

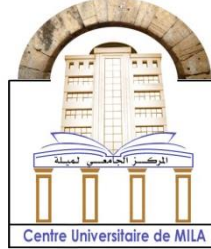
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

N°Ref : .....



**Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF- Mila**  
**Institut des Sciences et de la Technologie**  
**Département des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de**  
**Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Biotechnologie**

**Spécialité : Biotechnologie Végétale**

**Thème :**

**Étude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne et  
anticoagulante de deux espèces appartenant à la famille des  
Combretaceae : *Terminalia bellirica* L. et *Terminalia chebula* L.**

**Présenté par :**

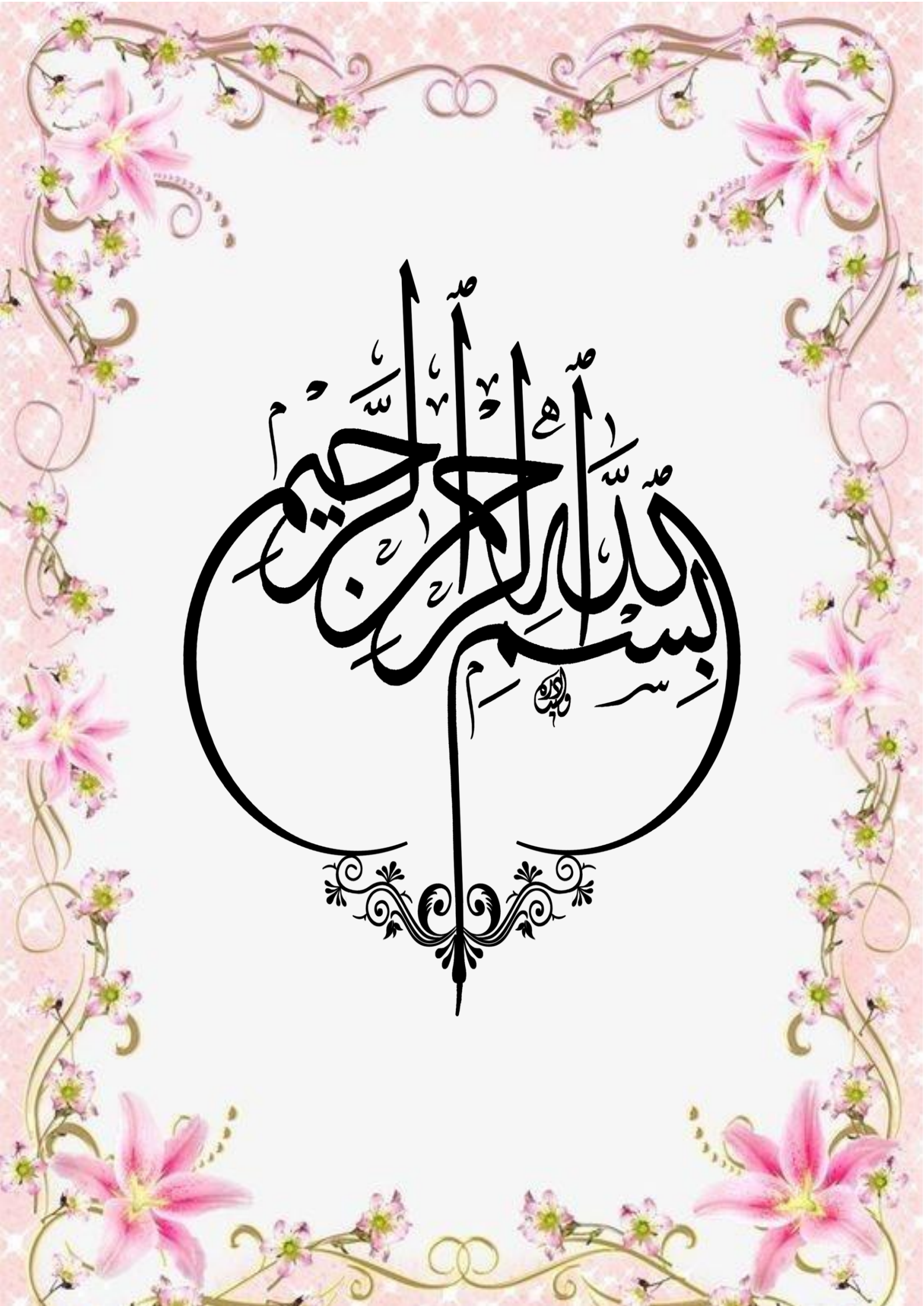
- **Hadef Rim**
- **Lezzar Manel**
- **Mokhbi Wissam**

**Devant le jury :**

<b>Dr TALHI Fahima</b>	<b>(MCB)</b>	<b>Centre universitaire -Mila-</b>	<b>Président</b>
<b>Dr BENTAHAR Soumia</b>	<b>(MCB)</b>	<b>Centre universitaire -Mila-</b>	<b>Examinateur</b>
<b>Dr BOUKERIA Sabah</b>	<b>(MCA)</b>	<b>Centre universitaire -Mila-</b>	<b>Promoteur</b>

**Année Universitaire : 2021/2022**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



## **Remerciement**

*Avant tout nous remercions Dieu « ALLAH » le tout puissant de nous avoir accordé*

*la force, le courage et la patience pour terminer ce travail, La réalisation d'un mémoire est la somme d'un travail collectif où l'apport de chacun bien que d'importance inégale, est toujours indispensable et précieux.*

*Nos remerciements s'adressent également à notre directrice de thèse, le Docteur- BOUKERIA Sabah qui Pendant ces deux années de Master a été d'un soutien exceptionnel. Sa disponibilité, son écoute, sa gentillesse, sa compréhension et surtout son extrême tolérance nous ont permis d'évoluer sereinement au cours de ce parcours. On la remercie pour ses discussions scientifiques, ses échanges personnels enrichissants et surtout de nous avoir aidée à éteindre cette énorme diode qu'est la thèse, et ce, toujours avec le sourire et la sympathie. Pour tout cela et aussi pour son aide, sa confiance et son soutien moral,*

*on la remercie vivement.*

*On adresse nos remerciements aux membres du jury le Docteur TALHI Fahima et Docteur. BENTAHAR Soumia on les remercie d'avoir accepté d'évaluer ce travail.*

*Nous voudrions aussi exprimer toute notre Gratitude et nos remerciements à tous les enseignants, pour leurs Orientations et leurs conseils.*

*Nous remercions particulièrement Docteur MIROUH de nous avoir accueillie au sein de son Laboratoire d'analyses médicales (Ferjioua). En nous faisant confiance et en nous acceptant dans son équipe, il nous a permis de réaliser ce projet qui nous tenait à cœur.*

*On remercie tous les membres de l'équipe du laboratoire de l'université Abdelhafid BOUSSOUF-Mila pour leur aide précieuse.*

*Enfin nous voudrions dire merci A toutes les personnes qui nous ont aidé de proche ou de loin.*

## Résumé

Dans l'ère actuelle, les produits à base de plantes sont mesurés pour être les symboles de la sécurité par rapport aux produits synthétique qui sont considérés comme dangereux pour la vie humaine et l'environnement. Avec cela, et dans un cadre sanitaire une tentative a été faite dans ce travail pour enquêter sur les activités antibactérienne et anticoagulante et l'analyse phytochimique des fruits de deux espèces végétales : *Terminalia chebulla* L. et *Terminalia bellerica* L.

Les fruits utilisés ont été broyés et transformés en poudre, et les composés potentiels (extraits phénoliques) ont été extraits par le méthanol et l'eau distillée.

Des analyses phytochimiques des extraits de *Terminalia bellerica* L et *Terminalia chebula* L ont été effectuées et ont montré la richesse de métabolites secondaires comme les glycosides, poly phénols tel que les flavonoïdes et les tannins les anthraquinones les quinones libres.

Les extraits (aqueux et méthanolique) des fruits de *Terminalia chebula* L et *Terminalia bellerica* L ont été étudié pour leur activités antibactériennes contre des souches bactériennes de référence cliniquement importantes (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*). Le pouvoir antibactérien a été évalué à l'aide de la méthode de diffusion des disques. Les résultats ont montré que nos extraits étaient actifs contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, Ces résultats indiquent que les fruits secs de *Terminalia chebula* L. et *Terminalia bellerica* L. possèdent un large spectre potentiel d'activité antibactérienne mais il est plus remarquable dans l'extrait méthanoliques chez les deux espèces que dans leur extrait aqueux. Cependant ce pouvoir antibactérien est moins important que celui de l'antibiotique pris comme témoins et qu'une recherche du composéactif majoritaire est nécessaire.

Enfin, l'effet anticoagulant des deux espèces étudiées a été évalué par temps prothrombine *in vitro* en utilisant les tests du temps de céphaline-kaolin (TCK) et du temps de Quick (TQ), après cinq minutes de réaction, les deux milieux d'essai ont été incoagulables ce qui prouve la présence de l'activité anticoagulante chez les deux espèces également que chez les médicaments anticoagulants (Lovenox) qui empêchent la formation ou l'extension des caillots dans les vaisseaux sanguins.

**Mots clés :** *Terminalia chebula* L. *Terminalia bellerica* L., activité antibactérienne, polyphénols, Activité anticoagulants, , analyses phytochimiques.

## ملخص

في العصر الحالي، يتم قياس المنتجات النباتية على أنها رموز للسلامة مقارنة بالمنتجات المصنعة التي تعتبر خطيرة على حياة الإنسان والبيئة. ففي إطار صحي قمنا في هذا العمل بتحليل كيميائي للمركبات والبحث عن إمكانية وجود نشاط مضاد بكتيري ومضاد للتخثر النباتي لفاكهة نوعين من نبات الاهليج *Terminalia chebula* L و *Terminalia bellirica* L.

كانت الثمار المستخدمة مطحونة ومسحوقة، وتم استخراج المركبات المحتملة (المستخلصات الفينولية) بواسطة الميثانول والماء المقطر.

التحليلات الكيميائية النباتية لمستخلصات *Terminalia bellirica* L و *Terminalia chebula* L تم إجراؤها وأظهرت نواتج الايض الثانوي وجود الجليكوسيدات والبوليفينولات مثل الفلافونويدات والعفصيات أنثراكينونات وخالية من الكينونات.

تمت دراسة المستخلصات (المائية والميثانول) من ثمار *Terminalia chebula* L و *Terminalia bellirica* L لأنشطتها المضادة للبكتيريا ضد السلالات البكتيرية المرجعية المهمة سريريًا ( *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* ) تم تقييم الطاقة المضادة للبكتيريا باستخدام طريقة انتشار القرص. أظهرت النتائج أن مستخلصاتنا كانت نشطة ضد البكتيريا إيجابية الغرام وسلبية الغرام، وتشير هذه النتائج إلى أن الفواكه المجففة من *Terminalia chebula* L و *Terminalia bellirica* L لها مجال واسع من النشاط المضاد للبكتيريا ولكنها أكثر بروزًا في مستخلص الميثانول في كلا النوعين. ومع ذلك، فإنه أقل أهمية من تلك الموجودة في المضادات الحيوية التي يتم أخذها كضوابط وأن البحث عن المركب النشط في الغالبية ضروري.

أخيرًا، تم تقييم التأثير المضاد للتخثر للنوعين المدروسين بواسطة تقنية البروثرومبين في المختبر باستخدام TCK وTQ، بعد خمس دقائق من التفاعل كانت لم يلاحظ حدوث تخثر، مما يثبت وجود نشاط مضاد للتخثر في كلا النوعين مثلما هو الحال في الأدوية المضادة للتخثر (Lovenox) التي تمنع تكوين أو امتداد الجلطات في الأوعية الدموية. الكلمات المفتاحية: *Terminalia chebula* L *Terminalia bellirica* L، النباتات الطبية، نشاط مضاد التخثر، نشاط مضاد البكتيريا، التحليل الكيميائي النباتي، البوليفينولات .

## Abstract

In the current era, plant-products are measured to be symbols of safety compared to synthetic products that are considered dangerous to human life and the environment. With this, and in a sanitary environment an attempt was made in this work to investigate the activities antibacterial and anticoagulant and photochemical analysis of fruits of two plant species: *Terminalia chebula* L. and *Terminalia bellirica* L.

The fruits used were ground and powdered and potential compounds (phenolic extracts) were extracted by methanol and distilled water.

Phytochemical analyses of extracts of *Terminalia bellirica* L and *Terminalia chebula* L were carried out and showed the richness of secondary metabolites such as glycosides, poly phenols such as flavonoids and tannins anthraquinones free quinones.

The extracts (aqueous and methanol) of the fruits of *Terminalia chebula* L and *Terminalia bellirica* L have been studied for their antibacterial activities against clinically important reference bacterial strains (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*). The antibacterial power was evaluated using the Disc Diffusion Method. The results showed that our extracts were active against gram-positive and gram-negative bacteria, these results indicate that the dried fruits of *Terminalia chebula* L and *Terminalia bellirica* L possess a broad spectrum of antibacterial activity but it is more remarkable in the methanol extract in both species than in their aqueous extracts. However, this antibacterial power is less important than that of the antibiotic taken as controls and that a search for the majority active compound is necessary.

Finally, the anticoagulant effect of the two species studied was evaluated by prothrombin time in vitro using the tests of cephalon-kaolin time (TCK) and Quick time (TQ), after five minutes of reaction, the two-test media were incoagulable, which proves the presence of anticoagulant activity in both species as well as in anticoagulant drugs (Lovenox) that prevent the formation or extension of clots in the blood vessels.

Keywords: *Terminalia chebula* L, *Terminalia bellirica* L, anti-coagulant activity, anti-bacterian activity, phytochemical analysis, polyphenols.



*Liste des Abréviations*

<b>%</b> : Pourcentage
<b>Abs</b> : Absorbance
<b>ADN</b> : acide désoxyribonucléase
<b>ARN</b> : acide ribonucléase
<b>AVK</b> : anti vitamine K
<b>APG</b> : Angiosperme phylogénie group
<b>BC</b> : Bacillus cereus
<b>°C</b> : Degré Celsius
<b>C<sub>5</sub>H<sub>8</sub></b> : Isomérisation
<b>Cm</b> : Centimètre
<b>DMSO</b> : Diméthyle sulfoxyde
<b>EAG/g.MS</b> : Équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche
<b>EC</b> : Escherichia coli
<b>g</b> :gramme
<b>g/l</b> :Rapport gramme par litre
<b>GAE</b> : Capsule aux essences Maturative
<b>HBPM</b> : Héparines de bas poids moléculaire
<b>HNF</b> : Héparines non fractionnés
<b>Mg<sup>2+</sup></b> : Magnésium
<b>mg</b> : Milligramme
<b>mm</b> : Millimètre
<b>nm</b> : Nanomètre
<b>PA</b> : Pseudomonas aeruginosa
<b>R%</b> : Rendement en %
<b>SA</b> : Staphylococcus aureus
<b>TCK</b> : Temps de céphaline kaolin
<b>TP</b> : Taux de prothrombine
<b>TFPI</b> : Tissue F pathway inhibition
<b>TC</b> : <i>Terminalia chebula</i>
<b>TB</b> : <i>Terminalia bellirica</i>
<b>OMC</b> : Organisation mondiale de la santé
<b>VIH</b> : Virus de l'immunodéficience humaine

## Liste des figures

Figure N°		Page
01	structure de noyau phénolique	5
02	Squelette de base des flavonoïdes	6
03	Structure chimique de coumarine	6
04	Structure de la molécule d'isoprène	7
05	Exemples des structures chimiques des quinones	9
06	arbre de <i>Terminalia chebula</i> L	13
07	<i>Terminalia chebula</i> L plant diagram	13
08	fruit de <i>Terminalia chebula</i> L	14
09	arbre de <i>Terminalia bellirica</i> L	15
10	<i>Terminalia bellirica</i> L plant diagram	16
11	Fruit de <i>Terminalia bellirica</i> L	16
12	Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de Pétri	21
13	cascade de la coagulation dans la voie endogène et la voie exogène.	24
14	Activation et inhibition de la coagulation	25
15	<i>Terminalia Bellirica</i>	27
16	<i>Terminalia Chebula</i>	27
17	<i>Terminalia chebula</i> (poudre	28
18	<i>Terminalia bellirica</i> (poudre) ( <i>cliché personnel</i> ).	28
19	étapes de la macération éthanolique.	29
20	Etapes de la macération méthanolique et aqueuse	32
21	matériel préparé pour le dosage des polyphénols totaux	34
22	Protocole de dosage des polyphénols totaux.	34



23	Etapes de préparation d'un pool de plasma	36
24	matériel préparé pour l'évaluation de TCK	37
25	Etapes de la voie endogène	38
26	<b>Matériel préparé pour l'évaluation de TQ</b>	39
27	Etapes de la voie endogène	40
28	Test des polyphénols	45
29	Test des saponosides	45
30	Test des flavonoïdes	46
31	Test des coumarines	46
32	Test glycosides	47
33	Test alcaloïdes	47
34	Test des tanins	48
35	Test des anthra-quinons	48
36	Test des anthocyanes	49
37	Test des quinones	49
38	Test des stéroïdes	50
39	Rendement % en extraits bruts	51
40	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	52
41	Teneur en polyphénols totaux de TB et TC.	53
42	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) des extraits bruts des espèces étudiées	57
43	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) l'extraits brute des espèces étudiées	59

*Liste des tableaux*

Tableau N°		Page
01	Facteurs de la coagulation	23
02	souches bactériennes :	41
03	Evaluation de l'effet antibactérien selon le diamètre d'inhibition.	43
04	résultats de screening phytochimique	44
05	Diamètres des zones d'inhibitions des deux antibiotiques (témoin positif)	55
06	Résultats de l'activité antibactérienne des Témoins négatifs.	56
07	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) des extraits bruts de TB	56
08	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) des extraits bruts de TC	58
09	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) des extraits dilués de TC	60

*Table des matières*

Résumé

ملخص

Abstract

Liste des Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

***Partie 01 : Synthèse bibliographique***

***Chapitre I : Plantes médicinales et métabolites secondaires***

I.1. Généralités sur les plantes médicinales .....	4
I.2. Métabolites secondaires .....	4
I.2.1. Principes actifs des plantes médicinales : .....	5
I.2.1.1. Les composés phénoliques .....	5
I.2.1.2. Flavonoïdes .....	5
I.2.1.3 Coumarines .....	6
I.2.1.4. Tanins .....	6
I.2.1.5. Terpènes .....	7
I.2.1.6. Saponines .....	7
I.2.1.7. Quinones .....	8
I.2.1.8. Alcaloïdes .....	9
I.2.1.9. Les huiles essentielles .....	10

***Chapitre II : Généralités sur les espèces étudiées***

II. 1.. Famille des Combretaceae .....	11
II.1.1. Genre Terminalia .....	11

II.1.2 Classification systématique de <i>terminalia</i> .....	12
II.1.3. Terminalia chebula L. : .....	12
II.1.3.1 Description botanique de <i>Terminalia chebula</i> .....	12
II.1.3.2 Répartition géographique de <i>Terminalia chebula</i> .....	14
II.1.3.3 Classification de <i>Terminalia chebula</i> .....	14
II.1.4. Terminalia bellirica : .....	15
II.1.4.1. Description botanique de <i>Terminalia bellirica L</i> .....	15
II.1.4.2. Répartition géographique de <i>Terminalia bellirica L</i> .....	17
II.1.4.3. Classification de <i>Terminalia bellirica</i> .....	17
II.1.5. Utilisation des Terminalia bellirica L et Terminalia chebula L .....	17

