.et traité par une des trois doses de l'extrait éthanolique d'*E. obliqua* Hert. (D0,25; D0,75 et D1,5).

**T<sub>5</sub>**= Germes plantés en sol inoculé par l'isolatdu *F. culmorum* et traité par une des trois doses de l'extrait méthanolique d'*E. obliqua* Hert. (D0,25 ; D0,75 et D1,5).



**Figure n° 22** - Incubation du sol inoculé et des sols traités avec le résidu sec.

a. Traitement du sol      b. sol incubé      (Moulay, 2019).



**Figure n°23** - Dispositif expérimental au niveau de la serre (Moulay, 2019).

#### 5.4.5.11 - Notation des résultats

Durant ce test, les plants sont suivis régulièrement pour noter l'évolution des symptômes. Les premières notations sont effectuées au moment de la germination et les deuxièmes sont effectuées après 40 jours, lors de l'arrachage des plants.

L'évaluation des paramètres de la sévérité de la maladie a été réalisée sur la longueur de la partie aérienne (**LA**), la longueur de la partie racinaire (**LR**), le poids frais des plants (**PF**), le poids sec des plants (**PS**), le nombre de feuilles par plant (**NF**) et l'indice de la sévérité de la maladie (**IM**).

L'estimation de l'intensité des symptômes est effectuée selon une échelle de notation de 4 degrés allant de 0 à 3 :

- **0** : Absence de symptôme
- **1** : Noircissement ou brunissement de 1-25 % de la surface du collet.
- **2** : Noircissement ou brunissement de 26-50 % de la surface du collet.
- **3** : Noircissement ou brunissement de plus de 50 % de la surface du collet.

La réaction moyenne est évaluée par le rapport suivant :

$$\text{IM} = [(0 \times F_0) + (1 \times F_1) + (2 \times F_2) + (3 \times F_3)] / N$$

Où :

- **IM** : Indice de la maladie.
- **F** : Nombre de plants pour chaque degré dans l'échelle de notation de 0 à 3.
- **N** : Nombre total de plants utilisés.

## 5.5 - Caractérisation des composés actifs au niveau des trois plantes

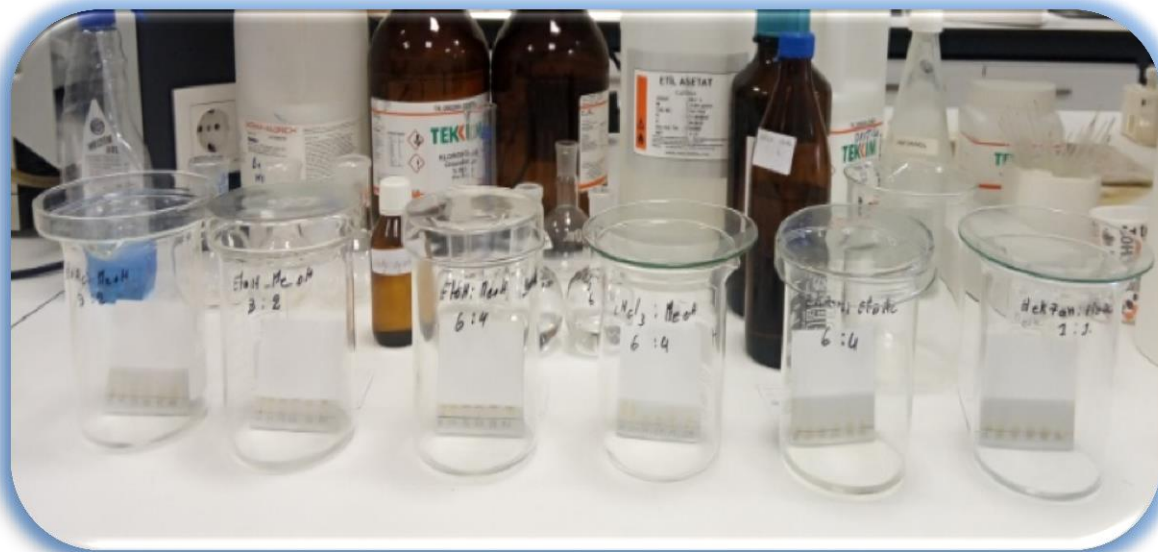
La caractérisation des métabolites secondaires a été effectuée au niveau du laboratoire des analyses chromatographiques et le laboratoire des plantes aromatiques et médicinales à l'université de Kilis7 Aralik en Turquie.

### 5.5.1 - Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Les résidus secs des différents extraits ont été dissous dans leurs solvants de départ et homogénéisés à l'aide d'un vortex. La migration des composants a été réalisée sur un mélange de solvants par polarité. Les solvants utilisés sont : ethyl acétate/methanol :8/2, Ethanol/methanol :8/2, Ethanol/methanol :6/4, chloroforme/methanol :6/4, hexane/ethyl-acétate :6/4 et hexane /ethyl-acétate :1/1.

Une goutte de chaque extrait a été mise sur la plaque en silice (TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> ; 20x20 cm) préalablement découpées en plaquettes de dimensions de 6,2x 6,2cm.

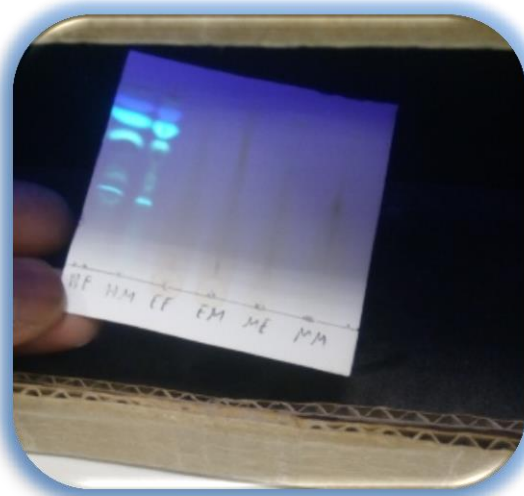
Chaque plaquette a été placée dans des différents systèmes de migration et laissée un certain temps jusqu'à la fin du processus de migration (**Figure n°24**). Ensuite, les plaquettes ont été pulvérisées par la vanilline dissoute dans l'acide sulfurique (0,1g/10ml). La révélation des spots obtenus a été faite premièrement sous une lampe UV à 254 nm puis à 365nm (**Figure n° 25 et 26**).



**Figure n° 24** - Systèmes de migration utilisés au cours de la CCM avec révélation sous lampe UV (Moulay, 2018).



**Figure n°25** - Première révélation à 254 nm. (Moulay, 2018).



**Figure n°26** - Deuxième révélation à 365nm (Moulay, 2018).

### 5.5.2 - Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)

D'un point de vue analytique, d'important progrès ont été réalisés en couplant la CPG avec un spectromètre de masse (SM). En effet, le couplage CPG-SM en mode impact



électronique (IE), dit CPG-SM(IE), est la technique utilisée en routine pour l'analyse dans le domaine des huiles essentielles. Le principe de la spectrométrie de masse consiste à bombarder à l'aide d'électrons une molécule qui sera fragmentée ; les différents fragments obtenus, chargés positivement constituent le spectre de masse de la molécule. Cette technique permet d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques de spectres informatisées ou sous format papier construites au laboratoire ou commerciales (**Mc Lafferty et Stauffer, 1994 ; Adams, 1989 et 2001**).

Cependant, il faut utiliser les bibliothèques commerciales avec précaution, car bien que très utiles, elles ne sont pas les plus performantes. En fait, dans la pratique, l'utilisation conjointe de la spectrométrie de masse (utilisation conjointe de banques laboratoire et littérature) et des indices de rétention calculés sur deux colonnes de polarité différente en CPG, permet, en général l'identification d'un grand nombre de constituants dans les mélanges complexes (**Lianga et al., 2004**). Ainsi, **Vernin et al., (1988)**, d'une part **Cavaleiro (2001)** d'autre part ont développé un logiciel leur permettant de combiner les résultats de la spectrométrie de masse avec les valeurs des indices de rétention sur colonne apolaire et polaire.

L'analyse GC a été effectuée sur un appareil Finnigan SSQ 7000 équipé d'une colonne de DB-5 (30 m x 0,25 mm i.d. épaisseur de film 0,25 mm) (**Figure n° 27**). Les paramètres MS étant :

- ✓ Température de trappe d'ions : 200°C
- ✓ Rapport split : 1 :10
- ✓ Potentiel d'ionisation : 70°C ev
- ✓ Courant d'ionisation : 2A
- ✓ Bande de scan : 40-400 u
- ✓ Temps de scan : 1s

Les composants des trois plantes ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention (RI) relatifs aux n-alcanes C9-C17 et à leur MS avec les données (Librairies NIST et WILEY) correspondantes ainsi qu'aux spectres données par la littérature (**Adams, 2007 ; Swigar et Silverstein, 1981**). Le pourcentage relatif aux composés identifiés a été calculé à partir de la GC par intégrateur informatisé.



**Figure n° 27** - Dispositif de la CPG-SM au laboratoire (Moulay, 2018).

### **5.6 - Analyses statistiques**

Afin d'évaluer l'effet des différents extraits des trois plantes sur le rendement, les teneurs : en polyphénols, en flavonoïdes, en tanins condensés et sur l'activité antioxydante et antibactérienne ; on a réalisé une analyse de la variance (ANOVA) à un seul facteur en utilisant Microsoft Office Excel 2010 Professionnel dans le but de déceler les éventuelles variations des paramètres étudiés qui peuvent exister entre les différents extraits. Pour le test antifongique, une analyse de la variance (ANOVA) à deux facteurs a été effectuée pour montrer l'effet de facteur «Concentration» et «Traitement» sur les paramètres étudiés. Les différences entre les différents paramètres étudiés ont été comparées au seuil de 5%.

# CHAPITRE VI

## RÉSULTATS ET DISCUSSION



Ce chapitre est consacré à analyser les résultats obtenus, les interpréter et les discuter en détails.

## 6.1 - Résultats obtenus

Dans un premier temps on va présenter les analyses physicochimiques suivies par les analyses biochimiques puis l'étude phytochimique et le test de l'activité biologique des extraits et on terminera par une caractérisation des composés bioactifs par chromatographie sur couche mince (CCM) et par chromatographie gazeuse couplée par spectrométrie de masse (GC-MS).

### 6.1.1 - Analyses physicochimiques

Les résultats des paramètres physico-chimiques des plantes étudiées sont présentés dans le **tableau n°4** ci-dessous :

**Tableau n° 04 - Résultats des tests physicochimiques.**

<b>Plante</b> <b>Paramètre</b>	<i>E. obliqua</i> Hert.	<i>M. vulgare</i> L.	<i>P. harmala</i> L.
Teneur en eau (%)	59,04±0,93	42,56 ± 0,36	29,13 ± 1,01
Cendre(%)	5,80 ± 0,44	17,76±0,39	6,1 ± 0,72
pH	5,21 ± 0,12	6,02 ± 0,02	6,27 ± 0,005
Solides solubles (degré de Brix)	2,5 ± 00	3,25 ± 00	2,41 ± 0,28
Indice de réfraction	1,3360 ± 00	1,3375 ± 00	1,3363 ± 0,0005
Conductivité électrique (mS/cm <sup>2</sup> )	4,75 ± 0.02	4,57 ± 0,44	5,04 ± 0,31

L'étude physicochimique d'*E. obliqua* Hert., *M. vulgare* L. et *P. harmala* L. a montré une teneur en eau qui varie entre 29,13 ± 1,01 et 59,04±0,93 %, un pH variant entre 5,21 ± 0,12 et 6,27 ± 0,005, une conductivité électrique entre 4,57 ± 0,44 et 5,04 ± 0,31 mS/cm<sup>2</sup>. Le taux de solides solubles fluctue entre 2,41 ± 0,28 et 3,25 ± 00 degré de Brix et un indice de réfraction entre 1,3360 ± 00 et 1,3375 ± 00.

### 6.1.2 - Analyses biochimiques

Les taux de sucres totaux et protéines sont déterminés par comparaison avec des courbes d'étalonnage réalisés selon une gamme d'étalon de glucose pour les sucres totaux et du sérum d'albumine de bovine pour les protéines réalisées dans les mêmes conditions (Figures n° 28 et 29).

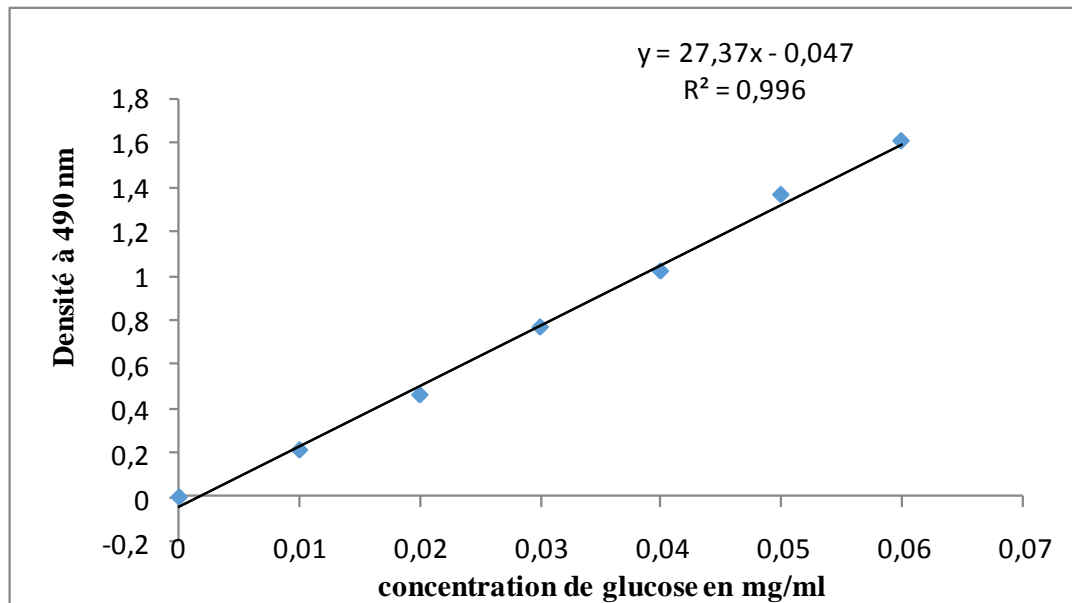


Figure n° 28 - Courbe d'étalonnage du glucose

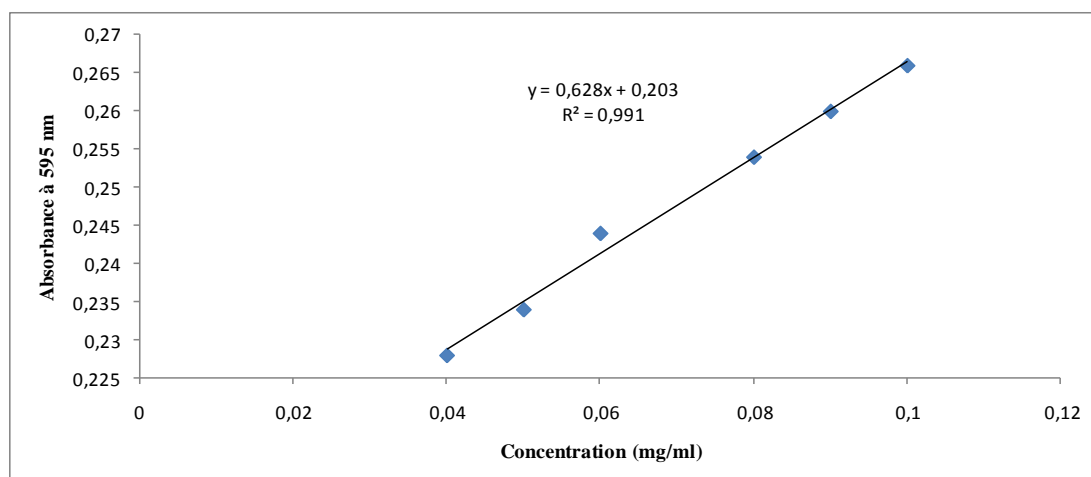


Figure n° 29 - Courbe d'étalonnage du sérum d'albumine de bovine

Les résultats des paramètres biochimiques des plantes étudiées sont regroupés dans le **tableau n° 05**.

**Tableau n° 05 : Résultats des tests biochimiques des plantes étudiées**

<b>Plante</b> <b>Paramètre</b>	<i>E. obliqua</i> Hert.	<i>M. vulgare</i> L.	<i>P. harmala</i> L.
Taux de cendre (%)	5,80 ± 0,44	17,76 ± 1,10	6,1 ± 0,72
Taux de fibre (%)	2,75 ± 0,19	6,42 ± 1,74	8,66 ± 0,57
Taux de sucres totaux (%)	20,77 ± 0,18	5,91 ± 0,13	14,12 ± 0,05
Taux de lipide (%)	5,38 ± 0,39	4,12 ± 0,07	1,55 ± 0,7
Taux de protéine (%)	2,30 ± 0,08	11,03 ± 0,40	2,89 ± 0,25

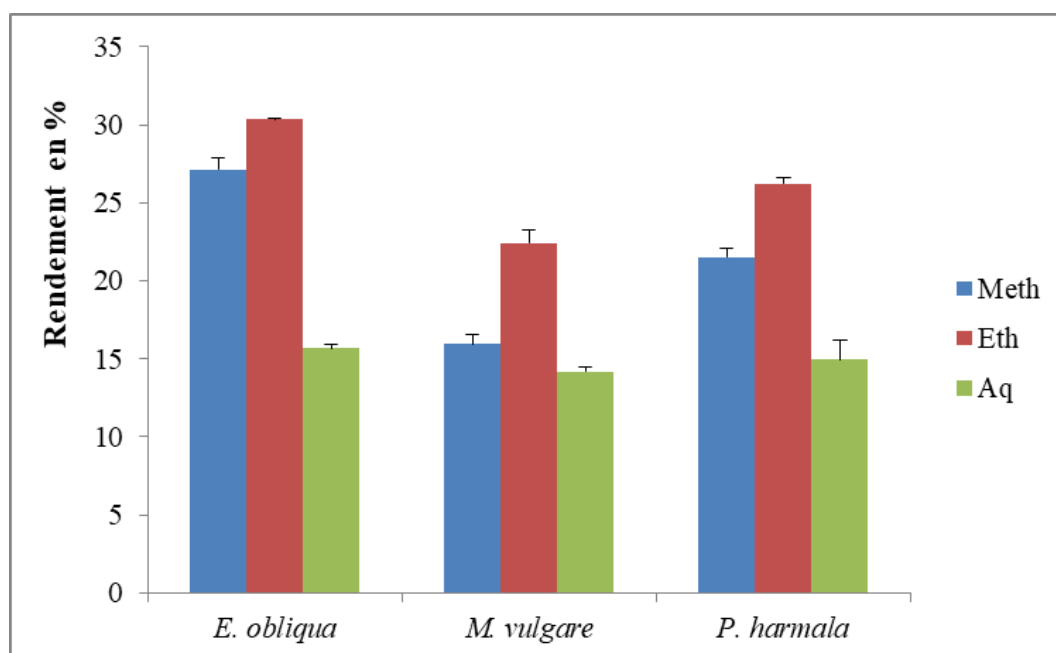
L'étude biochimique des plantes étudiées a révélé les pourcentages suivants: un taux qui varie entre 5,80 ± 0,44 et 17,76 ± 1,10% de cendre. Les fibres totales fluctuent entre 2,75 ± 0,19 et 8,66 ± 0,57%. Le taux des sucres totaux se trouve entre 5,91 ± 0,13 et 20,77 ± 0,18% et celui des lipides entre 1,55 ± 0,07 et 5,38 ± 0,39% ; alors que la teneur en protéines entre 2,30 ± 0,08 et 11,03 ± 0,40 %. À partir de ces taux, on peut déduire que les trois espèces sont pauvres en macronutriments.

### 6.1.3 - Etude phytochimique

Les analyses phytochimiques ont été portées sur le rendement d'extraction des trois extraits (méthanolique, éthanolique et aqueux); on a fait l'analyse phytochimique qualitative par criblage des métabolites et l'analyse quantitative par le dosage des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins condensés pour chaque extrait.

#### 6.1.3.1 - Rendement des extraits

Les rendements obtenus pour les différents extraits des trois plantes étudiées sont présentés dans la **figure n° 30**.



**Figure n° 30** - Rendements des différents extraits des plantes étudiées.

Les rendements varient d'un extrait à un autre et d'une plante à une autre. Le rendement le plus élevé a été enregistré au niveau d'extrait éthanolique pour les trois plantes étudiées (*E. obliqua* Hert. (30,33%), *P. harmala* L. (26,21%) et *M. vulgare* L. (22,42%) suivi par l'extrait méthanolique avec un rendement qui varie entre 15,94 et 27,13%. Le plus faible rendement a été constaté chez l'extrait aqueux avec une moyenne qui se rapproche de 15% pour les trois plantes (**Figure n° 30**). L'étude statistique a révélé une différence significative des rendements des extraits des plantes étudiées (**Annexe n° II**).

### 6.1.3.2 - Criblage phytochimique des métabolites secondaires

Les résultats de screening phytochimique du point de vue qualitative des différents extraits des plantes étudiées sont présentés dans les **tableaux n° 06, 07 et 08** et **annexe n° I**. La phytochimie de l'espèce *M. vulgare* L. est présentée par le **tableau n° 06**.

**Tableau n°06** - Résultats de screening phytochimique de *M. vulgare* L.

Métabolite secondaire	E. meth	E. eth	E. aq
Alcaloïdes	+	+	+
Anthocyanes	-	+	-
Flavonoïdes	+	+	-
Glycosides cardiaques	+	+	+
Mucilage	+	+	+
Saponines	-	+	-
Tanins	+	+	+
Terpénoïdes	+	-	+

Au niveau du **tableau n° 07**, on voit les métabolites secondaires présents au niveau des extraits d'*E. obliqua* Hert.

**Tableau n°07** - Résultats de screening phytochimique d'*E. obliqua* Hert.

Métabolite secondaire	E. meth	E. eth	E. aq
Alcaloïdes	+	+	+
Anthocyanes	-	+	-
Flavonoïdes	+	+	+
Glycosides cardiaques	+	+	-
Mucilage	-	-	-
saponines	-	+	+
Tanins	+	+	+
Terpénoïdes	-	+	+

Le screening phytochimique des extraits de *P. harmala* L. est mis en évidence par le **tableau n° 08**.

**Tableau n°08** - Résultats de screening phytochimique de *P.harmala* L.

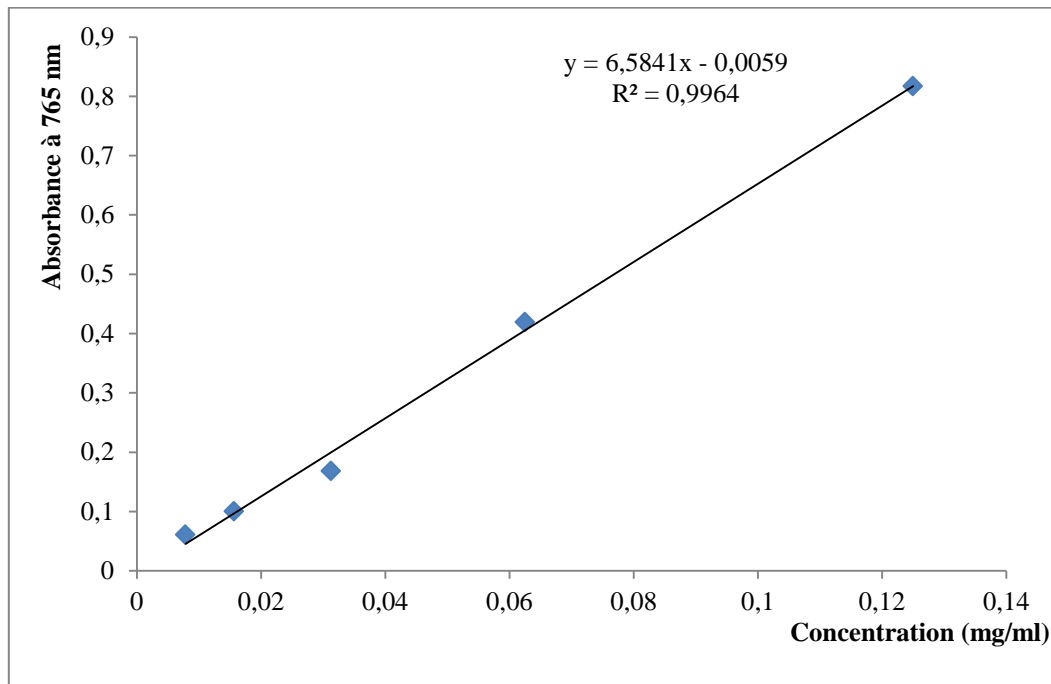
Métabolite secondaire	E. meth	E. eth	E. aq
Alcaloïdes	+	+	+
Anthocyanes	-	-	-
Flavonoïdes	+	+	+
Glycosides cardiaques	+	+	+
Mucilage	+	-	+
Saponines	-	+	+
Tanins	+	+	+
Terpénoïdes	-	+	+

Les résultats obtenus montrent que l'ensemble des extraits de plantes étudiées renferment les composés suivants : les alcaloïdes, les flavonoïdes et les tanins. L'extrait éthanolique s'est révélé l'extrait le plus riche en métabolites secondaires (alcaloïdes, flavonoïdes, glycosides cardiaques et saponines) (**Tableaux n°06, 07 et 08**). La présence et l'absence du reste de métabolites secondaires varient d'un extrait à un autre et d'une plante à l'autre.

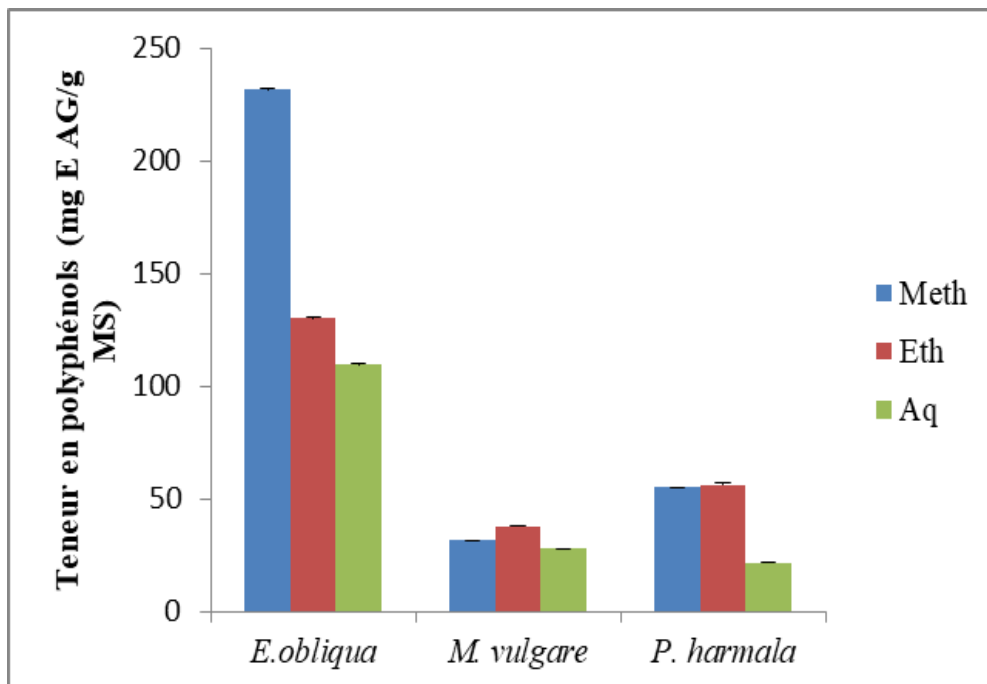
### 6.1.3.3 - Dosage des polyphénols totaux au niveau des trois extraits

La teneur en composés phénoliques obtenus à partir des trois extraits (méthanolique, éthanolique et aqueux) a été estimée grâce à une courbe d'étalonnage, réalisée avec un extrait de référence qui est l'acide gallique à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en mg équivalent en acide gallique par g de matière sèche (mg EAG/ g MS). La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,99$  (**Figure n° 31**).

Les résultats du dosage de polyphénols de l'ensemble des extraits de trois espèces végétales sont mis en évidence par la **figure n°32**.



**Figure n° 31** - Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.



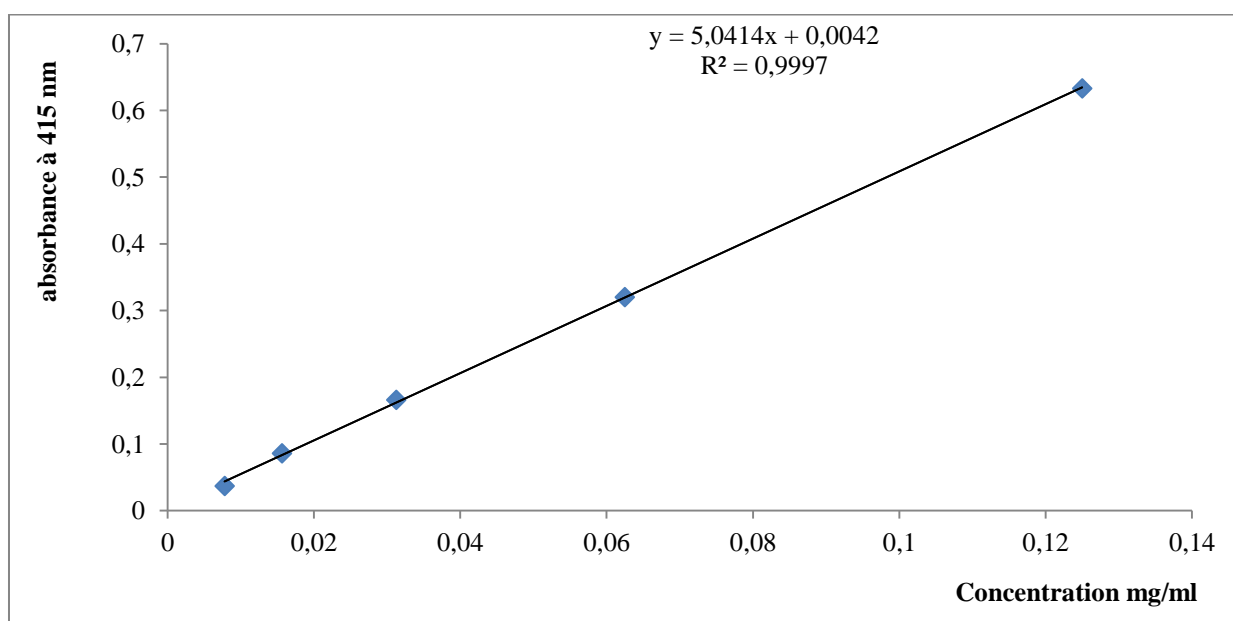
**Figure n° 32** - Taux de polyphénols des extraits de plantes étudiées.