### ***Chapitre III : Les activités Biologiques***

III.1. Généralités sur l'activité antibactérienne .....	19
III.1.1. Les principales substances antimicrobiennes : .....	19
III.1.1.1. Composés phénoliques .....	19
III.1.1.2. Antibiotiques.....	20
III.1.2. Méthodes utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne .....	20
III.1.2.1. Aromatogramme.....	20
III.1.2.2. Micro atmosphères .....	21
III.1.2.3. <i>Méthode</i> de diffusion en puits .....	21
III.1.2.4. Méthode de dilution .....	22
III.2. Activité anticoagulante : .....	22
III.2.1. Définition .....	22
III.2.2. Facteurs de coagulation : .....	22
III.2.3. Voies de la coagulation.....	23
III.2.3.1. Voie endogène.....	24
III.2.3.2. Voie exogène.....	24

III.2.3.3. Voie commune .....	24
III.2.4. Inhibiteurs de coagulation.....	24
III.2.5. Anticoagulants .....	25
III.2.5.1. Les héparines.....	25
III.2.5.2. Les anti-vitamines k .....	26
III.2.5.3. Les nouveaux anticoagulants oraux (NACO) .....	26

***Partie II : Etude expérimentale***

***Chapitre I : Matériels et méthodes***

I.1 Matériel .....	27
I.2 Méthodes .....	27
I.3. Screening phytochimique :.....	28
I.3.1. Préparation de l'extrait éthanolique.....	28
I.3.2. Tests préliminaires réalisés :.....	29
I.4. Extraction et dosage des polyphénols totaux : .....	31
I.4.1 Extraction des polyphénols totaux.....	31
I.4.1.1. Préparation de l'extrait méthanolique.....	31
I.4.1.2 Préparations de l'extrait aqueux : .....	31
I.4.1.3 Rendement de l'extrait brut .....	33
I.4.2. Dosage des polyphénols totaux par colorimétrie (méthode de Folin Ciocalteu)...	33
I.5. Activité anti coagulante.....	35
I.5.1. Préparation du pool plasmatique .....	35
I.5.2. Activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène .....	36
I.5.3. Activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène (TQ) .....	39
I.6. Activité antibactérienne.....	41
I.6.1. Matériel du test de l'activité antibactérienne : .....	41
I.6.1.1. Souches bactériennes .....	41

I.6.1.2. Milieux de culture .....	41
I.6.1.3. Préparation des extraits .....	41
I.6.1.4. Préparation de l'inoculum .....	42
I.6.1.5. Ensemencement .....	42
I.6.1.6. Préparation des disques d'aromatogramme .....	42
I.6.1.7. Lecture .....	43

***Chapitre II : Résultats et discussion***

II.1. Résultats .....	44
II.1.1. Screening phytochimique .....	44
II.2. Interprétation des Résultats .....	50
II.2.1. Rendement en extrait brut .....	50
II.2.2. Dosage des polyphénols totaux .....	52
II.2.3. Activité anticoagulante .....	54
II.2.4. Activité antibactérienne .....	54
II.2.4.1. Résultats de l'activité antibactérienne des antibiotiques et de DMSO .....	55
II.2.4.2. Résultats de l'activité antibactérienne des extraits bruts .....	56

Conclusion et perspectives

Références Bibliographiques

Annexes



# *Introduction*

### **Introduction**

Depuis des milliers d'années, l'homme utilise les plantes trouvées dans la nature, comme aliments, abris et matières principales pour le maintien de sa beauté et le soin de sa santé et pour traiter et soigner des maladies (Sanago, 2006). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2003), environ 65-80% de la population mondiale à recours au médecine traditionnelle pour satisfaire ses besoins en soins de santé primaire, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne (**Mann et al,1997**).

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in vivo* et *in vitro* des tissus végétaux. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et représentent une nouvelle source de composés actifs (**Teixeira Da Silva, 2004**).

Ces dernières années l'attention s'est portée sur les activités biologiques des plantes médicinales en raison du rôle qu'elles jouent dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, les accidents vasculaires cérébraux, l'ischémie, les maladies infectieuses, le cancer, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer en combattant les stress cardiovasculaires, infectieux et oxydatif.

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 (**Benbrinis, 2012**). En parallèle les accidents vasculaires survenu d'une coagulation incorrecte dans les organes vitaux tels que le cerveau, le cœur et le foie, causera la mort.

Par conséquent, trouver des approches thérapeutiques sûres et efficaces pour prévenir et traiter ces maladies, en particulier avec l'utilisation de plantes médicinales, qui sont plus sûres, moins chères, et plus disponible, est un objectif important que nous cherchons à atteindre.

L'évaluation des propriétés phytopharmaceutiques, antimicrobienne anticoagulante et antioxydante demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine traditionnelle.

L'Algérie est l'un des pays méditerranéens qui constitue un véritable réservoir phytogénétique et qui a une longue tradition médicale et un savoir-faire ancestral à base des

plantes médicinales. Selon **(Kaddem, 1990)**, L'étude de la médecine traditionnelles et du traitement par les plantes est particulièrement intéressante en Algérie pour la richesse floristique, et la persistance de l'usage des plantes par une proportion de la population.

Terminalia est une plante endémique de La famille des Combretaceae est constituée de 17 genres regroupant environ 525 espèces réparties principalement dans les régions tropicales et subtropicales d'Afrique, de l'Europe centrale, de l'Amérique du Sud, de l'Asie du Sud et de l'Australie du Nord **(Maurin et al, 2010)**.

Les investigations menées sur les Combretaceae ont rapporté plusieurs activités biologiques à savoir antifongiques, antimicrobiennes, antivirales et antioxydantes. La famille des Combretaceae est une source riche en tannins, flavonoïdes, et terpénoïdes **(Mann et al, 2009)**.

Traditionnellement Terminalia est utilisée pour traiter une liste exhaustive de maladies tels que les troubles abdominaux, le mal de dos, les infections bactériennes, la bilharziose, le cancer, les toux, la conjonctivite, la constipation, la diarrhée, la dysenterie, les dysménorrhées, les maux d'oreilles, la fièvre, les ulcères gastriques, les maladies vénériennes, les céphalées, les maladies cardiaques, l'hypertension, les oedèmes, la syphilis, les troubles de l'estomac... **(Eloff et al, 2008)**.

Vu les bienfaits thérapeutiques de la plante terminalia et dans le but de l'introduire parmi la flore Algérienne et profiter de ses propriétés chimiques on a lancé cette étude.

Dans ce cadre, on a travaillé *in vitro* sur deux espèces de la plante terminalia (*chebula et bellirica*), en réalisant un criblage phytochimique, en cherchant les composants actifs, en calculant le dosage des polyphénols à partir de l'extrait méthanolique et aqueux et en évaluant leur activité anticoagulante vis-à-vis de deux voies endogène et exogène, et l'activité antibactérienne vis-à-vis de trois souches bactériennes.

Ce travail est subdivisé en deux parties :

La première partie contient une présentation bibliographique partagée en trois chapitres :

- Le premier chapitre discute les plantes médicinales et le métabolisme secondaire.
- Deuxième chapitre présente des généralités sur les deux espèces étudiées.
- Troisième chapitre explique brièvement les activités biologiques.

La deuxième partie c'est la partie expérimentale ; Comporte deux chapitres :

- Le premier chapitre concerne le matériel et les différentes méthodes utilisées afin de réaliser ce travail.
- Le deuxième chapitre regroupe l'ensemble des résultats suivis par une discussion, Enfin une conclusion générale et terminer le travail par procurer des perspectives.

# **Partie 01 : Synthèse bibliographique**

**Chapitre I :**  
**Plantes médicinales et**  
**métabolites secondaires**



## **I.1. Généralités sur les plantes médicinales**

L'utilisation des plantes, à des fins thérapeutiques, est rapportée dans les littératures antiques arabes, chinoises, égyptiennes, hindous, grecques, romaines (**Anonyme, 1974**).

A l'ère préhistorique lorsque les hommes vivaient de la chasse et de la cueillette, la nourriture était souvent synonyme de remède. Les plantes étaient cueillies en fonction des besoins. Ceux en énergie, hydrate de carbone et protéines, étaient quotidiens. D'autres étaient occasionnels, antiseptiques hémostatiques pour une blessure, ou astringents contre la diarrhée (**Konemann, 1999**).

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments, elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (**Maurice, 1997**).

Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie ; Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes (**Bahorun et al, 1996**).

### **Définition des plantes médicinales**

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (**Farnsworth et al.1986**), Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (**Elqaj et al., 2007**).

## **I.2. Métabolites secondaires**

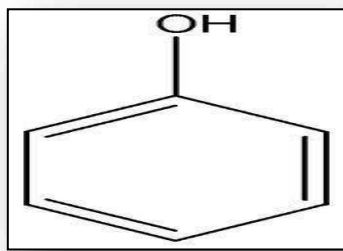
Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes (**Lutge et al. 2002**). Elles sont caractérisées généralement par de faible concentration dans les tissus végétaux (généralement quelques pourcents du carbone total, si on exclue la lignine de cette catégorie) (**Newman et Cragg, 2012**).

Ces molécules jouent un rôle dans l'adaptation des plantes à leur environnement et représentent également une source importante de produits pharmaceutiques (**Bourgaud et al, 2001**). Ils appartiennent à des groupes chimiques variés : alcaloïdes, terpènes et composés phénoliques (**Macheix et al, 2005**).

### I.2.1. Principes actifs des plantes médicinales :

#### I.2.1.1. Les composés phénoliques

Ils englobent les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C6-C1), suivis des dérivés D'esters hydroxycinamiques (C6-C3) (**Barboni, 2006**) (Figure 01).



**Figure 1** : structure de noyau phénolique (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

#### I.2.1.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules très répandues dans le règne végétal. Ils participent à l'apparition de différents pigments jaunes, orangés et rouges de différents organes de végétaux. Les flavonoïdes sont caractérisés par la présence d'un noyau flavone, ils possèdent une structure générale en (C6-C3-C6) et sont composés de deux cycles benzoïques reliés par un cycle pyrone (**Rice et al, 1996 ; Hakkinen, 2000** (figure 2)).

Les flavonoïdes se rencontrent également associés à des sucres, et se distinguent généralement par six différentes sous-classes : anthocyanes, flavanols, flavanones, flavones, flavonols et isoflavones (**Ferreira, 2017**).

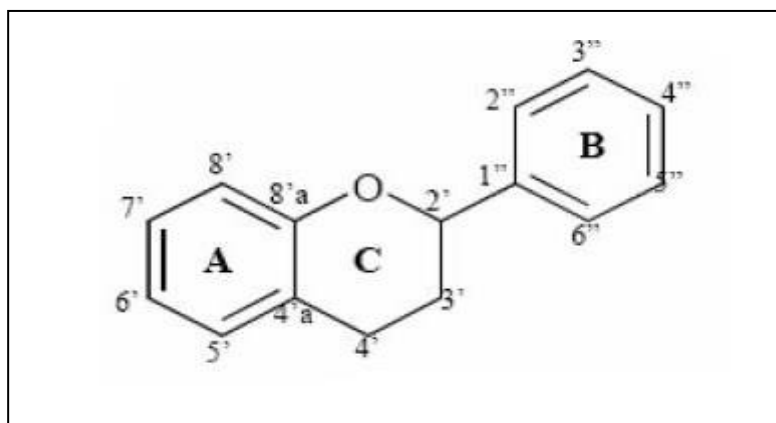


Figure 2 : Squelette de base des flavonoïdes (Girotti-Chanu,2006).

### I.2.1.3 Coumarines

Les coumarines qui sont les dérivés de (C6-C3), appartiennent au groupe des composés connus par des benzo- $\alpha$ -pyrone (O'Kennedy et Thornes, 1997) et toutes sont substituées en 7 par un hydroxyle. Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combinées avec des sucres. Plus d'un millier de coumarines naturelles ont été décrites. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin (Cowan, 1999) (figure2).

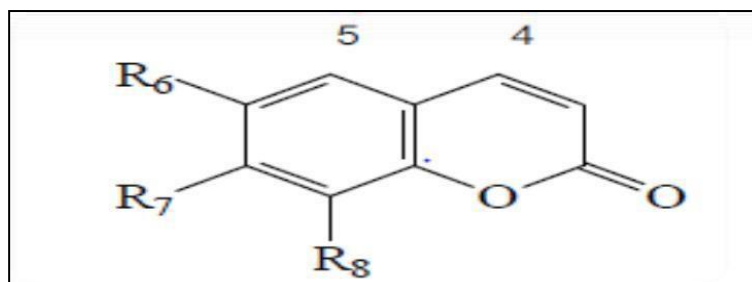


Figure 3 : Structure chimique de coumarine (O'Kennedy et Thornes,1997).

### I.2.1.4. Tanins

Toutes les plantes contiennent les tanins à un degré plus ou moins élevé ceux-ci donnent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles et les rendent impropres à la consommation pour les insectes ou les bétails. Ce sont des composés polyphénoliques que l'on trouve dans pratiquement tous les végétaux, et dans toutes leurs parties (écorces, racines, feuilles, etc.). Caractérisées par leur astringence (sensation de dessèchement en bouche). Par exemple, les pépins de raisins sont très chargés en tanins (Mann, 1962). Le tanin se retrouve aussi dans le cidre, le calvados et le pommé. Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques et par leur degré d'oxydation

(Hemingway, 1992). Ils ont la propriété de stopper les hémorragies, de lutter contre les infections et de précipiter les protéines (fongiques ou virales) et les métaux lourds. Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus souples comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure (Pousset, 1989 ; Nowitz et Bottet, 2000).

#### I.2.1.5. Terpènes

Les terpènes forment une classe d'hydrocarbures, produits par de nombreuses plantes, en particulier les conifères. Ce sont des composants majeurs de la résine et de l'essence de térébenthine produite à partir de résine. Les terpènes sont des dérivés de l'isoprène C<sub>5</sub>H<sub>8</sub> (7) et ont pour formule de base des multiples de celle-ci (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)<sub>n</sub>. On peut considérer l'isoprène comme l'un des éléments de construction préférés de la nature (figure 4).

Parmi les terpènes les plus importants on trouve : l' $\alpha$ -pinène, le  $\beta$ -pinène, le  $\delta$ -3- carène, le limonène, le carotène... En revanche, les caroténoïdes qui contiennent des atomes d'oxygène, ne sont pas à proprement parler des terpènes, mais des terpénoïdes (luteine). Deux de propriétés fondamentales de terpènes sont leurs caractères odoriférants (géranium) et leurs sensibilités à la lumière.

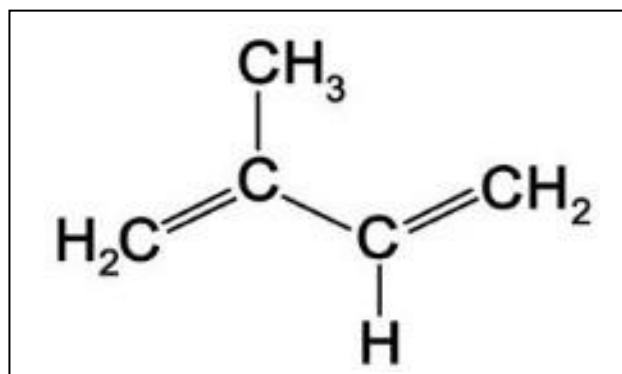


Figure 4 : Structure de la molécule d'isoprène (Mostafa, 2008).

#### I.2.1.6. Saponines

Sont des métabolites secondaires hétérosidiques. Ils se divisent en saponosides à géninetriterpenique et stéroïdique. Le nom saponoside est dérivé du mot latin *sapo* qui veut dire savon, elles se caractérisent par propriétés moussantes émulsifiants en contact avec l'eau (Bruneton, 1999). Les saponines stéroïdiques ont une structure chimique similaire à celle de nombreuses hormones humaines (cortisol et oestrogène) et confèrent aux plantes qui les

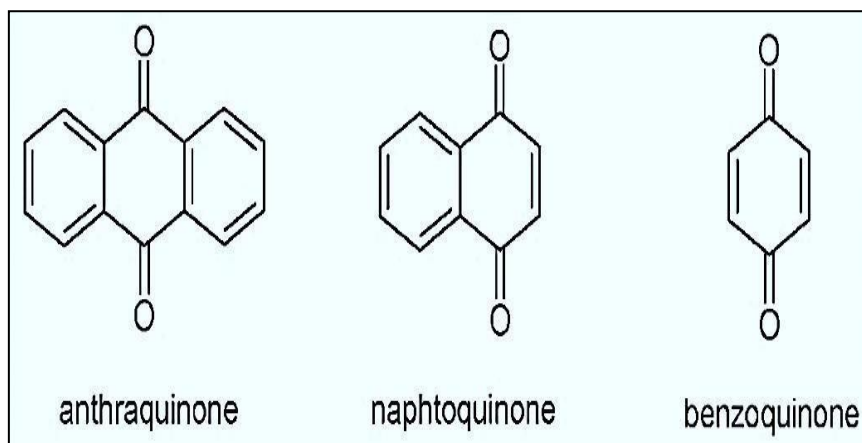
contiennent une activité hormonale. Les triterpenoides présents dans les racines de primevère « Premulaveris » sont de puissants expectorants, mais peuvent aussi faciliter l'absorption des éléments nutritifs.

Fréquemment rencontrés chez les végétaux supérieurs en particulier chez les Dicotylédones (racines, fruits, écorces, tiges, feuilles ou graines), mais sont synthétisés également par certains animaux marins tels que les concombres de mer ou les étoiles de mer.

Les saponosides sont des composés, pour la plupart, très polaires et sont souvent retrouvés sous forme de mélanges complexes dans la plante. Ils possèdent en outre, un large spectre de propriétés biologiques et pharmacologiques notamment des propriétés immunomodulatrice, immunoadjuvante, cytotoxique, antitumorale et hypocholestérolémiant (Lacaille-Dubois, 2000). Les saponines hémolysent les globules rouges, irritent les muqueuses, causent un relâchement intestinal et augmentent les sécrétions muqueuses bronchiales (Larousse, 2001).

#### **I.2.1.7. Quinones**

Ce sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques. Elles sont caractérisées par un motif 1,4-dicéto cyclohexa2,5-diéniq (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa-3,5diéniq (ortho-quinones). Elles sont ubiquitaires dans la nature, principalement dans le règne végétal et sont fortement réactifs (benhammou,2012) (figure 5).



**Figure 5 :** Exemples des structures chimiques des quinones (**harrar, 2012**).

### I.2.1.8. Alcaloïdes

Ce sont des substances d'origine biologique et le plus souvent végétale (il n'en n'existe que des rares représentants dans le règne animal), Formant un groupe très large, les alcaloïdes possèdent au moins un atome d'azote hétérocyclique qui les rend pharmaceutiquement très actifs. Les alcaloïdes renferment toujours du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène (exceptionnellement quelques alcaloïdes contiennent du soufre).

Chez le végétal, les alcaloïdes existent sous la forme soluble, de sels (citrates, malates, tartrates, méconates, isobutyrate, benzoates) ou sous celle d'une combinaison avec les tanins. Leur nom se termine toujours par « ine ». Certains sont des médicaments connus qui ont des vertus thérapeutiques avérés, c'est le cas d'un dérivé de la pervenche « Vincarosea » employé pour traiter certains cancers (**Nowitz et Bottet, 2000 ; Larousse, 2001**).

De plus, ils ont une action physiologique remarquable sur le système nerveux central ou sur le système nerveux autonome sympathique et parasympathique dont ils agissent en petite quantité. Les plantes les utilisent pour la plupart d'entre eux dans leur système de défense contre les herbivores et les pathogènes car ces composés sont toxiques. On peut les classer selon leur composition chimique et surtout leur structure moléculaire en plusieurs groupes :

Des phénylalanines.

- Des alcaloïdes quinoléiques.
- Des alcaloïdes iso quinoléiques.
- Des alcaloïdes pyridiques et pipéridiques.



**I.2.1.9. Les huiles essentielles**

Il s'agit de mélange de composés lipophiles, volatiles et souvent liquides, d'extraits de la plante grâce à des procédés physiques. Les huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante (**Teuscheret al, 2005**). Elles sont utilisées pour leurs parfums dans les préparations cosmétologiques et aussi pour leurs propriétés antiseptiques et anti-inflammatoires. D'autres sont utilisées comme édulcorants (**Domart et Bourneuf, 1988**).

**Chapitre II :**  
**Généralités sur les espèces**  
**étudiées**

## II.1. Famille des Combretaceae

La famille des Combretaceae est constituée de 17 genres regroupant environ 525 espèces réparties principalement dans les régions tropicales et subtropicales d'Afrique, de l'Europe centrale, de l'Amérique du Sud, de l'Asie du Sud et de l'Australie du Nord (**Maurin et al,2010**).

Elle est actuellement divisée en deux sous-familles : les Combretoideae et les Strephonematoideae. Les Strephonematoideae comprennent un seul genre, Strephonema, avec trois espèces d'arbres limitées à l'ouest de l'Afrique tropicale. La sous-famille des Combretoideae est divisée en deux tribus, les Laguncularieae et les Combreteae. La tribu des Combreteae comprend deux sous-tribus, les Terminaliinae et les Combretinae. Le genre Terminalia, pantropical, est le plus grand genre de la sous-tribu des Terminaliinae avec 150 espèces.

### II.1.1. Genre Terminalia

Les arbres feuillus du genre *Terminalia* sont des grandes espèces à fleurs et fruitières des régions tropicales. Le genre, très répandu et cosmopolite tropical, compte plus de 100 espèces. Les 100 à 200 espèces sont réparties presque dans le monde entier sous les tropiques. L'espèce la plus prisée est le badamier, cultivé pour ses effets bénéfiques comme plante médicinale.

Le nom générique (du latin terminalis) indique que les feuilles ont l'apparence de feuilles accumulées aux extrémités des branches. Chaque feuille naît tout au bout des pousses latérales en croissance. La plupart des espèces ont une croissance alterne et en spirale, parfois presque rarement disposées complètement opposées ou en verticilles, les feuilles simples sont entières. Les stipules sont absente (**Eloff et al,2008**).

Les arbres à feuilles terminales sont surtout connus comme source de métabolites secondaires. Les feuilles de Catappa et l'écorce contiennent des triterpènes (cycliques) et certains dérivés comme les flavonoïdes, les tanins et autres molécules aromatiques.

Les arbres, parfois seulement des arbustes pour quelques espèces, mesurent jusqu'à plus de 20 mètres de haut. Les espèces donnent principalement des fruits charnus, ressemblant à des fruits à noyau, coriaces, à deux à cinq bords ailés. Ils ne contiennent qu'une seule graine endosperme, une sorte d'amande. Les cotylédons contenant de l'huile sont ondulés ou enroulés en spirale.

Plusieurs espèces de *Terminalia* sont utilisées pour extraire des substances telles que les triterpènes cycliques, les flavonoïdes et les tanins. Certaines de ces substances sont efficaces contre les bactéries et les champignons; des agents anticancéreux sont également inclus. Les feuilles de *Bellirica* sont très appréciées en aquarium pour leurs effets bénéfiques antibactériens, antibiotiques, antifongiques, antioxydants, astringents et anti inflammatoires.

*Terminalia chebula* L et *Terminalia bellirica* L ainsi que *Terminalia citrina* L ont été principalement utilisés en médecine de l'antiquité jusqu'au début de la période moderne.

**Distribution géographique de *Terminalia* :** originaire ; Asie tropicale, plantée et naturalisée dans toutes les régions tropicales (Stevens, P.F,2012).

### II.1.2 Classification systématique de *terminalia*

*Terminalia* est un genre de plantes de la famille des Combretaceae. Il est principalement composé de grands arbres, environ 100 espèces réparties dans les régions tropicales du monde.

Classification systématique

Règne : Plantae

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Myrtales

Famille : Combretaceae

Divition : Magnoliophyta

Genre : Terminalia

### II.1.3. Terminalia chebula L. :

#### II.1.3.1 Description botanique de *Terminalia chebula*

Arbre caducifolié atteignant 30 m de haut, avec un fût généralement court et cylindrique atteignant jusqu'à 10 m de long et 80(-130) cm de diamètre ; écorce marron foncé, normalement fendillée longitudinalement avec des écailles ligneuses ; cime arrondie, avec des rameaux étalés (figure 06).



**Figure 6 :** arbre de *Terminalia chebula* L (indiabiodiversity.org).

Feuilles alternes ou opposées, simples et entières ; stipules absentes ; pétiole de 1–3 cm de long, pourvu de 2 glandes près de l’apex ; limbe ovale à elliptique-obovale, de 7–15 cm × 4–10 cm, cunéiforme à légèrement cordé à la base, obtus à aigu à l’apex, finement coriace, pubescent au-dessous, pennatinervé (figure 07).



**Figure 7 :** *Terminalia chebula* L plant diagram

Inflorescence : épi axillaire ou terminal, simple ou ramifié de 3–7 cm de long.

Fleurs bisexuées ou mâles, régulières, 5-mères, petites, d’un blanc jaunâtre, à odeur déplaisante ; calice avec un tube glabre ; corolle absente ; étamines 10, exsertes ; ovaire infère, 1-loculaire, style simple.

Fruit : drupe obovoïde ou cylindrique-ellipsoïde de 2,5–5 cm de long, légèrement 5-angulaire, jaune à brun orangé à maturité, glabre, contenant 1 graine (Stevens, P. F,2012) (figure 08).



**Figure 8 :** fruit de *Terminalia chebula* L (Cliché personnel)

Plantule à germination épigée, avec une longue racine primaire, plutôt mince, hypocotyle court et épais, cotylédons glabres avec 3 nervures apparentes et 2 moins visibles.

### **II.1.3.2 Répartition géographique de *Terminalia chebula***

*Terminalia chebula* est indigène depuis la région sub-himalayenne du Népal et du nord de l'Inde jusqu'au Sri Lanka, au Myanmar, en Thaïlande, en Indochine et dans le sud de la Chine. Il a été introduit en Afrique tropicale où des individus sont parfois cultivés (comme en Côte d'Ivoire, en R.D. du Congo et en Tanzanie).

### **II.1.3.3 Classification de *Terminalia chebula***

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Divition : magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Myrtales

Famille : Combretaceae

Genre : terminalia

Espèce : *Terminalia chebula*

#### **II.1.4. Terminalia bellirica :**

##### **II.1.4.1. Description botanique de *Terminalia bellirica* L**

*Terminalia Bellirica* L est un grand arbre à feuilles caduques pouvant atteindre 50 m de haut et un diamètre de 3 m, avec une couronne arrondie. La base du tronc, souvent étayée, est dépourvue de branches jusqu'à 20 mètres jusqu'à 20 m (figure09).

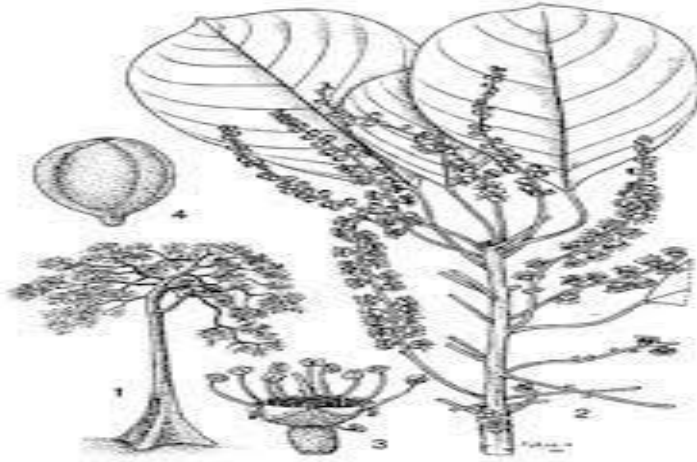


**Figure 9 :** arbre de *Terminalia bellirica* L ([indiabiodiversity.org](http://indiabiodiversity.org)).

- L'écorce est bleuâtre ou grise cendré, couverte de nombreuses fissures longitudinales fines. De nombreuses et fines fissures longitudinales, l'écorce interne est jaunâtre.
- Feuilles grandes, glabres, alternes, largement elliptiques à obovales-elliptiques, 4-24 cm x 2-11 cm, base arrondie à cunéiforme, rufous-sericeous mais bientôt glabrescentes, avec 6-9 feuilles. Glabrescent, avec 6-9 paires de veines secondaires. Nervation secondaire et tertiaire nervation secondaire et tertiaire proéminente sur les deux surfaces, regroupée vers les



extrémités des ramifications. Pétiole de 2,5-9 cm de long Jeunes feuilles rouge cuivre, devenant rapidement vert perroquet, puis vert foncé (figure 10).



**Figure 10 :** *Terminalia bellirica* L plant diagram

- Fleurs solitaires, petites, 3-15 cm de long, blanc verdâtre, simples, en épis axillaires simples, axillaires ; tube du calice densément séreux ou tomenteux ; les fleurs apparaissent en même temps que les nouvelles feuilles et ont un fort parfum de miel.
- Fruit sub-globulaire à largement ellipsoïde, 2-4 x 1,8-2,2 cm, densément velouté ou séreux, jaune clair. Ou séreuse, jaune clair, obscurément à 5 angles et finement brune (**Mann et al.2009**) (Figure 11).



**Figure 11 :** Fruit de *Terminalia bellirica* L (Cliché personnel).



- Le nom générique "*Terminalia*" vient du mot latin "terminus" ou "terminalis" (fin), et fait référence à l'habitude des feuilles d'être entassées ou portées à l'extrémité des pousses.

**II.1.4.2. Répartition géographique de *Terminalia bellirica* L.**

*Terminalia bellirica* c'est des plus anciennes herbes médicinales de l'Inde, du Pakistan, du Népal, du Bangladesh et du Sri Lanka ainsi que de l'Asie du Sud-Est.

**II.1.4.3. Classification de *Terminalia bellirica***

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Myrtales

Famille : Combretaceae

Genre : terminalia

Espèce : *Terminalia bellirica*

**II.1.5. Utilisation des *Terminalia bellirica* L et *Terminalia chebula* L**

Le *Terminalia bellirica* L et le *Terminalia chebula* L sont tous deux utilisés pour traiter l'hypercholestérolémie et les troubles digestifs, y compris la diarrhée, la constipation et l'indigestion. Ils ont également été utilisés pour l'infection par le VIH.

Le *Terminalia bellirica* L est utilisé pour protéger le foie et pour traiter les affections respiratoires, notamment les infections des voies respiratoires, la toux et les maux de gorge.

Le *Terminalia chebula* L est utilisé pour la dysenterie.

Le *Terminalia bellirica* L et le *Terminalia chebula* L sont utilisés comme lotion pour les yeux douloureux.

Le *Terminalia chebula* L est également utilisé par voie topique comme bain de bouche et gargarisme.

Par voie intravaginale, le *Terminalia chebula* L est utilisé comme douche pour traiter les infections vaginales.

Dans la médecine traditionnelle ayurvédique, le *Terminalia bellerica* L est utilisé comme un "harmonisateur de santé" en combinaison avec le *Terminalia chebula* et l'*Emblica officinalis*. Cette combinaison est également utilisée pour réduire le cholestérol et prévenir la mort des tissus cardiaques.

**Chapitre III :**  
**Les activités Biologiques**

Le chercheur doit aussi étudier l'activité des plantes médicinales et de leur s'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.

### **III.1. Généralités sur l'activité antibactérienne**

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces microorganismes de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut schématiquement en distinguer 3groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise (**Kaufmann, 1997**).

#### **III.1.1. Les principales substances antimicrobiennes :**

##### **III.1.1.1. Composés phénoliques**

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Les polyphénols sont doués d'activité antibactériennes importantes et diverses, probablement dû à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité (**Cowan, 1999**). Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés plus ils sont inhibiteurs des microorganismes (**Scalbert, 1991**). Les flavane-3-ols, les flavonols et les tanins ont reçu plus d'attention due à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols (**Daglia, 2011**).

Ces composés jouent un rôle inhibiteur, ils n'agissent pas sur la paroi bactérienne mais plutôt sur un mécanisme interne. Ces composés sont supposés agir sur l'ADN, l'ARN et la synthèse protéique (**Ulanowska et al,2008**) Ils possèdent une capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne telle que l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes ainsi qu'à leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques (**Daglia, 2011**).

**III.1.1.2. Antibiotiques**

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibe sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (**Bergogne-Berezin et Dellamonica, 1995**).

**III.1.2. Méthodes utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne**

Lorsque l'on parle d'activité antimicrobienne, on distingue deux sortes d'effets : une activité létale ou bactéricide et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique.

Différents protocoles peuvent ainsi être classés :

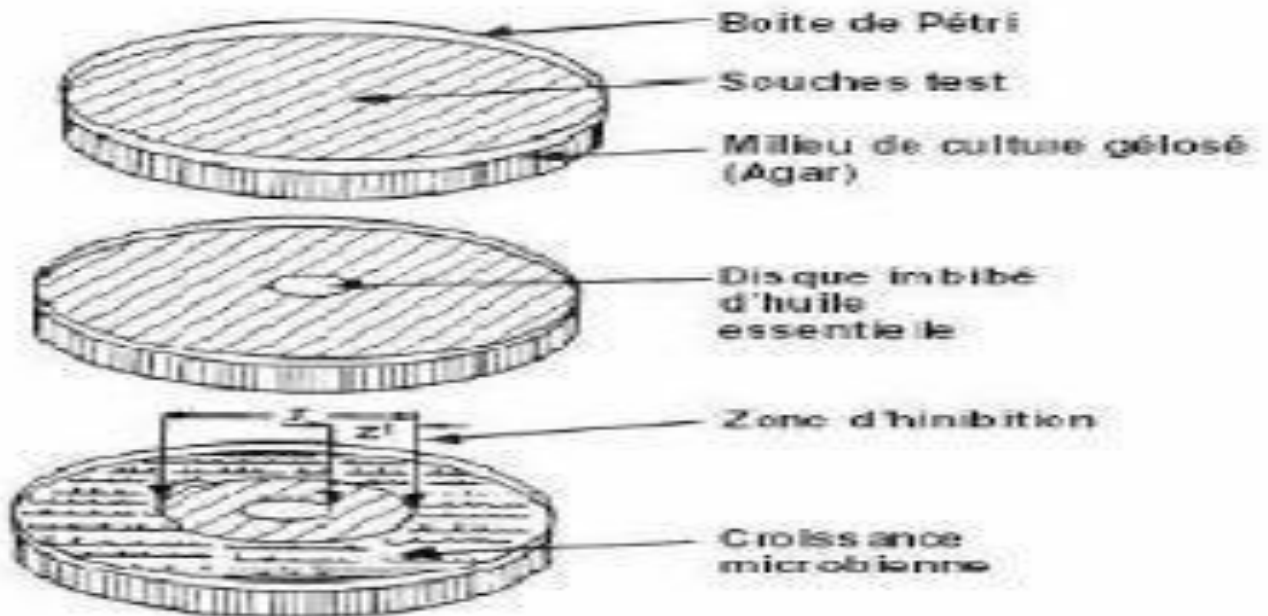
- Selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'échantillon, soit liquide, solide ou gazeux,
- Selon la nature du contact de l'échantillon avec le germe : diffusion sur disque, solution alcoolique ou dispersion dans un émulsionnant (**Pibiri ,2005**).

**III.1.2.1. Aromatogramme**

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antibactérienne en milieu solide dans un boite de pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antibactérien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition (**Hellal ,2011**).

Placés dans une étuve à 37,5 °C, dans des conditions optimales de culture, les germes pathogènes se développent rapidement sur le milieu nutritif. Sur ces colonies microbiennes, plusieurs séries (6 à 8 par boîte) de petits disques de papier buvard imprégné de différents échantillons à tester sont ensuite disposées. Après un temps de latence à 37,5 °C, le diamètre du halo d'inhibition entourant les disques st alors mesuré. Chaque halo, une zone claire, montre la destruction des germes pathogènes et donne une indication précise de l'activité antibactérienne de l'échantillon (figure12).

L'aromatogramme représente cependant un point de repère essentiel puisque sa technique est identique à celle utilisée pour mesurer l'activité bactéricide des antibiotiques (figure12).



**Figure 12 :** Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de Pétri

(Zaika,1988)

### III.1.2.2. Micro atmosphères

Dérivé de la méthode précédente le protocole des micros atmosphères est techniquement proche de celle des aromagrammes. La différence réside principalement dans la position du disque imprègne.

Dans cette technique, le disque imprègne est déposé au centre du couvercle de la boîte de Petri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélose (Pibiri ,2005)

### III.1.2.3. Méthode de diffusion en puits

Méthode proposée par **Cooper Et Woodman**, reprise par **Shroeder et Messing**. Elle assure une diffusion radiale de l'échantillon à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable. La méthode consiste à découper un trou circulaire dans la gélose et y verser une solution de l'échantillon de concentration connue. L'échantillon diffuse radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne.

**III.1.2.4. Méthode de dilution**

Les échantillons à tester peuvent également être directement mélangés en concentration connue au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide (exige la dispersion homogène par un émulsifiant). Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes, après incubation, on note la présence ou l'absence de culture. La lecture peut être visuelle ou à l'aide d'un spectrophotomètre, le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (**Robert-Demuet, 1995**).

**III.2. Activité anticoagulante :****III.2.1. Définition**

La coagulation est l'aboutissement d'une cascade de réaction protéolytiques entraînant l'activité en chaîne de facteurs plasmatiques de la coagulation, circulant sous forme de précurseurs inactifs (zymogènes) (**Ajjan, et Grant.2006**). C'est un phénomène par lequel le sang fluide et circulant se transforme en une masse insoluble et immobile (caillot). IL est lié à la transformation de fibrinogène en fibrine. Cette transformation à lieu après une série de réactions enzymatiques faisant intervenir de nombreux facteurs tant plasmatiques que plaquettaires (**Ekoumou, 2003**).