Le dosage de polyphénols chez l'ensemble des plantes révèle que les extraits méthanoliques et éthanoliques montrent des teneurs les plus élevées en polyphénols totaux qui sont de l'ordre de  $231,58 \pm 0,41$  et  $129,96 \pm 0,00$  mg EAG/g MS pour *E. obliqua* Hert.,  $54,92 \pm 0,00$  et  $56,06 \pm 0,82$  mg EAG/g MS pour *P. harmala* L. et  $31,59 \pm 0,04$  et  $37,92 \pm 0,3223$  mg EAG/g MS respectivement (**Figure n° 32**). Cependant, le taux de polyphénols les plus faibles sont enregistrés au niveau des extraits aqueux ( $109,52 \pm 0,16$  pour *E. obliqua* Hert.,  $27,67 \pm 0,00$  pour *M. vulgare* L. et  $21,57 \pm 0,08$  pour *P. harmala* L. D'après ces résultats, l'eucalyptus s'est révélé le plus riche en composés phénoliques par rapport aux autres plantes.

L'analyse de la variance pour le paramètre taux de polyphénols totaux a révélé une différence très hautement significative ( $p < 0,05$ ) (**Annexe n° III**).

#### 6.1.3.4 - Teneur en flavonoïdes

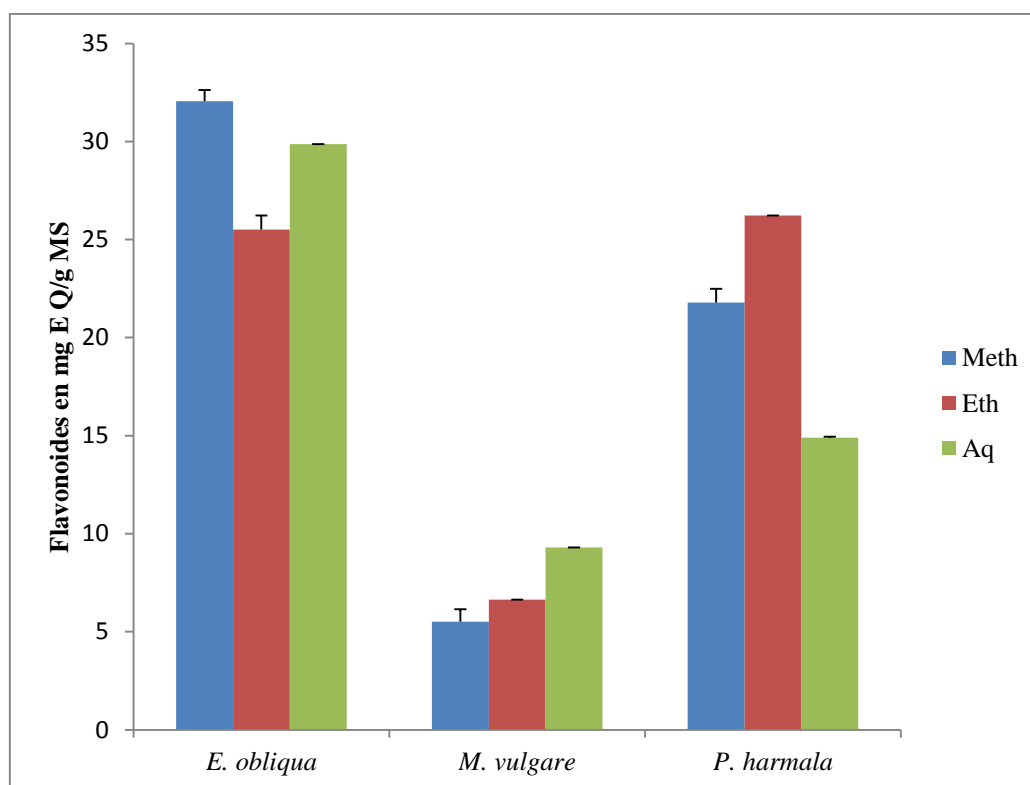
La teneur en flavonoïdes obtenue à partir des trois extraits (méthanolique, éthanolique et aqueux) a été estimée grâce à une courbe d'étalonnage, réalisée avec un extrait de référence qui est la quercétine à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en mg équivalent en quercétine par g de matière sèche (mg EQ/ g MS). La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,99$  (**Figure n° 33**). Cette dernière montre qu'il y a une relation directe entre la concentration en quercétine et l'absorbance.



**Figure n° 33** - Courbe d'étalonnage de la quercétine.



Les résultats de dosage de flavonoïdes des plantes étudiées sont présentés dans la **figure n° 34**.



**Figure n° 34 - Taux de flavonoïdes des extraits des plantes étudiées**

D'après la **figure n° 34**, les résultats de dosage de flavonoïdes montrent que pour l'espèce *E. obliqua* Hert., l'extrait méthanolique a présenté la teneur la plus élevée suivie par l'extrait aqueux et éthanolique ( $32,06 \pm 0,57 > 29,78 \pm 0,75 > 25,5 \pm 0,00$  mg EC/g MS respectivement). Néanmoins, l'extrait aqueux de *M. vulgare* L. s'est révélé le plus riche en flavonoïdes suivi par l'extrait éthanolique et méthanolique ( $9,29 \pm 0,00 > 6,64 \pm 0,00 > 5,51 \pm 0,62$  mg EC/g MS respectivement). Au niveau de l'extrait éthanolique de *P. harmala* L., on a constaté le plus grand taux de ces composés bioactifs pour cette plante avec une valeur de  $26,23 \pm 0,00$  mg EC/g MS. L'extrait méthanolique a présenté une teneur de  $21,79 \pm 0,69$  mg EC/g MS. Le rendement le plus faible est enregistré au niveau l'extrait aqueux ( $14,90 \pm 0,05$  mg EC/g MS).

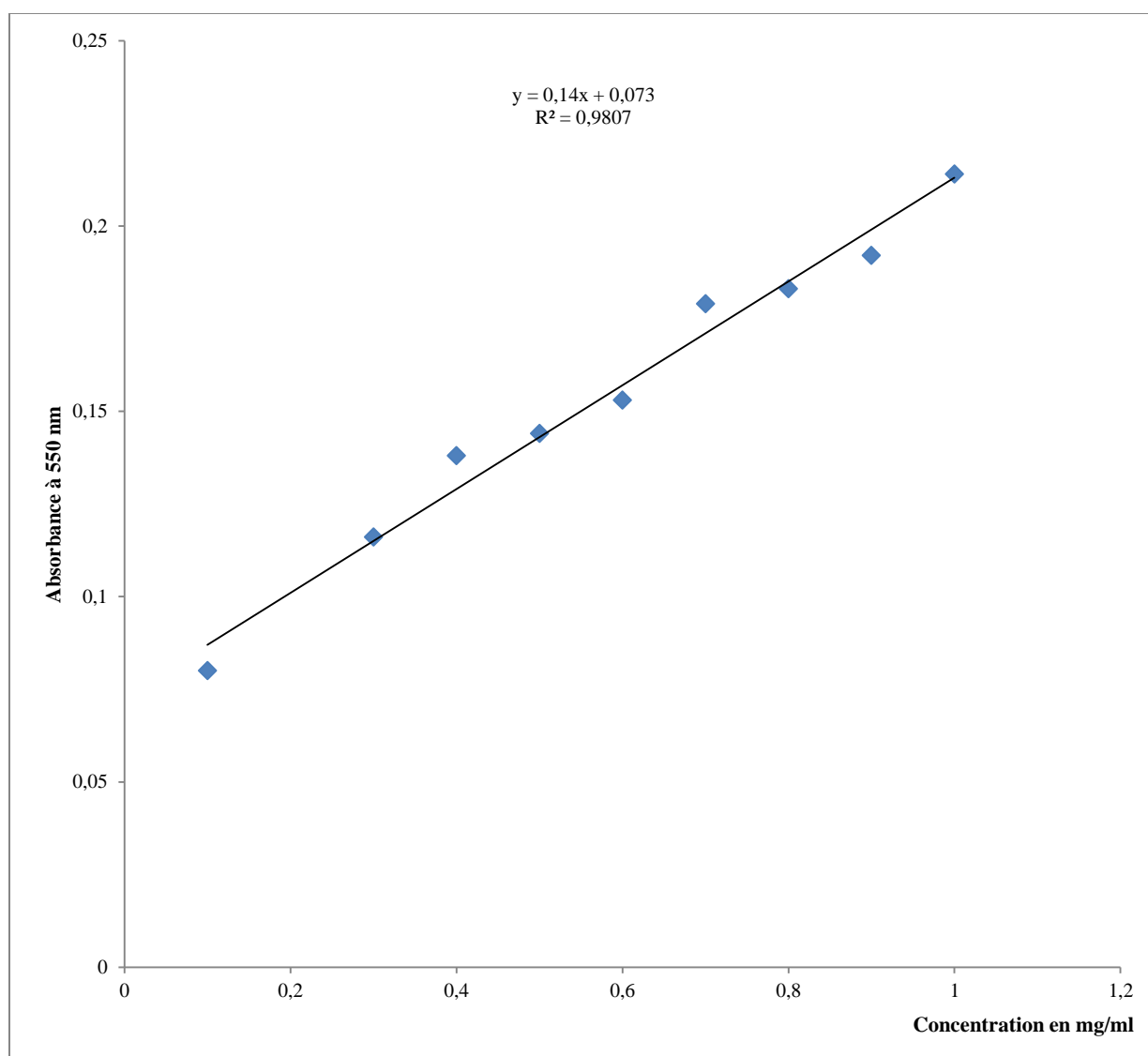
D'après ces résultats, on déduit que le contenu flavonoïque dans les extraits examinés, dépend de la polarité du solvant utilisé pour l'extraction.

L'analyse de la variance de la teneur en flavonoïdes a révélé une différence très hautement significative ( $p < 0,05$ ) (**Annexe n° IV**).

### 6.1.3.5 -Tanins condensés

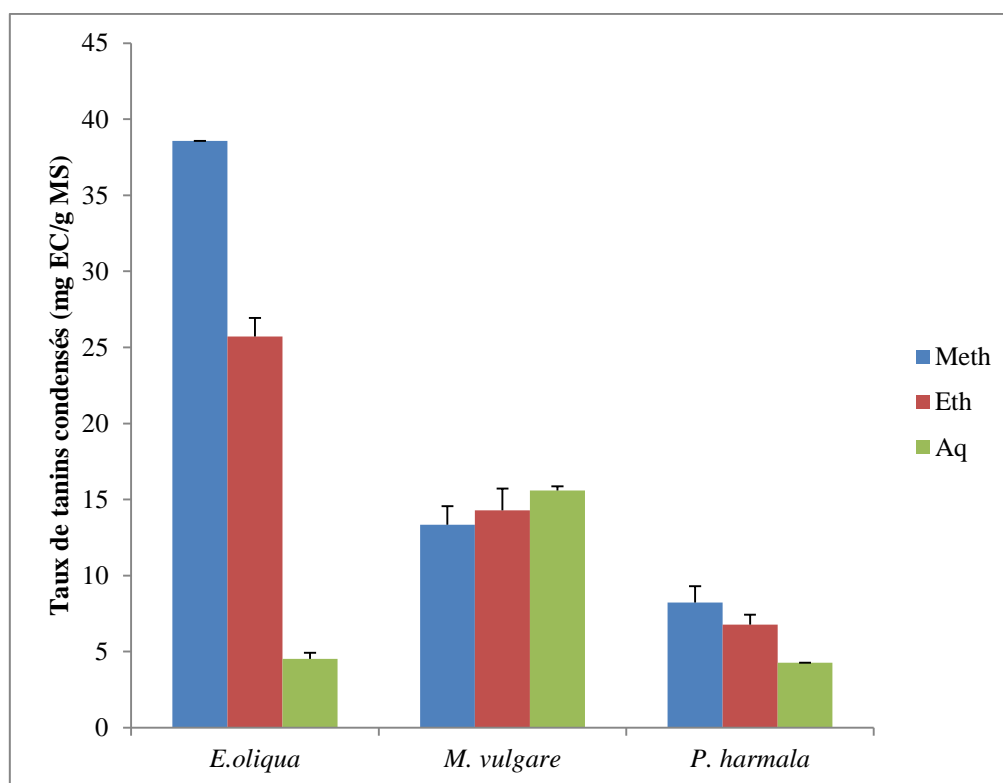
La teneur en tanins condensés obtenue à partir des trois extraits (méthanolique, éthanolique et aqueux) a été estimée grâce à une courbe d'étalonnage réalisée avec un extrait de référence qui est le catéchol à différentes concentrations.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent en catéchol par g de matière sèche (mg EQ/g MS). La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,98$  (**Figure n° 35**). D'après cette courbe, il s'avère que tout en augmentant la concentration en catéchol, l'absorbance remonte en valeur.



**Figure n° 35** - Courbe d'étalonnage du Catéchol

Les résultats du dosage des tanins condensés sont présentés dans la **figure n° 36**.



**Figure n° 36** - Taux de tanins condensés des extraits des plantes étudiées.

Ce dosage a révélé des taux notables et variables en tanins condensés. Les taux les plus élevés de tanins se rencontrent dans les extraits méthanoliques et éthanoliques des espèces *E. obliqua* Hert. ( $38,70 \pm 0,00$  et  $25,71 \pm 1,23$  mg EQ/ g MS respectivement) et *P. harmala* L. ( $8,22 \pm 1,07$  et  $6,77 \pm 0,66$  mg EQ/ g MS respectivement). L'extrait aqueux de ces deux plantes a présenté les teneurs les plus faibles de l'ordre de  $4,52 \pm 0,41$  mg EQ/ g MS pour *E. obliqua* Hert. et  $4,26 \pm 0,02$  mg EQ/ g MS. Tandis que la plus importante teneur en tanins condensés pour *M. vulgare* L. a été mesurée dans l'extrait aqueux suivi par l'extrait éthanolique et méthanolique ( $15,59 \pm 0,27$  ;  $14,28 \pm 1,41$  ;  $13,33 \pm 1,09$  mg EQ/ g MS respectivement).

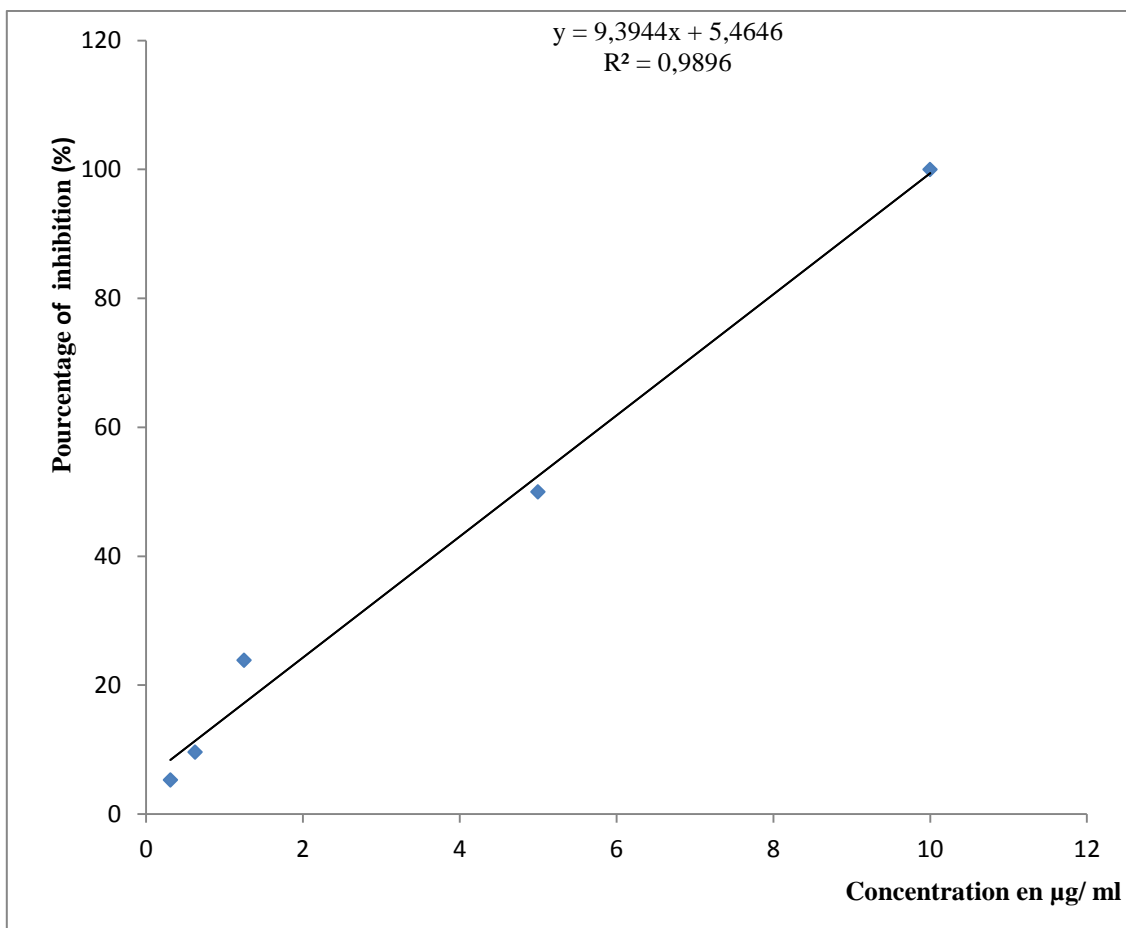
L'analyse de la variance du paramètre teneur en tanins condensés des extraits a montré une différence non significative ( $P > 0,05$ ) (**Annexe n° V**).

#### 6.1.4 - Evaluation des activités biologiques

Les activités biologiques étudiées *in vitro* sont : l'activité antioxydante, l'activité antibactérienne et l'activité antifongique.

### 6.1.4.1 - Activité antioxydante par piégeage du radical libre DPPH

Les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH enregistrés par l'acide ascorbique et les différents extraits des plantes sont représentés par les **figures n° 37, 38, 39 et 40**.



**Figure n° 37** - Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'acide ascorbique.

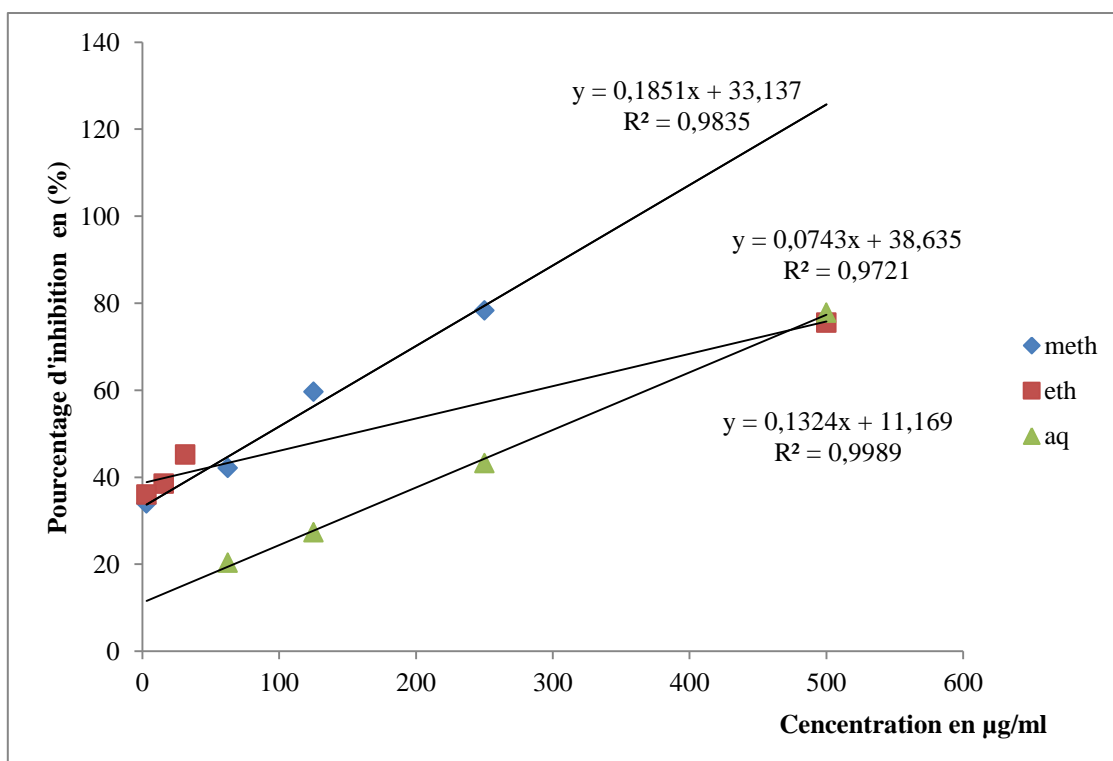


Figure n° 38 - Pourcentages d'inhibition de DPPH par les extraits d'*E. obliqua* Hert.

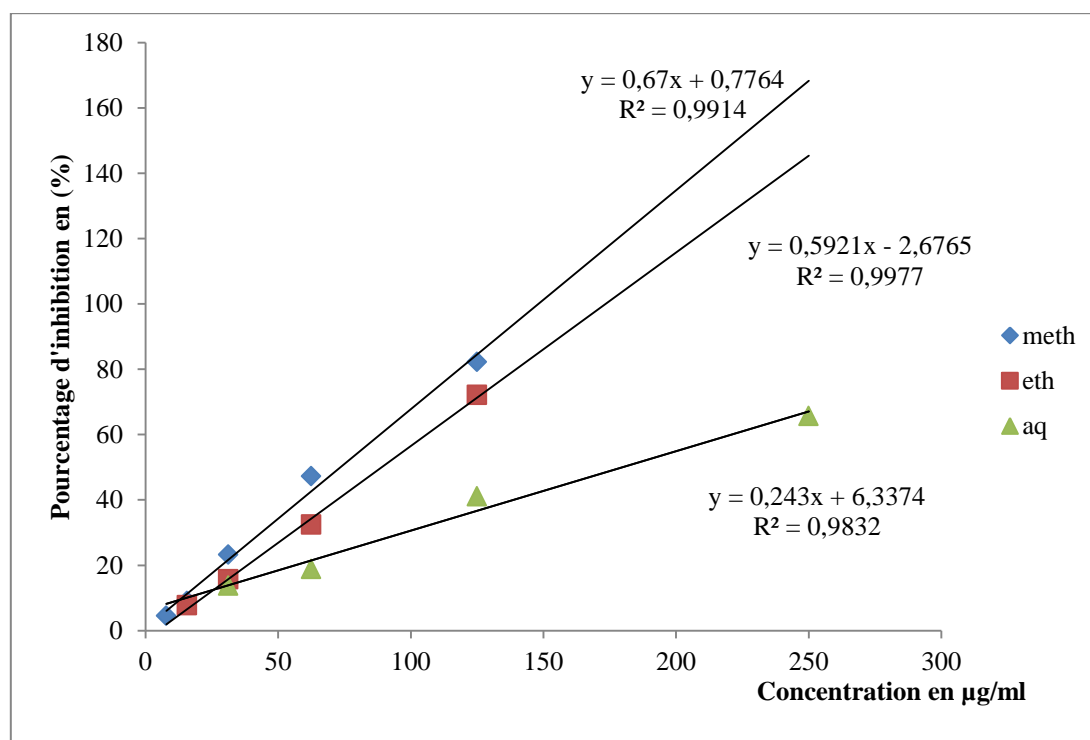
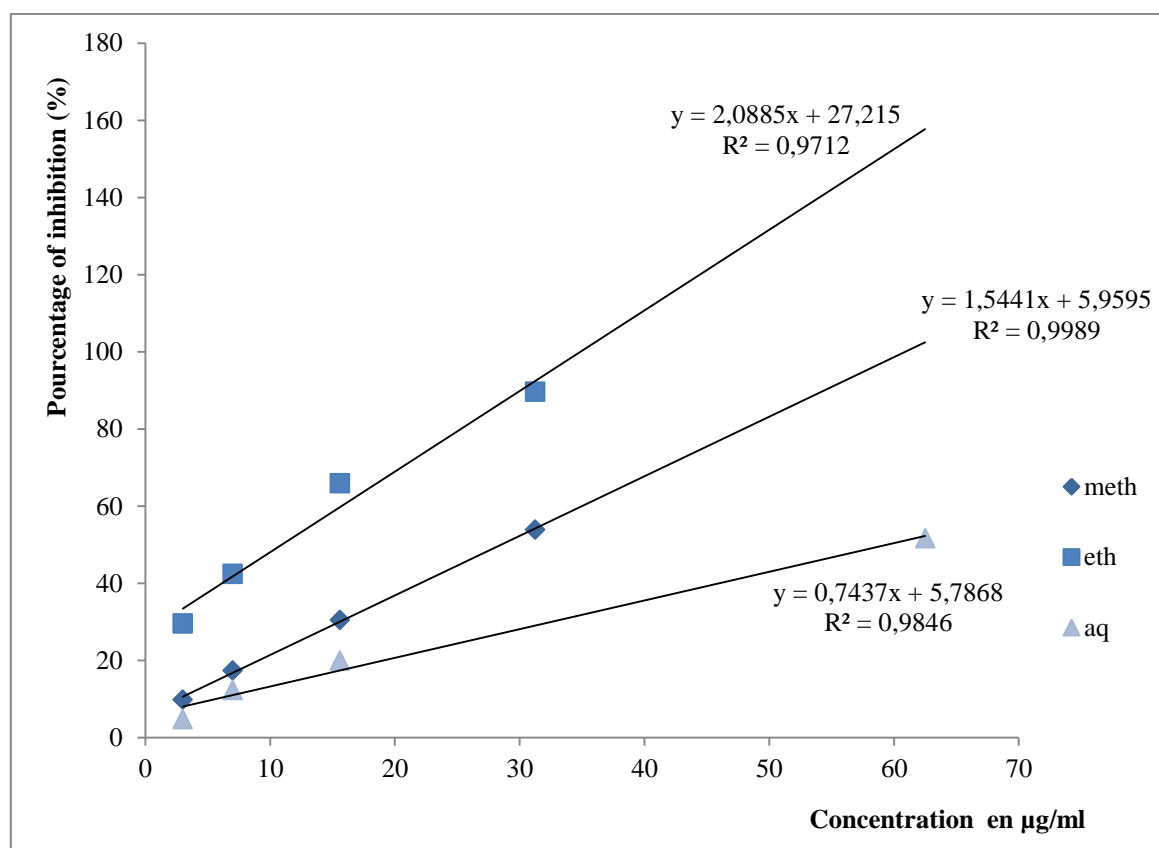


Figure n° 39 - Pourcentages d'inhibition de DPPH par les extraits de *P. harmala* L.



**Figure n° 40** - Pourcentages d'inhibition de DPPH par les extraits de *M. vulgare* L.

D'après les résultats obtenus, on remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration. Les taux d'inhibition du DPPH enregistrés en présence des différents extraits de la plante sont inférieurs à ceux de l'acide ascorbique (**Figure n° 37**). L'extrait méthanolique semble avoir une activité antioxydante meilleure que celle provoquée par l'extrait éthanolique et aqueux chez les trois espèces végétales (**Figures n° 38, 39 et 40**). Cependant, les extraits aqueux sont moins efficaces dans l'élimination des radicaux libres pour l'ensemble des plantes étudiées.

La concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du DPPH radicalaire (IC50), a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculés en fonction de différentes concentrations d'extraits préparés. IC50 est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Les IC50 des extraits analysés sont indiquées dans le **tableau n° 09**.

**Tableau n° 09** - Valeurs des IC50 des différents extraits des plantes étudiées.

Plante Extrait	<i>E. obliqua</i> Hert.	<i>M. vulgare</i> L.	<i>P. harmala</i> L.
E. meth	91,18±0,004 µg/ml	10,86±0,005 µg/ml	73,46±0,005 µg/ml
E. eth	153,64±0,02 µg/ml	26,66±0,015 µg/ml	88,97 ± 0,02 µg/ml
E. aq	294,24±0,002 µg/ml	58 ± 0,017 µg/ml	179,68±0,005 µg/ml

L'ensemble des extraits révèle des propriétés antiradicalaires intéressantes (notamment l'extrait méthanolique) qui se manifestent par des faibles valeurs d'IC50. L'extrait méthanolique de *M. vulgare* L. a enregistré le pouvoir antioxydant le plus élevé (IC50 = 10,86±0,005 µg/ml qui se rapproche de celui de l'acide ascorbique (IC50 = 4,74±0,00 µg/ml). L'analyse de la variance des IC50 des extraits a révélé une différence non significative ( $p > 0,05$ ) (**Annexe n° VI**).

#### 6.1.4.2 - Activité antibactérienne

##### 6.1.4.2.1 - Effet des extraits sur les souches bactériennes

Les résultats des différents tests réalisés avec les souches bactériennes utilisées vis-à-vis des différents extraits sont regroupés dans le **tableau n° 10** et la **figure n°41**.