**III.2.2. Facteurs de coagulation :**

Les facteurs de la coagulation ont été découverts et décrits comme une activité biologique présente chez l'homme normale et absente au cours de maladies hémorragiques héréditaires (**cambus ,2002**) (**Tablau01**).

Tableau 1 : Facteurs de la coagulation

N° de factures	Nom de facteurs	Rôle	Lieu de synthèse
I	Fibrinogène	Substrat	Foie
II	Prothrombine	Zymogène	Foie
III	Facteur tissulaire	Cofacteur	Sous-Endothélium Cellule sanguines
V	Proéaccélérine	Cofacteur	Foie
VII	Proconvertine	Zymogène	Foie
VIII	Facteur Anti hémophilique A	Cofacteurs	Foie
IX	Facteur Anti hémophilique B	Zymogène	Foie
X	Facteur STUART	Zymogène	Foie
XI	Facteur de Rosenthal	Zymogène	Foie
XII	Facteur de Hageman	Zymogène	Foie

### III.2.3. Voies de la coagulation

#### Cascade d'activation des facteurs de coagulation

Cette étape complexe de formation du caillot sanguin prend trois à six minutes. De manière schématique, elle est classiquement divisée en deux voies : la voie endogène et la voie exogène qui activent toutes les deux la voie commune finale du facteur X, de la thrombine et de la fibrine.



III.2.3.1. Voie endogène

Sollicite les facteurs de coagulation qui sont dissous dans le sang. La voie endogène est la voie la moins importante. En cas de déficit (facteur XII ou PK ou KHPM), il n’y aura pas de syndrome hémorragique grave.

III.2.3.2. Voie exogène

La voie la plus importante dans l’initiation de la coagulation et son rôle principal est de générer très rapidement une grande quantité de thrombine. Le facteur tissulaire (FT ou facteur III) provenant du tissu endommagé et le facteur VII activé vont activer le facteur X en facteur Xa.

III.2.3.3. Voie commune

La cascade se poursuit. Grâce au facteur X activé, la prothrombine (facteur II) sera activée en thrombine qui polarisera le fibrinogène (facteur I) en filaments de fibrine insoluble et activera le facteur XIII qui à son tour stabilisera le caillot sanguin (figure 13).

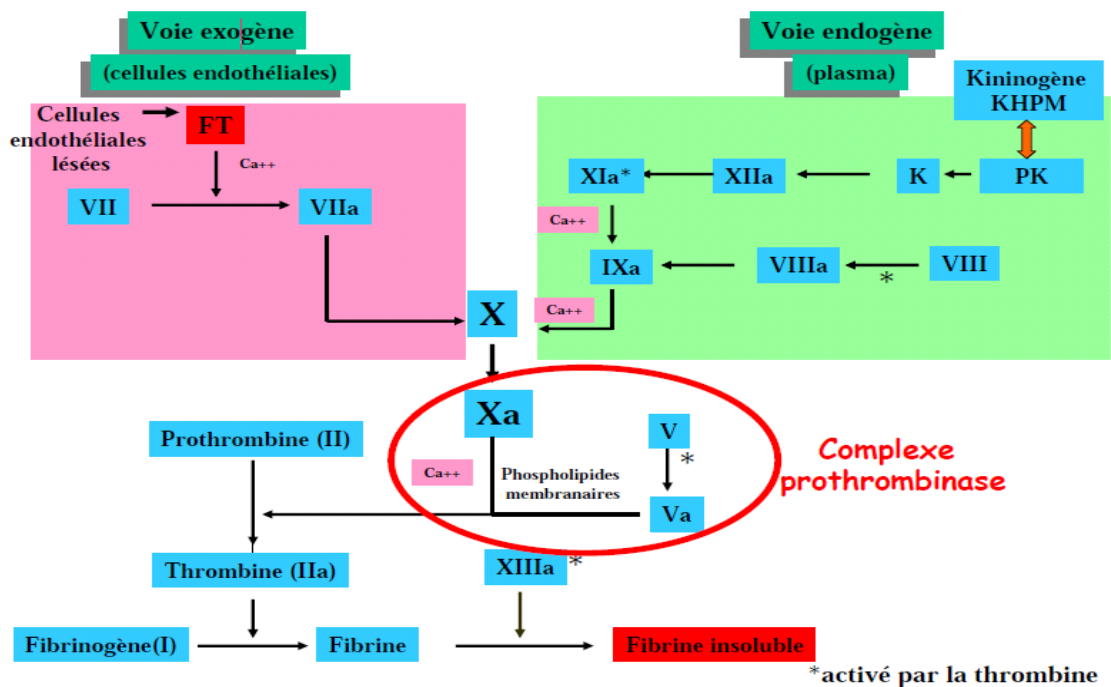


Figure 13 : cascade de la coagulation dans la voie endogène et la voie exogène.

III.2.4. Inhibiteurs de coagulation

Face aux facteurs de la coagulation, des systèmes inhibiteurs existent dans le plasma : l’anti-thrombine, la protéine C, la protéine S, le TFPI (Tissue Factor Pathan Inhibitor). Ce

système physiologique très complexe de la régulation de la coagulation est mis en oeuvre afin de limiter l'extension locale du caillot et d'éviter la diffusion à distance de la fibrinof ormation. La coagulation est donc nécessaire, grâce aux facteurs de la coagulation, mais pas trop, grâce aux inhibiteurs de la coagulation ! Donc cet équilibre entre facteurs de coagulation et inhibiteurs de la coagulation contribuent à un équilibre hémostatique physiologique (figure 14).

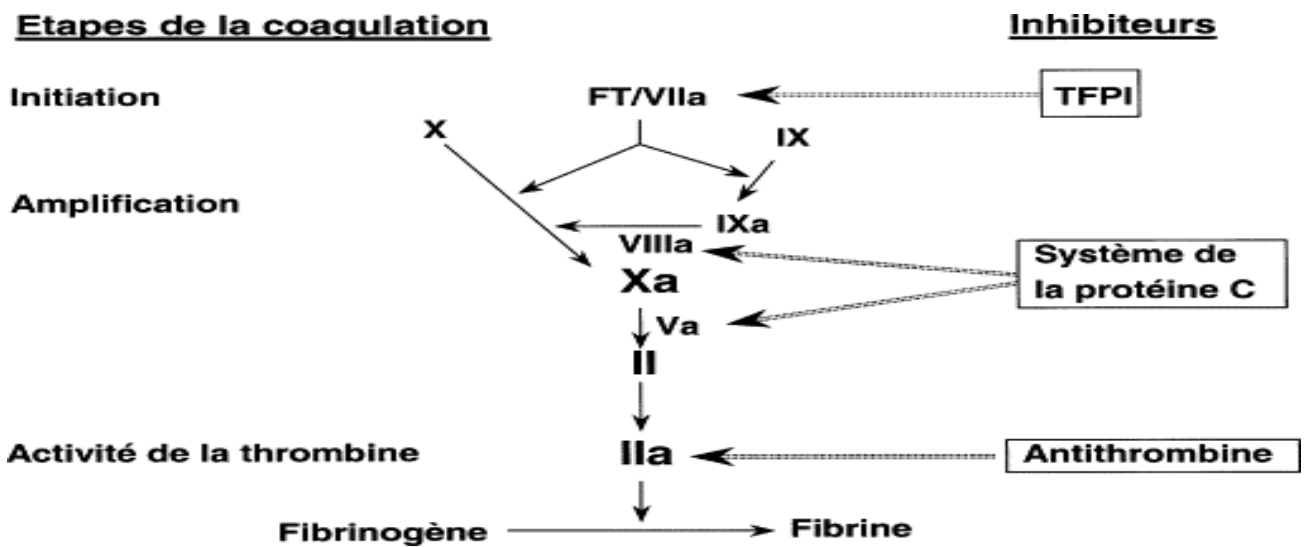


Figure 14 : Activation et inhibition de la coagulation

### III.2.5. Anticoagulants

Les anticoagulants représentent le traitement principal de la maladie veineuse thrombo-embolique. De nombreux anticoagulants agissant à différents niveaux de la cascade de la coagulation sont utilisés et ils sont regroupés en trois classes, deux classes des anticoagulants classiques (les héparines et les anti vitamines K) et la classe des nouveaux anticoagulants (Batty et Smith,2010).

#### III.2.5.1. Les héparines

Il existe deux types des héparines utilisables et administrées par voie intraveineuse ou sous cutanée. Les héparines non fractionnées (HNF), d'origine porcine, exerçant leur action anticoagulante par leur activité anti-Xa et anti-IIa, les héparines de bas poids moléculaire (HBPM), obtenues par dépolymérisation chimique ou enzymatique des HNF, plus homogènes en masse moléculaire, constituées essentiellement de chaînes courtes, ce qui leur confère une activité anti-Xa prédominante.

L'HNF et les HBPM forment un complexe avec l'anticoagulant physiologique l'antithrombine **III** potentialisant son effet sur l'inactivation de divers facteurs de coagulation (**Batty et Smith,2010**).

### **III.2.5.2. Les anti-vitamines k**

La vitamine K est un élément nécessaire dans la synthèse au niveau du foie de 4 facteurs de la coagulation, la prothrombine, la proconvertine **VII**, le facteur Stuart **X** , et le facteur anti hémophilique B (le facteur **IX**).

Les indications des anti-vitamines K (AVK) sont extrêmement nombreuses car ils sont utilisés dans la prévention des thromboses et des embolies, notamment les thromboses veineuses et les embolies pulmonaires (**Vidal,2009**).

### **III.2.5.3. Les nouveaux anticoagulants oraux (NACO)**

Forts des résultats encourageants des essais cliniques, qui montraient une efficacité similaire, voire supérieure dans certaines indications par rapport aux médicaments de référence (antivitamines K ou AVK, héparines), **trois NACO sont arrivés en force sur le marché :**

- **Le rivaroxaban** (Xarelto®), un inhibiteur direct du facteur Xa de la coagulation.
- **L'apixaban** (Eliquis®), un autre inhibiteur direct du facteur Xa de la coagulation.
- **Le dabigatran** (Pradaxa®), un inhibiteur direct de la thrombine (ou facteur IIa).

#### **Remarque :**

La prise de médicaments anticoagulants oraux est le plus souvent nécessaire afin d'éviter les embolies cérébrales ou systémiques. Ces anticoagulants oraux sont de nature diverse : **les antivitamines K (AVK) et les anticoagulants d'action directe**, aussi appelés "nouveaux anticoagulants oraux" (NACO).

**Partie II :**  
**Etude expérimentale**

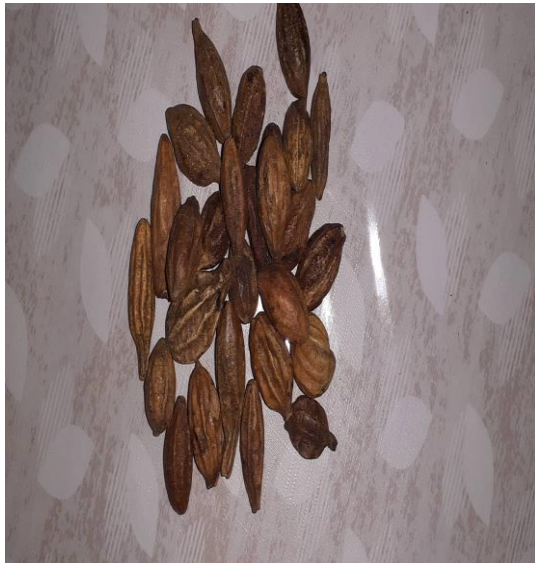
# **Chapitre I :**

## **Matériels et méthodes**

## I.1 Matériel

- **Matériel végétal**

Le matériel végétal utilisé dans ce travail est constitué de fruits de deux espèces appartenant à la famille des Combretaceae : *Terminalia Bellirica* L. et *Terminalia Chebula* L. (figure 15) et (figure 16). Ces fruits ont été achetés chez un herboriste à Ain oulmen wilaya de Setif.



**Figure 15 :** *Terminalia Bellirica* (cliché personnel).



**Figure 16 :** *Terminalia Chebula* (cliché personnel).

## I.2 Méthodes

### Préparation du matériel végétal :

Les fruits de *Terminalia Bellirica* L et *Terminalia Chebula* L ont été broyés à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à obtention d'une poudre. Cette dernière est récupérée après tamisage et conservée dans des flacons en verre et stocké à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation (figure 17) et (figure 18).



**Figure 17 :** *Terminalia chebula* (poudre  
(cliché personnel).



**Figure 18 :** *Terminalia bellirica* (poudre  
(cliché personnel).

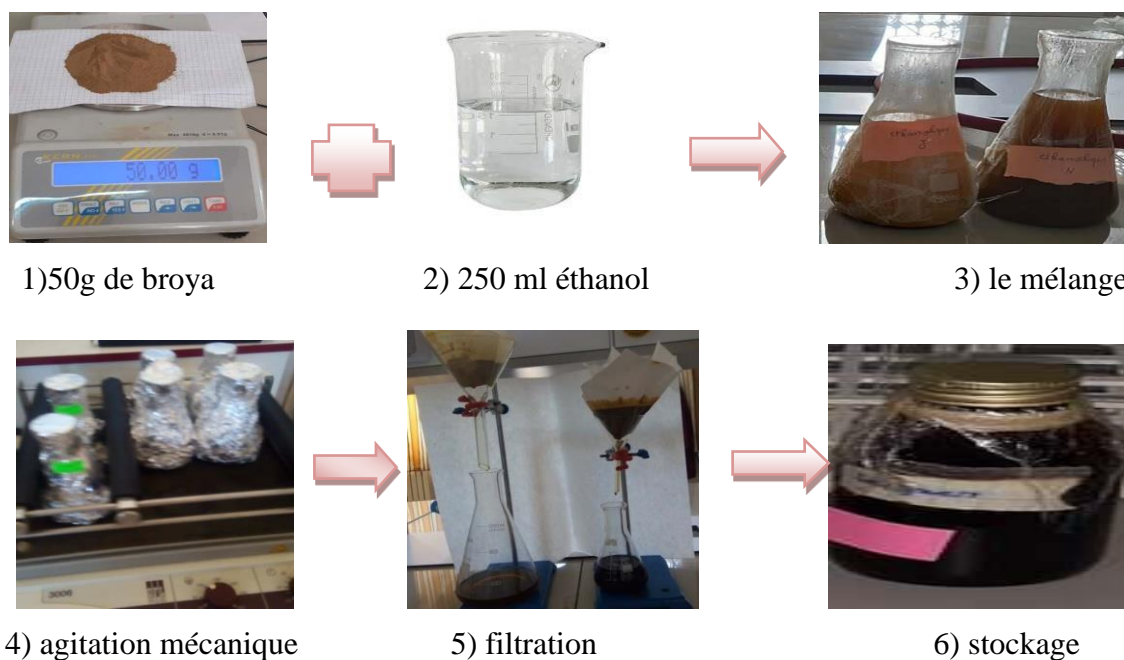
### I.3. Screening phytochimique :

Le screening phytochimique met en évidence la présence des familles de molécules actives, c'est une étude qualitative utilisée pour connaître la composition chimique globale des extraits. Elle est basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation, des observations sous lampe UV peuvent être aussi utiles en (+ et -) selon la teneur (Békro *et al.*, 2007).

La macération est la méthode d'extraction solide/liquide la plus simple. Elle consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour extraire les principes actifs avec ou sans agitation, à température ambiante (à l'avantage de préserver les substances thermosensibles) ou à température élevée pour une durée déterminée (Llaneza *et al.*, 2009).

#### I.3.1. Préparation de l'extrait éthanolique

50g de la matière végétale a été mise à macérer dans 250ml de l'éthanol (80%) sous agitation mécanique à une température ambiante pendant deux à trois jours. Après le mélange obtenu sera filtré à l'aide d'un papier filtre de type whatman. le filtrat obtenu est conservé dans des flacons en verre fermés hermétiquement et stockés à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation (Figure 19).



**Figure 19** : étapes de la macération éthanolique.

### I.3.2. Tests préliminaires réalisés :

Afin de réaliser l'**étude phytochimique** des deux extraits des espèces ordonnées on a procédé à des **protocoles *in vitro*** en utilisant des réactifs chimiques identifiants mentionnés comme suit :

#### ❖ Test des polyphénols

La caractérisation des poly phénols est basée sur une réaction au chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ).

2 ml d'extrait une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2% est ajoutée. L'apparition d'une coloration bleu noirâtre ou verte plus ou moins foncée fut le signe de la présence des polyphénols (**békroet al ,2007**).

#### ❖ Test des saponosides

2g de la poudre de notre plante a été macéré avec 80 ml d'eau distillée pendant quelques minutes, suivi d'une filtration et agitation. L'apparition d'une mousse persistante dans le milieu prouve la présence des saponosides (**Kalla, 2012**).

#### ❖ Test des flavonoïdes

Pour la détection des flavonoïdes On ajoute à 5 ml d'extrait à tester, quelques gouttes de HCl et quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose, rouge ou jaune



prouve la présence des flavonoïdes (**Trease et Evans, 1987**).

❖ **Test des coumarines**

La recherche des coumarines nécessite 10g de la poudre qui a été macéré dans 20ml d'éthanol pendant quelque minute. Après macération et filtration, on ajoute au 5ml de filtrat ,5ml de KOH (10%), et 5ml d'HCl (10%). La précipitation rouge brune révèle la présence des coumarines (**Trease et Evans, 1987**).

❖ **Test des glucosides**

Pour détecter ces molécules, un mélange constitué de 1ml de l'extrait brut avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de liqueur de Fehling a été chauffé à 70°C dans un bain marie, un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique (**Trease et Evans, 1987**).

❖ **Test des alcaloïdes**

Le test est réalisé par des réactions de précipitation avec le réactif de Wagner. 20 ml de l'extrait a été ajouté à 5 ml d'acide chlorhydrique HCl (10%), puis chauffer dans un bain Marie, où un volume de solution d'hydroxyde d'ammonium (10%) a été ajouté dans un milieu de pH = 9, une extraction avec de l'éther di éthylique est réalisée suivi d'une concentration avec un dispositif « évaporateur rotatif ».

Le résidu est repris dans 5 ml de HCl (2%), est traité par quelques gouttes de réactif de Wagner afin d'obtenir un précipité brun indiquant la présence des alcaloïdes (**Memelink et al, 2001**).

❖ **Test des tanins**

1 ml de l'extrait a été ajouté à 2 ml d'eau distillée et 2-3 gouttes de la solution de chlorure ferrique FeCl<sub>3</sub> 1 % permet de détecter la présence ou non de tanins. L'apparition d'une couleur verte ou bleu-vert indique la présence de tanins. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques (**Trease et al, 1987**).

❖ **Test des anthraquinones**

Ajouter 10ml de l'extrait à 5ml de NH<sub>4</sub>OH à 10% après agitation. L'apparition d'un anneau rouge indique la présence des anthraquinones (**Oloyede, 2005**).

❖ **Test des anthocyanes**

Ajouter 15 ml d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) à 5ml de l'extrait dans un tube (milieu

acide). Après agitation, ajouter au mélange 5ml NH<sub>4</sub>OH à 10% (milieu basique). Une coloration rouge en milieu acide et bleue violacée en milieu basique témoigne la présence des anthocyanes (Oloyede, 2005).

#### ❖ Test quinones libres

1g de matériel végétal finement broyé est placé dans un tube avec 15 à 30ml d'éther de pétrole, après agitation et un repos de 24h, l'extrait est filtré et concentré au rota vapeur. On ajoute quelques gouttes de NaOH 1/10, la couleur jaune vire, rouge ou violet prouve la présence des quinones libres.

#### ❖ Test des stéroïdes

Dans un bécher, on introduit 5 ml d'anhydride acétique à 5 ml de l'extrait, qui sont repris dans un tube à essai dans lequel sont ajoutés 0,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. L'apparition d'une coloration violette qui vire au bleu puis au vert indique une réaction positive (Harborne, 1998).

### **I.4. Extraction et dosage des polyphénols totaux :**

#### **I.4.1 Extraction des polyphénols totaux**

Extraction des polyphénols totaux Nous avons procédé à l'extraction des polyphénols totaux en utilisant la méthode de macération par solvant décrite par Chan et al. (2009) avec de légères modifications.

##### **I.4.1.1. Préparation de l'extrait méthanolique**

10g du matériel végétal broyé est macéré dans une solution méthanol/eau (70 : 30, v/v) sous agitation mécanique pendant 2 à 3 jours à une température ambiante. Après macération et filtration le filtrat obtenu est soumis à une évaporation par rota-vapeur jusqu'à l'obtention d'un extrait brut qui est conservé dans des boîtes de pétrie en verre fermées hermétiquement et stockées à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation.

##### **I.4.1.2 Préparations de l'extrait aqueux :**

10g du matériel végétal broyé est macéré dans 100ml d'eau distillée sous agitation mécanique pendant 5h à une température ambiante. Après macération et filtration le filtrat obtenu est évaporé dans une étuve à une température 40°C pour éliminer l'eau. L'extrait brut est conservé dans des boîtes de pétrie en verre fermés hermétiquement et stocké à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation (Figure20).

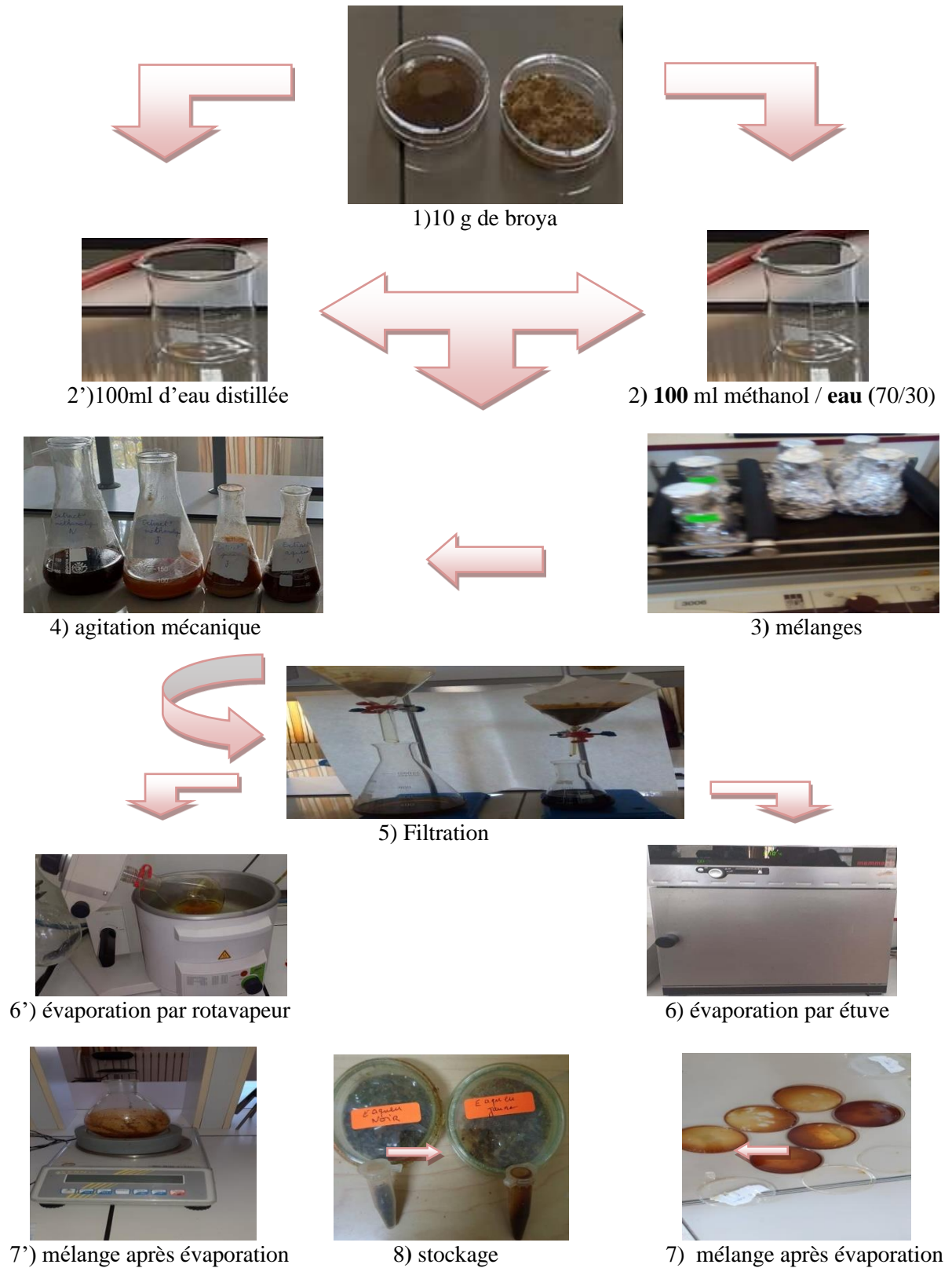


Figure 20 : Etapes de la macération méthanolique et aqueuse

### I.4.1.3 Rendement de l'extrait brut

Le rendement de l'extrait brut est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenue et la masse du matériel végétal traité (**Harborne, 1998**). Ce rendement est calculé via l'équation :

$$R\% = (Me / Mv) \times 100$$

**R (%)** : Rendement en %.

**Me** : Masse de l'extrait après évaporation du solvant (g).

**Mv** : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction(g)

### I.4.2. Dosage des polyphénols totaux par colorimétrie (méthode de Folin Ciocalteu)

Le dosage des polyphénols totaux a été déterminé par spectrophotométrie, selon la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait.

#### ❖ Principe

Les composés phénoliques réagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteu, ce dernier est composé d'un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) qui se réduit, lors de l'oxydation des polyphénols, en oxyde bleu de tungstène (W<sub>8</sub>O<sub>23</sub>) et de molybdène (Mo<sub>8</sub>O<sub>23</sub>) qui absorbe fortement à une longueur d'onde de 760 nm (**Ribéreau, 1968**). La coloration produite, dont l'absorption maximum 760 nm est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Boizot et Charpentier, 2006**). Le phénol standard utilisé dans cette méthode est l'acide gallique.

#### Protocole de dosage :

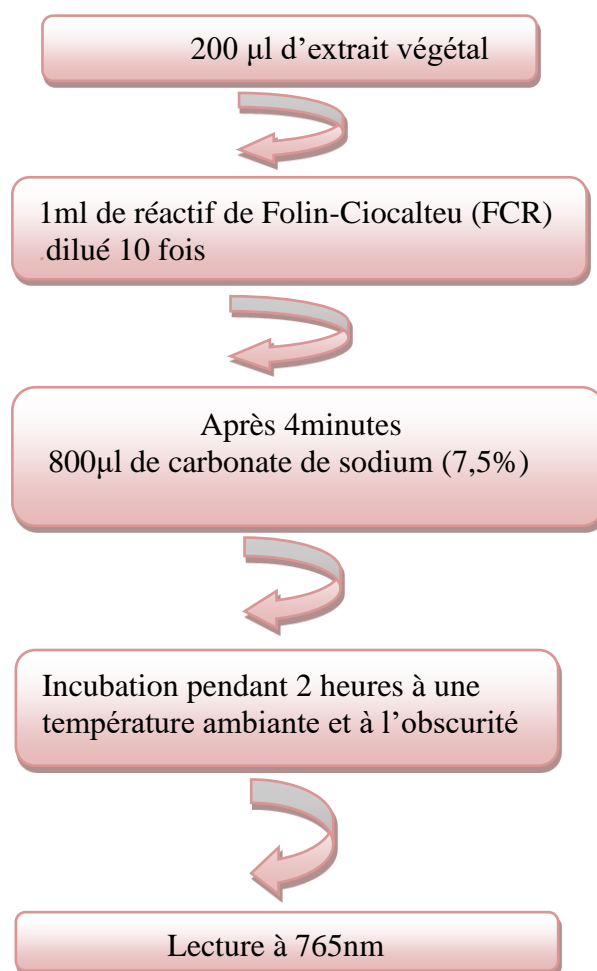
Le test de dosage des polyphénols totaux a été réalisé au sein des laboratoires pédagogiques de l'université de Abdelhafid BOUSSOUF, Mila.

Une quantité de 200 µl de l'extrait à différentes concentrations est mélangé à 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois) (1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu et 9 ml d'eau distillée). Après une incubation de 4minutes, on ajoute 800 µl de carbonates de sodium (NaCO<sub>3</sub>) (7,5%), le mélange est encore incubé pendant 2h à une température ambiante à l'abri

de la lumière. la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre (UV) à 760 nm (figure 21) (Figure 22).



**Figure 21** : matériel préparé pour le dosage des polyphénols totaux (cliché personnel)



**Figure 22** : Protocole de dosage des polyphénols totaux. (Li et al.2007)

La courbe d'étalonnage linéaire ( $y = ax$ ) est effectuée par l'acide gallique ; A partir d'une solution mère aqueuse préparée de l'acide gallique de concentration massique 0.75g/1, des solutions filles sont ainsi préparées à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par 1g du poids sec de la plante en poudre.

Le traitement et l'interprétation de la teneur des polyphénols ont été traités par le tableur EXCEL2019.

## **I.5. Activité anti coagulante**

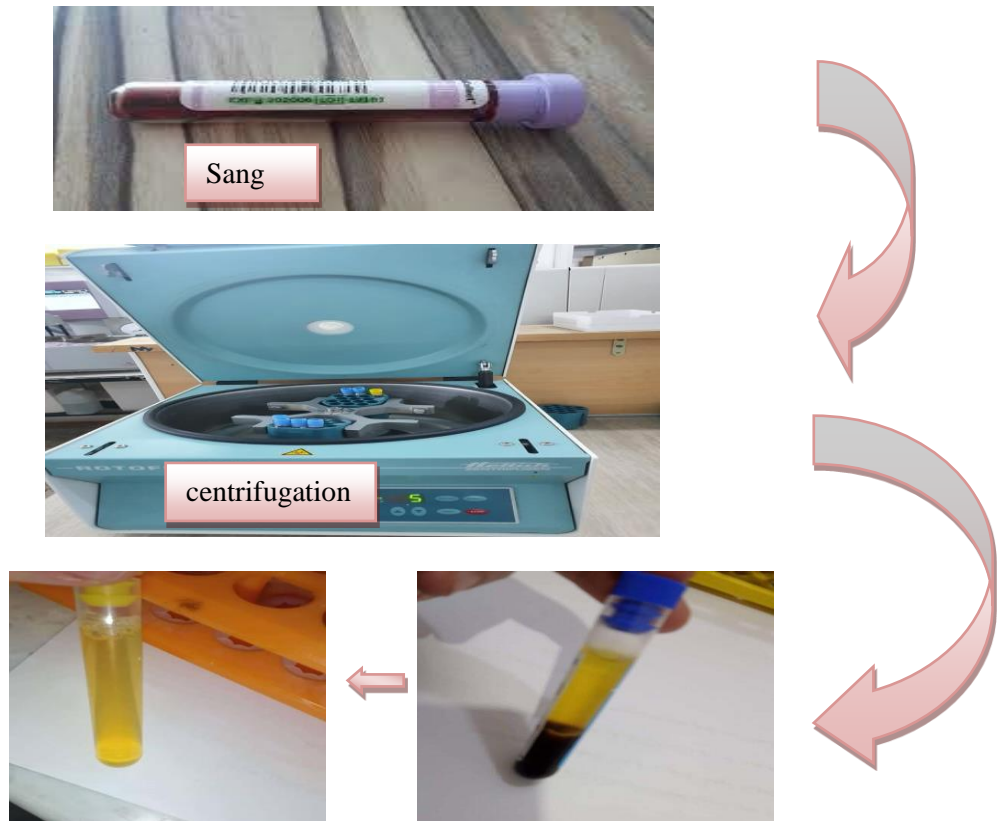
L'activité anticoagulante des extraits de la plante étudiée et de leurs principaux constituants a été réalisée au sein du laboratoire d'analyses médicales : Dr. Mirouh.H à Ferdjioua.

Cette activité a été évaluée *in vitro* vis-à-vis des deux voies de la coagulation (la voie endogène et la voie exogène) sur un pool des plasmas normaux déplaquettés et à l'aide des deux tests chronométrique globaux, le test de temps de céphalin-kaolin (TCK) et le test de temps de Quick (TQ).

### **I.5.1. Préparation du pool plasmatique**

Le pool plasmatique déplaquetté est un mélange de plasma déplaquetté de 10 volontaires seins adultes non traités, dont les TQ et TCK sont normaux.

Le sang de chaque volontaire est prélevé par ponction veineuse dans un tube en plastique sur une solution anticoagulante de citrate de sodium à 3,2% et à raison de 1 volume pour 9 volumes du sang. Le sang est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 3000 rpm pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes. Le mélange de ces plasmas (plasma standard) est conservé à basse température (-10C°) jusqu'à son utilisation (figure23).



**Figure 23 :** Etapes de préparation d'un pool de plasma (cliché personnel).

### I.5.2. Activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène

#### Principe

L'évaluation de l'activité anticoagulante des extraits vis-à-vis la voie endogène de la coagulation a été réalisée en utilisant le temps de céphaline-kaolin ou le temps de thromboplastine partielle activé, un test qui permet d'explorer l'activité des facteurs II, V, VIII, IX, X, XI et XII de la voie endogène et la voie commune de la coagulation (**Rizzo et al, 2008**).

Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37 C° d'un plasma pauvre en plaquettes (PPP) et citrate mis en présence de phospholipides (la céphaline) substitut du facteur 3 plaquettaire (F3P) d'un activateur du système contact (Prékalikriène, Kininogène de haut poids moléculaire et le facteur XII) qui est généralement le Kaolin et de calcium comme un facteur déclenchant (**Caquet, 2004**).



**Mode opératoire**

L'activité des extraits et de certains de leurs composés est établie sur 100  $\mu$ l de ce plasma qui est mélangé avec différents volumes de ces solutions (10, 20, 30  $\mu$ l) préparées à une concentration donnée. Après 15 min. d'incubation à 37°C, 100  $\mu$ l de céphaline-kaolin est additionné au mélange qui est ré-incubé durant exactement 3 min sous agitation à 37°C.

Le temps de coagulation est alors déterminé à l'aide d'un coagulomètre par ajout de 100  $\mu$ l de chlorure de calcium (0,025M) préchauffé (Wang *et al*, 2010). (Figure25)



**Figure 24** : matériel préparé pour l'évaluation de TCK(cliché personnel).



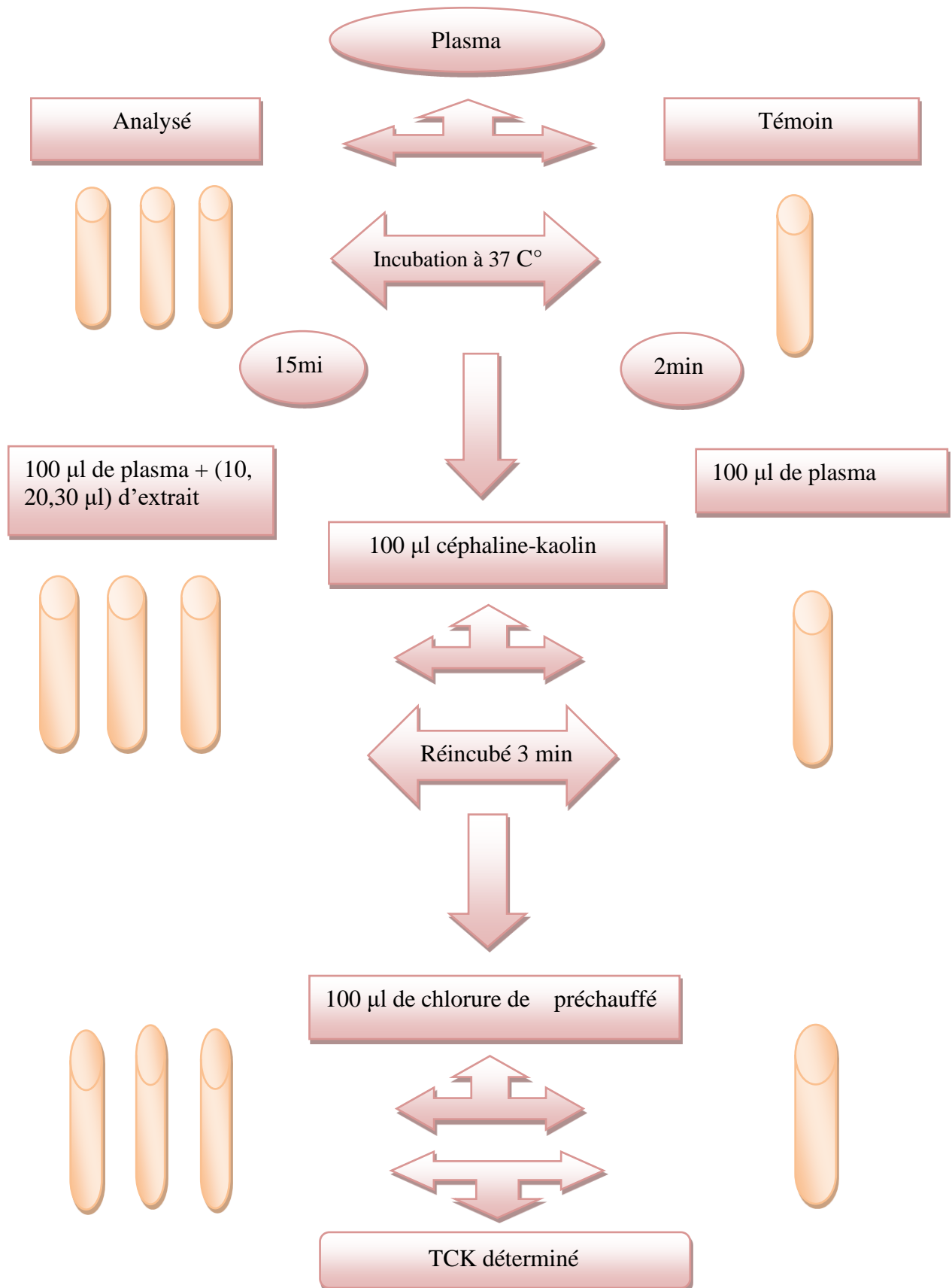


Figure 25 : Etapes de la voie endogène (Wang *et al*, 2010).