**Tableau n°10** - Activité antibactérienne des extraits de plantes étudiées sur milieu Mueller-Hinton (mm).

		BS	ML	PA	EC	EA
<i>E. obliqua</i> Hert.	Meth	9,68 ±0,40	8,43 ±0,60	9,90±0,97	0 ±0,00	9,18 ±0,74
	Eth	10,73 ±0,78	9,27±0,51	10,4 ±2,69	0±0,00	10,6±0,87
	Aq	9,07±0,47	9,44±0,20	13,6±0,0	0 ±0,00	9,16±0,38
<i>M. vulgare</i> L.	Meth	8,80±1,41	7,3±0,68	10,04±0,44	0±0,00	9,24±0,34
	Eth	8,2±1,31	8,61±1,35	10,27±0,27	0±0,00	9,12±0,77
	Aq	8,18±0,90	6,16±0,16	9,16±0,43	0±0,00	9,27±1,07
<i>P. harmala</i> L.	Meth	8,42±1,70	7,41±0,41	7,78±0,65	0±0,00	7,68±0,07
	Eth	8,97±1,05	7,99±1,40	8,98±0,47	0±0,00	9,24±0,32
	Aq	8,18±0,90	8,9±0,14	9,06±1,51	0±0,00	8,71±1,56

Les valeurs représentent la moyenne ± écart type (n=3)

BS :*Bacillus subtilis* ATCC 6633, ML : *Micrococcus luteus* ATCC 14452, PA :*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, EC : *Erwinia carotovora*, EA : *Erwinia amylovora*. meth : méthanolique ; eth : éthanolique ; aq : aqueux.

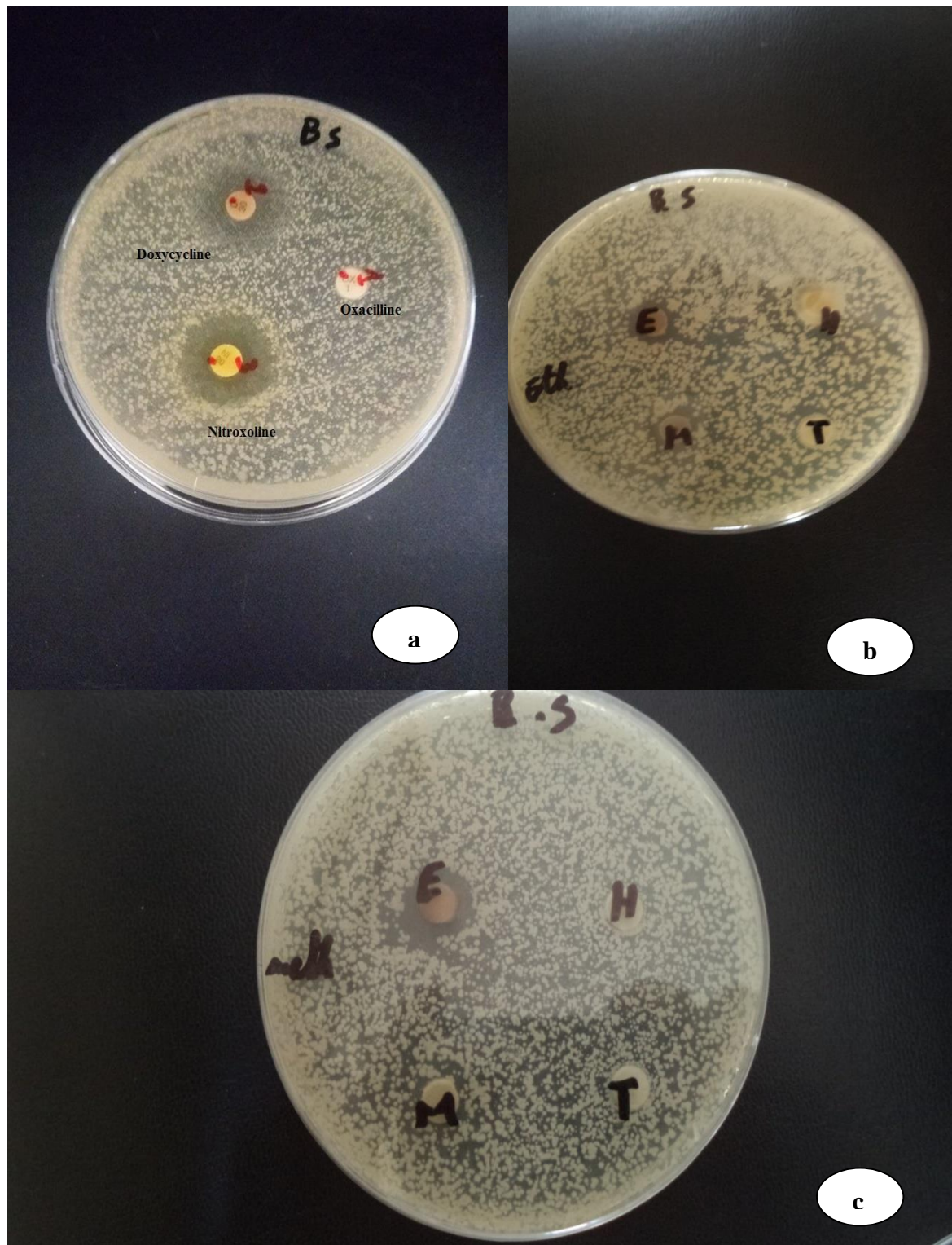
Les diamètres d'inhibition enregistrés par les trois antibiotiques sont mis en évidence par le **tableau n° 11**.

**Tableau n° 11** - Activités antibactérienne des antibiotiques utilisés comme standards en mm

Souches Antibiotiques	BS	ML	PS	EC	EA
Oxacillne	0 ±0,00	0 ±0,00	0 ±0,00	0 ±0,00	0 ±0,00
Doxycycline	17 ±1,73	16,33±0,57	17 ±1,73	18,66 ± 1,52	19,66 ±0,57
Nitroxoline	18,66±2,30	20 ±0,0	20,66 ±0,57	19 ± 2,64	20 ±0,00

Les valeurs représentent la moyenne, ± écart type (n=3)





**Figure n° 41** - Effets des trois antibiotiques et des extraits méthanoliques et éthanoliques plantes sur la souche bactérienne *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **a** : antibiotiques ; **b** : extrait éthanolique ; **c** : extrait méthanolique. B.S : *Bacillus subtilis*. E : *E. obliqua* Hert.; H : *P. harmala* L.; M : *M. vulgare* L. T : témoin négatif (Moulay,2019).

Les tableaux montrent qu'il y a une variabilité dans les résultats obtenus. Les souches bactériennes utilisées ont réagi plus ou moins bien selon la nature des extraits végétaux, les diamètres des zones d'inhibition sont compris entre  $6,16 \pm 0,16$  et  $13,6 \pm 0,00$  mm. La souche *Erwinia carotovora* semble être résistante à l'ensemble des extraits végétaux ( $0 \pm 0,00$  mm). Toutes les souches bactériennes utilisées révèlent une résistance à l'antibiotique Oxacilline ( $0 \pm 0,00$  mm) et une sensibilité aux deux autres antibiotiques (entre  $16,33 \pm 0,57$  et  $19,66 \pm 0,57$  mm pour le Doxycycline ; entre  $18,66 \pm 2,30$  et  $20 \pm 0,00$  pour le Nitroxoline).

Les résultats obtenus confirment l'efficacité de certains extraits des plantes médicinales étudiées et leur pouvoir antiseptique. L'extrait éthanolique d'*E. obliqua* Hert. s'est révélé actif contre les souches bactériennes : *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Erwinia amylovora* avec un diamètre d'inhibition supérieur à 10 mm. De même, *Pseudomonas aeruginosa* a présenté une sensibilité aux extraits méthanoliques et éthanoliques de *M. vulgare* L. ( $10,04 \pm 0,44$  mm et  $10,27 \pm 0,27$  mm respectivement) et aussi à l'extrait aqueux d'*E. obliqua* Hert. ( $13,6 \pm 0,0$  mm).

#### **6.1.4.2.2 - Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales bactéricides (CMB)**

Selon **Bouabdelli et al. (2016)**, l'activité bactéricide est basée sur la valeur du rapport CMB/CMI. Si  $CMB/CMI < 2$  on dit que l'extrait a une activité bactéricide;  $MBC/MIC > 2$ : Bacteriostatique;  $MBC/MIC \geq 32$ : la souche est résistante à l'extrait. Donc on doit conclure que la plus part des extraits utilisés possèdent une activité bactériostatique (**Tableau n° 12**).

**Tableau n°12** - Concentrations minimales inhibitrices et concentrations minimales bactéricides des extraits.

Plante	Extrait	CMI et CMB	BS	ML	PS	EC	EA
<i>E. obliqua</i>	meth	CMI	25	25	50	25	25
		CMB	50	50	-	50	50
	Eth	CMI	12,5	12,5	12,5	25	25
		CMB	25	25	25	50	50
	Aq	CMI	6,25	25	12,5	25	25
		CMB	12,5	50	25	50	50
<i>M. vulgare</i> <i>L.</i>	meth	CMI	-	-	-	-	-
		CMB	-	-	-	-	-
	Eth	CMI	50	25	-	50	50
		CMB	-	50	-	-	-
	Aq	CMI	25	50	25	50	25
		CMB	50	-	50	-	50
<i>P. harmala</i>	meth	CMI	12,5	25	12,5	25	25
		CMB	25	50	25	50	50
	Eth	CMI	12,5	12,5	25	12,5	12,5
		CMB	25	25	50	25	25
	Aq	CMI	25	25	25	25	25
		CMB	50	50	50	50	50

- : Non identifié

#### 6.1.4.3 - Activité antifongique *in vitro*

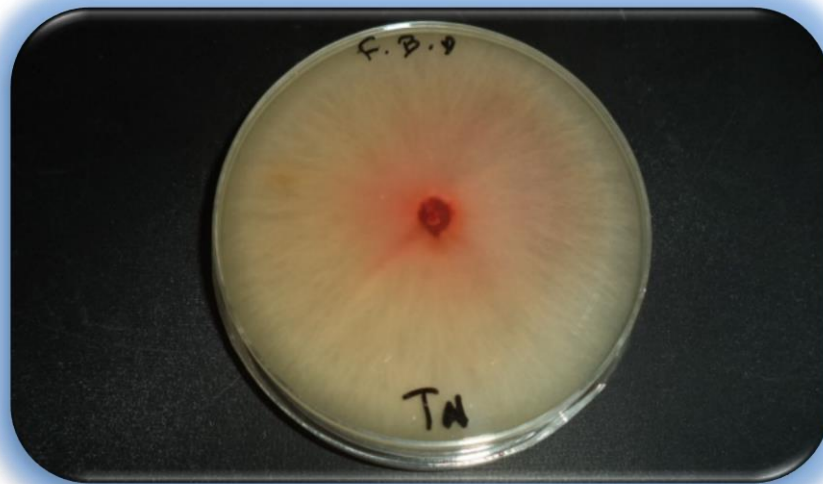
##### 6.1.4.3.1 - Identification morphologique des souches de *Fusarium sp.*

Conventionnellement, l'identification des genres fongiques repose sur l'identification de critères morphologiques ; d'une part par l'observation macroscopique du mycélium, et d'autre par l'observation microscopique des structures reproductrices. En se basant sur la description des espèces du genre *Fusarium* établie par **Leslie et Summerell (2006)** et **Tivoli (1988)** sur le milieu PDA, on a opté à identifier les trois souches fongique comme suit :

#### 6.1.4.3.1.1 - Souche 01 *Fusarium culmorum*

##### ✚ Observation macroscopique

Cette souche isolée à partir du blé se développe rapidement et produit des sporodochies abondantes dans une grande masse de spores centrale (1 à 2 cm de diamètre), initialement orange pâle mais qui devient brune à brun foncé avec l'âge (**Figure n° 42**).



**Figure n° 42** - Colonie mycélienne de *F. culmorum* montrant une coloration orange pâle (**Moulay, 2019**).

##### ✚ Observation microscopique

1) **Macroconidies** : Morphologie générale: Robuste, relativement court et parois épaisses. La face dorsale est quelque peu incurvée, mais la face ventrale est presque droite. Assez large par rapport à la longueur (**Figure n° 43**).

- Morphologie des cellules apicales: arrondies et émoussées.
- Morphologie des cellules basales: entaillées et sans forme de pied distincte.
- Nombre de septa: généralement 3 ou 4 cloisons.
- Abondance: Habituellement abondante dans les sporodochies. Ces macroconidies sont généralement de forme et de taille uniformes.

2) **Microconidies** : elles sont absentes.

3) **Chlamydospores** : elles sont abondantes.

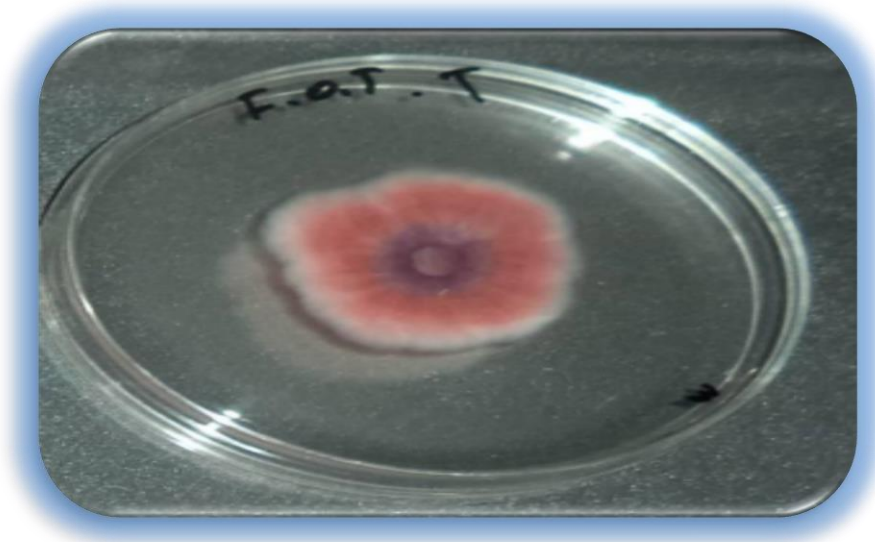


**Figure n° 43** - Macroconidies de *F. culmorum* sous microscope optique (10 x 40)  
(Moulay,2019).

#### 6.1.4.3.1.2 - Souche 02 *Fusarium oxysporum*

##### ✚ Observation macroscopique

La morphologie des colonies sur PDA varie largement. Les mycéliums peuvent être floconneux, clairsemés ou abondants et varient en couleur du blanc au violet pâle (**Figure n° 44**).



**Figure n° 44** - Colonie mycélienne de *F. oxysporum* montrant une coloration violet pâle (Moulay, 2019).



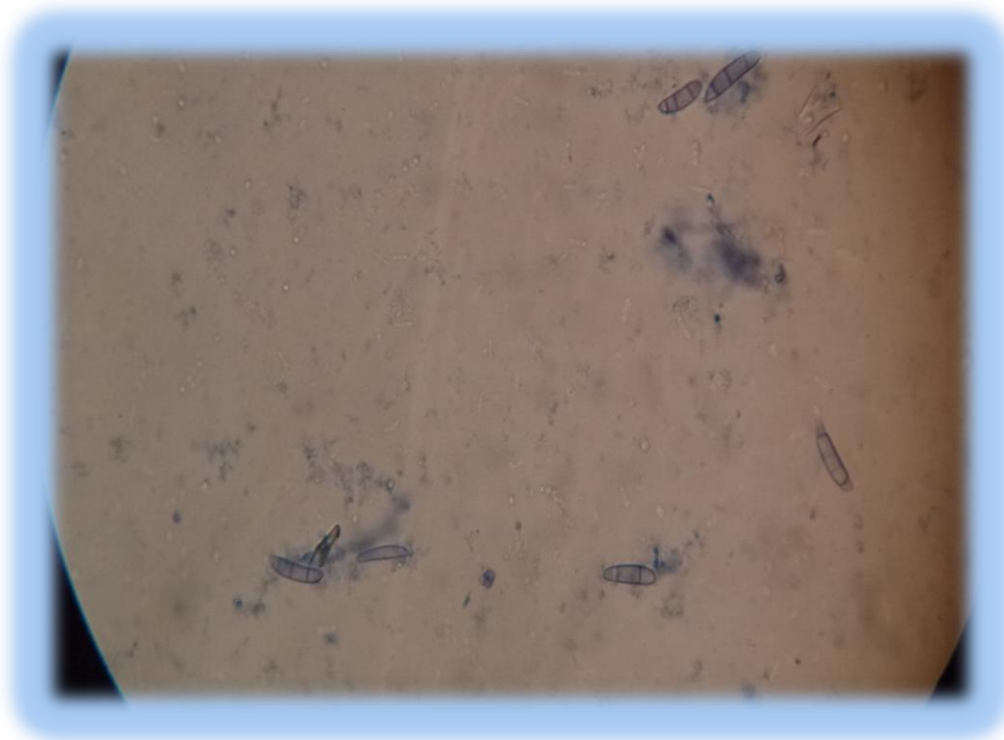
### ✚ Observation microscopique

1) **Macroconidies** : Des macroconidies abondantes orange pâle ou violet pâle sont produites dans une masse de spores centrale chez certains isolats (**Figure n° 45**). De petits sclérotés brun pâle, bleus à bleu-noir ou violets peuvent être produits en abondance par certains isolats.

- Morphologie générale: courte à moyenne, droite à légèrement incurvé, relativement élancé et à parois minces.
- Morphologie des cellules apicales: effilées et courbes, parfois avec un léger crochet.
- Morphologie des cellules basales: pied en forme pointue.
- Nombre de septa: généralement 3 cloisonnés.

2) **Microconidies** : Elles sont abondantes et de forme ovale.

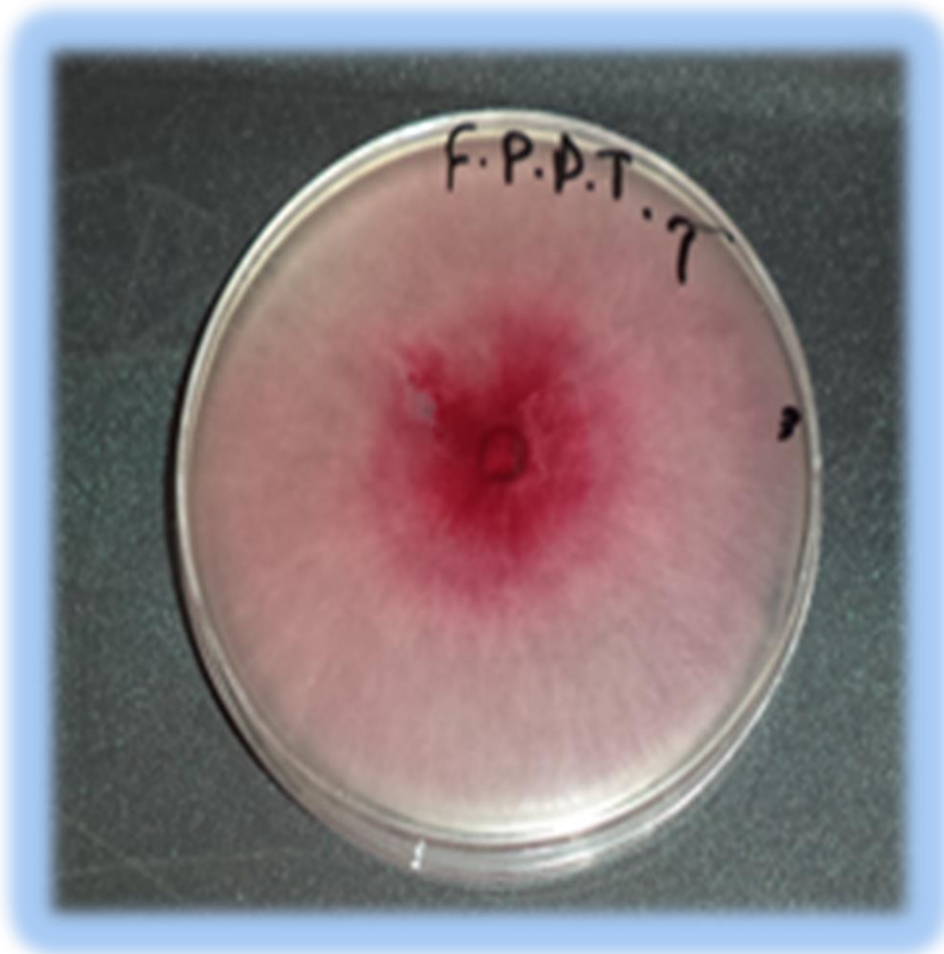
3) **Chlamydo-spores** : Elles sont abondantes avec une forme ovale et généralement non cloisonné.



**Figure n° 45** - Macroconidies de *F. oxysporum* sous microscope optique (10 x 40)  
(Moulay, 2019).

**6.1.4.3.1.3 - Souche 03 *Fusarium roseum*****+ Observation macroscopique**

Le long du mycélium situé au contact de la gélose, se développent, dès le 4<sup>ème</sup> jour après l'isolement des sporodochies de couleur rose saumon, très rapprochées les unes des autres, qui donnent à la colonie un aspect gras et une couleur d'ensemble rosée (Figure n° 46).



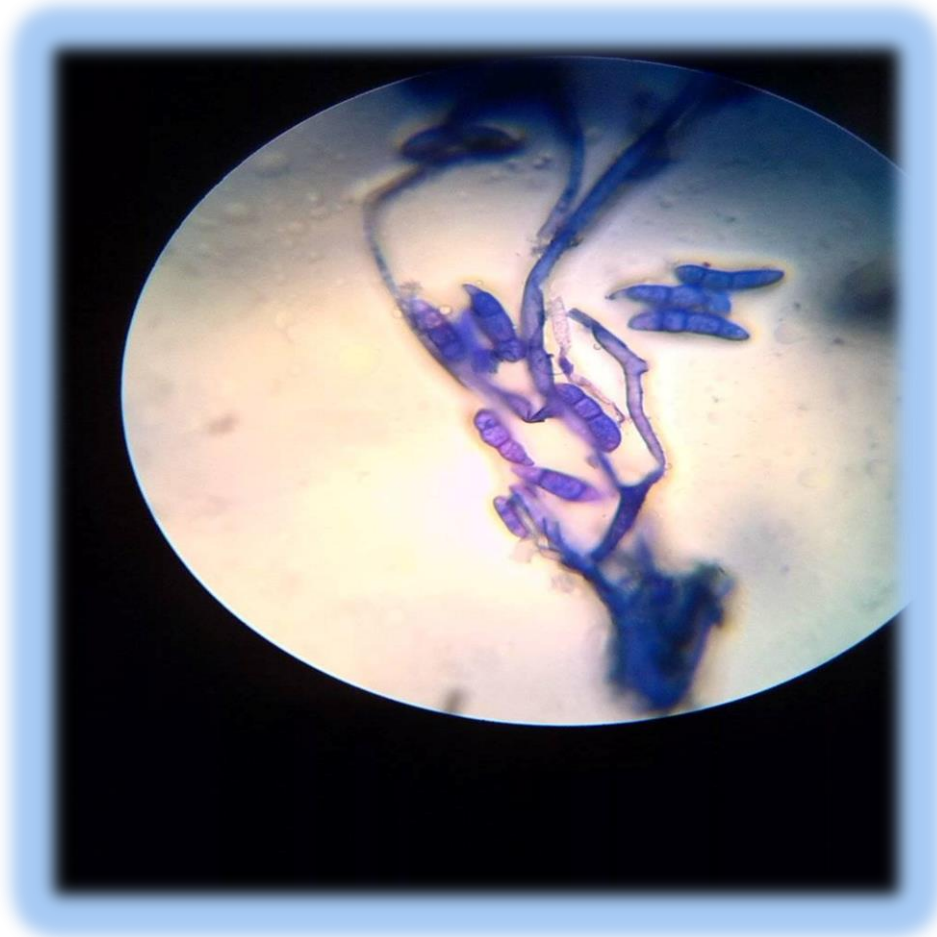
**Figure n° 46** - Colonie mycélienne de *F. roseum* montrant une coloration rosée (Moulay, 2019).

**+ Observation microscopique**

1) **Macroconidies** : Ce champignon possède uniquement des macroconidies courtes, caractérisées par des extrémités anguleuses, brutalement pointues (Figure n° 47).

2) **Microconidies** : Elles sont absentes.

3) **Chlamydospores** : Ce champignon possède, par ailleurs, de très nombreuses chlamydospores intercalaires situées dans les hyphes. Elles sont globuleuses, parfois uniques mais disposées souvent en chaînettes ou en groupes imbriqués de 2 ou 3.



**Figure n° 47** - Macroconidies de *F. oxysporum* sous microscope optique (10 x 40)  
(Moulay, 2019).

#### 6.1.4.3.2 - Effet des extraits sur les souches *F. culmorum*, *F. oxysporum* et *F. roseum in vitro*

Les résultats de l'effet des différents extraits sur les souches fongiques utilisées sont mis en évidence par les **figures n° 48,49** et **50**.



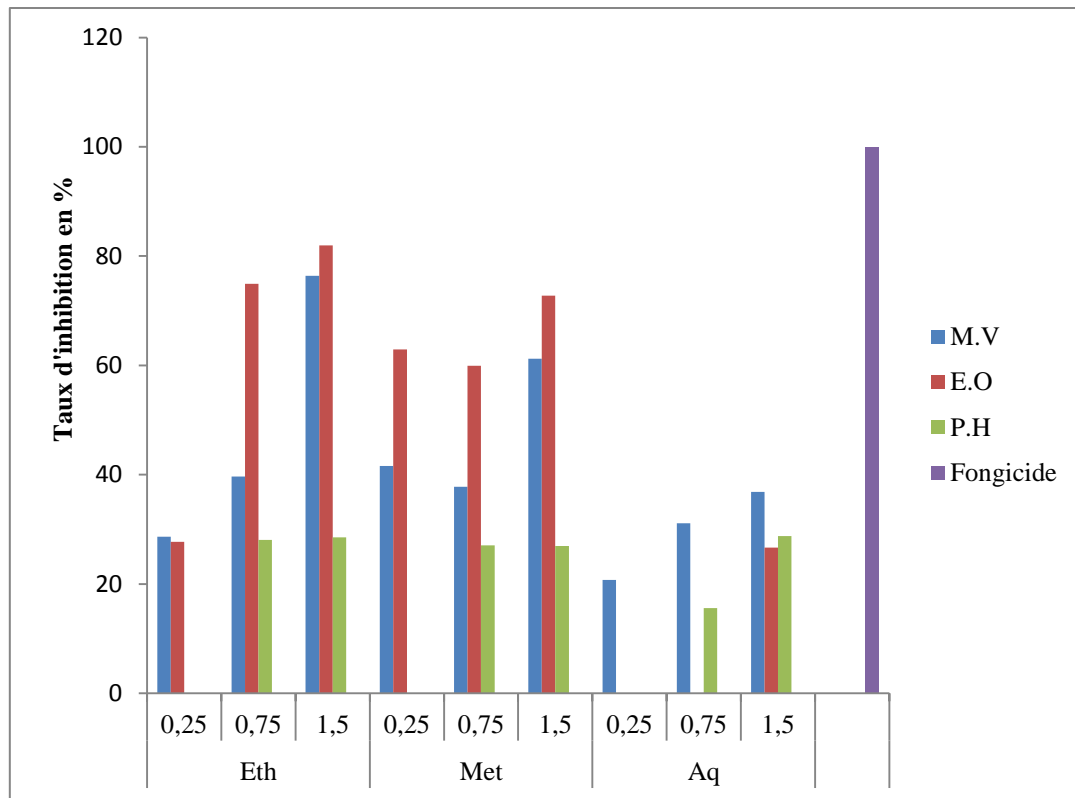


Figure n° 48 - Effet des extraits sur la souche de *F. culmorum*

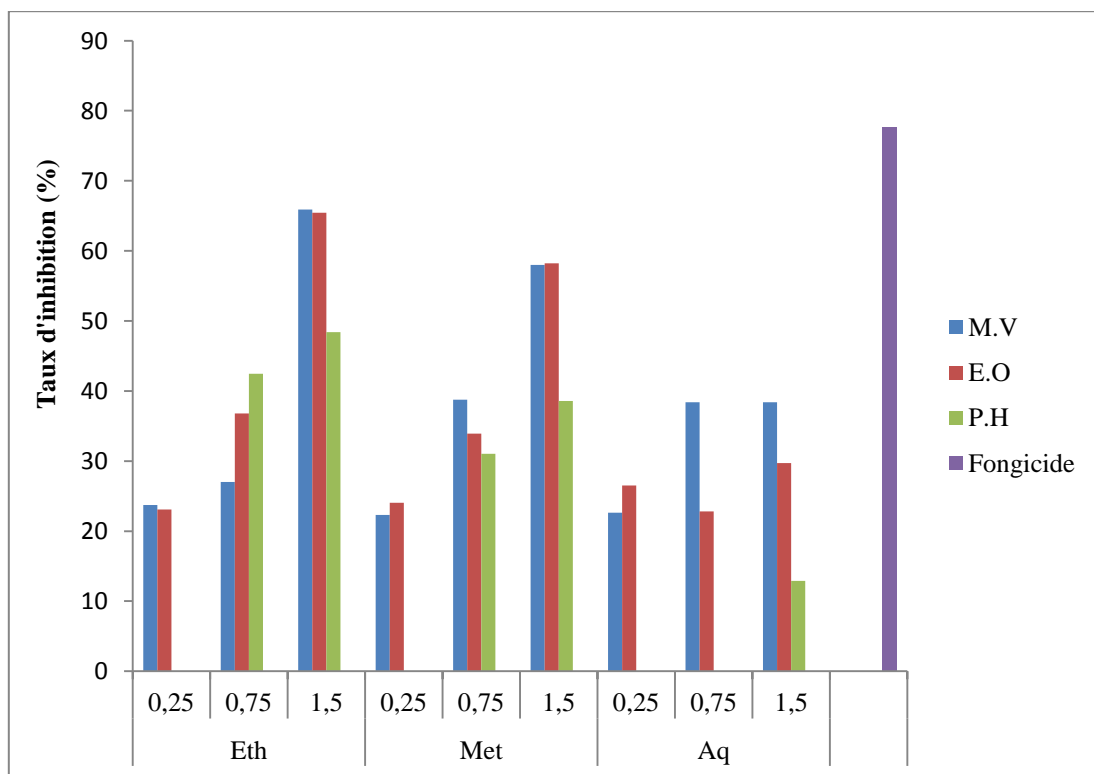
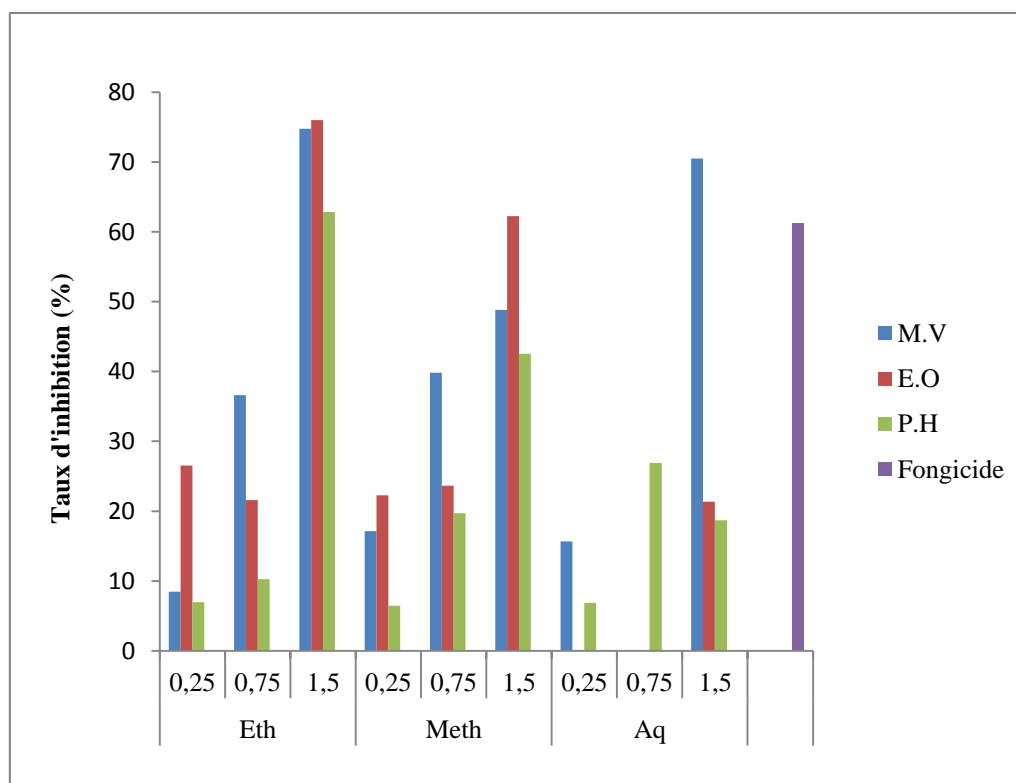