### I.5.3. Activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène (TQ)

#### Principe

L'activité anticoagulante des échantillons et de leurs constituants vis-à-vis la voie exogène de la coagulation a été déterminée en utilisant un test de coagulation appelé le temps de Quick ou le taux de prothrombine (TP) est le test qui explore les facteurs II, V, VII et X de la voie extrinsèque et la voie commune de la coagulation (**Rizzoet al, 2008**).

La technique originale a été décrite par Quick en 1935. Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37°C d'un plasma pauvre en plaquettes en présence d'un mélange de facteurs tissulaires et des phospholipides (la thromboplastine) et de calcium. Les facteurs de la voie exogène donc sont activés et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot est mesuré (**Athukorala et al, 2007**).

#### Mode opératoire

L'effet des extraits sur la voie exogène de la coagulation a été évalué selon le protocole décrit par Wang et ses collaborateurs (2010), Les facteurs de la voie exogène sont donc activés et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot est mesuré.

100 µl de plasma pauvre en plaquettes préchauffé durant 2 min à 37°C est mélangé avec différents volumes des extraits et de certains de leurs composés (10, 20, 30 µl), préparées à une concentration donnée. Après 15 min. d'incubation à 37°C, 200 µl de thromboplastine calcique (préchauffée au moins 15 minutes à 37°C) est additionné au mélange et le temps de la coagulation est alors enregistré à l'aide d'un coagulomètre (**Wang et al, 2010**) (Figure 27).



**Figure 26 :** Matériel préparé pour l'évaluation de TQ(cliché personnel).

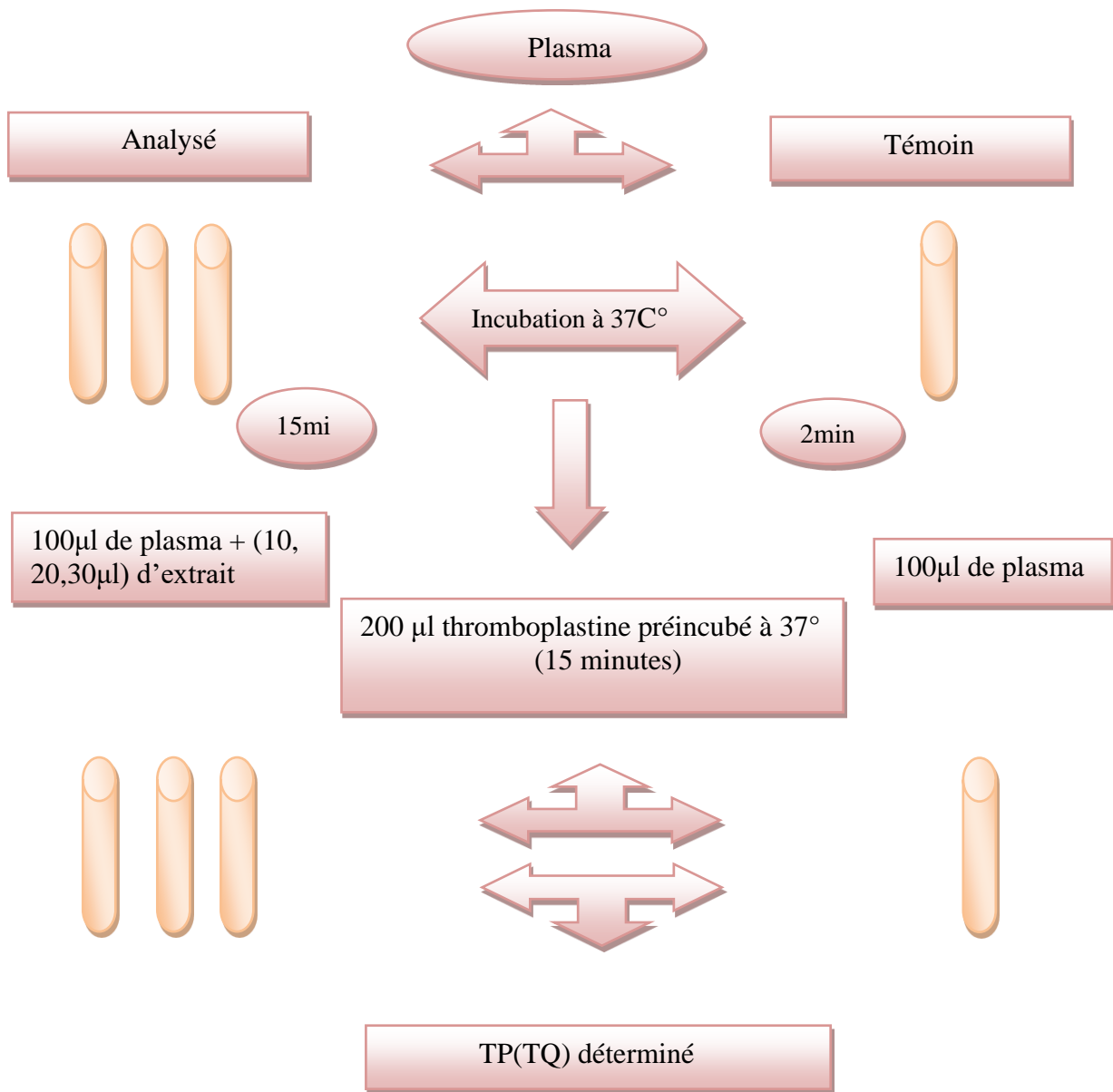


Figure 27 : Etapes de la voie endogène (Wang *et al*, 2010)..

## I.6. Activité antibactérienne

Dans notre travail, l'étude de l'activité antibactérienne de l'extrait des deux espèces *in vitro* vis à vis des différentes souches bactériennes *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, a été réalisée par la méthode de l'aromatogramme.

### I.6.1. Matériel du test de l'activité antibactérienne :

#### I.6.1.1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes sur lesquelles nous avons testé l'activité de l'extrait (Tableau 2), sont des lots de l'ATCC (American Type Culture Collection), ont été choisies pour leur haute pathogénicité et leur multi résistance. Ce sont des espèces Gram négatif /ou Gram positif, pathogènes et responsables d'infections graves chez l'homme et dont la plupart sont résistantes aux antibiotiques. Elles sont activées à 37 °C pendant 24 heures par repiquage sur milieu gélosé Muller-Hinton (MH). Ces souches bactériennes appartiennent à la collection du laboratoire de microbiologie de l'hôpital CHU de Constantine.

**Tableau 2 :** souches bactériennes :

Genre et espèce	N° ATCC	Gram	Famille
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	+	Staphylococcacées
<i>Bacillus cereus</i>	11778	+	Bacillus
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	-	Pseudomonadacées
<i>Escherichia coli</i>	25922	-	Enterobacteriacées

#### I.6.1.2. Milieux de culture

Les milieux de culture servent de support pour la croissance de micro-organismes Muller-Hinton (MH) : 38g de poudre a 1000 ml d'eau distillé.

#### I.6.1.3. Préparation des extraits

100mg d'extrait à 1ml solution méthanol/eau (7 : 3, v/v).

**Méthode de diffusion par disque (l'aromatogramme)**

Cette méthode permet d'évaluer l'activité antibactérienne d'extrait. Elle consiste à déposer un disque stérilisé, imbibé d'extrait étudié, sur un tapis bactérien au début de sa croissance et de mesurer la zone où les bactéries n'ont pas pu se développer. Le diamètre d'inhibition, qui traduit l'activité antibactérienne de l'extrait, est ainsi déterminé (**Hayes et Markovic, 2002**).

**I.6.1.4. Préparation de l'inoculum**

L'inoculum a été préparé à partir de culture des souches bactériennes dans le bouillon nutritif après incubation pendant 24 heures à 37°C dans l'étuve, quelques millilitres de cette culture sont ajoutés dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile, et agité au vortex pendant quelques secondes. L'opacité de la suspension doit être équivalente à 0.5 Mc Ferland, pour cela la concentration bactérienne des différentes solutions ou inoculum est évaluée par turbidité est exprimée par la mesure des densités optiques de 0.08 à 0.10. à une longueur d'onde de 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit le milieu de culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérilisée s'il est trop fort. Il est à signaler d'une part, que la suspension ajustée devra contenir 10<sup>8</sup> UFC /ml (units forming colony /ml) et d'autre part, que l'inoculum ainsi préparé ne doit pas être utilisé au-delà de 15 minutes, faute de quoi, la concentration et donc l'opacité risque d'augmenter à cause de la croissance bactérienne.

**I.6.1.5. Ensemencement**

Cet inoculum sert à ensemer des géloses de Mueller Hinton coulées dans des boîtes Pétri. L'ensemencement est effectué par écouvillonnage, à partir de l'inoculum fraîchement préparé. Il consiste à tremper un écouvillon de coton stérilisé dans la suspension puis le frotter, après l'avoir essoré à l'intérieur du tube, à trois reprises sur la totalité de la surface gélosée de façon à former des stries serrées, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application pour obtenir une distribution égale de l'inoculum. Pour chaque souche testée, 10 boîtes de pétri, sont écouvillonnées par le même écouvillon à la condition d'être recharger pour chacune d'elles.

**I.6.1.6. Préparation des disques d'aromatogramme**

Les disques sont fabriqués à partir de papier Wattman n°3 avec un diamètre de 6 mm. Ensuite ils sont mis dans un tube à essai (ou plus si nécessaire), et stérilisés à l'autoclave. Les disques sont déposés délicatement sur la surface de la gélose MH inoculée à l'aide

d'une pince stérilisée au bec bunsen. Puis à l'aide de micropipette, un disque est imprégné par les extrait bruts des deux espèces de *Terminalia*, un autre disque est imprégné par les extrait diluée dans du DMSO (dimethylsulfoxyde) à 1/2, (v/v), et un dernier disque témoin imprégné par DMSO (témoins positifs appropriés prêts à l'emploi ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés). Le test est répété deux fois pour avoir des résultats fiables. Finalement, les boites de pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C dans l'étuve.

#### I.6.1.7. Lecture

La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone d'inhibition (à l'aide d'une règle à l'extérieure de la boite) qui est représentée par une auréole formée autour de disque où aucune croissance n'est observée (Najjaa et al., 2007) (Tableau 03).

**Tableau 3** : Evaluation de l'effet antibactérien selon le diamètre d'inhibition.

Observation	Signe	Diameter d'inhibition
Non sensible	(-)	>8 mm
Sensible	(+)	8 à 14mm
Très sensible	(++)	15 à 20mm
Extrêmement sensible	(+++)	<20mm

# **Chapitre II :**

## **Résultats et discussion**

## II.1. Résultats

### II.1.1. Screening phytochimique

Les tests de caractérisation phytochimique, réalisés sur les différents extraits contenant des substances naturelles, ont donné les résultats présentés dans le tableau et les figures ci-dessous.

**Tableau 4** : résultats de screening phytochimique

<b>Test</b> <b>Résultats</b>	<i>Terminalia bellirica</i>	<i>Terminalia chebula</i>
<b>Polyphénols</b>	++	++
<b>Saponosides</b>	-	-
<b>Flavonoïdes</b>	++	++
<b>Coumarines</b>	+	+
<b>Glycosides</b>	+++	+++
<b>Alcaloïdes</b>	+	+
<b>Tanins</b>	+	+
<b>Anthra-quinones</b>	++	++
<b>Anthocyanes</b>	-	-
<b>Quinones libres</b>	+	+
<b>Stéroïdes</b>	-	-

(+++) Test fortement positive, (++) test positive moyenne, (+) test positive, (-) test négatif



Selon les résultats du screening phytochimique effectué dans les extraits de (TB, TN) :

On remarque que TB et TN présente une teneur relativement élevée en polyphénols est confirmée par l'apparition d'une couleur bleu noirâtre (figure 28).



Figure 28 : Test des polyphénols (cliché personnel)

TB et TN ne contiennent pas des saponosides ; ces résultats sont confirmés par l'absence d'une mousse après agitation des tubes à essai(figure29).

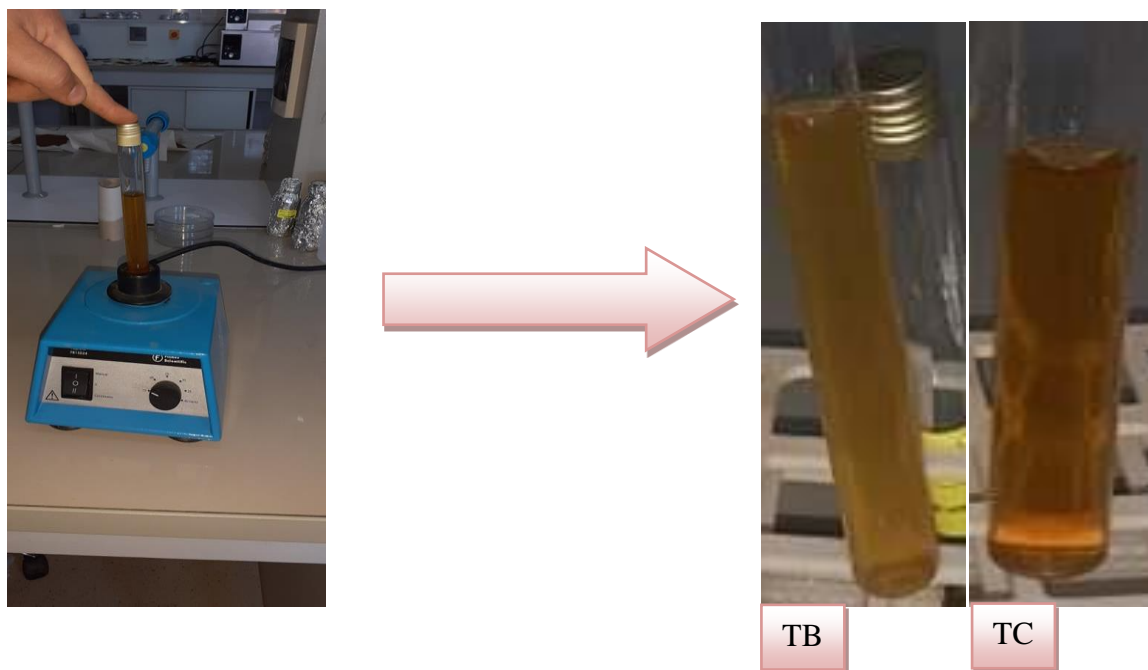


Figure 29 : Test des saponosides (cliché personnel)

Pour le test des flavonoïdes l'apparition de la couleur jaune dans les extraits de TB et TN confirme leur richesse en flavonoïdes (figure 30)



**Figure 30 : Test des flavonoïdes (cliché personnel).**

La présence des coumarines dans les extraits de TB et TN est confirmée par l'apparition d'une précipitation rouge brune(figure31).



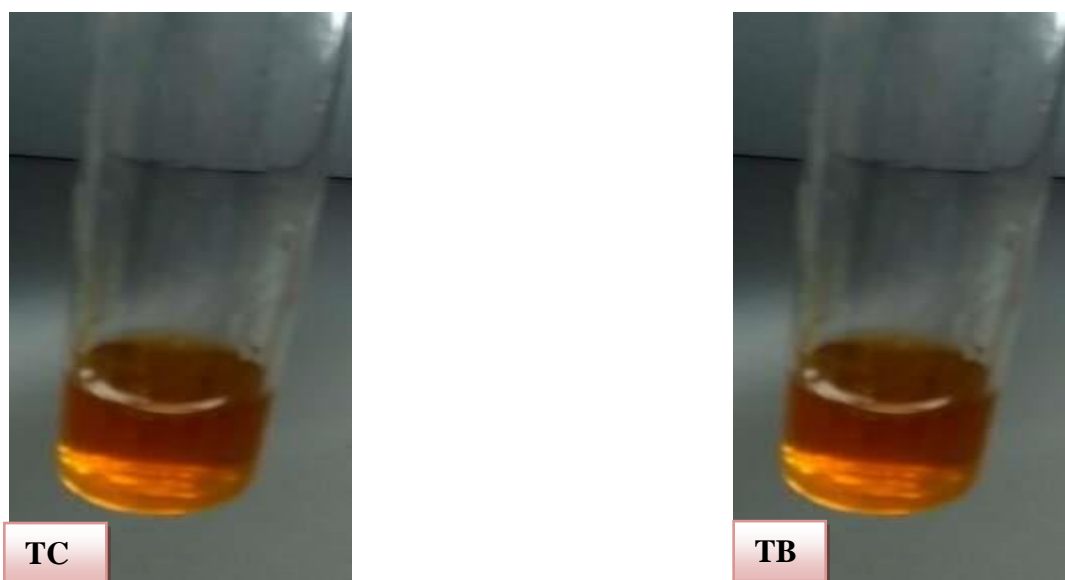
**Figure 31 : Test des coumarines (cliché personnel).**

Les glycosides sont présents avec une intensité importante dans les extraits de TB et TN, cela est confirmée par l'apparition d'une précipitation rouge brique sous forme de granulés(figure32).



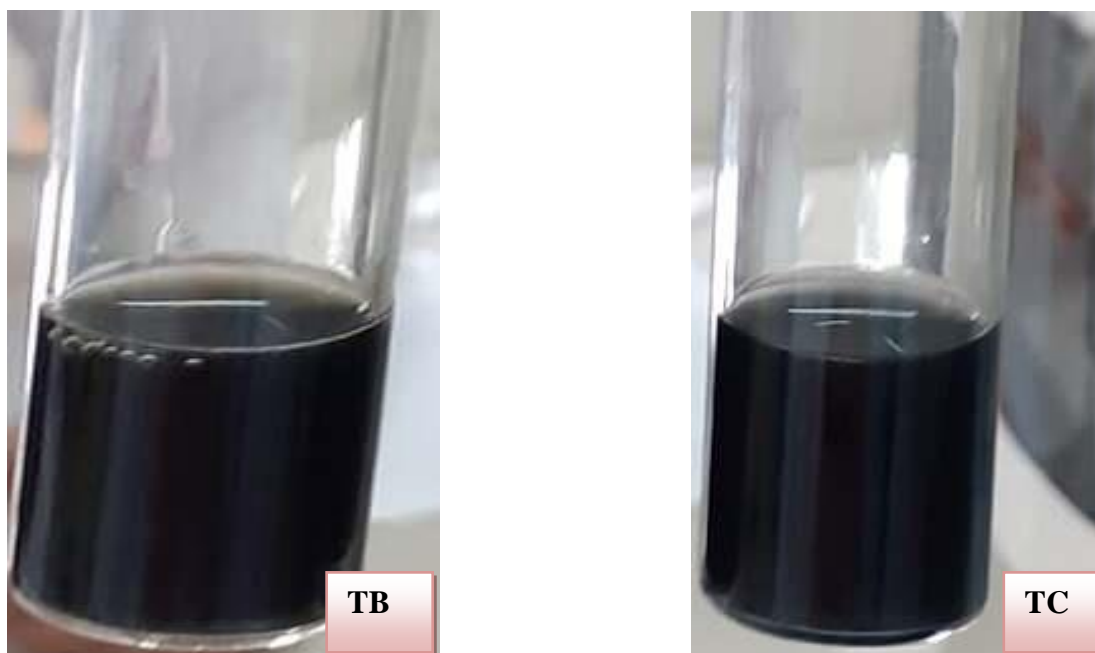
**Figure 32 : Test glycosides (cliché personnel).**

La présence d'un précipité blanc après avoir traité les deux extraits avec le réactif de Wagner confirme que nos espèces contiennent des alcaloïdes(figure33).



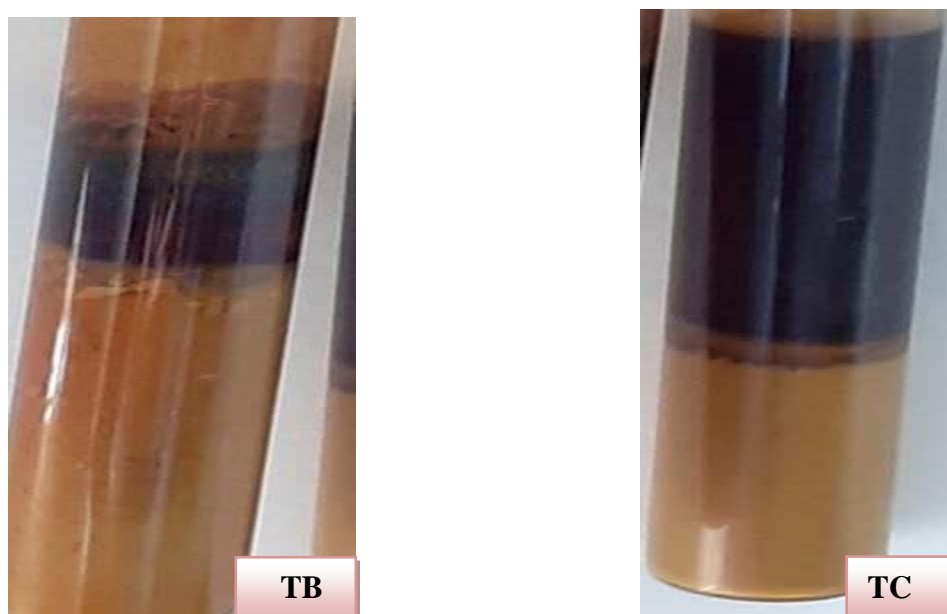
**Figure 33 : Test alcaloïdes (cliché personnel).**

Après le traitement des extraits par FeCL<sub>3</sub>, l'apparition d'une intensité de couleur bleu vert dans l'extrait TC et de couleur bleu noir dans l'extrait TB prouve la présence des tanins(figure34).



**Figure 34 : Test des tanins (cliché personnel).**

Les Anthra-quinones sont présents avec une teneur relativement élevée dans les deux extraits, l'apparition d'un anneau rouge confirme leur présence (figure35).



**Figure 35 : Test des anthra-quinones (cliché personnel).**

L'absence d'une couleur bleu violacé dans les deux extraits démontre que nos espèces ne contiennent pas des anthocyanes(figure36).



**Figure 36 : Test des anthocyanes (cliché personnel).**

Pour le test des quinones libres l'apparition de la couleur jaune dans les extraits de TB et TC confirme leur richesse en quinones libre(figure37).



**Figure 37 : Test des quinones libre (cliché personnel).**

Les stéroïdes secs sont absents dans les extraits secs les résultats sont confirmés par L'absence d'une coloration violette qui vire au bleu puis au vert. (Figure38)

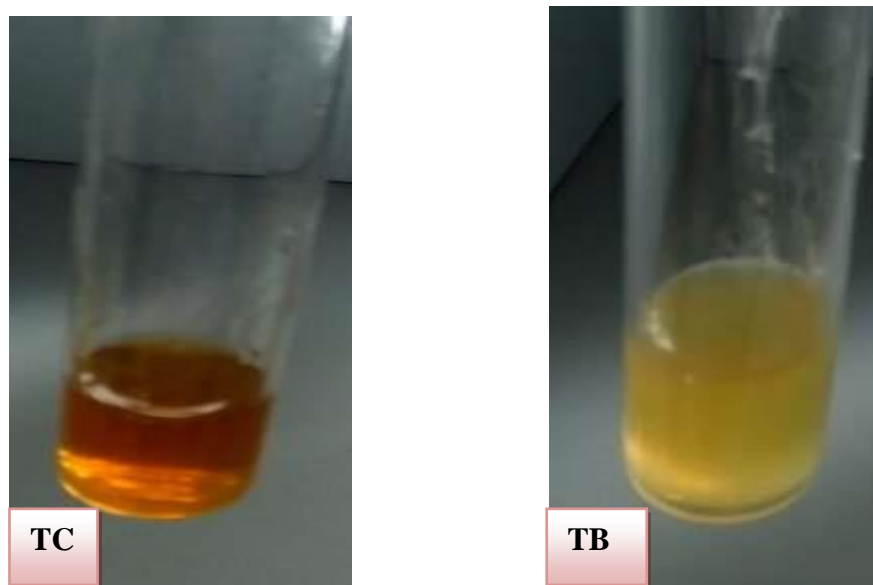


Figure 38 : Test des stéroïdes (cliché personnel).

## II.2. Interprétation des Résultats

L'analyse colorimétrique a révélé une forte teneur en composés phénoliques (tel que les poly phénols et les flavonoïdes) ; en composés aromatiques (tel que les anthra-quinone et les quinones libres) et les alcaloïdes ; une teneur plus importante en glycosides ; par conséquent, les teneurs en coumarine et en tanin sont faibles dans les fruits de ces deux espèces avec une petite différence dans la teneur des flavonoïdes qui est un peu moins chez *Terminalia bellirica* que *Terminalia chebula*.

Quant aux saponosides, les anthocyanes, et les stéroïdes on a marqué une absence totale.

Ces résultats sont similaires avec les résultats de (Poonkothai et al, 2014) chez *Terminalia bellirica* et (R.rathinamoorthy et al, 2014) chez *Terminalia chebula*.

### II.2.1. Rendement en extrait brut

On a mesuré par la méthode de macération des extraits bruts des fruits de *Terminalia bellirica* L et *Terminalia chebula* L, qui ont été préparé dans des solvants très polaires le premier méthanolique (Méthanol 70 – Eau30) et le deuxième aqueux (eau distillée). Le rendement de ces extraits a été déterminé par rapport au matériel végétal. Les résultats obtenus sont représentés dans la (figure39)

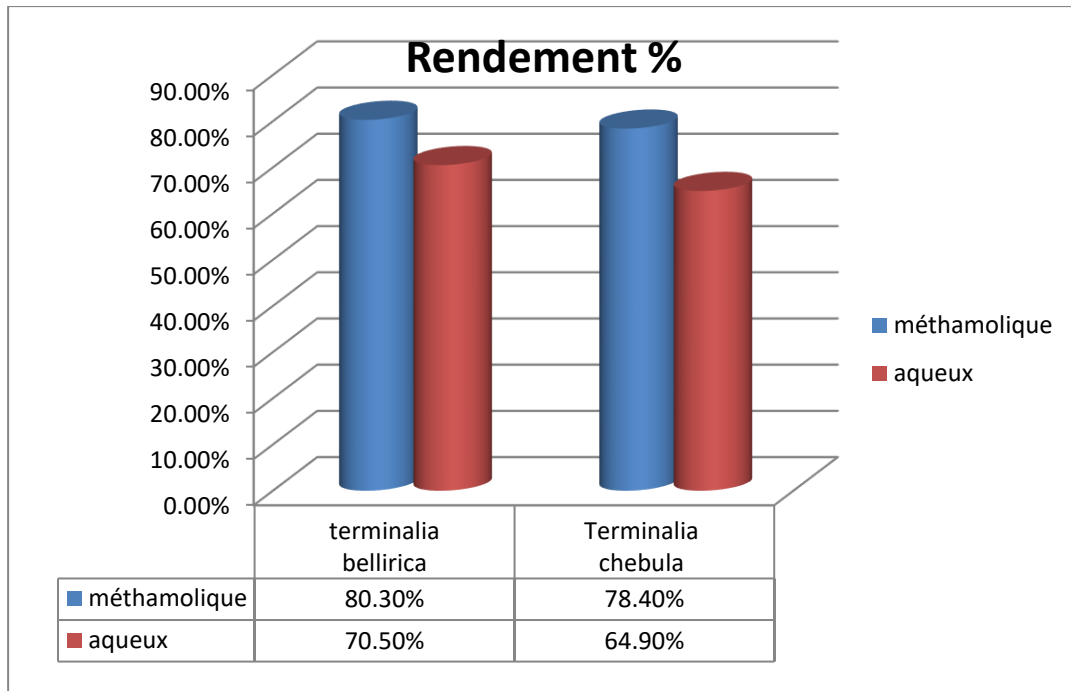


Figure 39 : Rendement % en extraits bruts

### Interprétation des Résultats

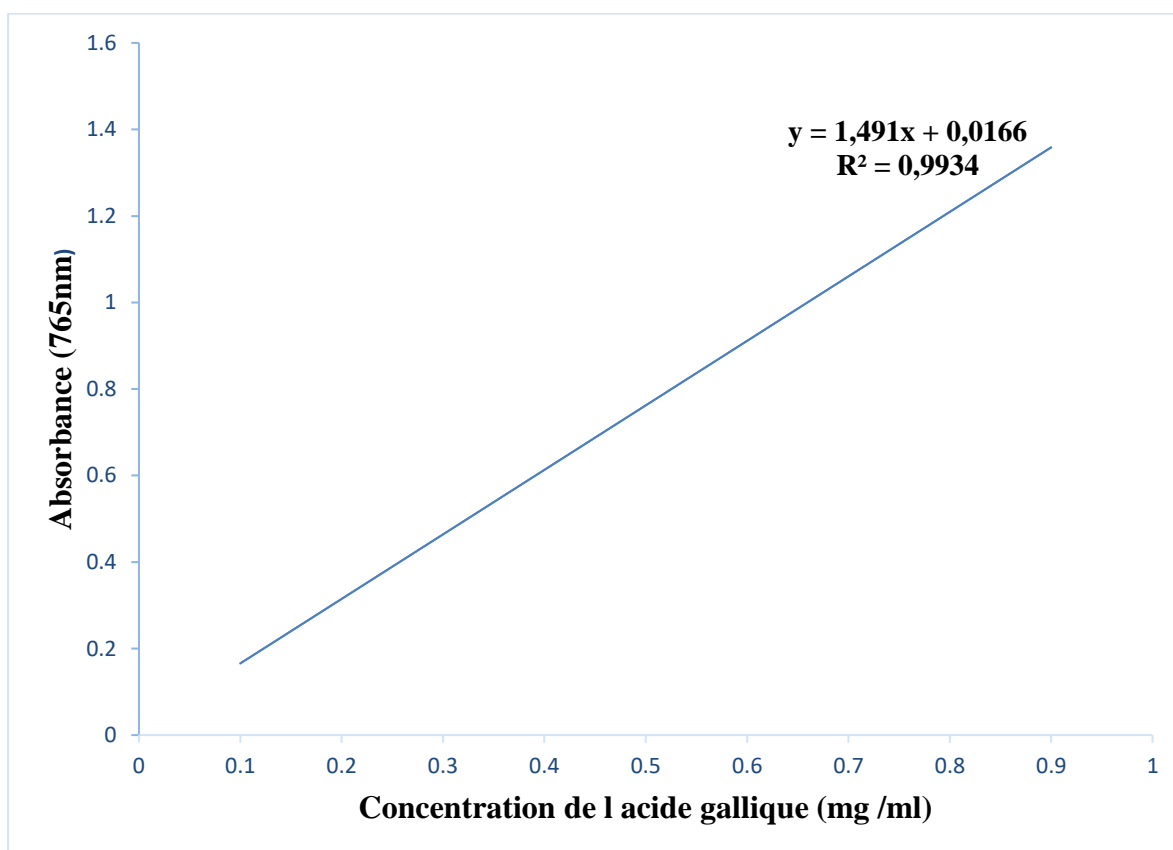
Au vu des résultats rapportés dans la (figure39), on a marqué un écart entre le rendement des extraits méthanolique de TB et TC. Ces Rendements sont estimés de 80.3% et 78.4% respectivement. Alors que le Rendement des extraits aqueux de TB et TC s'est révélé relativement moins faibles que ceux des extraits méthanolique, ils sont estimés de 78.4% et 64.9% respectivement.

Ce pourcentage se diffère d'une plante à l'autre, ainsi que plusieurs études ont montré que des facteurs de sol, y compris les substances nutritives et le niveau de l'acidité, la diversité du genre peuvent affectés le rendement (Nahak et sahu, 2011).

### II.2.2. Dosage des polyphénols totaux

La détermination de la teneur en phénols totaux dans les deux extraits méthanolique et aqueux des deux espèces étudiées est estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg GAE/g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique.

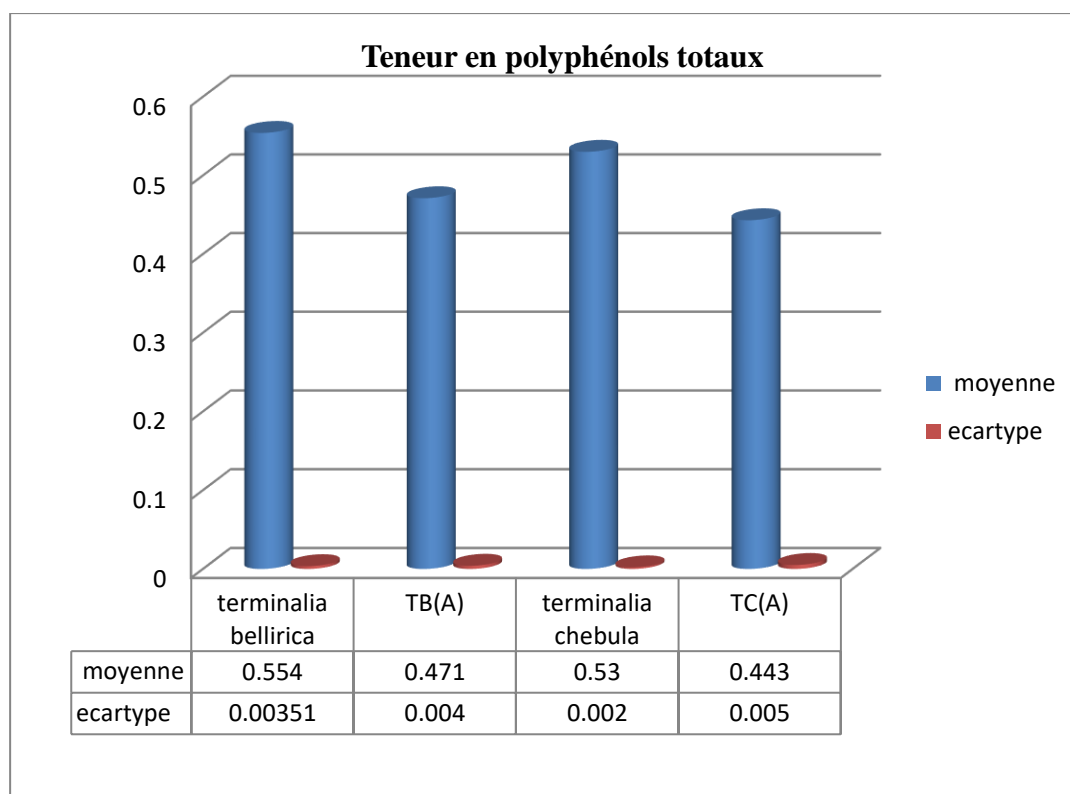
La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est représentée dans la figure40.



**Figure 40 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Les polyphénols sont les composés essentiels de toutes les plantes en raison de leurs fonctions importantes et de leurs multiples propriétés. La teneur en polyphénols totaux. (Figure 41).





**Figure 41** : Teneur en polyphénols totaux de TB et TC.

### Interprétation des résultats

Les résultats de la teneur en polyphénols totaux présentés dans la (Figure 41) précédente nous permettent d'obtenir une valeur moyenne de 0.554 et de 0.471 dans la dilution 1 /4 de l'extrait méthanolique et aqueux respectivement chez l'espèce *Terminalia bellirica*, ce qui exprime une teneur en polyphénols totaux égale à (  $2.26 \pm 0.00351$  mg EAQ/g) et (  $1.88 \pm 0.004$  mg EAQ/g) ,

Pour *Terminalia chebula* nous avons obtenus une valeur moyenne de 0.53 et de 0.443 dans la dilution 1 /4 de l'extrait méthanolique et aqueux successivement, ce qui exprime une teneur en polyphénols totaux égale à (  $2.12 \pm 0.002$  mg EAQ/g), (  $1.77 \pm 0.005$  mg EAQ/g).

### Discussion des résultats

Les résultats de dosage obtenus chez les deux espèces de *Terminalia* sont si proches prouvent que leurs fruits sont très riches en polyphénol, pour *Terminalia bellirica* L le dosage était (  $2.22$  mg EAQ/g) dans l'extrait méthanolique et d'une quantité un peu moins dans l'extrait aqueux (  $1.882.22$  mg EAQ/g) qui est proche à ceux de (Poonkothai et al, 2014).

Le dosage de *Terminalia chebula* est estimé de (2.12 mg EAQ/g) dans l'extrait méthanolique et d'une quantité un peu moins dans l'extrait aqueux (1.77 mg EAQ/g) qui est proche à ceux de (Phadke et Kulkarni, 1989).

La teneur en polyphénols totaux n'est pas stable et diffère d'une espèce à l'autre, cette différence entre les résultats est due à plusieurs raisons tel que l'influence de plusieurs paramètres comme le temps et la méthode d'extraction, les dimensions des particules des échantillons, la susceptibilité des polyphénols à l'oxydation, cette dernière qui doit être prise en considération (Telli *et al*, 2010). Les facteurs climatiques et environnementaux (Ebrahimi *et al*, 2008) et la période de la récolte et de la conservation pourront également influencer la teneur en polyphénols (Miliauskas *et al*, 2004).

Ainsi, la méthode d'extraction et de quantification et aussi la sélectivité du réactif ou solvant (réactif de Folin-Ciocalteu à une grande influence sur la teneur en polyphénols) utilisés peuvent également influencer la teneur en polyphénols totaux (Lee *et a*, 2003).

À la lumière de ces résultats, on conclut que les polyphénols sont les composés phytochimiques les plus importants dans ces deux espèces étudiées, leur présence est d'une quantité élevée, et qu'ils sont probablement les responsables des différentes fonctions physiologiques.