Figure n° 49 - Effet des extraits sur la souche de *F. oxysporum*



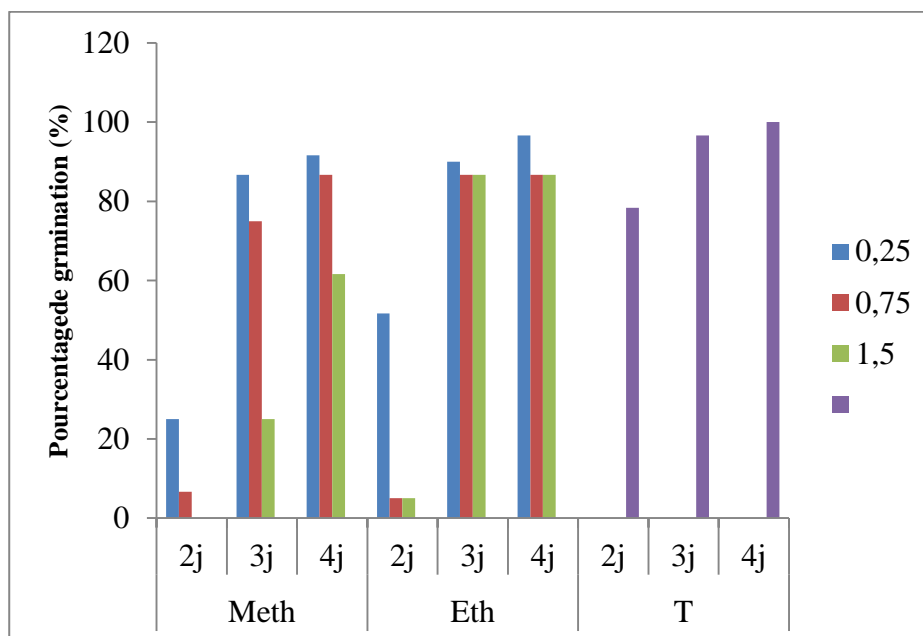
**Figure n° 50** - Effet des extraits sur la souche de *Fusarium roseum*

Les extraits éthanoliques et méthanoliques se sont révélés les plus actifs contre les trois souches fongiques par rapport aux extraits aqueux chez l'ensemble des plantes étudiées. Les extraits hydroalcoliques d'*E. obliqua* Hert.(1,5 et 0,75% (m/v)) et de *M. vulgare* L. (1,5%(m/v)) ont enregistré les pourcentages d'inhibition les plus élevés qui sont supérieurs à 50% contre *F. culmorum* et *F. oxysporum* (**Annexes n° XXI, XXII, XXIII, XXIV**). L'extrait éthanolique d'*E. obliqua* Hert. (1,5% (m/v)) a montré le taux d'inhibition le plus élevé qui est égal à  $81,98 \pm 0,57\%$  contre *F. culmorum*,  $65,88 \pm 0,57\%$  contre *F. oxysporum* et  $76,01 \pm 0,71\%$  vis à vis *F. roseum* comparativement au reste des extraits de plantes (**Figures n° 48, 49 et 50**). Les extraits de *P. harmala* L.se sont avérés les moins actifs contre les deux souches fongiques avec des pourcentages qui n'ont pas dépassé le seuil de  $28,74 \pm 1,39\%$ ,  $48,40 \pm 0,56\%$  et  $42,52 \pm 0,55\%$  pour le *F. culmorum* et *F. oxysporum* respectivement et à l'exception, l'extrait éthanolique à la concentration 1,5% (m/v) a inhibé la croissance mycélienne de *F. roseum* à  $70,49 \pm 1,31\%$ . Cependant, le fongicide utilisé (Tachigazole) a inhibé complètement la croissance de *F. culmorum* ( $100 \pm 0,00\%$ ). Ce dernier a montré des pourcentages d'inhibition de  $77,64 \pm 1,17$  et  $61,17 \pm 0,30\%$  contre *F. oxysporum* et *F. roseum* respectivement.

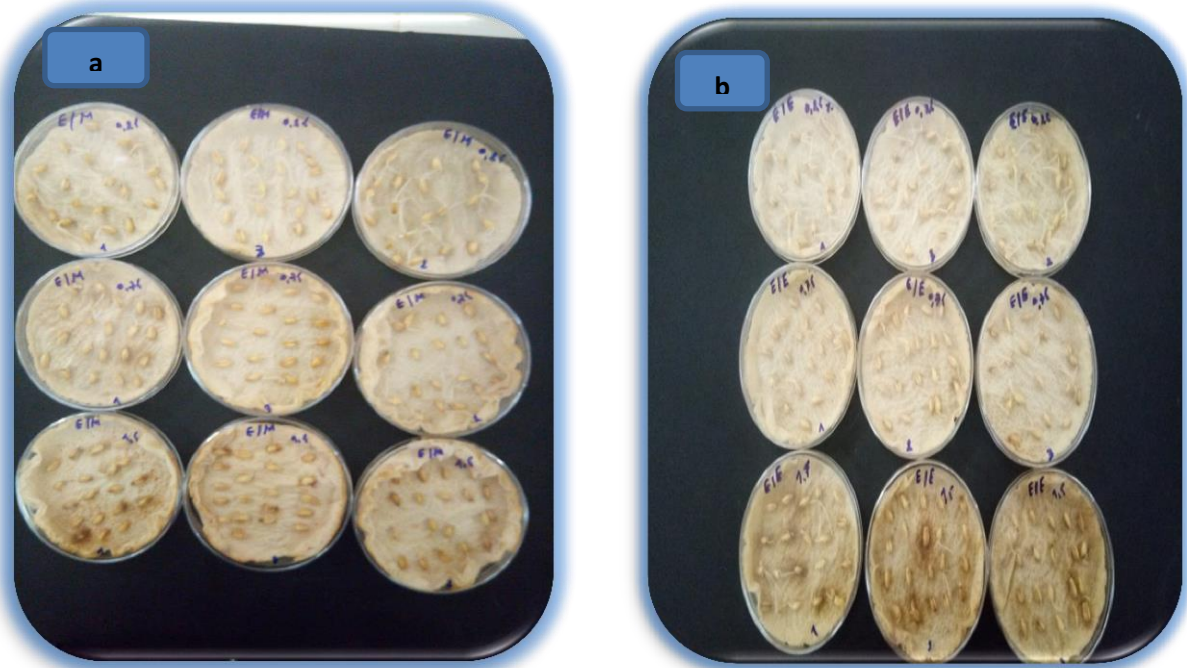
L'analyse de la variance de l'effet des différentes concentrations et différents types d'extrait sur l'inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques a révélé une différence très hautement significative pour le facteur concentration pour l'ensemble des souches (**Annexes n° VII, IX et XI**). Pour le facteur extrait, l'analyse de la variance a montré une différence très hautement significative pour *F. culmorum* et une différence non significative des extraits sur les taux d'inhibition de *F. oxysporum* et *F. roseum* (**Annexes n° VIII, X et XII**).

#### 6.1.4.4 - Effet des extraits éthanoliques et méthanoliques d'*E. obliqua* Hert. sur la germination des graines du blé dur (var. vitron)

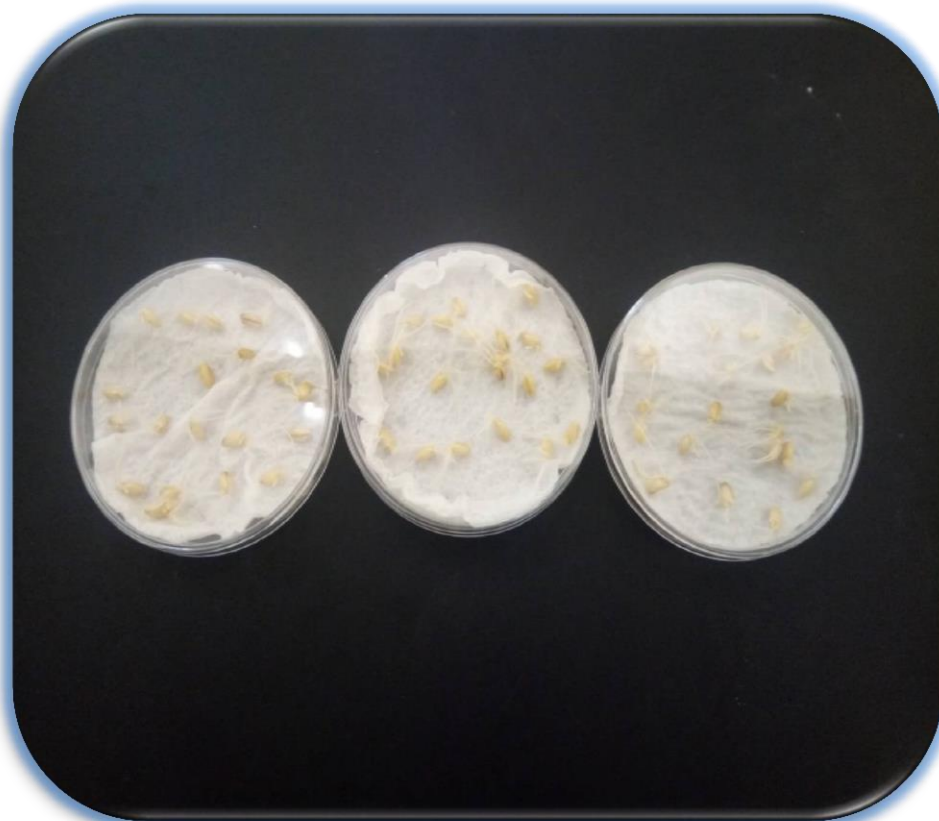
À la lumière des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne importants contre la souche *F. culmorum* *in vitro* enregistré par les extraits éthanoliques et méthanoliques d'*E. obliqua* Hert., on a opté à tester cette activité *in vivo* en commençant par étudier cet effet sur la germination des graines comme étape de départ pour ce test. Les résultats obtenus sont présentés dans les **figures n° 51, 52 et 53**.



**Figure n° 51** - Pourcentages de germination des graines de blé traitées par l'extrait méthanolique et éthanolique d'*E. obliqua* Hert.



**Figure n° 52** - Test de germination des graines de blé traitées par l'extrait méthanolique et éthanolique d'*E. obliqua* Hert. a: méthanolique b : éthanolique



**Figure n° 53** - Test de germination des graines de blé non traitées (Témoin négatif).

Les résultats ont montré que le pourcentage de germination augmente avec le temps au niveau des graines traitées et de témoin. La concentration 0,25% (m/v) a enregistré les taux de germination les plus élevés pour les deux extraits comparativement aux autres concentrations au 4<sup>ème</sup> jour (91,66 % et 96,66 % pour l'extrait méthanolique et éthanolique respectivement). Lorsque la concentration des extraits a augmenté, le pourcentage de germination a diminué. L'extrait méthanolique et éthanolique ont révélé des taux de 86,66%, 61,66% et 86,66 % respectivement pour les concentrations (0,75 et 1,5 % (m/v)) (**Figures n° 51 et 52**). Le témoin négatif a révélé un taux de germination de 100% (**Figure n° 53**).

L'analyse de la variance de l'effet des différentes concentrations des extraits étudiés sur les pourcentages de germination des graines a avéré une différence significative pour le facteur concentration et une différence non significative pour le facteur extrait (**Annexes n° XIII et XIV**). Le pourcentage de germination des graines n'a pas été significativement différent de celui du témoin non traité.

#### **6.1.4.5 - Test de l'activité antifongique de l'extrait méthanolique et éthanolique d'*E. obliqua* Hert. contre *Fusarium culmorum* in vivo**

##### **6.1.4.5.1 - Effet des extraits sur les paramètres de développement des plantules**

Les résultats de l'effet de l'extrait méthanolique et éthanolique d'*E. obliqua* Hert. sur les paramètres de développement des plantules de blé sont regroupés dans le **tableau n° 13** et **les annexes n° XXV et XXVI**.

D'après ces résultats, on constate que les concentrations 1,5% (p/p) de l'extrait méthanolique et 0,25% (p/p) de l'extrait éthanolique ont montré le meilleur développement des plantules en enregistrant les valeurs les plus élevées de la longueur de racine ( $34,33 \pm 0,57$  cm et  $32,16 \pm 1,32$  cm respectivement), de la longueur de la partie aérienne ( $41,66 \pm 0,57$  cm et  $48 \pm 2,51$  cm respectivement), de poids frais ( $2,39 \pm 0,70$ g et  $1,19 \pm 0,35$  respectivement), de poids sec ( $0,372 \pm 0,10$ g et  $0,45 \pm 0,06$  respectivement) et de nombre de feuilles ( $7,33 \pm 1,15$  et  $7,33 \pm 0,57$  respectivement) comparativement au témoin négatif et au reste des concentrations des deux extraits. Le traitement avec le fongicide (TP) a donné des résultats qui se rapprochent des deux concentrations (1,5% et 0,25% (p/p)) des extraits précédemment cités. Cependant, le témoin inoculé a présenté le plus faible développement des plantules avec une longueur de racine égale à  $21,66 \pm 1,00$  cm, une longueur de la partie aérienne égale à  $23,5 \pm 0,50$  cm, un poids frais et sec égal à  $1,24 \pm 0,01$ g et  $0,20 \pm 0,02$  g respectivement et un nombre de feuilles égal à  $6 \pm 1,00$ .

**Tableau n° 13** - Effet des extraits sur la longueur de la racine(LR), longueur de la partie aérienne (LA), poids frais (PF), poids sec (PS) et nombre de feuilles (NF).

		LR (cm)	LA (cm)	PF(g)	PS (g)	NF
Meth	0,25% (p/p)	23,16 ±1,04	36,66 ±1,15	2,39 ±0,70	0,372 ±0,10	6,33 ±0,57
	0,75% (p/p)	29,33 ±1,15	39 ±1,00	2,36 ±0,25	0,32 ±0,01	6,33 ±0,57
	1,5% (p/p)	<b>34,33 ±0,57</b>	<b>41,66 ±0,57</b>	<b>2,723 ±0,51</b>	<b>0,40 ±0,05</b>	<b>7,33 ±1,15</b>
Eth	0,25% (p/p)	<b>32,16 ±1,32</b>	<b>48 ±2,51</b>	<b>2,576 ±0,46</b>	<b>0,45 ±0,06</b>	<b>7,33 ±0,57</b>
	0,75% (p/p)	31,33 ±1,52	34,83 ±0,76	1,19 ±0,35	0,44 ±0,04	6 ±0,00
	1,5% (p/p)	28 ±1,52	36 ±1,73	1,11 ±0,27	0,19 ±0,03	5,33 ±0,57
TN	/	25 ±0,00	38,16 ±1,60	1,63 ±0,15	0,29 ±0,04	6,33 ±0,57
TP	0,15 % (v/p)	27,5 ±1,04	39,16 ±0,76	2,44 ±0,45	0,45 ±0,01	7 ±0,00
TIN	/	21,66 ±1,00	23,5 ±0,50	1,24 ±0,01	0,20 ±0,02	6 ±1,00

L'analyse de la variance de l'effet des différentes concentrations des extraits méthanoliques et éthanoliques (traitements) sur les paramètres étudiés a révélé une différence non significative pour le facteur concentration et aussi pour le facteur traitement pour les paramètres (LR, LA, PF et NF) sauf le paramètre PS qui a révélé une différence très hautement significative pour le facteur concentration (**Annexes n° XV, XVI, XVII, XVIII et XIV**).

#### 6.1.4.5.2 - Effet des extraits sur l'indice de maladie

Les indices de la maladie sous l'effet des différentes concentrations de l'extrait méthanoliques et éthanoliques sont présentés dans le **tableau n° 14**.

**Tableau n° 14 - Indices de maladie**

	concentration	IM
meth	0,25% (p/p)	1
	0,75% (p/p)	1,2
	1,5% (p/p)	<b>0,25</b>
eth	0,25% (p/p)	<b>0,5</b>
	0,75% (p/p)	1,5
	1,5% (p/p)	2,25
T-		0
T- in		3
TP		0,5

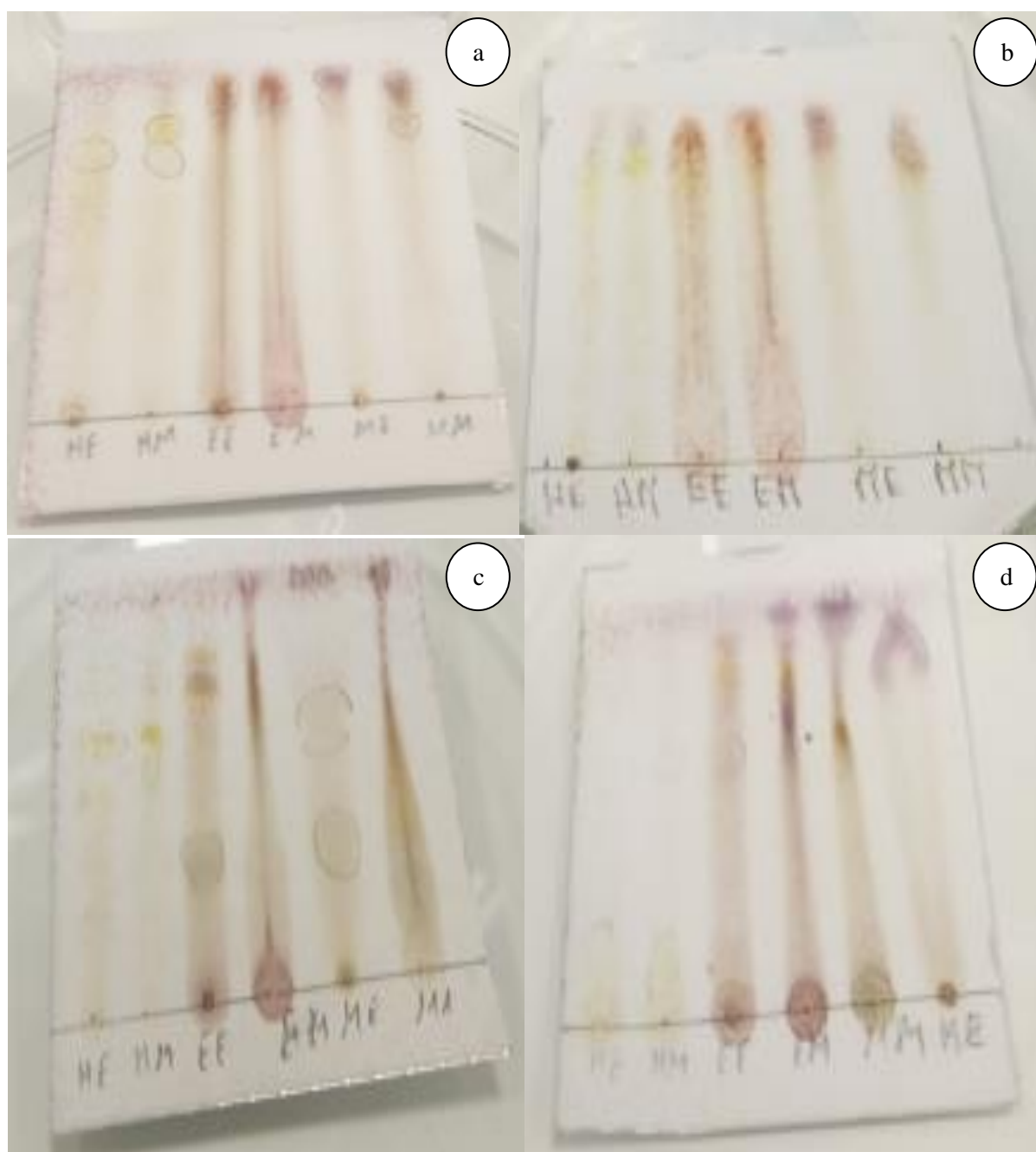
D'après ces résultats, on constate que les extraits méthanoliques et éthanoliques ont réduit la sévérité de la fusariose de blé. La concentration 1,5% (p/p) d'extrait méthanolique et 0,25% (p/p) d'extrait éthanolique se sont avérées les plus efficaces en enregistrant les indices de maladie les plus faibles (0,25 et 0,5 respectivement) qui sont semblables à celui enregistré par le témoin positif (0,5) (**Tableau n° 14**). Les plantules inoculées non traitées ont été les plus affectées par le pathogène en enregistrant l'indice de maladie le plus élevé qui est égal à 3.

L'analyse de la variance pour le paramètre « indice de maladie » a révélé une différence non significative pour les facteurs: concentration et traitement (**Annexe n° XX**).

### **6.1.5 - Caractérisation des composés bioactifs par chromatographie sur couche mince (CCM)**

En raison de l'activité élevée des fractions méthanolique et éthanolique des plantes étudiées, elles ont été soumises à une analyse de Chromatographie sur Couche Mince (CCM). L'analyse par CCM a révélé plusieurs taches de couleurs multiples ayant des rapports frontaux compris entre 0,24 et 0,97 (**Tableaux n° 15, 16 et 17**). L'action de vanilline et l'acide sulfurique sur les taches obtenues a révélé des couleurs différentes : jaune, marron, violet...etc. (**Figure n° 54**). Ces couleurs indiquent la présence de multiples composés chimiques au niveau des plantes étudiées.





**Figure n° 54** - Résultats de quelques plaques CCM utilisées (a. système eth/meth 6:4; b. eth/meth 8:2 ; c. chloro/ meth 6:4 ; d. eth ac/ meth 8:2).

Les rapports frontaux calculés à partir des plaques CCM pour la plante *P. harmala* L. se figurent dans le **tableau n° 15**.



**Tableau n° 15** - Rapports frontaux calculés des extraits méthanoliques et éthanoliques pour *P. harmala* L.

	meth	eth	Pigmentation	Composés identifiés
eth/meth 6:4	0,35 0,71	0,33 0,66	Jaune, jaune pale	Flavonoides ( <b>N'gaman Kohué et al., 2009</b> )
eth/meth 8:2	0,75 0,11 0,55	0,77 0,06 0,11 0,6	Jaune, jaune pale	Harmine, Harmaline ( <b>Pulpati et al., 2008</b> )
chloro /meth 6:4	0,68	0,72	Brune	Harmaline ( <b>Pulpati et al., 2008</b> )
hex/eth ac 6:4	absence	absence	/	/
hex/eth ac 1:1	absence	absence		Non identifié
eth ac/meth 8:2	0,51 0,61 0,8	0,63 0,76	Jaune, jaune pale	Flavonoïdes (( <b>Kabran et al., 2011; Guy et al., 2010</b> ); Tannins ( <b>Mamyrbekova-Bekro et al., 2013a; Kabran et al., 2011</b> ))

Les rapports frontaux calculés à partir des plaques CCM pour la plante *E. obliqua* Hert. se figurent dans le **tableau n° 16**.

**Tableau n° 16** - Rapports frontaux calculés des extraits méthanoliques et éthanoliques pour *E. obliqua* Hert.

	meth	eth	pigmentation	Composés identifiés
eth/meth 6:4	0,88	0,88	marron	Non identifié
eth/meth 8:2	0,62 0,71 0,8 0,93	0,88 0,95	Orange, marron,jaune	Flavonoides ( <b>N'gaman Kohué et al., 2009</b> )
chloro/meth 6 :4	0,33 0,81 0,7	0,72	Jaune, violet et brune	Flavonoides ( <b>N'gaman Kohué et al., 2009</b> )
hex/eth ac 6:4	absence	absence	/	/
hex /eth ac 1:1	absence	absence	/	/
eth ac/ meth 8:2	0,27 0,81	0,95	Jaune, violet et brune	Non identifié

Les rapports frontaux calculés à partir des plaques CCM pour la plante *M. vulgare* L. se figurent dans le **tableau n° 17**.

**Tableau n° 17** - Rapports frontaux calculés des extraits méthanoliques et éthanoliques pour *M. vulgare* L.

	meth	eth	Pigmentation	Composés identifiés
eth/meth 6:4	0,88	0,84	brune	Non identifié
eth/meth 8:2	0,88	0,62 0,95	violet	Saponine B stéroïdienne ( <b>Mamyrbekova-Bekro et al. 2013a; Guy et al., 2010</b> )
chloro/meth 6 :4	0,74	0,27 0,52 0,62	jaune, brune, marron	Flavonols ( <b>Guy et al. 2010; N'gaman Kohué et al., 2009</b> ), Tannins ( <b>Kabran et al., 2011</b> ), Flavonoïdes ( <b>N'gaman Kohué et al., 2009</b> )
hex/eth ac 6:4	0,41 0,7	0,39 0,7 0,85	Jaune , brune	Flavonoides ( <b>Djahra et al., 2012</b> )
hex/eth ac 1:1	0,45 0,7	0,41 0,72 0,89	marron	Non identifié
eth ac/ meth 6:4	absence	0,55 0,97	brune	Non identifié

### 6.1.6 - Caractérisation des composés bioactifs par chromatographie gazeuse couplée par spectrométrie de masse (CG-SM)

Les résultats obtenus par la CG-SM sont mis en évidence par les **tableaux n° 18 et 19** et par les **annexes n° XXVII et XXVIII**.

Tableau n° 18 - Composition chimique d'*E. obliqua* Hert.

N°	Composé	Temps de rétention (mn)	Pourcentage (%)
<b>Composés majeurs</b>			
1	$\alpha$ - pinène	10,842	24,197
2	Camphène	11,243	0,780
3	Thuju-2,4(10)-diène	11,416	0,369
4	$\beta$ - pinène	12,123	0,406
5	p- cymène	13,685	1,976
6	1,8-cinéol	13,996	<b>54,856</b>
7	(E)-pinocarvéol	17,174	3,346
8	Pinocarvone	17,858	1,230
9	$\alpha$ -cubèbène	23,685	0,340
10	Isolonjufolène	24,688	0,815
11	$\beta$ -gurjunène	25,350	0,685
12	Aromadendrène	25,578	8,308
13	Allo-aromadrendrène	26,145	0,875
14	$\mu$ -gurjunène	26,835	0,346
15	Germacrène-D-	27,049	0,512
16	Globulol-D-	29,387	0,608
<b>Composés mineurs</b>			
1	$\alpha$ -copaène	23,756	/
2	$\beta$ -caryophyllène	24,980	/

Les analyses chimiques ont montré que *E. obliqua* Hert. est constitué de seize composés majeurs ( $\alpha$  – pinène, Camphène, Thuju-2,4(10)-diène,  $\beta$ - pinène, p- cymène, 1,8-cinéol, (E)-pinocarvéol, Pinocarvone,  $\alpha$ -cubèbène, Isolonjufolène,  $\beta$ -gurjunène, Aromadendrène, Allo-aromadrendrène,  $\mu$ -gurjunène, Germacrène-D-, Globulol-D-) dont le 1,8-cinéol appelé aussi l'eucalyptol a présenté le pourcentage le plus élevé (54,856%) et deux composés mineurs ( $\alpha$ -copaène,  $\beta$ -caryophyllène) (Tableau n° 37). Le même test a avéré que l'espèce *M. vulgare* L. renferment huit composés majeurs qui sont : Propanol,  $\alpha$  – pinone, p- cymène, 1,8 cinéole, (E) pinocarvéol, Polégone, Thymol, et aromadendrène et quatres

composés mineurs sous forme de traces (camphor, menthone, Pinocarvone et Terpinèn-4-ol) (**Tableau n°38**). Pour le *P. harmala* L., ce test n'a pas donné de résultats interprétables.

La composition chimique de *M. vulgare* L. se figure dans le **tableau n° 38**.

**Tableau n° 19 - Composition chimique de *M. vulgare* L.**

N°	composé	Temps de rétention (mn)	Pourcentage (%)
<b>Composés majeurs</b>			
1	Propanol	2,742	11,007
2	$\alpha$ - pinène	10,763	13,970
3	p- cymène	13,598	9,089
4	1,8 cinéole	13,828	30,287
5	(E) pinocarvéol	17,140	6,868
6	Polégone	20,041	8,031
7	Thymol	21,651	12,396
8	Aromadendrène	25,524	8,333
<b>Composés mineurs</b>			
1	Camphor	17,317	/
2	Menthone	17,572	/
3	Pinocarvone	17,862	/
4	Terpinèn-4-ol	18,243	/

## 6.2 - Discussion des résultats

Cette recherche s'inscrit dans le cadre de valorisation des métabolites secondaires extraits à partir de trois plantes médicinales qui sont : *P. harmala* L., *M. vulgare* L. et *E. obliqua* Hert.

### 6.2.1 – Discussion des résultats des analyses physicochimiques et biochimiques

Les paramètres physicochimiques comme la teneur en eau et le pH ont un très grand intérêt pour renseigner sur la préservation et la stabilité de l'échantillon pendant une longue durée et peuvent jouer le rôle d'un indicateur du degré de maturité des végétaux (AOAC, 2002). La teneur en cendre pour *E.obliqua* Hert. est inférieure à celle trouvée par

**Shah et al. (2012)** qui ont rapporté une teneur de 14,2% de cendre pour l'espèce *E. globulus*. Les résultats des analyses biochimiques pour l'espèce *M. vulgare* L. sont nettement inférieurs à ceux obtenus par **Fernandes et al. (2010)** qui ont déclaré un taux de 84,74% de carbohydrates chez l'espèce *Mentha pulegium* tandis que les taux des lipides et de cendre chez le marrube sont supérieurs (respectivement 2,22% et 5,92%) comparativement à la menthe pouliot. Ces deux espèces appartiennent à la même famille botanique Lamiacées. Cette différence de macronutriments au sein de cette famille pourrait être due à plusieurs facteurs qui entourent la plante tels que le facteur écologique, édaphique et climatique. D'autre part, les résultats de la présente étude confirme les travaux de **Lemarchand (2008)** qui a déclaré que l'eucalyptus est de pauvre qualité nutritionnelle et de composition extrêmement variable. De plus, la composition des feuilles varie d'un arbre à l'autre au sein d'une même espèce, suivant de nombreuses variables environnementales, mais également suivant le patrimoine génétique de la plante et la pression de sélection exercée.

### 6.2.2 – Discussion des résultats de l'étude phytochimique

Le rendement d'extraction est influencé par divers facteurs tels que la méthode d'extraction, le type du solvant, la concentration du solvant, le temps de contact, la température d'extraction, le rapport solide / solvant et la taille de particules (**Pinelo et al., 2005 ; Chrinos et al., 2007**). La variabilité des rendements trouvés pourrait être expliquée par l'utilisation combinée d'eau et de solvant organique qui peut faciliter l'extraction de composés chimiques solubles dans l'eau et / ou un solvant organique. Le choix du solvant est un facteur critique pour le processus d'extraction (**Humaira et al., 2015**). Cependant, il ne faut pas oublier que le plus grand rendement n'impose pas la garantie de l'activité biologique de l'extrait. L'activité peut être plus prononcée dans le solvant à faible rendement ou vice versa (**Zahra et al., 2017**). Les résultats de cette étude sont comparables à celui de **Dallali et al. (2017)** qui ont réalisé une étude sur le *M. vulgare* L. et ils ont trouvé un rendement de  $12,77 \pm 0,67$  pour l'extraction aqueuse et de  $23,60 \pm 1,15$  pour l'extrait méthanolique qui est une valeur supérieure par rapport à celle qu'on a trouvée. L'éthanol et l'eau sont préférables pour l'extraction car ils ont l'avantage d'être non polluants, moins chers et non toxiques par rapport à d'autres solvants comme le méthanol (**Jokić et al., 2010**).

Le criblage phytochimique a démontré que la présence et l'absence des autres groupes de principes actifs varient d'un extrait à un autre et d'une plante à une autre. Cela pourrait être attribuable à la solubilité et au poids moléculaire qui varient d'un métabolite

secondaire à un autre. Les principaux métabolites qui sont les alcaloïdes, les flavonoïdes et les tanins ont été présents chez l'ensemble des extraits de différentes plantes. Les alcaloïdes sont parmi les métabolites secondaires des plantes qui ont le potentiel de protéger les cellules contre les organismes étrangers en raison de leur nature toxique. Cette nature est responsable des valeurs médicinales de diverses plantes utilisées pour la gestion du cancer humain, des activités antipaludiques, analgésiques, antiseptiques et bactéricides (**Neumann et al., 2004**). La présence d'alcaloïdes dans les différents extraits de plantes étudiées pourrait être une source utile pour des remèdes à base de plantes. Les composés polyphénoliques tels que les flavonoïdes sont des composants végétaux importants avec une activité antioxydante importante et un large éventail d'activités biologiques, notamment antibactériennes, propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et anti-allergiques (**Ferguson et al., 2001**). Ces composés sont indiqués dans plusieurs études comme piègeurs de radicaux libres contre les radicaux anion superoxyde, lipide peroxyde et hydroxyle et mettent ainsi en évidence un bon nombre de leurs fonctions favorables à la santé dans les organismes, ce qui est important pour la prévention des maladies associées aux dommages oxydatifs des membranes, des protéines et des ADN (**Oyedemi et al., 2010**). La présence de tanins dans les extraits de plantes étudiées confère une crédibilité à l'utilisation ethnomédicinale de l'extrait dans le traitement de diverses maladies. Plusieurs chercheurs ont signalé l'importance des tanins pour la prévention et le traitement du cancer, le traitement des tissus ulcérés, l'inhibition de l'oxydation lipidique, l'antibactérien et amélioration de l'insuffisance rénale (**Yokozawa et al., 1993 ; Dharmananda et al., 2003**).

Des travaux réalisés sur le dosage des polyphénols totaux par **Khaled-Khodja et al. (2014) ; Luís et al. (2014) ; Bouabelli et al. (2016)** ont démontré la richesse des extraits de ces plantes en composés phénoliques avec des teneurs qui sont comparables à celles qu'on a trouvées. Plusieurs études ont montré que la teneur en polyphénols varie selon la polarité des solvants. Par exemple, le méthanol absolu a été utilisé pour l'extraction de polyphénols de thé (**Yao et al., 2006**) et 50% d'acétone pour l'extraction des composés phénoliques totaux du blé (**Zhou et Yu, 2004**), qui ont été jugés plus efficaces que l'eau. De plus, **Hayouni et al., (2007)** ont signalé que l'eau et les solvants organiques utilisés individuellement ou en mélange tels que l'acétone /eau / acide acétique (90 / 9,5 / 0,5) et acétate d'éthyle / méthanol / eau (60/30/10) ont affecté de manière significative la teneur totale en polyphénols des extraits de fruits de *Quercus coccifera* L. et *Juniperus phoenicea* L. D'autre part, les variations des

teneurs en composés phénoliques sont souvent considérables d'une espèce à l'autre, à l'intérieur de la même espèce et selon les variétés considérées.

Quant aux flavonoïdes qui sont la forme de composés phénoliques la plus répandue et la plus diversifiée (**Zahra et al., 2017**), il était démontré que l'addition d'eau aux solvants organiques (en particulier l'éthanol ou le méthanol) ont amélioré le rendement d'extraction des flavonoïdes (**Robards et Antolovich 1997**).

La variation de la teneur en tanins pourrait s'expliquer par le fait que l'extraction des tanins condensés, dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires (**Deba et al., 2008**). La présence des tanins suggère aux plantes étudiées la capacité de jouer un rôle majeur en tant qu'agent antimicrobien et antioxydant (**Tepe et al., 2006**).

### 6.2.3 – Discussion des résultats de l'activité biologique des extraits

Selon **khaled-khoudja et al. (2014)**, la valeur la plus faible d'IC50 représente l'activité antioxydante la plus élevée de l'extrait, il semble donc que l'extrait méthanolique ait le pouvoir antioxydant le plus intéressant ( $10,86 \pm 0,005 \mu\text{g/ml}$  ;  $73,46 \pm 0,005 \mu\text{g/ml}$  et  $73,46 \pm 0,005 \mu\text{g/ml}$  pour le *M. vulgare* L., *P. harmala* L. et *Eucalyptus obliqua* Hert. respectivement) par rapport aux autres extraits ce qui pourrait être attribué à la présence de composés bioactifs qui ont la capacité d'interagir avec les radicaux libres en agissant comme donneur d'électrons ou hydrogène. Les substances à base de plantes sont utilisées contre les radicaux libres qui sont liés à plusieurs pathologies telles que le cancer et les maladies neurodégénératives (**Bey-Ould Si Said, 2016**). Ils sont également utilisés pour éviter la détérioration de la qualité organoleptique et hygiénique des aliments (**Hale et al., 2008**).

De nombreux travaux soulignent l'effet antibactérien des principes actifs naturels. En effet, **Djahra et al., (2012)** ; **Bouharb et al. (2014)**, **Bey-Oueld Si Said et al. (2016)** et **Bouabdelli et al. (2016)** ont démontré l'effet antibactérien du marrube blanc, eucalyptus et le harmal. Du fait que la principale cible de ces composés naturels est la membrane bactérienne, l'activité antibactérienne des substances naturelles s'explique par la lyse de ces membranes. Les huiles essentielles, flavonoïdes, alcaloïdes voire même les tanins pourraient induire une fuite d'ions potassium au niveau de la membrane et par voie de conséquences des lésions irréversibles au niveau de cette membrane (**Djahra, 2014**).

L'étude microscopique des souches fongiques a montré un mycélium cloisonné avec l'apparition de macronidies avec une présence ou absence des micronidies et des chlamydospores. Selon **Leslie et Summerell (2006)** et **Tivoli (1988)**, les souches étudiées appartiennent aux espèces suivantes : *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum* et *Fusarium roseum*.

L'effet antifongique des extraits sur les souches *F. culmorum*, *F. oxysporum* et *F. rosum in vitro* se concorde avec plusieurs travaux qui ont montré que les extraits de plantes peuvent contrôler les champignons anamorphiques pathogènes des plantes (**Parveen et Kumar, 2000 ; Bhatm, 2001 ; Agrios, 2005**). Afin de réduire la dépendance aux fongicides synthétiques, des méthodes alternatives pour lutter contre *F. oxysporum* ont été testées en utilisant des composés naturels dérivés de plantes (**Bowers et Locke, 2000; Tegege et Pretorius, 2007; Hassanein et al., 2010; Pârvu et al., 2011**). Plusieurs études ont été menées sur le mécanisme d'action des extraits des plantes sur les champignons. Cette fonction pourrait être attribuée aux composés phénoliques qui ont une activité antifongique (**Douadi et al., 2017**). Ces composés peuvent agir en altérant la structure de la membrane cellulaire, en inhibant la croissance mycélienne (**Ghani et al., 2008 ; Yan et al., 2008**).

L'effet des extraits éthanoliques et méthanoliques d'*E. obliqua* Hert. sur la germination des graines du blé dur (var. vitron) a montré des résultats qui sont en accord avec ceux obtenus par **Ahmed et al. (2008)** qui ont déclaré que les feuilles d'*E. camaldulesis* ont induit des effets inhibiteurs sur quelques cultures forestières et agricoles. Ils ont également constaté que l'effet dépend de la concentration de l'extrait et le type d'espèce réceptrice. Du même, **Abdelgaleil et Hashinaga (2007)** ont trouvé que les sesquiterpènes extraites des feuilles de *Magnolia grandiflora* L. réduisent la germination des graines du blé. Cependant, **Rongai et al.(2016)** ont démontré qu'à de faibles concentrations, il n'y avait aucun effet allélopathique des extraits de grenadier sur la germination des graines de tomate ce qui peut être expliqué par le fait que l'allélopathie ne se manifeste que lorsqu'une quantité suffisante des substances allélopathiques atteint la graine cible, c'est un effet concentration-dépendant.

Les résultats du test de l'activité antifongique de l'extrait méthanolique et éthanolique d'*E. obliqua* Hert. contre *F. culmorum in vivo* se sont avérés généralement en concordance avec le travail de **Hassenein et al. (2010)**, qui ont rapporté que les pulvérisations foliaires d'extraits aqueux de feuilles du Neem réduisaient la gravité de la fusariose. Pour contrôler les agents pathogènes, des extraits de plantes ont été utilisés comme agents



antifongiques. Ces extraits peuvent être facilement préparés par les agriculteurs (**Okigbo et Nameka, 2005**).

#### 6.2.4 – Discussion des résultats de la caractérisation des composés bioactifs par chromatographie sur couche mince (CCM)

La caractérisation des composés bioactifs par chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits méthanoliques et éthanoliques a révélé la richesse des plantes étudiées en composés phénoliques tels que les flavonoïdes (**Kabran et al., 2011; Guy et al., 2010**) et les tanins (**Mamyrbekova-Bekro et al., 2013a; Kabran et al., 2011**) pour l'ensemble des plantes. À ceci, s'ajoute harmine, harmaline et vasicinone chez l'espèce *P. harmala L.* (**Pulpati et al., 2008**).

#### 6.2.5 – Discussion des résultats de la caractérisation des composés bioactifs par chromatographie gazeuse couplée par spectrométrie de masse (CG-SM)

Les analyses chimiques par GC-MS ont montré une variabilité de principes actifs qui rentrent dans la composition chimique de *M. vulgare L.* Ce test a démontré que cette plante présente une différence originale de point de vue composition, avec celle de l'Égypte dont les principaux composés étaient le tricyclène, le  $\beta$ -pinène, le bisabolol, l' $\beta$ -élémane et l'isomenthon-8-thiol (**Kadri et al., 2011**), de Tunisie dont les composés majoritaires sont le  $\gamma$ -eudesmol (11,93%),  $\beta$ -citronellol (9,90%), citronellyl formate (9,50%) et germacrène-D- (9,37%) (**Hamdaoui et al., 2013**), et celle d'autres régions de l'Algérie dont les principaux constituants de *Marrubium vulgare L.* étaient le 4,8,12,16-tétraméthyl heptadécane-4-olide (16,97%), le germacrène D-4-ol (9,61%), l' $\alpha$ -pinène (9,37%), phytol (4,87%), hydro-sabina cétone (4,12%), piperitone (3,27%),  $\delta$ -cadinène (3,13%), 1-octène-3-ol (2,35%) et benzaldéhyde (2,31%) (**Santos et al., 2006**). Cependant, **Bhagat et ses collaborateurs (2016)** ont confirmés les résultats obtenus en démontrant que l'huile essentielle d'*E. lancaeoletus* contient les mêmes composés majeurs trouvés dans cette étude qui sont :  $\alpha$  – pinène, eucalyptol, para-cymène et  $\beta$ - pinène. Ces chercheurs ont déclaré que les composés majeurs cités précédemment possèdent des propriétés antioxydantes, antibactériennes et d'autres activités thérapeutiques.

# CONCLUSION

De nos jours, le secteur des plantes aromatiques et médicinales (PAM) concerne majoritairement des marchés tels que la parfumerie, la cosmétique, l'aromathérapie et l'agroalimentaire et il est en constante progression (Bouzabata, 2015). En Algérie, ce secteur est encore balbutiant contrairement au Maroc et à la Tunisie qui possèdent dans ce domaine un savoir-faire plus affirmé et son développement passe d'abord par une meilleure connaissance de la composition chimique des composés bioactifs.

Cette étude a été menée sur la caractérisation physicochimique et biochimique de trois espèces de plantes médicinales qui sont : *Eucalyptus obliqua* Hert. , *Marrubium vulgare* L. et *Peganum harmala* L. et aussi la mise en évidence des profils phytochimiques et des activités biologiques de leurs extraits méthanolique, éthanoliques et aqueux.

Les résultats obtenus ont montré que les trois plantes sont de pauvre qualité nutritionnelle. L'étude phytochimique des extraits méthanoliques, éthanoliques et aqueux, a permis d'obtenir des rendements qui varient d'un extrait à un autre et d'une plante à une autre. Le rendement le plus élevé a été enregistré au niveau d'extrait éthanolique pour les trois plantes étudiées (*E. obliqua* Hert. (30,33 ±0,08 %), *P. harmala* L. (26,21 ±0,50 %) et *M. vulgare* L. (22,42 ±0,80 %). Le criblage phytochimique a révélé que l'ensemble des extraits de plantes étudiées renferment les composés suivants : les alcaloïdes, les flavonoïdes et les tanins. Quantitativement, l'extrait méthanolique d'*E. obliqua* Hert. a donné les plus fortes teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés de l'ordre de 231,58 ±0,40 mg EAG/g MS, 32,06 ±0,57 mg EQ/g MS et 38,57±0,00 mg EQ/g MS respectivement par rapport à l'extraits éthanolique et aqueux de cette espèce et à l'ensemble des extraits de *M. vulgare* L. et *P. harmala* L.

L'évaluation du pouvoir antioxydant a révélé *in vitro* des capacités antioxydantes chez tous les extraits. Les activités les plus potentielles par le mécanisme de piégeage direct des radicaux libres par la méthode de DPPH sont prouvées par l'extrait éthanolique de *M. vulgare* L. (EC<sub>50</sub>= 10,86 ± 0,005 µg/ml).

Le test antibactérien *in vitro* a montré que les souches bactériennes étudiées ont réagi plus ou moins bien selon la nature des extraits végétaux. L'extrait éthanolique d'*E. obliqua* Hert. s'est révélé actif contre les souches bactériennes : *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Erwinia amylovora* avec un diamètre d'inhibition supérieur à 10 mm. Du même, *Pseudomonas aeruginosa* a présenté une

sensibilité aux extraits méthanolique et éthanolique de *M. vulgare* L. ( $10,04 \pm 0,44$  mm et  $10,27 \pm 0,27$  mm respectivement) et aussi à l'extrait aqueux d'*E. obliqua* Hert. ( $13,6 \pm 0,0$  mm). La souche *Erwinia carotovra* semble être résistante à l'ensemble des extraits végétaux ( $0 \pm 0,00$  mm). Toutes les souches bactériennes utilisées révèlent une résistance à l'antibiotique Oxacilline ( $0 \pm 0,00$  mm) et une sensibilité aux deux autres antibiotiques (entre  $16,33 \pm 0,57$  et  $19,66 \pm 0,57$  mm pour le Doxycycline ; entre  $18,66 \pm 2,30$  et  $20 \pm 0,00$  pour le Nitroxoline).

Le test de l'activité antifongique *in vitro* a démontré que les extraits éthanoliques et méthanoliques se sont révélés plus actifs contre les trois souches fongiques par rapport aux extraits aqueux chez l'ensemble des plantes étudiées. L'extrait éthanolique d'*E. obliqua* Hert. (1,5% (m/v)) a enregistré les taux d'inhibition plus élevés qui sont de l'ordre de  $81,98 \pm 0,57\%$  contre *F. culmorum*,  $65,88 \pm 0,57\%$  contre *F. oxysporum* et  $76,01 \pm 0,71\%$  vis à vis *F. roseum* comparativement au reste des extraits de plantes. Cependant, le fongicide synthétique (Tachigazole) a inhibé complètement la croissance de *F. culmorum* ( $100 \pm 0,00\%$ ). Ce dernier a montré des pourcentages d'inhibition de  $77,64 \pm 1,17$  et  $61,17 \pm 0,30\%$  contre *F. oxysporum* et *F. roseum* respectivement.

Le test de l'efficacité *in vivo* des extraits hydroalcooliques d'*E. obliqua* Hert., a démontré que l'extrait méthanolique (1,5 % (p/p)) et l'extrait éthanolique (0,25 % (p/p)) ont amélioré le développement des plantules en enregistrant les valeurs les plus élevées de la longueur de racine ( $34,33 \pm 0,57$  cm et  $32,16 \pm 1,32$  cm respectivement), de la longueur de la partie aérienne ( $41,66 \pm 0,57$  cm et  $48 \pm 2,51$  cm respectivement), du poids frais ( $2,39 \pm 0,70$  et  $1,19 \pm 0,35$  g respectivement), du poids sec ( $0,372 \pm 0,10$  et  $0,45 \pm 0,06$  g respectivement) et du nombre de feuilles ( $7,33 \pm 1,15$  et  $7,33 \pm 0,57$  respectivement) comparativement au témoin négatif et au reste des concentrations des deux extraits. Les plantules traitées avec le fongicide synthétique ont présenté des résultats qui se rapprochent de ceux enregistré par l'extrait méthanolique (1,5 % (p/p)) et l'extrait éthanolique (0,25 % (p/p)). Cependant, le témoin inoculé a présenté le plus faible développement des plantules. Ces extraits ont également réduit la sévérité de la fusariose de blé.

La caractérisation des composés bioactifs par chromatographie sur couche mince (CCM) a décelé la richesse des espèces végétales étudiées en molécule actives principalement les composés phénoliques tels que les flavonoïdes et les tanins qui pourraient être l'origine de l'activité biologique de ces plantes. Du même, la chromatographie gazeuse couplée par spectrométrie de masse (CG-SM) a montré une variabilité du point de vue composition

chimique entre *E. obliqua* Hert. et *M. vulgare* L. Les composés majeurs  $\alpha$  – pinène, Camphène, Thuju-2,4(10)-diène,  $\beta$ - pinène, p- cymène, 1,8-cinéol, (E)-pinocarvéol, Pinocarvone,  $\alpha$ -cubèbène, Isolonjufolène,  $\beta$ -gurjunène, Aromadendrène, Allo-aromadendrène,  $\mu$ -gurjunène, Germacrène-D-, Globulol-D-) correspondent à la plante *E. obliqua* et Propanol,  $\alpha$  – pinone, p- cymène, 1,8 cinéole, (E) pinocarvéol, Polégone, Thymol, aromadendrène pour *M. vulgare* L.

En conséquence, les plantes étudiées ont un potentiel antioxydant et antimicrobien très importants et pourraient être exploitées comme une source d'agents antioxydants (particulièrement *M. vulgare* L.) antibactériens naturels (surtout *E. obliqua* Hert.), pour traiter les maladies infectieuses et autres pathologies liées au stress oxydant chez l'homme. Les extraits d'*E. obliqua* Hert. pourraient être valorisés dans le domaine agricole comme biofongicide pour diminuer les dégâts causés par la fusariose de blé et éviter les problèmes de résistance aux fongicides synthétiques et leurs effets secondaires sur l'homme et l'environnement.

Au terme de ce travail, il serait souhaitable de renforcer les résultats obtenus *in vivo* par des essais en plein champs et d'exploiter les activités biologiques *in vitro* comme un point de départ essentiel pour entreprendre des études *in vivo* sur modèle animal. Il serait important de tester l'effet herbicide des plantes étudiées sur les mauvaises herbes et l'effet insecticide sur les ravageurs des cultures.

D'autre part, il serait intéressant d'utiliser les autres méthodes d'extraction, de séparation et de caractérisation pour mettre en évidence tous les principes bioactifs. À ceci, s'ajoute la combinaison de plusieurs extraits des plantes et tester l'efficacité de ces formulations. En outre, il serait nécessaire de poursuivre les travaux sur les composés isolés afin de révéler leur mécanisme d'action et d'explorer les activités antivirales des produits purs ayant montré un effet antibactérien pour résoudre les problèmes de santé publique représentés par les virus pour lesquels il n'existe pas de traitement.

Dans le contexte de la lutte biologique, il serait intéressant de tester l'efficacité de la combinaison des extraits des plantes médicinales avec des agents biologiques (*Trichoderma*, *Bacillus*....) pour contrôler les bio-agresseurs des cultures en évitant le phénomène de résistance aux produits synthétiques et leurs effets secondaires sur l'Homme et l'environnement.

**RÉFÉRENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

**Abdelgaleil S. A. M., Hashinaga F. (2007).** Allelopathic potential of two sesquiterpene lactones from *Magnolia grandiflora* L. *Biochemical Systematics and Ecology*; 35(11):737-742.

**Adams R.P. (1989).** *Identification of essential oils by Ion Trap Mass Spectroscopy*. Academic Press N.Y. Inc. 302 p. ISBN 0-12-044230-2

**Adams R.P. (2001).** *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*. 3rd ed. Carol Stream Ill. 456 p .ISBN: 09317110855

**Adams R.P.(2007).** *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*.4<sup>th</sup>ed.Carol Stream, Illinois.804p. ISBN: 9781932633214

**Agrios G.N. (2005).** *Plant Pathology*. 5th ed. Elsevier-AcademicPress, San Diego, CA.922 p.

**Ahmed R., Rafiqul Hoque A. T. M., Hossain M. K. (2008).** Allelopathic effects of leaf litters of *Eucalyptus camaldulensis* on some forest and agricultural crops. *Journal of Forestry Research*; 19(1):19–24. DOI: 10.1007/s11676-008-0003-x

**Alconada Magliano T. M. et Chulze S. N. (2013).** *Fusarium Head Blight in Latin America*, Springer.New York. 304p.

**Amellal H. (2008).** Aptitudes technologiques de quelques variétés communes de dattes : formulation d'un yaourt naturellement, sucré et aromatisé. Thèse de doctorat. Université M'hamed Bouguera. Boumerdes.127p.

**Ammar N., Nefzi A., Jabnoun-Khiareddine H., Daami-Remadi M. (2017).** Control of Fusarium Dry Rot Incited by *Fusarium oxysporum* f. *sp.tuberosi* Using *Sargassum vulgare* Aqueous and Organic Extracts. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*; 9:200-208. DOI: 10.4172/1948-5948.1000366

**Anderson, J. A. (2007).** Marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat. *International Journal of Food Microbiology*; 119: 51–53.

**Anjali S., Sheetal S.(2013).** Phytochemical Analysis and Free Radical Scavenging Potential of Herbal and Medicinal Plant Extracts. *Journal of Pharmacogny Phytochemistry*; 2: 22-29.

**AOAC .(2000).** *Official Methods of Analysis*. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.

**AOAC. (2002).**Official method 920.153. Ash content. In: *official methods of analysis*. 17<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg. Maryland. USA.

**Bagre I., Bahi C., Gnahoue G., Djaman A. J., Guede G. F. (2007).** Phytochemical composition and in vitro evaluation of the antifungal activity of *Morinda morindoides* leaves (baker) milne-redhead (Rubiaceae) on aspergillus fumigatus and candida albicans. *Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*; 8:15-23.

**Bajpai V.K., Kang C.S. (2010).** Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia aglyptostroboides* Miki ex Hu. *Journal of the American Oil Chemists' Society* ; 87:327-336.

**Benabdelkader T. (2012).** Biodiversité, Bioactivité et Biosynthèse des Composés Terpéniques Volatils des Lavandes Ailées, *Lavandula stoechas* Sensu Lato, un Complexe d'Espèces Méditerranéennes d'Intérêt Pharmacologique. Thèse de Doctorat. Ecole Normale Supérieure, Kouba-Alger.

**Benada M., Boumaaza B., Boudalia S., Khaladi O., Guessas B.(2018).** Variability of aggressiveness and virulence of *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovorum* causing the soft rot on potato tubers in the western of Algeria. *International Journal of Plant Biology* ; 09:7568.

**Benzie I.F., Strain J., (1996).** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* ; 239 : 70-76.

**Bey-Ould Si Said Z., Haddadi-Guemghara H., Boulekbache-Makhloufa L., Rigoub P., Reminia H., Adjaouda A., Khaled-Khoudja N., Madani K. (2016).** Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistilled extract of *Eucalyptus globulus* fruits. *Industrial Crops and Products*; 89: 167–175.

**Bhagat M., Gupta S., Jamwal V.S., Sharma S., Kattal M., Dawa M., Devi S., Bindu R. (2016).** Comparative study on chemical profiling and antimicrobial properties of essential oils from different parts of *Eucalyptus lanceolatus*. *Indian Journal of traditional knowledge*; 15(3):425-432.

**Bhat N. (2001).** *In vitro* evaluation of some leaf extracts against *Fusarium* spp. causing yellows of ginger in Sikkim. *Plant Disease Research*, 16(2):259-262.

**Bidie A.P., N'guessan B.B., Yapo A. F., N'guessan J.D., Djaman A.J. (2011).** Antioxidant activities of ten medicinal plants of the Ivorian pharmacopoeia. *Science and Nature*, 8: 1 –11.

**Bitar D., Lortholary O., Dromer F., Coignard B., Che D. (2013).** Mycoses invasives et France Métropolitaine, PMSI, incidence, létalité et tendances 2001– 2010. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 109-114.

**Biyiti L.F., Meko'o D.J.L., Tamze V., Amvam Z.P.H. (2004).** Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises. *Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaine* ; 13: 11–20.

**Bonin C. M., Kolb F. L. (2009).** Resistance to *Fusarium* head blight and kernel damage in a winter wheat recombinant inbred line population. *Crop Science*; 49: 1304–1312.

**Bouabedelli F., Missoun F., Benhamimed E., Djebli N. (2016).** Phytochemical and antimicrobial study of the seeds and leaves of *Peganum harmala* L. against urinary tract infection pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*; 6:10.



**Bouharb H., el badaoui K., Zair T., El amri J., Chakir S., Alaoui T. (2014).** Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun pour l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Biosciences* ; 78, 6685- 6693.

**Bouque V. (1997).** Etude de la production des métabolites secondaires par des cultures in vitro de Psoralées (Leguminosae). Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine.200p

**Bouzabata A. (2015) .**Contribution à l'étude d'une plante medicinale et aromatique *Myrtus communis* L. Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar. Annaba. 190p.

**Bowers J. H., Locke J. C. (2000).** Effect of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of fusarium wilt in the greenhouse. *Plant Disease*; 84,300–305.

**Braca A., Sortino C., Politi M., Morelli I., Mendez J. (2002).** Antioxidant activity of flavonoids from Licanialicaniae flora. *Journal of Ethnopharmacology*; 79(3): 379-381

**Bradford M.M. (1976).** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*; 72: 248-254.

**Breitmaier P.D.E., (2006).** *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*. Lavoisier, ed. Tec. & Doc., Weinheim, Germany.213p.

**Bubonja-Sonje M., Giacometti J., Abram M., (2011).** Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*; 127: 1821-1827.

**Careaga M., Fernández E., Dorantes L., Mota L., Jaramillo M.E., Hernandez-Sanchez H (2003).** Antibacterial activity of Capsicum extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. *International Journal of Food Microbiology*; 83: 331-335.

**Caron D. (2000).** *Maladies des céréales et des orges*. ITCF. Paris. France. 30-39 pp.

**Calatayud P. A., Marion–Poll F., Sauvion N., Thierry D.(2013).** *Interaction insectes-plantes*. Ed.Quae. IRD. Marseille.749p. ISBN: 978709917449.

**Cavaleiro C. (2001).** Oleos essenciais de *Juniperus* de Portugal. Thèse de Doctorat. Université de Coimbra. Portugal. 359p.

**Cawoy H., Bettiol W., Fickers P. et Ongena M. (2011).** Bacillus-based biological control of plant diseases. In: *Pesticides in the Modern World-pesticides Use and Management*. Stoytcheva, M. Ed. DOI: 10.5772/17184.

**Chala A., Weinert J. et Wolf G. A. (2003).** An integrated approach to the evaluation of the efficacy of fungicides against *Fusarium culmorum*, the cause of head blight of wheat. *Journal of Phytopathology*; 151: 673-678.

**Clavel A. J. (2006).** *Diagnostic des accidents du blé dur*. ARVALIS Institut du Végétal. Paris.France. 105 p.

**Covarelli L., Beccari G., Prodi A., Generotti S., Etruschi F., Meca G., Juan C. et Manes J. (2014).** Biosynthesis of beauvericin and enniatins *in vitro* by wheat *Fusarium* species and natural grain contamination in an area of central Italy. *Food Microbiology*; 46: 618-626.

**Crane J. M., Gibson D. M., Vaughan R. H. et Bergstrom G. C. (2013).** Iturin levels on wheat spikes linked to biological control of *Fusarium* head blight by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Phytopathology*; 103: 146–155.

**Dallali S., Rouz S., Aichi H., Ben Hassine H. (2017).** Phenolic content and allelopathic potential of leaves and rhizosphere soil aqueous extracts of white horehound (*Maribum vulgare* L.). *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*; 39(3): 2106-2120. E-ISSN 2286-5314. [www.jnsciences.org](http://www.jnsciences.org)

**Daroui-Mokaddem H. (2012).** Etude phytochimique et biologique des espèces *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Smyrniolum olusatrum* (Apiaceae), *Asteriscus maritimus* ET *Chrysanthemum trifurcatum* (Asteraceae). Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar Annaba .p.197

**Deba F., Dang Xuan T., Yasuda M., Tawata S. (2008).** "Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*". *Food Control*; 19:346.

**Dehpour A. A., Ibrahimzadeh M. A., SeyedFazel N., et Seyed Mohammad N. (2009).** Antioxydant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. *Grasas Y Aceites*. 60 :405-412.

**Dellagi A., Brisset M. N., Paulin J. P., Expert D. (1998).** Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*; 11: 734–742.

**Dharmananda S. (2003).** Golinuts and the Uses of Tannins in Chinese Medicine. In Proceedings of Institute for Traditional Medicine, Portland, OR, USA.

**Djahra A.B. (2014).** Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L. Thèse de Doctorat. Université d'Annaba. 114p.

**Djahra A.B., Bordjiba O., Benkherara S. (2012).** .Activité antibactérienne des flavonoïdes d'une plante médicinale spontanée *Marrubium vulgare* L. de la région d'El Tarf (Nord-Est Algérien). *Review of Science and Technology*; 24: 29-37.

**Doolotkeldieva T., Bobusheva S., Suleymankisi A. (2016).** Biological control of *erwinia carotovora* ssp. *carotovora* by *streptomyces* species. *Advances in Microbiology*; 6:104-14.

**Dorrance A.E., Berry S.A., Bowen P., Lipps P.E.(2004).** Characterization of *Pythium* spp. From three Ohio fields for pathogenicity on corn and soybean and metalaxyl sensitivity. *Plant Health Progress*.

**Douadi A., Bammou M., Haloui Z., Ibjibjen J., Nassiri L. (2017).** Antifungal activity of the aqueous extracts of *Calendula officinalis* L., *Urginea maritima* (L.) Baker and *Chenopodium ambrosioides* L. *European Scientific Journal*; 13:42.

**Dubois M., Gilles K A., Hamilton J K, Rebers P A., Smith F. (1956).** Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*; 28(3): 350–356.

**Dunet J. (2009).** Réactions de Michael et de Mannich appliquées à des arylcyclohexa-2,5-dienes en vue de la synthèse d'alcaloïdes de type aspidosperma et morphinanes. Thèse de Doctorat. École doctorale de sciences chimiques. Université Bordeaux I. 263 p.

**Ferguson L.R. (2001).** Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*; 475: 89 –111.

**Fernandes Â S F., Barros L., Carvalho A M., Ferreira I.C.F.R. (2010).** Lipophilic and hydrophilic antioxidants, lipid peroxidation inhibition and radical scavenging activity of two Lamiaceae food plants. *European Journal of Lipid Science and Technology*; 112, 1115–1121.

**Fosse T., Peloux Y., Granthil C., Toga B., Bertrando J., Sethian M.(1985).** Meningitis due to *Micrococcus luteus*. *Infection*; 13:280-281

**Fried A., Schell E., Moltman E., Wensing, A. (2013).** Control of fire blight in Baden-Württemberg at the end of the streptomycin era. *Acta Horticulturae* ; 1056 : 55–56.

**Gaussen H., Leroy H. F. (1982).** *Précis de botanique, végétaux supérieurs*. 2ème ed. Masson. Paris. 426 p.

**Ghani S. B. A., Weaver L., Zidan Z. H., Ali H. M., Keevil C. W., Brown R. C. (2008).** Microwave-assisted synthesis and antimicrobial activities of flavonoid derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 18: 518-522.

**Ghazghazi H., Aouadhi C., Riahi Leila., Maaroufi A., Hasnaoui B. (2014).** Fatty acids composition of Tunisian *Ziziphus lotus* L. (Desf.) fruits and variation in biological activities between leaf and fruit extracts. *Natural Product Letters*; 28(14) 1106-1110. DOI: 10.1080/14786419.2014.913244

**Ghedira K., (2005).** Les flavonoïdes : Structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique . *Phytothérapie*; 4: 162-169. DOI 10.1007/s10298-005-0096-8

**Gilbert J., Haber S., (2013).** Overview of some recent research developments in Fusarium head blight of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*; 35: 1-26.

**Gilbert J., Tekauz A. (2000).** Recent developments in research on Fusarium head blight of wheat in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*; 22: 1–8.

**Gordon S.M., Serkey J.M., Keys T.F., Ryan T., Fatica C.A., Schmitt S.K. (1998).** Secular trends in nosocomial bloodstream infections in a 55-bed cardiothoracic intensive care unit. *Annals of Thoracic Surgery*; 65:95-100.

**Gräfenhan T., Schroers H., Nirenberg H.I., Seifert, K. A. (2011).** An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella*, and *Volutella*. *Studies in Mycology*; 68:79-113.

**Guignard J.L. (1983).** *Abrégé de botanique*. 5<sup>e</sup>ed.Masson. Paris .ISBN: 2-225-78826-x.p.259

**Guo X. W., Fernando W. G. D., Bullock P., Sapirstein, H. (2010).** Quantifying cropping practices in relation to inoculum levels of *Fusarium graminearum* on crop stubble. *Plant Pathology*; 59: 1107–1113.

**Guy B.K., Akhanovna M-B.J., Odette D.D., Jonathan G. S., Yves-Alain B. (2010).** Sur la Composition Phytochimique Qualitative desExtraits bruts Hydrométhanoliques des Feuilles de 6 Cultivars de Manihot Esculenta Crantz de Côte d'Ivoire. *European Journal of Scientific Research*; 2(45): 200-211. ISSN 1450-216X

**Haidukowski M., Pascale M., Perrone G., Pancaldi D., Campagna C., Visconti A. (2005).** Effect of fungicides on the development of *Fusarium* head blight, yield and deoxynivalenol accumulation in wheat inoculated under field conditions with *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *Journal of. Science. Food and Agriculture*; 85:191-198.

**Hale A. L., Reddivari L., Nzaramba M. N., Bamberg J. B., Miller J. J.C. (2008).** Interspecific variability for antioxidant activity and phenolic content among *Solanum* species. *American. Journal of. Potato Research*; 85: 332–341

**Hamdaoui W ., Marley B., Ben Brahim N ., Marzouk B. (2013).** Composition des huiles essentielles de deux espèces de perroquets tunisiens: *Marrubium vulgare L. et Marrubium aschersonii*. *Magnus*; (16): 608-612.

**Harborne J. B. (1998).** *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis*.3rd ed. CHAPMAN and HALL.Britanie. 294p.

**Hassanein N. M., Ali M. M., Youssef K. A., Mahmoud D. A. (2010).** Control of tomato early blight and wilt using aqueous extract of neem leaves. *Phytopathologia Mediterranea*; 49:143–151.

**Hayouni E. A., Abedrabba M., Bouix M., Hamdi M. (2007).** The effects of solventsand extraction method on the phenolic contents and biological activities invitro of Tunisian *Quercus coccifera L.* and *Juniperus phoenicea L.* fruit extracts.*Food Chemistry*; 105: 1126 – 1134.

**Hensel Wolfgang. (2008).** *350 plantes médicinales*. Delachaux et Niestlé SA, Paris.256p. ISBN: 978-2-603-01531-5.

**Hess M. (2002).** *Alkaloids. Nature's Curse or Blessing ?*. Wiley-VHC, Zürich, 413 p., ISBN 3-906390-24-1.

**Hopkins J. (1995).** The glycoalkaloids: naturally of interest (but a hot potato?). *Food and Chemical Toxicology*; 33: 323-328.

**Hu F.B., (2003).** Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *American Journal of Clinical Nutrition*; 78: 544-551.

**Humaira F., Khan K., Zia M., Rehman T. U., Mirza B., Haq I. U. (2015).** Extraction optimization of medicinally important metabolites from *Datura innoxia* mill.: an in vitro biological and phytochemical investigation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*; 15:1–18.

**Hysing S., Wiik L., (2014).** Fusarium seedling blight of wheat and oats: effects of infection level and fungicide seed treatments on agronomic characters. *Acta Agriculturae Scandinavica* ; 64: 537-546.

**Index phytosanitaire des produits à usage agricole. (2017).** Direction de la protection des végétaux et des contrôles techniques. Alger.p.230.

**Jarrige R., Grenet E., Demarquilly C., Besle J.M., (1995).** Les constituants de l'appareil végétatif des plantes fourragères. In: *Nutrition des ruminants domestiques - Ingestion et digestion*. R. Jarrige, Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M-H. Farce et M. Journet (eds). INRA. Paris. 901p

**Jellis G., Kelly C., Clark, B., Bryson, R., Tonguç L. (2010).** *The Encyclopaedia Of Cereal Diseases*. HGCA. BASF the chemical company. pp39-41

**Joffin JN., Leyral G. (2001).** *Microbiologie technique 1 dictionnaire des techniques*. 3ème ed. Biologie Technique. 58 p.

**Jokić S., Velić D., Bilić M., A. Bucić-Kojić A., M. Planinić M., Tomas S. (2010).** Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *Journal of Food Science*; 28: 206-212.

**Judd W. S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Steven P. (2002).** *Botanique systématique: Une perspective phylogénétique*. 1ere ed. Paris et Bruxelles. pp. 369-384.

**Julkunen-Titto R. (1985).** Phenolic constituents in the leaves of northern willows methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food chemistry*; 33:213.

**Jung B., Park S., Lee Y., Lee J. (2013).** Biological efficacy of *Streptomyces* sp. StrainBN1 against the cereal head blight pathogen *Fusarium graminearum*. *Plant Pathology Journal*; 29: 52–58.

**Kabran G.R., Ambeu N.C., Mamyrbékova-Békro J.A., Békro Y.A. (2011).** CCMD'extraits Sélectifs de 10 Plantes Utilisées Dans le Traitement Traditionnel du Cancer du Sein en Côte d'Ivoire. *European Journal of Science Research* ; 63 (4):592–603.

- Kadri A., Zarai Z., Békir A., Gharsallah N., Damak M., Gdoura R. (2011).** Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* L. de Tunisie. *Revue Africaine de Biotechnologie*; 11-19.
- Kammoun-Gargouri L. (2010).** La fusariose de l'épi de blé en Tunisie : identification, pathogénie et chémotypage des espèces toxigènes. Thèse de Doctorat. Université de Tunis El Manar. Tunisie, 124 p.
- Khaled-Khodja N., Boulekbache-Makhlouf L. b, Madani K.(2014).** Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial Crops and Products*; 61:41–48.
- Khan N. I., Schisler D. A., Boehm M. J., Lipps P. E., Slininger P. J. (2004).** Field testing of antagonist of Fusarium Head Blight incited by *Gibberella zae*. *Biological Control*; 29: 245–255.
- Kloos W. E., Tornabene T. G., Schleifer K. H. (1974).** Isolation and characterization of micrococci from human skin, including two new species: *Micrococcus lylae* and *Micrococcus kristinae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*; 24:79-101.
- Kotowicz N. K., Frac M., Lipiec J. (2014).** The Importance of Fusarium Fungi in Wheat Cultivation – Pathogenicity and Mycotoxins Production. *Journal of Animal and Plant Sciences*; 21: 3326-3343.
- Kresánek J. (1981).** *Les plantes médicinales*. SLOVART Bratislava et S.N.R.Baudouin. Paris. 224p. ISBN 2-86 396-080-6.
- Krimat S., Dob T., Lamari L., Boumeridja S., Chelghoum C., Metidji H. (2014).** Antioxidant and antimicrobial activities of selected medicinal plants from Algeria. *Journal of Coastal Life Medicine*; 2(6): 478-483. DOI:10.12980/JCLM.2.2014APJTB-2014-0071.
- Kurbatova, N.V., Muzychkina R.A., Mukhitdinov N.M. and Parshina, G.N. (2013)** Comparative Phytochemical Investigation of the Composition and Content of Biologically Active Substances in *Marrubium vulgare* and *Marrubium alternidens*. *Chemistry of Natural Compounds*; 39:501-502. <http://dx.doi.org/10.1023/B:CONC.0000011128.64886.f4>
- Laala S., Manceau C., Valentini F., Kerkoud M., Kheddami M. (2012).** Fire blight survey and first characterization of *Erwinia amylovora* isolates from Algeria. *Journal of Plant Pathology*; 94:693–696.
- Laraba I. (2018).** Étude de la diversité génétique, de la pathogénicité et du potentiel toxigène de *Fusarium culmorum* (Wm. G. Smith) Sacc. Agent de la pourriture racinaire et de la fusariose de l'épi du blé en Algérie. Thèse de Doctorat. ENSA.Alger.126p
- Latour X., Faure D., Diallo S., Cirou A., Smadja B., Dessaux Y. Orange N. (2008).** Lutte contre les maladies bactériennes de la pomme de terre dues aux *Pectobacterium spp.* (*Erwinia carotovora*). *Cahiers Agricultures*;17:355-60.



- Lemarchand M.L.J. (2008).** Les marsupiaux arboricoles Folivores et l'eucalyptus : Un exemple d'adaptation aux défenses Anti-herbivores des plantes. Thèse de Doctorat.Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE. France.
- Leslie J. F., Summerell B. A. (2006).** *The Fusarium laboratory Manual*. Blackwell publishing. Ames. USA. 388 p.
- Lianga Y. Z., Xieb P., Chan K. (2004).** Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography B*, 812: 53-70.
- Luís Â., Neiva D., Pereira H., Gominho J., Domingues F. Duarte A.P.(2014).** Stumps of Eucalyptus globulus as a Source of Antioxidant and Antimicrobial Polyphenols. *Molecules*; 19: 16428-16446. doi:10.3390/molecules191016428
- Macheix J.J. (1996).** Les composés phénoliques des végétaux : quelles perspectives à la fin du XX<sup>e</sup> siècle ?. *Acta Botanica Gallica*; 143 :473-479.
- Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005).** *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. Lausanne. Suisse. 181p. ISBN : 2-88074-625-6.
- Madani S., Boudjelal A., Noui H., Djamel S., Abderrahim B. (2015).** Flora and ethnobotany of medicinal plants in the southeast of the capital of Hodna (Algeria). *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*; 1(1):24-30.
- Malcolm S.B. (1991).** Cardenolide-mediated interactions between plants and herbivores. pp.251-296. In: G.A. Rosenthal and M.R. Berenbaum (editors), *Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites*, 2nd ed. Volume I: *The Chemical Participants*. Academic Press. San Diego.
- Mamyrbekova-Bekro J.A., Boua B.B., Kouassi K.C., Békro Y.A. (2013).** Sur l'analyse qualitative et pharmacologique de 2 plantes antihypertensives utilisées à N'gramanssabo en Côte d'Ivoire. *Nature & Technologie*; 8:2-12.
- Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V., Beer S. V., Machado M. A., Toth I., Salmond G., Foster G. D. (2012).** Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology: top 10 plant pathogenic bacteria. *Molecular Plant Pathology*; 13, 614-629
- Mateo E. M., Valle-Algarra F. M., Mateo R., Jiménez M., Magan N. (2011).** Effect of fenpropimorph, prochloraz and tebuconazole on growth and production of T-2 and HT-2 toxins by *Fusarium langsethiae* in oat-based medium. *International Journal of Food Microbiology*; 151 : 289-298.
- Mc Lafferty F. W., Stauffer D. B. (1994).** *Wiley Registry of Mass Spectral Data*. 6th ed. Mass spectrometry library search system BenchTop/PBM, version 3.10d. Palisade Co.: Newfield.

**Mesterházy A., Bartók T., Lamper C. (2003).** Influence of wheat cultivar, species of *Fusarium*, and isolate aggressiveness on the efficacy of fungicides for control of Fusarium head blight. *Plant Disease* ; 87: 1107-1115.

**Michiko M. N. et Peter Z., (1998).** Anaerobic growth of a “strict aerobe” (*Bacillus subtilis*). *Annual Review of Microbiology*; 52:165–190. ISSN 0066-4227. DOI 10.1146/annurev.micro.52.1.165

**Mikiciński A., Sobiczewski P., Puławska J., Malusa E. (2016).** Antagonistic potential of *Pseudomonas graminis* 49M against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *Archives of Microbiology*; 198: 531–539.

**Moh A.A., Massart S., Jijakli M.H., Lepoivre P. (2012).** Models to predict the combined effects of temperature and relative humidity on *Pectobacterium atrosepticum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* population density and soft rot disease development at the surface of wounded potato tubers. *Journal of Plant Pathology*; 94:181-91.

**Mohammedi F.Z. (2013).** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l’Algérie. Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen. 170 p.

**Moretti A. N. (2009).** Taxonomy of *Fusarium* genus, a continuous fight between lumpers and splitters. *Zbornik Matice Srpske za Prirodne Nauke Novi Sad*. 117: 7-13.

**Moussaoui M. (2014).** *Plantes médicinales de Méditerranée et d’Orient*. Sabil. France. 137p. ISBN 978-2-9542435-0-4

**Moya-Elizondo E. A. (2013).** *Fusarium* crown rot disease: biology, interactions, management and function as a possible sensor of global climate change. *Ciencia e Investigación Agraria*; 40: 235-252.

**Mujeeb F., Bajpai P., Pathak N. 2014.** Phytochemical Evaluation, Antimicrobial Activity, and Determination of Bioactive Components from Leaves of *Aegle marmelos*. *Biomed Research International*; 1-11.

**Müllenborn, C., Steiner U., Ludwig M., Oerke E. C. (2008).** Effect of fungicides on the complex of *Fusarium* species and saprophytic fungi colonizing wheat kernels. *European Journal of Plant Pathology*; 120: 157-166.

**N’gaman Kohué C.C., Békro Y.A., Mamyrbékova-Békro J.A, Béné A., Gooré B.S. (2009).** Sur la Composition en Métabolites Secondaires et L’activité Anti-Oxydante D’extraits Bruts de *Gmelina arborea* Roxb. (Verbanaceae) de Côte d’Ivoire, Afrique de l’Ouest : analyse par Chromatographie en Couche Mince. *European Journal of Science Research*; 36 (2):161–171. [http://www.lablcbosn.com/wp-content/uploads/2015/09/ejsr\\_36\\_2\\_03.pdf](http://www.lablcbosn.com/wp-content/uploads/2015/09/ejsr_36_2_03.pdf)

**Nawwar Mahmoud A.M., El-Mousallamy A.M.D., Barakat H.H., Buddrus J., and Linscheid M. (1989).** Flavonoid Lactates from Leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry*; 28, 3201-3206. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80307-3](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(89)80307-3)



- Neumann, U.P.; Berg, T.; Baha, M.; Puhl, G.; Guckelbeger, O.; Langreh, J.M.; Neuhaus, P. (2004). Long-term outcome of liver transplant for hepatitis C: A 10 year follow-up. *Transplantation*; 77: 226–231.
- Norelli J. L., Jones A. L., Aldwinckle H. S. (2003). Fire blight management in the twenty-first century: Using new technologies that enhance host resistance in apple. *Plant Disease*; 87, 756–765.
- Noudogbessi J. P. A., Natta A. K., Tchobo F. P., Bogninou G. S., Bothon F. T. D., Bossou A. D., Figueredo G., Chalard P., Chalchat J. C., Sohounhloué D. C. K. (2013). Phytochemical Screening of Pentadesmabutyracea Sabine (Clusiaceae) Acclimated in Benin by GC/MS. *ISRN Analytical Chemistry*; 1-7. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/172397>.
- Nourozian, J., Etebarian, H. R., Khodakaramian, G. (2006). Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*; 28: 29–38.
- Okigbo R.N., Nameka I.A. (2005). Control of yam tuber with leaf extracts of *Xylopi*a *aethiopia* and *Zingiber officinale*. *African Journal of Biotechnology*. 4(8): 804 – 807.
- Osman M., He X., Singh R. P., Duveiller E., Lillemo M., Pereyra S. A., Westerdijk Hoks I., Kurushima M., Yau S., Benedettelli, S., Singh, P. K. (2015). Phenotypic and genotypic characterization of CIMMYT's 15th international *Fusarium* head blight screening nursery of wheat. *Euphytica*; 205:521–537. DOI 10.1007/s10681-015-1425-0
- Oyedemi S.O.; Bradley G.; Afolayan A.J. (2010). In vivo and in vitro antioxidant activities of aqueous stem bark extract of *Strychnos henningsii* (Gilg). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* ; 4: 70–78.
- Ozenda P. (1991). *Flore et végétation du Sahara*. 3<sup>ème</sup> éd. augmentée. CNRS. Paris. 662p.
- Pageau D., Fillon F. (2012). Fusariose : réduire les risques au champ. Annale de la journée d'information sur les mycotoxines. 7p.
- Palazzini J. M., Ramirez M. L., Torres A. M., Chulze S. N. (2007). Potential biocontrol agents for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol production in wheat. *Crop Protection*; 26: 1702–1710.
- Pandit J., Aqil M., Sultana Y. (2015). Terpenes and essential oils as skin penetration enhancers. Dragicevic, N., Maibach, H.I., percutaneous penetration enhancers chemical methods. In: *penetration enhancement modification of the stratum corneum*. Springer, pp.174-183.
- Parekh J., Chanda S.V (2007). In vitro antimicrobial activity of *Trapanatans* L. fruit rind extracted in different solvents. *African Journal of Biotechnology*; 6(16): 1905-1909.
- Parveen S., Kumar V. R. (2000). Effect of extracts of some medicinal plants on the growth of *Alternaria triticina*. *Journal of Phytological Research*; 13 (2):195-196.

**Pârvu M., Pârvu A. E., Vlase L., Roșca-Casian O., Pârvu, O. (2011).** Antifungal properties of *Allium ursinum* L. Ethanol extract. *Journal of Medicinal Plants Research*; 5: 2041–2046.

**Paulitz T.C., Okubara P.A., Schroeder K. L. (2010).** Integrated Control of Soil borne Pathogens of Wheat. Recent Developments in Management of Plant Diseases. *Plant Pathology in the 21st Century*; 1: 229-245.

**Pessini GL., Prado Dias Filho Celso B., Nakamura V., Cortez DAG. (2003).** Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper Regnelli* (Miq.) C. DC. Var. *pallescens* (C. DC.) yunk. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*; 98(8): 1115-1120

**Pinelo M., Del Fabbro P., Marzocco L., Nunez M. J., Vicoli M. C. (2005).** Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry*; 92: 109–117.

**Piqué N., Miñana-Galbis D., Merino S., Tomás J. M. (2015).** Virulence factors of *Erwinia amylovora*: a review. *International Journal of Molecular Sciences*; 16:12836– 12854

**Pollack M. (1995).** *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Benett JE, Dolin R, *Principles and practice of infectious diseases*. 4th ed. New York: Churchill Livingstone.pp. 1980-2003.

**Pulpati H., Biradar Y. S., Rajani M. (2008).** High-Performance Thin-Layer Chromatography Densitometric Method for the Quantification of Harmine, Harmaline, Vasicine, and Vasicinone in *Peganum harmala*. *Journal of AOAC international*; 91: 5.

**Ramzi A.A.M., Salah A.A.A., Sidgi H., Faisal M.N.A., Sama A.Z.A. and Ulrike L. (2010).** Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities and phytochemical Screening of Some Yemeni Medicinal Plants. *Evidence Complementary and Alternative Medicine*; 7(3): 323–330.

**Ricardo da Silva J.M., Darmon N., Fernandez Y., Mitjavila S., (1991).** Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 39: 549-1552.

**Rinez A., Daami-Remadi M., Ladhari A., Omezzine .F, Rinez I. (2013).** Antifungal activity of *Datura metel* L. organic and aqueous extracts on some pathogenic and antagonistic fungi. *African Journal of Microbiology Research*; 7: 1605-1612.

**Robards K., Antolovich M. (1997).** Analytical chemistry of fruit bioflavonoids-a review. *Analyst*; 122: 11R–34R.

**Rongai D., Pulcini P., Pesce B., Milano F. (2016).** Antifungal activity of pomegranate peel extract against fusarium wilt of tomato. *European Journal of Plant Pathology*.147:229-238. DOI 10.1007/s10658-016-0994-7

**Sadasivam S., Manickman A. (1996).** *Biochemical methods*. 2<sup>nd</sup>ed. New Age International Publisher. New Delhi. 272 p.

- Sahpaz S., Garbacki N., Tits M. and Bailleul, F. (2012).** Isolation and Pharmacological Activity of Phenylpropanoid Esters from *Marrubium vulgare*. *Journal of Ethnopharmacology*; 79:389-392. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00415-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00415-9)
- Santos C., Costa P.A.G.,Barroso M.M., Pedro J.G.(2006).** Composition des huiles essentielles et trichomes glandulaires de *Marrubium vulgare* L. sauvage en Algérie. *Journal of Essential Oil Research* ; 18 : 369-373.
- Sarni–Manchado P., Cheynier V. (2006).** *Les polyphénols en agroalimentaire*. Edition TEC & DOC. Lavoisier. Paris. 398p. ISBN:2-7430-0805-9.
- Schauenberg P., Paris F., (1997) .** *Guide des plantes médicinales*. Delachaux et Niestlé. Paris. 396 P.
- Scherm B., Blamas V., Spanu F., Pani G., Delegou G., Pasquali M., Migheli O. (2013).** *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular Plant Pathology*; 14: 323-341.
- Schoonhoven L. M., Van Loon J. J. A., Dicke P. (2005).** *Insect-plant biology*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford University Press. Oxford.
- Shah G., kaur M.,2 Singh S. P., RaharS., Dhabliya F.,Arya Y., Shri R. (2012).**Pharmacognostic Parameters of *Eucalyptus globulus* Leaves. *Pharmacogony Journal*; 4(34): 39-43
- Singleton V. L., Rossi J. A. (1965).** Colorometry of total phenolics with pohsphomolybdciphotungstic acid reagents. *American. Journal of Enology and Viticulture*; 16:44-158.
- Swigar AA., Silverstein RM. (1981).** Monoterpenes-infrared, mass, proton-NMR, carbon-NMR spectra and Kovats Indices. *Wisconsin: Aldrich Chemical Company Inc.*; 3-121.
- Taffet L., Raio A. Holeva M. C., Dikhai R., Ould Kouskoussa C., Cesbron S., Krimi Z.(2020).** Molecular characterization of Algerian *Erwinia amylovora* strains by VNTR analysis and biocontrol efficacy of *Bacillus spp.* and *Pseudomonas brassicacearum* antagonists. *European Journal of Plant Pathology*; 156:867–883. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01938-6>
- Tegege G., Pretorius J. C. (2007).** In vitro and in vivo antifungal activity of crude extracts and powdered dry material from Ethiopian wild plants against economically important plant pathogens. *BioControl*; 52: 877–888.
- Tepe B., Sokmen M., Akpulat H. A., Sokmen A. (2006).** Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chemistry*; 95: 200.
- Tivoli B. (1988).** Guide d'identification des différentes espèces ou variétés de *Fusarium* rencontrées en France sur la pomme de terre et dans son environnement. *Agronomie, EDP Sciences*; 8 (3) :211-222.

- Tiwari P., Kumar B., Kaur M., Kaur G., Kaur H. (2011).** Phytochemical screening and extraction: A review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*; 1(1):98-106.
- Toussoun T. A., Nelson P. E. (1976).** *A pictorial guide to the identification of Fusarium species*. Second ed. The Pennsylvania State University Press. University Park and London. 43p.
- Trabut M. L. (1914).** Naturalisation d'un Eucalyptus en Algérie: *Eucalyptus algeriensis* Trab. *Bulletin de la Société Botanique de France*; 61:5. DOI:10.1080/00378941.1914.10832605
- van der Zwet T., et Beer S. (1995).** *Fire blight: Its nature, prevention and control*. A practical guide to integrated disease management. *USDA Agricultural Information Bulletin*: 631.
- Vansant G. (2004).** Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Symposium « *Antioxydants et alimentation* ». Institut Danone.
- Vernin G., Boniface C., Metzger J., Guiglione C., Hammoud A., Suon K. N., Fraisse D., Parkanyl C. (1988).** GC-MS-Specma bank analysis of *J. communis* needles and berries. *Phytochemistry*; 27: 1061-1064.
- Volák J., Stodola J., (1983).** *Plantes médicinales*. GRÜND. Paris. 319 p. ISBN 2-7000-1515-0
- Wenzel R.P. (1997).** *Prevention and control of nosocomial infections*. 3rd ed. Baltimore: Williams and Wilkins. 841p.
- Wharton, M., Rice J. R., McCallum R., Gallis H. A. (1986).** Septic arthritis due to *Micrococcus luteus*. *Journal of Rheumatology*; 13 :659-660
- Wiblin R.T. (1997).** **Nosocomial pneumonia.** In: Wenzel RP. *Prevention and control of nosocomial infections*. 3rd ed. Baltimore: Williams and Wilkins. pp. 807-19.
- Windels C. E. (2000).** Economic and social impacts of Fusarium head blight: changing farms and rural communities in the northern Great Plains. *Phytopathology*; 90(1): 17-21.
- Wolf E. D., Shroyer, J. P., Olson, B. (2011).** *Wheat disease identification*. Multi-state extension and research committees for small grain diseases. pp.20-21.
- Xue A. G., Chen Y., Voldeng H. D., Fedak G., Savard M. E., Langle T., Zhang J., Harman G. E. (2014).** Concentration and cultivar effects on efficacy of CLO-1 biofungicide in controlling Fusarium head blight of wheat. *Biological Control*; 73: 2–7.
- Xue A. G., Voldeng H. D., Savard M. E., Fedak G., Tian X., Hsiang, T. (2009).** Biological control of fusarium head blight of wheat with *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Canadian Journal of Plant Pathology*; 31: 169–179.

**Yan D., Jin C., Xiao X.H., Dong X.P. (2008).** Antimicrobial properties of berberines alkaloids in *Coptis chinensis* Franch by microcalorimetry. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*; 70(6): 845-849.

**Yao L., Liu Jiang Y., Caffin N., D'Arcy B., Singanusong R., Datta N.(2006).** Compositional analysis of teas from Australian supermarkets. *Food Chemistry*; 94: 115–122.

**Yokozawa T.; Oura H.; Hattori, M.; Iwano, M.; Dohi, K.; Sakanaka, S.; Kim, M. (1993).** Inhibitory effect of tannin in green tea on the proliferation of mesangial cells. *Nephron*; 65: 596–600.

**Zahra S. S., Ahmed M., Qasim M., Gul B., Zia M., Mirza B., Haq I. (2017).** Polarity based characterization of biologically active extracts of *Ajuga bracteosa* Wall. ex Benth. and RP-HPLC Analysis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*; 17:443. DOI 10.1186/s12906-017-1951-5.

**Zeguerrou R., Guesmia H., Lahmadi S. (2013).** *Recueil des plantes médicinales dans la région des ziban.* Centre de recherche scientifique et technique sur les régions arides Omar El Barnoui. 108p. ISBN : 978-9931-438-00-7.

**Zhang S. A., Schisler D. A., Boehm M. J., Slininger P. J. (2007).** Utilization of chemical inducers of resistance and *Cryptococcus flavescens* OH 182.9 to reduce *Fusarium* head blight under greenhouse conditions. *Biological Control*; 42: 308–315.

**Zhou K., Yu L. (2004).** Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*; 37: 717–721.

#### **Sites web**

<http://qzhchem.com/>. consulté 18/09/2019 à 20:27

<https://fr.db-city.com/> consulté le 03/01/2020 à 10:20

<http://Climate-Data.org/> consulté le 30/09/2020 à 20:00

# ANNEXES





**Annexe I – Résultats de quelques tests phytochimiques**

- a. Test des alcaloïdes (extrait méthanolique)      b. Test d'anthocyanes (extrait aqueux)  
 c. Test de stéroïdes (extrait éthanolique)      d. Test de mucilage (extrait méthanolique)

**Annexe II** - Analyse de la variance à un facteur de l'effet des extraits sur le rendement  
d'extraction

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	208,2383407	2	104,1191704	4,458233503	0,022572326	3,402826105
A l'intérieur des groupes	560,5045333	24	23,35435556			
Total	768,7428741	26				

**Annexe III** - Analyse de la variance de l'effet des solvants sur la teneur en polyphénols

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	85216,19907	8	10652,02488	6,819471367	0,000367899	2,510157895
A l'intérieur des groupes	28116,028	18	1562,001556			
Total	113332,2271	26				

**Annexe IV** - Analyse de la variance de l'effet des solvants sur la teneur en flavonoïdes.

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	2206,92303	8	275,8653787	16,8653827	0,0000006	2,510157895
A l'intérieur des groupes	294,4242	18	16,3569			
Total	2501,34723	26				



**Annexe V** - Analyse de la variance de l'effet des solvants sur la teneur en tanins condensés

---

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	652,3630296	2	326,1815148	3,26940119	0,05550229	3,402826105
A l'intérieur des groupes	2394,431244	24	99,76796852			
Total	3046,794274	26				

---

**Annexe VI-** Analyse de la variance de l'effet des solvants sur les IC50

---

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	54400,73407	8	6800,091759	2,35840818	0,06228049	2,510157895
A l'intérieur des groupes	51900,11333	18	2883,33963			
Total	106300,8474	26				

---

**Annexe VII** - Analyse de la variance de l'effet des concentrations sur *F. culmorum*

---

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	9053,94632	2	4526,97316	9,91074866	0,00014613	3,11379226
A l'intérieur des groupes	35628,3787	78	456,774086			
Total	44682,325	80				

---

**Annexe VIII** - Analyse de variance de l'effet des extraits sur *F. culmorum*

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	30290,81	26	1165,03116	4,37144266	0,0000024	1,7016361
A l'intérieur des groupes	14391,515	54	266,509536			
Total	44682,325	80				

**Annexe IX** - Analyse de variance de l'effet des concentrations sur *F. oxysporum*

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	16120,771	2	8060,38552	36,9309868	0,0000000000052	3,11379226
A l'intérieur des groupes	17023,9175	78	218,255352			
Total	33144,6885	80				

**Annexe X** - Analyse de variance de l'effet des extraits sur *F. oxysporum*

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	10490,5989	26	403,484574	0,96177632	0,52984672	1,7016361
A l'intérieur des groupes	22654,0896	54	419,520177			
Total	33144,6885	80				

**Annexe XI** - Analyse de variance de l'effet des concentrations sur *Fusarium roseum*

---

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	25253,6117	2	12626,8058	52,7448447	0,000000000000003	3,11379226
A l'intérieur des groupes	18672,7416	78	239,394123			
Total	43926,3532	80				

---

**Annexe XII** - Analyse de variance de l'effet des extraits sur *F. oxysporum*

---

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	9321,95282	26	358,536647	0,55949471	0,94569221	1,7016361
A l'intérieur des groupes	34604,4004	54	640,82223			
Total	43926,3532	80				

---

**Annexe XIII** - Analyse de variance de l'effet des concentrations sur le pourcentage de germination.

---

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	1225	2	612,5	5,65384615	0,01479326	3,68232034
A l'intérieur des groupes	1625	15	108,333333			
Total	2850	17				

---

**Annexe XIV** - Analyse de variance de l'effet des extraits sur le pourcentage de germination

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	616,666667	5	123,333333	0,66268657	0,65869166	3,10587524
A l'intérieur des groupes	2233,33333	12	186,111111			
Total	2850	17				

**Annexe XV** - Analyse de la variance de l'effet des concentrations et des traitements sur le poids frais.

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Traitements	2,62870667	5	0,52574133	2,34148804	0,07922964	2,71088984
concentration	1,94118	4	0,485295	2,16135267	0,11060325	2,8660814
Erreur	4,49066	20	0,224533			

**Annexe XVI** - Analyse de la variance de l'effet des concentrations et des traitements sur le poids sec.

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Traitements	1,17407257	6	0,19567876	0,62781114	0,70594875	2,99612038
Concentrations	9,75090124	2	4,87545062	15,6422811	0,00045403	3,88529383
Erreur	3,74020943	12	0,31168412			
Total	14,6651832	20				

**Annexe XVII** - Analyse de la variance de l'effet des doses et des traitements sur le nombre de feuilles.

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
traitements	4,27777778	5	0,85555556	1,63829787	0,23664624	3,32583453
Concentrations	2,11111111	2	1,05555556	2,0212766	0,18313427	4,10282102
Erreur	5,22222222	10	0,52222222			
Total	11,6111111	17				

**Annexe XVIII**- Analyse de la variance de l'effet des doses et des traitements sur la longueur de racine.

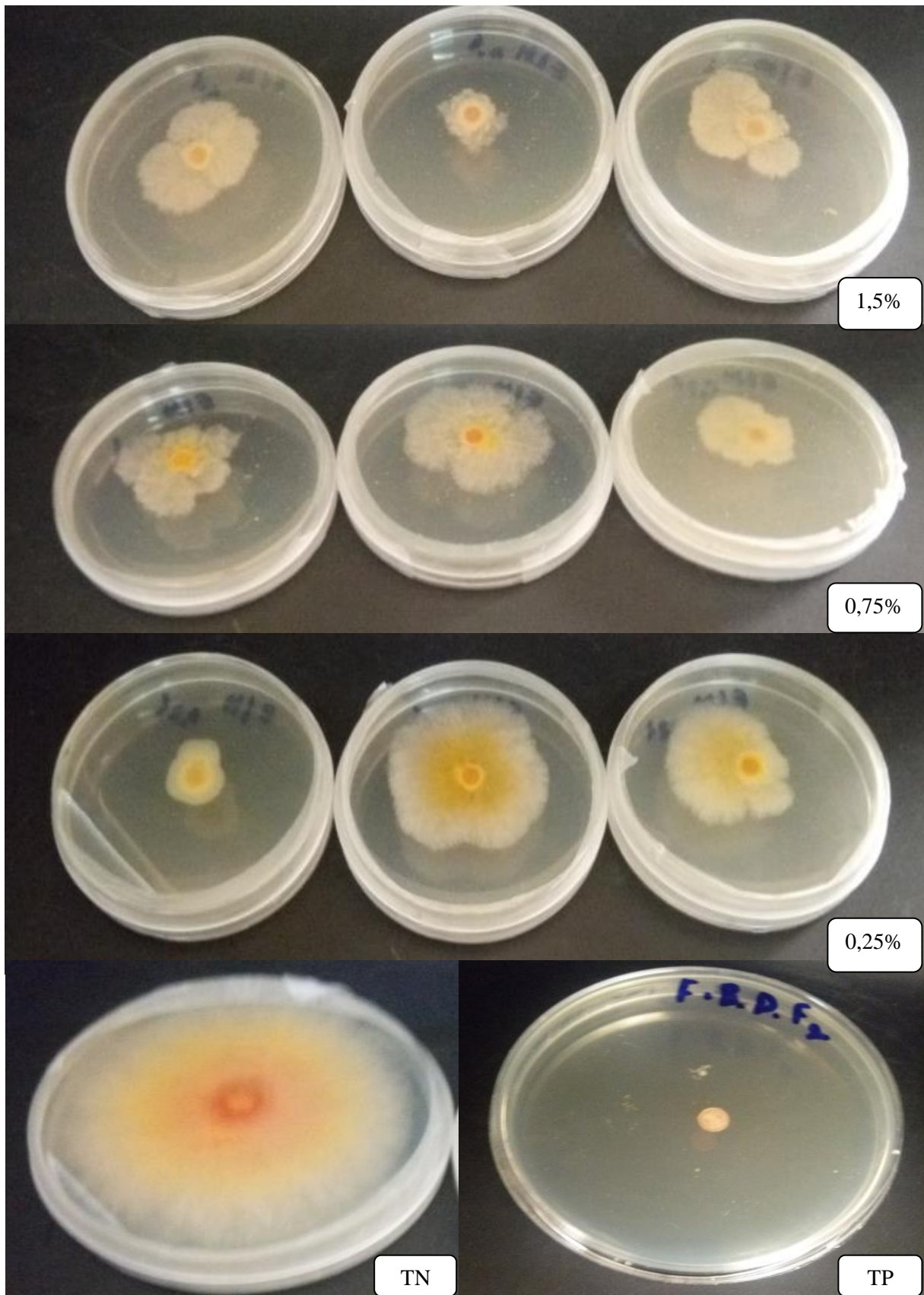
<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Traitements	195,111111	5	39,0222222	1,57789509	0,25193812	3,32583453
Concentrations	179,694444	2	89,8472222	3,63304504	0,06516734	4,10282102
Erreur	247,305556	10	24,7305556			
Total	622,111111	17				

**Annexe XIX** - Analyse de la variance de l'effet des concentrations et des traitements sur la longueur de la partie aérienne.

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Traitements	195,111111	5	39,0222222	1,57789509	0,25193812	3,32583453
Concentrations	179,694444	2	89,8472222	3,63304504	0,06516734	4,10282102
Erreur	247,305556	10	24,7305556			
Total	622,111111	17				

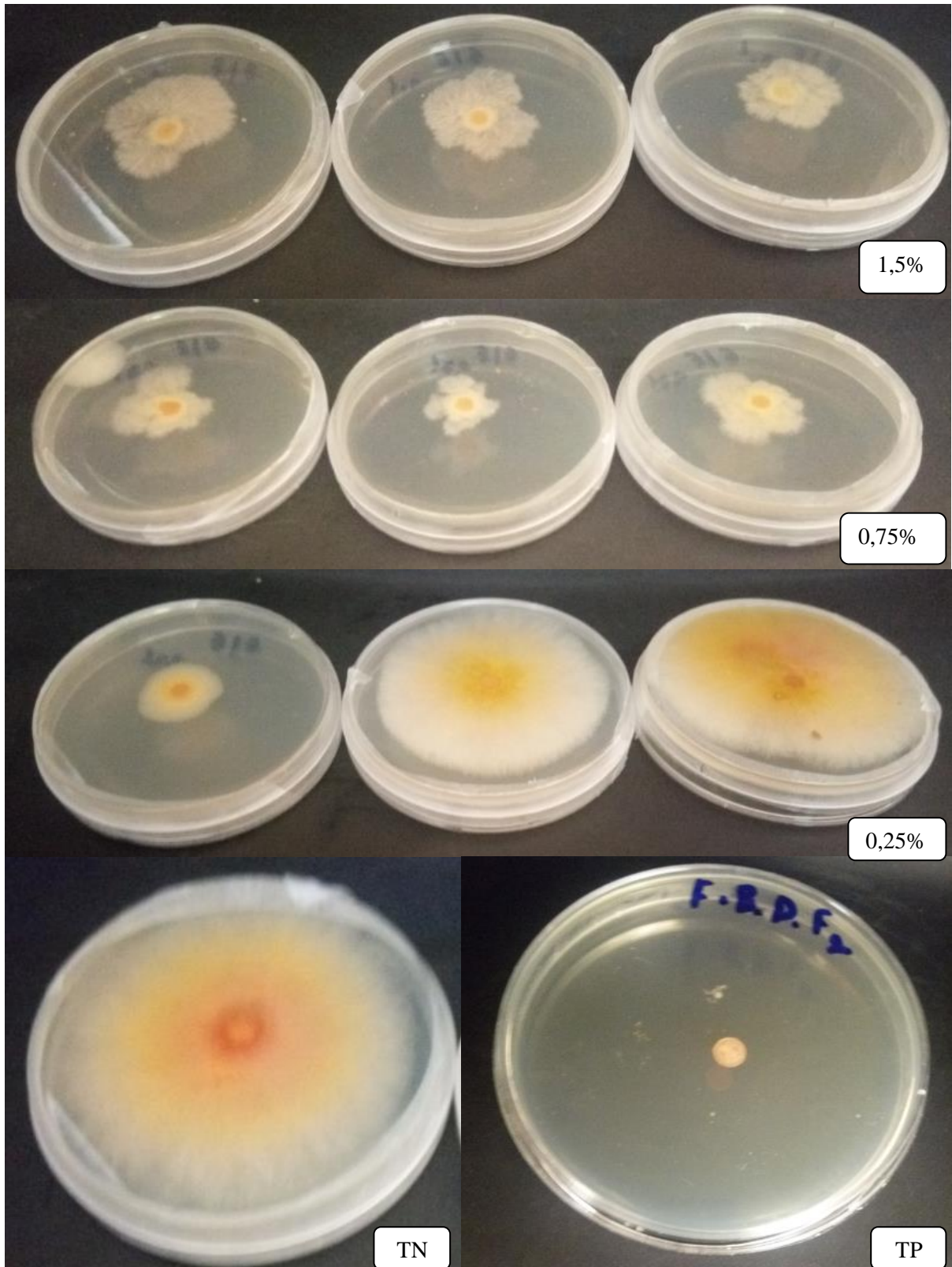
**Annexe XX** - Analyse de la variance de l'effet des doses et des traitements sur l'indice de maladie.

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Concentrations	0,21333333	2	0,10666667	0,11657559	0,89559543	19
Traitements	0,54	1	0,54	0,59016393	0,52266563	18,5128205
Erreur	1,83	2	0,915			
Total	2,58333333	5				



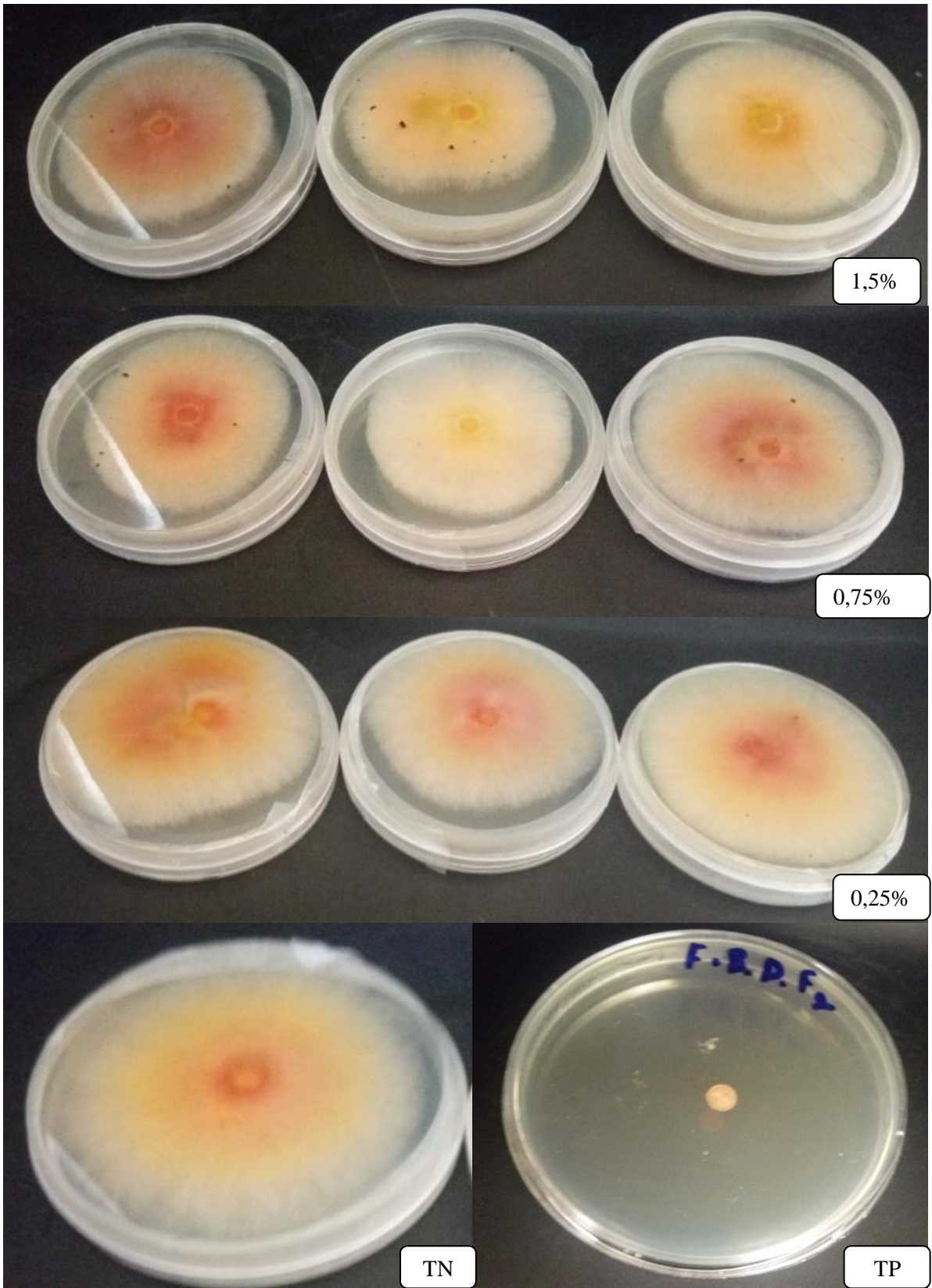
**Annexe XXI** - Effet de l'extrait méthanolique d'*E. obliqua* Hert. sur la croissance mycélienne de *F. culmorum* *in vitro*.



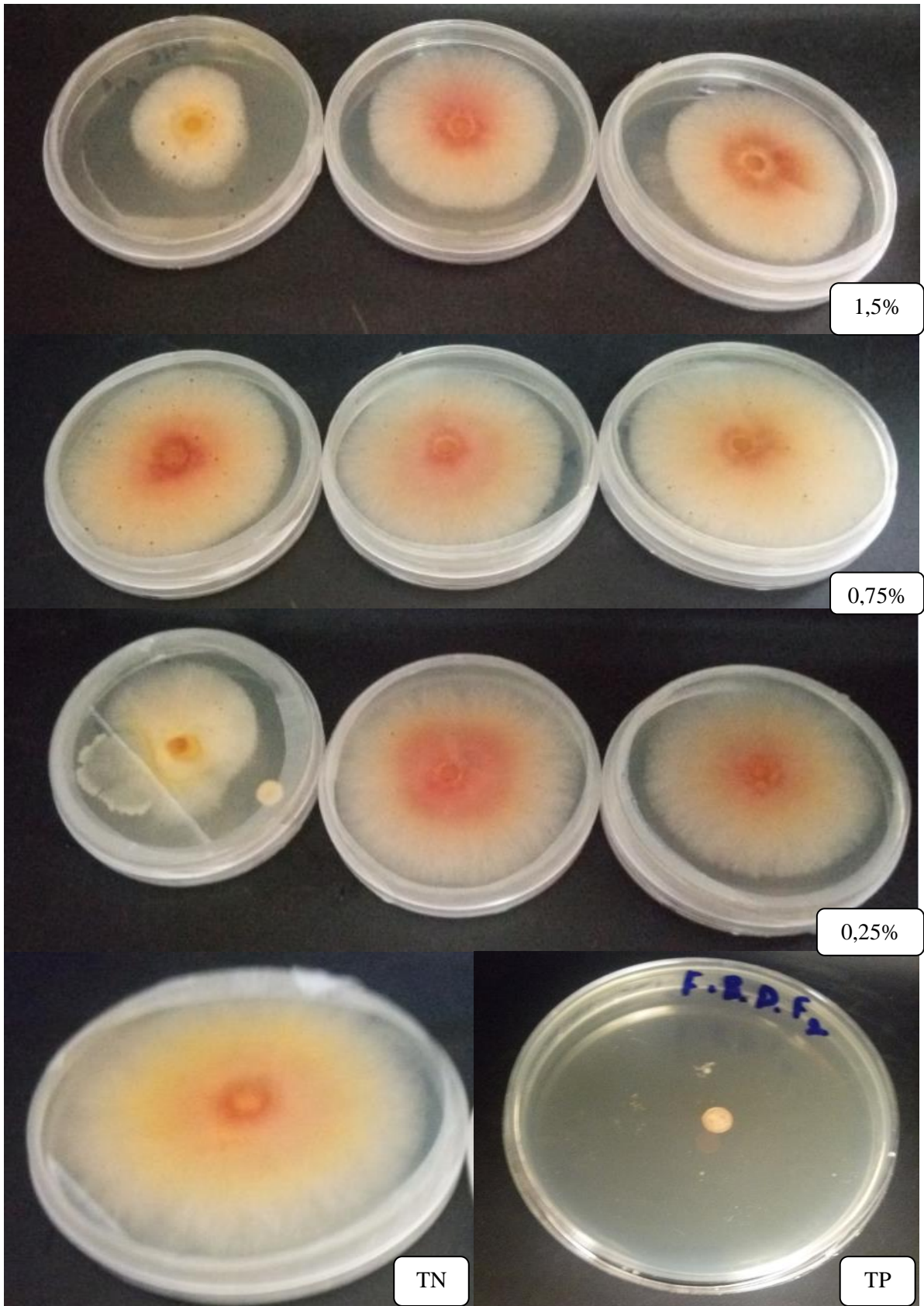


**Annexe XXII** - Effet de l'extrait éthanolique d'*E. obliqua* Hert. sur la croissance mycélienne de *F. culmorum* *in vitro*.



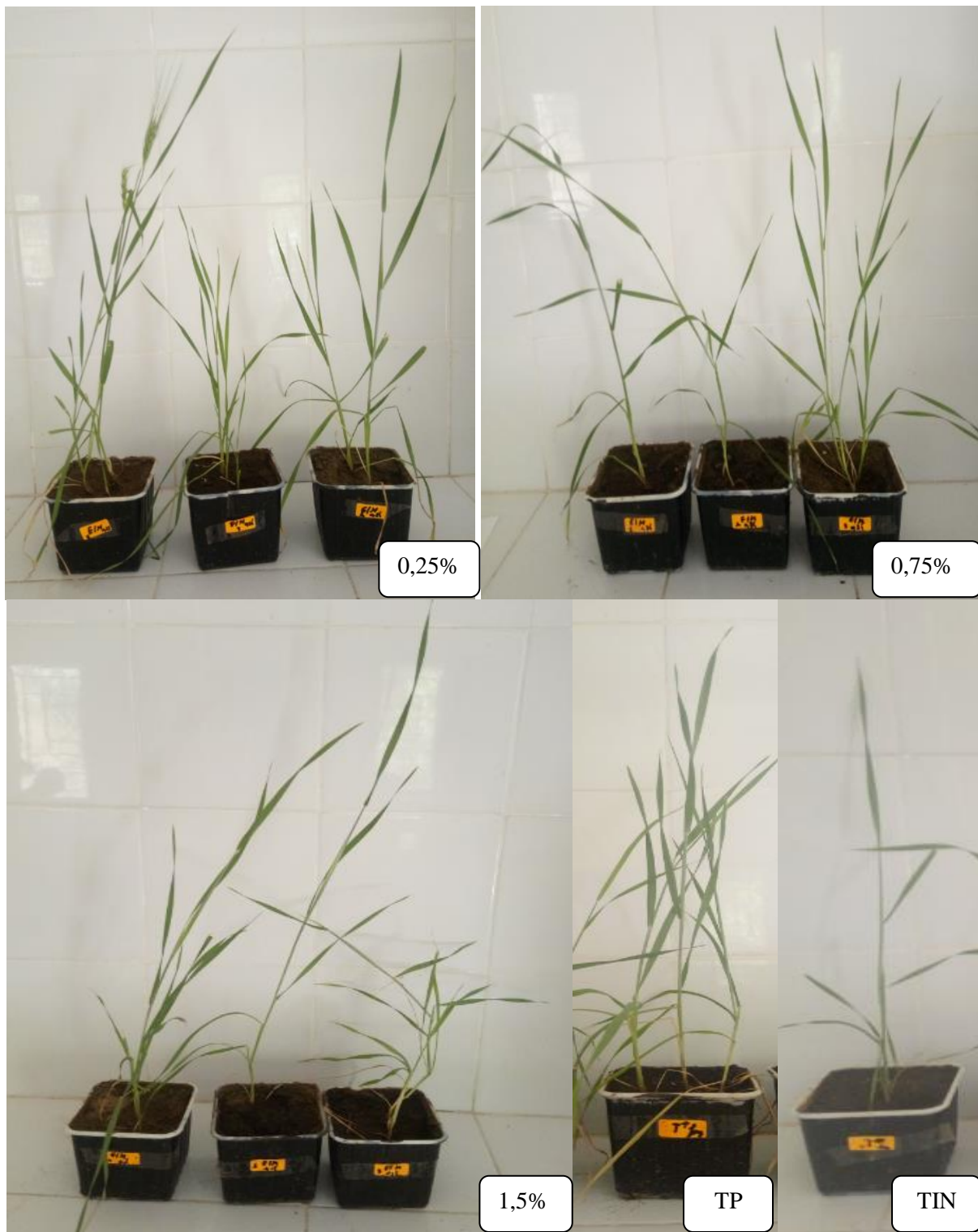


**Annexe XXIII** - Effet de l'extrait méthanolique de *M. vulgare* L. sur la croissance mycélienne de *F. culmorum* *in vitro*.

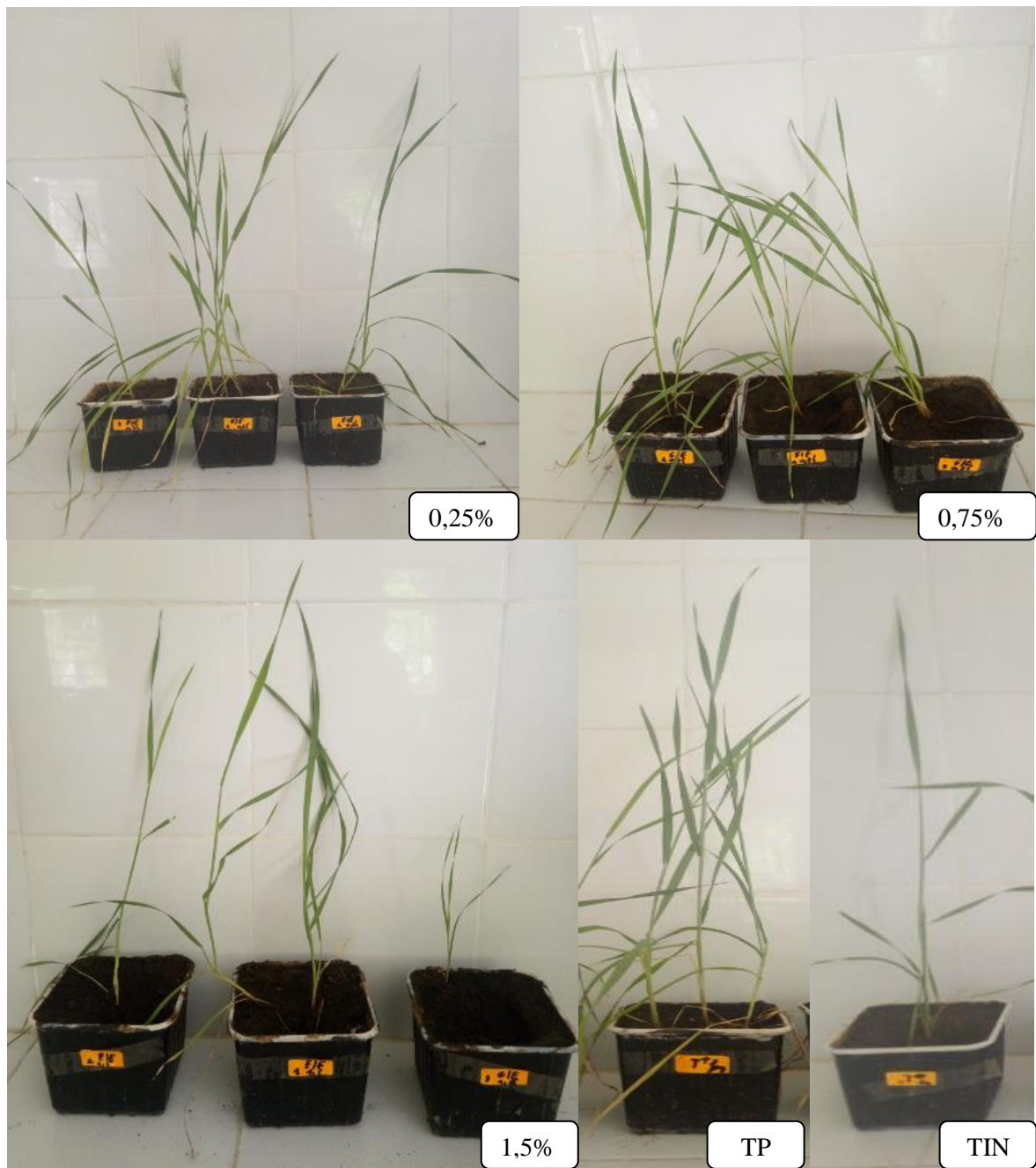


**Annexe XXIV** - Effet de l'extrait éthanolique de *M. vulgare* L. sur la croissance mycélienne de *F. culmorum* *in vitro*.



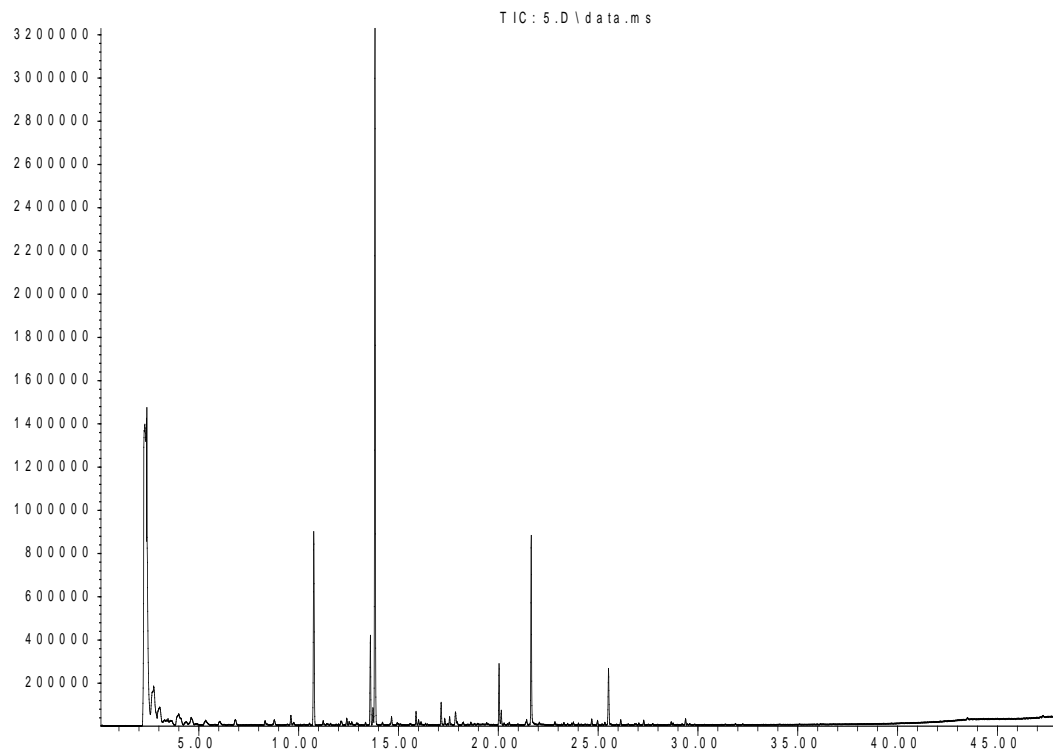


**Annexe XXV** -Effet de l'extrait méthanolique d'*E. obliqua* Hert. sur le développement des plantules.



**Annexe XXVI** -Effet de l'extrait éthanolique d'*E. obliqua* Hert. sur le développement des plantules.

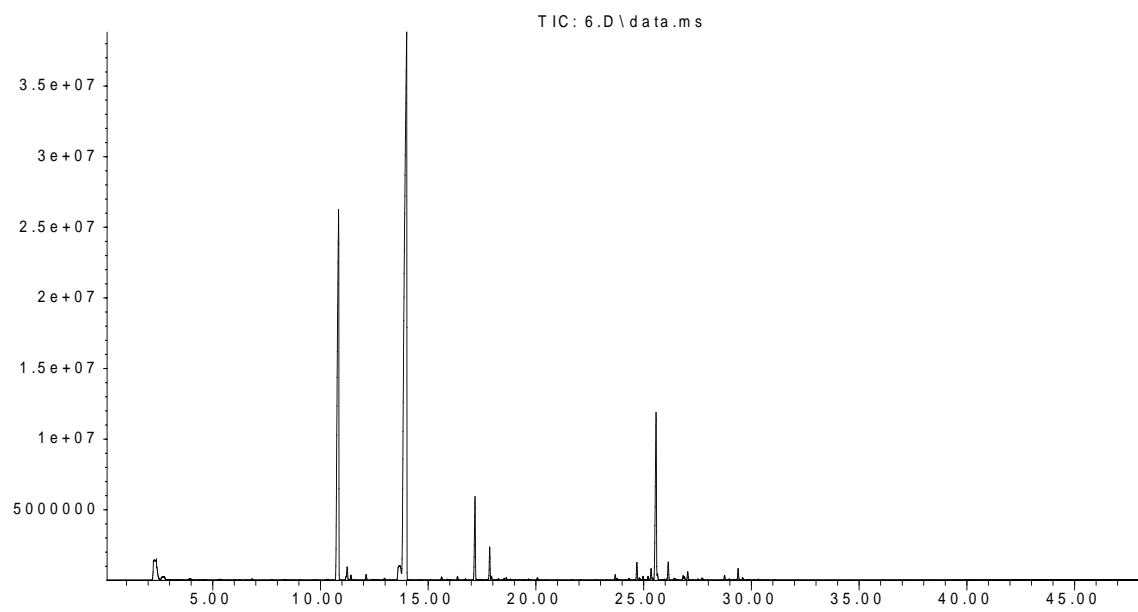
Abundance



Time-->

**Annexe XXVII** -Profil chromatographique de *M. vulgare* L. par GC-MS.

Abundance



Time-->

**Annexe XXIII** -Profil chromatographique d'*E. obliqua* Hert. par GC-MS.

**PUBLICATION ASSOCIÉE**

**PHYSICOCHEMICAL AND PHYTOCHEMICAL STUDY OF *Marrubium vulgare* L.  
(LAMIACEAE FAMILY)**

M. Moulay<sup>\*1</sup>, F. Labdelli<sup>1</sup>, F. Bousmaha<sup>1</sup>, M. Adamou-Djerbaoui<sup>1</sup>, R. Bouteldja<sup>1</sup>, R. Doucene<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Université de Tiaret, Faculté SNV, Laboratoire d'Agrobiotechnologie et de nutrition en zone semi-aride, Algérie

<sup>2</sup> Université Ibn Khaldoun.Tiaret ; Laboratoire de reproduction des animaux de la ferme, Algérie

Received: 13 June 2019/ Accepted: 17 April 2020 / Published online: 01 May 2020

**ABSTRACT**

*Marrubium vulgare* L. is a spontaneous plant of great medicinal value due to the presence of secondary metabolites. Our work aims to study the physicochemical and phytochemical profile of this species. The results of the physicochemical analyzes showed that *Marrubium vulgare* L. has a sugar content of 5.91%, a lipid content of 4.12%, a total fiber content of 6.42%, a water content of 42.42%, an ash content of 17.76%, a solids content of 2.5 degrees of Brix, an electrical conductivity of 4.06 mS/cm<sup>2</sup> and a pH of 4.8. Regarding the results of the various phytochemical tests, the latter revealed the presence of catholic tannins, saponins, flavonoids, alkaloids and mucilage in the horehound. However, the absence of anthocyanins, glycosides, quinones, anthraquinones and irroids has been noted.

**Key words:** *Marrubium vulgare* L., physicochemical analyzes phytochemical tests.

Author Correspondence, e-mail : [kmsoilaz@yahoo.fr](mailto:kmsoilaz@yahoo.fr)

doi: <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v12i2.14>



## 1. INTRODUCTION

La famille des lamiacées avec environ 230 genres et 7100 espèces, possède une grande importance en raison de leurs utilisations en médecine, en cuisine et en cosmétique [1]. Les plantes de ces familles sont réputées biologiquement actives par leurs composés phénoliques. C'est le cas de *Marrubium vulgare* L. communément appelé en Europe « marrube blanc » et dans la région méditerranéenne « Marute » ou « Merriouet », qui est une plante herbacée vivace originaire d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie [2,3].

En Algérie, *Marrubium vulgare* L. est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies digestives, la diarrhée, ainsi que le diabète, les rhumatismes, la bronchite aiguë ou chronique, la toux, l'asthme et d'autres infections respiratoires [4].

Des études phytochimiques sur *M. vulgare* L. avaient démontré à sa richesse en multiples métabolites secondaires telles que les diterpènes [5], les esters de phénylpropanoïdes [6], les tanins [7], les flavonoïdes [8], et les stérols [9]. Ces composés bioactifs peuvent être influencés par le site géographique, les conditions climatiques, édaphiques et la date de récolte.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la caractérisation physicochimique, biochimique et phytochimique de cette espèce végétale récoltée du centre-ouest de l'Algérie.

## 2. MATERIEL ET METHODES

**Matériel végétal :** La partie aérienne de *Marrubium vulgare* L. a été récoltée en avril 2017 dans la région de Tissemsilt (Algérie). Le matériel végétal a été séché à l'air libre, broyé à l'aide d'un broyeur électrique. Afin de décrire le profil physicochimique, biochimique et phytochimique de cette plante de multiples analyses ont été réalisées sur le marrube blanc.

**Les analyses physicochimiques et biochimiques :** Ces analyses ont été portées sur la mesure des paramètres suivants : pH, teneur en eau, conductivité électrique, taux de solides solubles, taux des sucres totaux, taux de lipide, taux de fibres totales et taux de cendre.

**Détermination du pH :** La mesure a été réalisée en plongeant l'électrode du pH-mètre dans la solution de *Marrubium vulgare* L. [10].

**Détermination de la teneur en eau :** La teneur en eau est mesurée en déterminant la perte de



pois de l'échantillon (5g) après son séchage à 105° pour 4 heures. La teneur en eau est calculée par la formule suivante [11] :

$$\text{TE} = [\text{P}_1 - \text{P}_2 / \text{P}_0] \times 100$$

**TE** : Teneur en eau (%);

**P<sub>0</sub>** : Poids de la prise d'essai (g);

**P<sub>1</sub>** : Poids du creuset plus échantillon avant étuvage (g);

**P<sub>2</sub>** : Poids du creuset plus échantillon après étuvage (g).

**Détermination de la conductivité électrique** : L'électrode de conductimètre a été plongée dans une solution à 20 % de matière sèche [12].

**Détermination du taux des solides solubles** : Le taux de solides solubles (TSS) exprimé en degré Brix est déterminé à l'aide d'un réfractomètre [11].

**Détermination de la teneur en sucres totaux** : Dans un tube à essai, 1ml de phénol (5%) et 5 ml d'acide sulfurique concentré (96%) ont été ajoutés à 1ml de la solution à analyser. Après 10 minutes, le mélange a été placé dans un bain-marie pendant 20 minutes à 25-30°C. La lecture de l'absorbance a été faite à 490 nm et la concentration en sucres totaux a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage le glucose [13]. La quantité des sucres totaux est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage par la formule suivante [14] :

$$\text{ST} = [(X \cdot V \cdot D) / P] \cdot 100$$

Dont :

**ST** : Taux de sucres totaux (%);

**X** : Quantité de sucres calculée à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml) .

**D** : Facteur de dilution ;

**V** : Volume de la solution analysée (ml);

**P** : Poids de la prise d'essai (g).

**Détermination de la teneur en lipides** : 10g de l'échantillon a été pesé et versé dans une cartouche qui a été fermée par un morceau de coton et placée dans l'extracteur « Soxhlet » où le solvant utilisé est l'hexane. Après 6 heures d'extraction, la totalité du solvant a été récupérée par un rotavapeur [15] et le résidu a été placé dans une étuve à 105°C afin d'éliminer les traces du solvant [16]. Le taux des lipides est calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{TL} = [\mathbf{P}_2 - \mathbf{P}_1 / \mathbf{P}_0] \times 100$$

Dont : **TL** : Taux de lipides (%) ;

**P<sub>0</sub>** : Poids de la prise d'essai (g);

**P<sub>1</sub>** : Poids du ballon vide (g) ;

**P<sub>2</sub>** : Poids du ballon + matière grasse (g).

**Détermination du taux de fibres totales** : Les fibres sont déterminées par la méthode de **Weende (1967)** citée par [17] qui consiste en une double hydrolyse acide par sulfurique (1.25%) suivie par une hydrolyse alcaline ou basique par 150 ml de KOH (1.25%) de 1g de l'échantillon. Par la suite, le résidu a été séché par étuvage à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Après étuvage, Le résidu a été calciné dans un four à moufle pendant 3 heures à 550°C puis pesé après refroidissement dans un dessiccateur [11]. La teneur en fibres est calculée selon la formule suivante [11]

$$\mathbf{FB} = [\mathbf{P}_1 - \mathbf{P}_2 / \mathbf{P}_0] \times 100$$

Dont : **FB** : Fibre brute (%) ;

**P<sub>0</sub>**: Prise d'essai (g) ;

**P<sub>1</sub>**: Poids du creuset après étuvage (g) ;

**P<sub>2</sub>**: Poids du creuset après incinération (g).

**Détermination du taux de cendres** : 10 g de notre échantillon ont été mis dans des creusets et incinérés dans un four à moufle à haute température (600°C) pendant cinq heures jusqu'à l'obtention de cendres blanchâtres à poids constant [14,18]. Le taux de cendres est calculé par la différence de poids avant et après incinération par la formule suivante [11] :

$$\mathbf{TC} = [\mathbf{P}_2 - \mathbf{P}_1 / \mathbf{P}_0] \times 100$$

**TC** : Taux de cendre (%) ;

**P<sub>0</sub>**: Poids de la prise d'essai (g);

**P<sub>1</sub>**: Poids des creusets vide (g) ;

**P<sub>2</sub>**: Poids des échantillons après incinération (g).

**Screening phytochimique de *Marrubium vulgare* L.** : Les différents tests phytochimiques

réalisés sur la partie aérienne de *Marrubium vulgare* L. selon [19] ; [20]; [21];[22]; [23];[24] ; [25]:

**Anthocyanes** : 5ml d'infusé + quelques gouttes d'HCl = Coloration rouge

**Alcaloïdes** : 0,5 à 0,6 g de l'extrait méthanolique + 8 ml d'HCl (1%) + chauffage au bain marie 2mn + filtration. 2ml du filtrat + le réactif de Wagner ou Bouchardât = Formation de turbidité ou de précipité.

**Anthraquinones** : 2 ml du macérât +1 ml d'ammoniaque (10%) = Phase aqueuse rose rouge

**Flavonoïdes** : Test d'acétate du plomb = Précipité de couleur jaune

**Glycosides cardiaques** : 5 ml d'extrait aqueux + acide acétique glacial + une goutte de FeCl<sub>3</sub> + 1ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré = Apparition d'un anneau brun.

**Irroïdes** : 2 ml d'infusé + quelques gouttes d'HCl + chauffer un peu = Coloration bleue

**Mucilage** : 1 ml d'infusé + 5 ml d'éthanol absolu + incubation pendant 15 min = Apparition d'un précipité floconneux.

**Phlobotanins** : 2 ml de macérât + 1 ml d'HCl dilué (2%) et porter à ébullition pendant quelques minutes = Précipité rouge.

**Quinones** : Humecter 2g de poudre par 2 ml d'HCl + 20ml de chloroforme. Après 3 heures le filtrat est agité avec 5ml d'ammoniaque (1/2) = Coloration rouge.

**Saponines** : Faire bouillir 2g de poudre avec 20 ml d'H<sub>2</sub>O + filtration. 10 ml du filtrat + 5 ml d'H<sub>2</sub>O + agitation vigoureuse = Formation d'une mousse persistante stable.

**Tanins galliques** : 1,5 g de poudre + 2 ml de méthanol (80%) + agitation pendant 15 min + filtration + ajout de FeCl<sub>3</sub> (1%) = Coloration bleue noire.

**Tanins cathéchiqes** : 1,5 g de poudre + 2 ml de méthanol (80%) + agitation pendant 15 min + filtration + ajout de FeCl<sub>3</sub> (1%) = Coloration brune verdâtre.

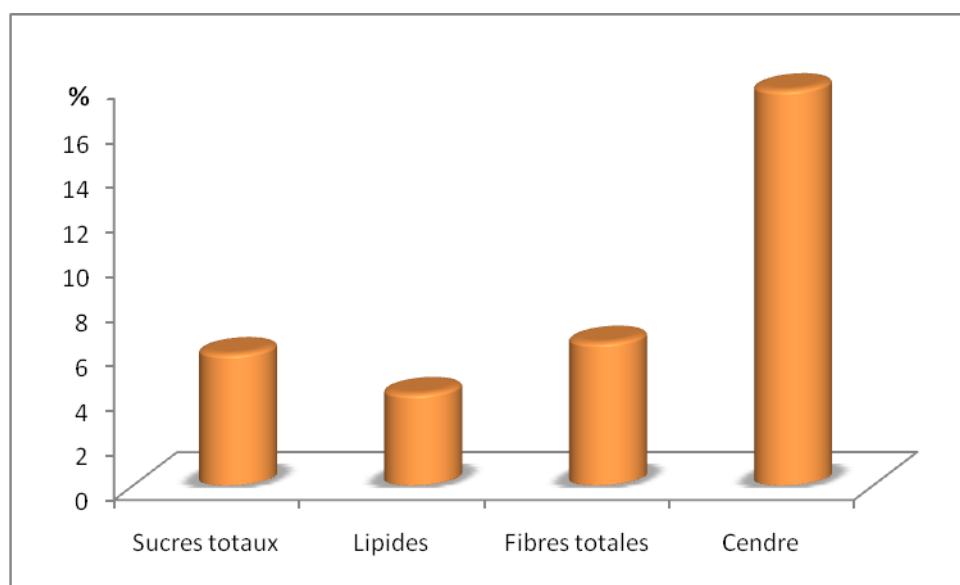
### 3. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats des paramètres physico-chimiques et biochimiques de la partie aérienne du marrube blanc sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 01):

**Tableau 1.** Analyses physicochimiques de *Marrubium vulgare* L.

Paramètre	pH	Teneur en eau	Conductivité électrique	Taux de solides solubles
Résultats	4.8 +/-0.02	42.42% +/-0.36	4.8 +/- 0.0 mS/cm <sup>2</sup>	2.5+/-0.0 degré de Brix

L'étude physicochimique de *Marrubium vulgare* L. a montré respectivement une teneur d'humidité égale à 42.42 +/-0.02 %, un PH de 4.8 +/-0.02, une conductivité électrique de 4,8 +/-0.0 mS/cm<sup>2</sup> et un taux de solides solubles égal à 2.5+/-0.0 degré de brix. Les paramètres physicochimiques comme la teneur en eau et le pH ont un très grand intérêt pour renseigner sur la préservation et la stabilité de l'échantillon pendant une longue durée et peuvent jouer le rôle d'un indicateur du degré de maturité des végétaux [10,26].

**Fig.1.** Analyses biochimiques de la partie aérienne de *Marrubium vulgare* L.

L'étude biochimique de la partie aérienne du marrube blanc a révélé les pourcentages suivants : 5.91% +/- 0.13 de sucres totaux, 4.12 % +/- 0.07 de lipides, 6.42% +/- 1.74 de fibres totales et 17.76% +/- 1.10 de cendre. Les résultats obtenus ont été nettement inférieures à ceux obtenus par [27] qui ont déclaré un taux de 84.74 de carbohydrates chez l'espèce *Mentha pulegium* tandis que les taux des lipides et de cendre chez le marrube ont été supérieurs (respectivement 2.22% et 5.92%) comparativement à la menthe pouliot. Ces deux

espèces appartiennent à la même famille botanique : Lamiacées. Cette différence de macronutriments au sein de cette famille pourrait être due à plusieurs facteurs qui entourent la plante tels que le facteur écologique, édaphique et climatique.

#### **Description phytochimique de *Marrubium vulgare* L.**

Les résultats de screening phytochimique ont révélé que *Marrubium vulgare* L. renferme six métabolites secondaires : les alcaloïdes, les flavonoïdes, le mucilage, les phllobotanins, les tanins catéchiques et les saponines et par contre, on a constaté l'absence d'autres principes actifs tel que les anthocyanes, les glycosides cardiaques, les quinones, les irroïdes et les tanins galliques. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par [28] qui a démontré la présence saponines, tanins catéchiques et les flavonoïdes au niveau de cette plante. [29] a isolé un grand nombre de métabolites secondaires telles que les flavonoïdes, les iridiodes, les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes. La présence de ces composés bioactifs pourrait être liée aux propriétés antimicrobiennes des extraits des plantes.

#### **4. CONCLUSION**

*Marrubium vulgare* L. est une plante médicinale révélée pauvre en macronutriments (5,91% de sucres totaux, 4,12 % de lipides, 6,42% de fibres totales et 17,76% de cendres). Cette espèce est révélée riche en diverses métabolites secondaires principalement les composés phénoliques tels que les flavonoïdes et les tanins qui pourraient posséder une activité antioxydante ou antimicrobienne raison pour laquelle la valorisation des extraits du marrube blanc pourrait bien constituer des produits à haute valeur économique et écologique et aussi pour la santé humaine.

#### **5. ACKNOWLEDGEMENTS**

Au terme de ce travail, je tiens à remercier madame ADAMOU-DJERBAOUI pour toutes ses orientations qui ont apporté un plus pour cet article et je remercie aussi les ingénieurs de laboratoire qui nous ont guidé au cours de la réalisation de la partie expérimentale.

## 6. REFERENCES

- [1] Harley R.M., Atkins, S., Budantsev A.L., Cantino P.D., Conn B.J., Grayer R., Harley M.M., de Kok R., Krestovskaja T., Morales R., Paton A.J., Ryding O., Upson T. (2004). Labiatae. In: Kadereit, J.W. (Ed.), *The Families and Genera of Vascular Plants, Lamiales*, vol. VII. Springer, Berlin, pp. 167–282.
- [2] Kanyonga P M., Faouzi M A., Meddah B., Mpona M., Essassi E.M., Cherrah, Y. (2011) Assessment of Methanolic Extract of *Marrubium vulgare* for Antiinflammatory, Analgesic and Anti-Microbiologic Activities. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **3**, 199-204.
- [3] Everist D L. *Poisonous plants of Australia*. 3rd ed. Sydney: Angus and Robertson; 1981, p. 449-450.
- [4] Belhattab, R. and Larous, L. (2006) Essential oil Composition and Glandular Trichomes of *Marrubium vulgare* L. Growing Wild in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, **18**, 369-373. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2006.9699116>
- [5] El Bardai S., Morel N., Wibo M., Fabre N., Liabres G., Lyoussi B., Quetin-Leclercq J. (2003) .The Vasorelaxant Activity of Marrubenol and Marrubiin from *Marrubium vulgare*. *Planta Medica*, **69**, 75-77. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2003-37042>
- [6] Sahpaz, S., Garbacki, N., Tits, M. and Bailleul, F. (2012) Isolation and Pharmacological Activity of Phenylpropanoid Esters from *Marrubium vulgare*. *Journal of Ethnopharmacology*, **79**, 389-392. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00415-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00415-9)
- [7] Kurbatova, N.V., Muzychkina R.A., Mukhitdinov, N.M. and Parshina, G.N. (2013) Comparative Phytochemical Investigation of the Composition and Content of Biologically Active Substances in *Marrubium vulgare* and *Marrubium alternidens*. *Chemistry of Natural Compounds*, **39**, 501-502. <http://dx.doi.org/10.1023/B:CONC.0000011128.64886.f4>
- [8] Nawwar Mahmoud, A.M., El-Mousallamy, A.M.D., Barakat, H.H., Buddrus, J. and Linscheid, M. (1989) Flavonoid Lactates from Leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry*, **28**, 3201-3206. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80307-3](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(89)80307-3)
- [9] Garjani1 A., Tila1 D., Hamedeyazdan S., Vaez1 H., Rameshrad M., Pashaii M., Fathiazad F. (2017). An investigation on cardioprotective potential *Marrubium vulgare* aqueous fraction

against ischaemia-reperfusion injury in isolated rat heart. *Folia Morphol.*, Vol. 76, No. 3. pp. 361–371. <http://dx.doi.org/10.5603/FM.a2017.0011>.

[10] AOAC. (2002). *Official Methods of Analysis*. 17th Ed. Gaithersburg, USA.

[11] AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis*. 17th Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA. Methods 925.10, 65.17, 974.24, 992.16.

[12] Amellal H. Aptitudes technologiques de quelques variétés communes de dattes : formulation d'un yaourt naturellement, sucré et aromatisé. Thèse de doctorat en Technologie Alimentaire. Université M'hamed Bouguera. Boumerdes, 2008, pp.127.

[13] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, Rebers P A, Smith F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Division of Biochemistry, University of Minnesota, St. Paul, Minn., 1956, 2 8 (3).

[16] AOAC. (1995). *Official methods of analysis* 16th Ed. Association of official analytical chemists. Washington DC, USA.

[17] Gaouar N. Etude de la valeur nutritive de la caroube de différentes variétés Algériennes. Mémoire de Magister en Nutrition. Université d'Abou Bakr Belkaid. Tlemcen, 2011, p.95.

[20] Rizk A M. (1982). Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterrapia*, 52 (2) , 35-42.

[23] Oloyede O I. (2005). Chemical profile of uripe pulp of *carica papaya*. *Pakistan Journal of Nutrition*. 4(6): 379-381.

[25] Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. (2011). Phytochemical screening and extraction. *Review International Pharmaceutica scientia*, 1(1).

[26] Messaid H. Optimisation du processus d'immersion-réhydratation du système Dattes seches- jus d'orange. Mémoire de Magister, 2011, p.96.

[27] Fernandes Â S F, Barros L, Carvalho A M, Ferreira I C F R. (2010). Lipophilic and hydrophilic antioxidants, lipid peroxidation inhibition and radical scavenging activity of two Lamiaceae food plants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 112, 1115–1121.

[28] Boutelis Djahra A. Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antihépatotoxique du marrube blanc *Marrubium vulgare* L. Thèse Doctorat. Université Badji Mokhtar. Annaba, 2014, p.114.

[29] Nait Said N. Etude phytochimique des extraits chloroformiques des plantes :

«*Pituranthos chlopanthus*» et «*Marrubium vulgare* ». Mèmoire de magister. Université El-Hadj Lakhdar . Batna, 2007, p.155.

[14] Sadasivam s. Manickman A. *Biochemical methods*. 2<sup>nd</sup>ed. New Age International Publisher, New Delhi, 1996. p.272.

[15] Audigie C, Figarlla J, Zonszain F. *Manipulations d'Analyse en Biochimie*. Ed. Doin, Paris, 1984, pp. 274.

[18] Nielsen S. *Food Analysis*: 4th ed. Springer. New York, NY, USA. 2010. p.177.

[19] Paris R, Moysse H. *Précis de matière médicale*. Paris: Masson,1969.

[21] Sofowara A. *Medicinal plants and Traditional medicine in Africa*. Spectrum Books Ltd. Ibadan. Nigeria,1993, p.289.

[22] Harborne A J. *Phytochemical method a guide to modern techniques of plant analysis*.3<sup>rd</sup> edition. London.Chapman & Hall., 1998, p.320.

[24] Raaman N. *Phytochemical techniques*. New Delhi. New India. Publishing Agenc, 2006, p.306.

**How to cite this article:**

Moulay M., Labdelli F., Bousmaha F., Adamou-Djerbaoui M., Boutheldja R., Doucene R. Physicochemical and phytochemical satudy of *Marrubium vulgare* L. (*Lamiaceae* family ). J. Fundam. Appl. Sci., 2020, 12(2), 728-737.