### II.2.3. Activité anticoagulante

Le pouvoir anticoagulant des extraits méthanolique et aqueux de *Terminalia bellirica* L et *Terminalia chebula* L a été évalué *in vitro* vis-à-vis de la voie endogène et la voie exogène de la coagulation à l'aide de deux tests chronométriques, le TCK et le TQ respectivement. Les résultats obtenus montrent que les deux extraits des deux espèces étudiées ont un effet incoagulable avec les deux voies de la coagulation, qui est similaire à celui du témoin positif enoxaparin sodium (0.8ml) (Lovenox), c-à-d qu'après cinq minutes, y'a eu de coagulation, donc ces extraits (méthanolique et aqueux) montrent un effet anticoagulant très important (incoagulable). Ce qui convient avec les résultats obtenus par (Aalikhani *et al*, 2016).

### II.2.4. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits des deux espèces de *terminalia (bellirica et chebula)* a été estimée en termes de diamètre de zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de quatre souches bactériennes étudiées (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). La détermination de la zone d'inhibition permet une estimation du caractère de sensibilité ou de

résistance de la souche bactérienne aux extraits aqueux et méthanolique.

#### II.2.4.1. Résultats de l'activité antibactérienne des antibiotiques et de DMSO

Les diamètres des zones d'inhibition des souches utilisées sous l'action des deux antibiotiques testés et de DMSO. (Tableaux 05)

##### a- Résultats de l'activité antibactérienne des antibiotiques

**Tableau 5 :** Diamètres des zones d'inhibitions des deux antibiotiques (témoin positif)

<b>Antibiotique</b> <b>Bactérie</b>	<b>Gentamicine (CN10)</b>	<b>Cotrimoxazol (Sxt25)</b>
<i>Escherichia coli</i>	16 mm	23 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30 mm	13 mm
<i>Bacillus cereus</i>	23 mm	30 mm

(-) : Absence de zone d'inhibition

Les résultats obtenus (tableau 05) développent qu'il y a des variabilités dans la réponse des souches étudiées (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* *Bacillus cereus*).

*Bacillus cereus* est une bactérie à Gram (+), elle est très sensible à l'antibiotique SXT25 (diamètre de zone d'inhibition de 30 mm), alors qu'elle a montré une sensibilité vis-à-vis la Gentamicine (diamètre de zone d'inhibition de 23 mm).

La bactérie *E. coli* (Gram -) est sensible à CN10 avec un diamètre de zone d'inhibition de 16 mm, alors qu'elle est sensible à SXT25 avec un diamètre de 23 mm.

*Staphylococcus aureus* est une bactérie à Gram (+), elle est sensible aux deux antibiotiques : CN10 (avec un diamètre de zone d'inhibition de 15 mm) et SXT25 (diamètre de zone d'inhibition de 20 mm).

*Pseudomonas aeruginosa* (Gram -) est extrêmement sensible vis-à-vis la CN10 avec un diamètre de zone d'inhibition de 30 mm, alors qu'elle a montré une sensibilité à l'antibiotique SXT25 d'un diamètre de zone d'inhibition de 13 mm.

La sensibilité de la souche *Bacillus cereus* a montré un meilleur résultat par rapport aux autres bactéries étudiées avec un diamètre de zone d'inhibition de 30mm pour SXT25, et

23mm pour CN10. Suivi par *Pseudomonas* (30mm) pour CN10, et 13 mm pour SXT25, ensuite on a *Staphylococcus aureus* (20mm) pour SXT25, et (15mm) pour CN10, enfin *E. coli* avec un diamètre de zone d'inhibition de 23mm pour SXT25, et 16 mm pour CN10.

**b- Résultats de l'activité antibactérienne des Témoins négatifs DMSO**

D'après les résultats obtenus il ressort que le DMSO n'a donné aucun effet inhibiteur à l'encontre des trois souches testées (tableau 06).

**Tableau 6 :** Résultats de l'activité antibactérienne des Témoins négatifs.

<b>Bactérie</b> <b>Témoine</b> <b>Négatif</b>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus Aureus</i>
<b>DMSO</b>	-	-	-	-

(-): Absence de zone d'inhibition

**II.2.4.2. Résultats de l'activité antibactérienne des extraits bruts**

Les diamètres des zones d'inhibition des souches utilisées sous l'action des extraits de TB et TC sont représentés dans les tableaux suivants :

**c- Résultats de l'activité antibactérienne des extraits bruts de TB**

Les diamètres des zones d'inhibition des souches utilisées sous l'action des extraits de TB et TC sont représentés dans le tableau 07.

**Tableau 7 :** Diamètres des zones d'inhibition en (mm) des extraits bruts de TB

<b>Bactéries</b> <b>Diamètres</b> <b>(mm)</b>	<i>Staphylococcus Aureus</i>	<i>Escherichia. coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>seudomanas aeruginosa</i>
TB (aqueux)	10.23±1.61	14.01±3.64	14.23±2.15	15.24±0.94
TB (méthanol)	16.26±3.46	16.87±0.89	15.37±3.14	15.48±0.70

**TB (aqueux)**= l'extrait aqueux de *Terminalia bellirica*

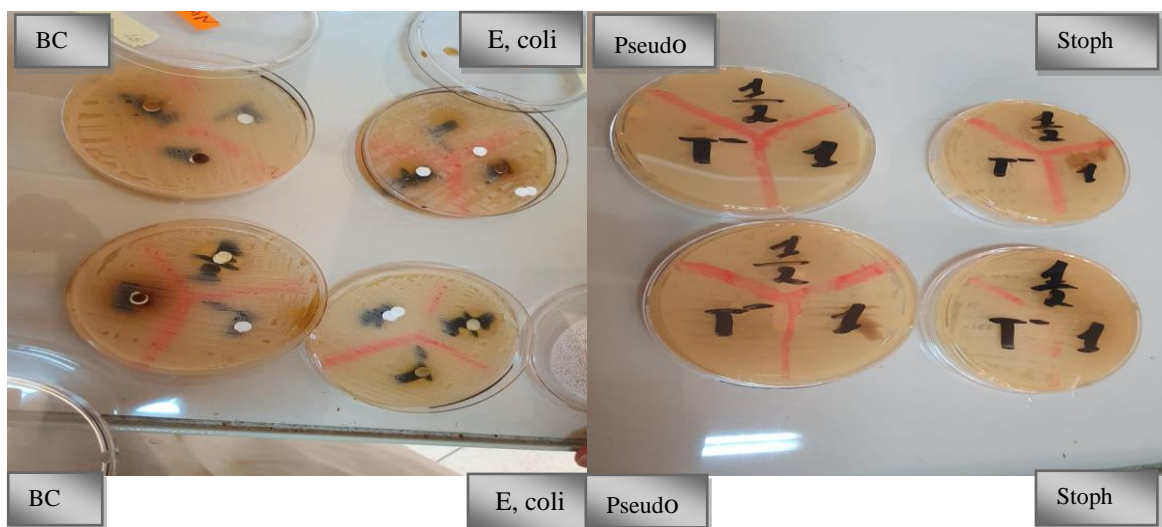
**TB (méthanol)**= l'extrait méthanolique de *Terminalia bellirica*

### Interprétation des résultats

À travers les résultats obtenus (tableau 08) et la si dessous (figure44) nous soulignons une variabilité dans la réponse des souches étudiées (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*,) vis-à-vis les extraits bruts (méthanolique et aqueux) de TB.

On remarque que les résultats de l'extrait méthanolique de TB sont plus élevés que ceux de l'extrait aqueux.

La sensibilité de la souche *Escherichia. coli* aux deux extraits testés a montré un meilleur résultat par rapport aux autres bactéries étudiées avec un diamètre de zone d'inhibition de 16.87mm pour TB (méthanol), et 14.01mm pour TB (aqueux), suivi par *Staphylococcus aureus* (16.26mm) pour TB (méthanol), et 10.23 mm pour TB (aqueux) , Ensuite on a *Pseudomonas aeruginosa* (15.48mm) pour TB (méthanol), et (15.24mm) pour TB (aqueux) ,enfin *Bacillus cereus* avec un diamètre de zone d'inhibition de15.37 mm pour TB (méthanol), et14.23 mm pour TB (aqueux) (Figure42 ).



**Figure 42 :** Diamètres des zones d'inhibition en (mm) des extraits bruts des espèces étudiées (Photo personnelle ; 2022).

#### a- Résultats de l'activité antibactérienne des extraits bruts de TC

Les diamètres des zones d'inhibition des souches utilisées sous l'action des extraits de TC méthanolique et TC aqueux sont représentés dans le tableau 08.

**Tableau 8 :** Diamètres des zones d'inhibition en (mm) des extraits bruts de TC

<b>Bactéries</b> <b>Diamètres</b> <b>(mm)</b>	<i>Staphylococcus</i> <i>Aureus</i>	<i>Escherichia.</i> <i>coli</i>	<i>Bacillus</i> <i>cereus</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>
TC (aqueux)	10.31±3.10	12.03±2.36	12.86±0.83	12.62±1.47
TC (méthanol)	13.26±2.45	14.86±2.89	13.93±0.17	14.53±1.34

**TC (aqueux)**= l'extrait aqueux de *Terminalia chebula*

**TC (méthanol)**= l'extrait méthanolique de *Terminalia chebula*

### Interprétation des résultats

D'après les résultats obtenus (tableau 09) et la (figure 43) nous soulignons une variabilité dans la sensibilité des souches étudiées (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*,) vis-à-vis les extraits bruts (méthanolique et aqueux) de TC.

On remarque que les résultats de l'extrait méthanolique de TC sont plus élevés que ceux de l'extrait aqueux.

La sensibilité de la souche *Escherichia. Coli* aux deux extraits testés a montré un meilleur résultat par rapport aux autres bactéries étudiées avec un diamètre de zone d'inhibition de 14.86mm pour TC (méthanol), et 12.03mm pour TC (aqueux), suivi par *Pseudomonas aeruginosa* (14.53mm) pour TC (méthanol), et 12.62 mm pour TC (aqueux), Ensuite on a *Bacillus cereus* un diamètre de (13.93mm) pour TC (méthanol), et de (12.86mm) pour TC(aqueux) ,enfin *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de zone d'inhibition de 13.26 mm pour TC (méthanol), et de 10.31 mm pour TC (aqueux).



**Figure 43 :** Diamètres des zones d'inhibition en (mm) l'extraits brute des espèces étudiées (cliché personnel).

### II.2.4.3. Résultats de l'activité antibactérienne des extraits dilués des deux espèces étudiées

Les diamètres des zones d'inhibition des souches utilisées sous l'action des extraits dilués de TB et TC sont représentés dans les tableaux suivants :

#### 1- Résultats de l'activité antibactérienne des extraits dilués de TB

**Tableau 10:** Diamètres des zones d'inhibition en (mm) des extraits dilués de TB

<b>Bactéries</b> <b>Diamètres</b> <b>(mm)</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia. coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomanas Aeruginosa</i>
TB (aqueux)	17.40±2.3	18.30±5.16	17.61±2.14	18.90±1.79
TB (méthanol)	18.87±2.34	21.26±2.86	20.22±1.6	21.36±0.5

**TB (aqueux)**= l'extrait aqueux de *Terminalia bellirica*

**TB (méthanol)**= l'extrait méthanolique de *Terminalia bellirica*



### Interprétation des résultats

D'après les résultats obtenus (tableau 10) nous soulignons une variabilité dans la sensibilité des souches étudiées (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*,) vis-à-vis les extraits dilués ½ (méthanolique et aqueux) de TB.

On remarque que les résultats de l'extrait méthanolique de TC sont plus élevés que ceux de l'extrait aqueux.

La sensibilité de la souche *Pseudomonas aeruginosa* aux deux extraits testés a montré un meilleur résultat par rapport aux autres bactéries étudiées avec un diamètre de zone d'inhibition de 21.36mm pour TB (méthanol), et 18.90mm pour TB (aqueux), suivi par *Escherichia. Coli* (21.26mm) pour TB (méthanol), et de 18.30 mm pour TB (aqueux), Ensuite on a *Bacillus cereus* (20.22mm) pour TB (méthanol), et (17.61mm) pour TB (aqueux), et en dernière position *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de zone d'inhibition de 18.87mm pour TB (méthanol), et de 17.40 mm pour TB (aqueux).

### 2- Résultats de l'activité antibactérienne des extraits dilués de TC

**Tableau 9 :** Diamètres des zones d'inhibition en (mm) des extraits dilués de TC

Bactéries Diamètres (mm)	<i>Staphylo cocus aureus</i>	<i>Escherichia. coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomanas Aeruginosa</i>
TC (aqueux)	14.68±1.11	17.41±0.14	16.75±2.53	18.37±1.95
TC (méthanol)	17.73±0.17	19.98±0.94	18.74±1.35	22.92±1.09

**TC (aqueux)**= l'extrait aqueux de *Terminalia chebula* L.

**TC (méthanol)**= l'extrait méthanolique de *Terminalia chebula* L.



### Interprétation des résultats

Les résultats obtenus (tableau 09) expriment une variabilité dans la réponse des souches étudiées (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*,) vis-à-vis les extraits dilués ½ (méthanolique et aqueux) de TC.

On remarque que ces résultats sont plus élevés dans l'extrait méthanolique de TC que dans l'extrait aqueux.

La sensibilité de la souche *Pseudomonas aeruginosa* aux deux extraits testés a montré un meilleur résultat par rapport aux autres bactéries étudiées avec un diamètre de zone d'inhibition de 22.92mm pour TC (méthanol), et 18.37mm pour TC (aqueux), suivi par *Escherichia. Coli* (19.98mm) pour TC (méthanol), et 17.41 mm pour TC (aqueux) , Ensuite on a *Bacillus cereus* (18.74mm) pour TC(méthanol), et (16.75mm) pour TC(aqueux) ,enfin *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de zone d'inhibition de17.73mm pour TC(méthanol), et de 14.68 mm pour TC(aqueux).

### Discussion

D'après ces études on a signalé que les bactéries à Gram- et à Gram+ sont plus sensibles aux extraits méthanolique qu'aux extraits aqueux mais la sensibilité des bactéries à Gram+ est inférieur à celle de Gram-.

L'activité antibactérienne élevée des extraits méthanolique peut être expliquée par la nature des composants actifs présents (alcaloïdes, flavonoïdes, huiles essentielles, tarpénoïdes, tanins, etc.) et qui peut être améliorée en présence de méthanol, ou par la forte capacité d'extraction du méthanol qui peut avoir donné un plus grand nombre de constituants actifs responsables de l'activité antibactérienne (**Ghosh et coll., 2008**) Nos résultats sont en accord avec ces conclusions.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que l'extrait brut des deux espèces testées donne un pouvoir antibactérien à l'encontre des quatre souches étudiées avec une intensité plus faible et cela revient à la réduction de l'absorbance de l'extrait brut (onctueux) par le disque (papier wattman 4).

Il ressort également que les dilutions des deux espèces montrent une action contre les souches étudiées, ce qui explique la présence d'un pouvoir antibactérien contre les bactéries à Gram- et Gram+ dans les extraits de *Terminalia bellirica* et *Terminalia chebula* et d'une réponse si proche chez les deux espèces. Ceci a été soutenu par une étude antérieure sur un

extrait méthanolique et aqueux contre les bactéries (**R.rathinamoorthy et al,2014 ;Poonkothai et al , 2014**). Et que les bactéries *P. aeruginosa* et *E. coli* sont les plus sensibles contre les deux extraits (**Gupta et al. 2002**) et a signalé qu'un acte de méthanol de fruits de *T.bellerica* ont montré des zones d'inhibition les plus élevées contre *P.aeruginosa* et *E.coli*.

# *Conclusion et Perspectives*

### **Conclusion et perspectives :**

À travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. La phytothérapie est l'art de se soigner par les plantes. Actuellement, de nombreux médicaments tirent leurs origines des plantes médicinales. Cette forme de médecine ne s'oppose pas aux autres thérapies, elle augmente l'efficacité d'un traitement ou atténue ses effets secondaires (Larousse, 2001).

La recherche des molécules bioactives dans les extraits de plantes va mener à leur utilisation comme alternative des molécules de synthèse.

Dans le cadre de ce travail, on a entamé à une étude comparative des activités biologiques de deux espèces de la plante *Terminalia* (*Chebula et Bellirica*) issues de l'ASIE (INDE), dans ce cadre, Le présent travail a pour objectif de l'étude phytochimique (screening phytochimique) et l'évaluation de l'activité antibactérienne ainsi que l'activité anticoagulante des espèces de ce genre.

Les résultats des analyses qualitatives phytochimiques des extraits ont révélé la présence de nombreuses familles chimiques représentées par les flavonoïdes, les coumarines, les glucosides, les Anthraquinones, les quinones libres et a fait ressortir une existence de composés phénoliques et de tanins comme constituants majeurs.

Les résultats de rendement en résidus sec des fruits montrent que le rendement de l'extrait méthanolique est plus élevé que celui de l'extrait aqueux, donc le rendement est variable selon le solvant et les procédures d'extraction.

L'évaluation quantitative des polyphénols totaux (dosage de polyphénols totaux) par la méthode de Folin-Ciocalteu a révélé la présence d'importantes quantités de polyphénols dans les extraits de fruits des deux plantes étudiées. Ce qui nous a permis de conclure que *Chebula* et *Bellirica* du genre *Terminalia* sont une source importante de polyphénols.

L'évaluation de l'effet antibactérien montre que les quatre bactéries utilisées sont sensibles aux antibiotiques utilisés. Nos extraits étaient actifs contre les isolats bactériens testés cela indique un large spectre d'activité. Cette observation est très importante en raison de la possibilité de développer des substances thérapeutiques qui seront actives contre les organismes multirésistants.

Nous avons enregistré également un effet incoagulable *in vitro*. Nos extraits exercent une activité anticoagulante très importante vis-à-vis des deux voies de coagulation qui est

similaire à celui du témoin positif enoxaparin sodium (0.8ml) (Lovenox), donc ces extraits (méthanolique et aqueux) montrent un effet anticoagulant très important. Pour cela il est conseillé d'utiliser la plante dans les traitements des maladies veineuses thromboemboliques.

Néanmoins, il y a certains problèmes apparemment associés à l'utilisation non contrôlée de produits "naturels" et de médicaments à base de plantes traditionnelles. Il doit être mentionné ici que les effets secondaires les plus graves proviennent de la surutilisation ou de l'abus de ces médicaments.

Il est à signaler toujours que cette étude est nouvellement réalisée, elle peut être considérée comme étant la première de son genre, nos extraits phénoliques sont riches en composés actifs et une exploitation de ces propriétés thérapeutiques s'impose sur une recherche approfondie de ces principes actifs, à cet effet, il est souhaité de :

- Compléter l'étude in vitro pour l'évaluation de l'activité anti diabétique et anti oxydant.
- L'étude in vivo pour l'évaluation de l'activité anti inflammatoire, cytotoxicité et déterminer la dose toxique.
- Évaluer l'activité antibactérienne des extraits phénoliques des fruits des espèces étudiées vis-à-vis d'autres souches est également évaluer l'activité antifongique.
- Cependant des études mécanistes et cliniques sont encore nécessaires pour combler les lacunes existantes dans nos connaissances afin de comprendre l'action thérapeutique de cette plante médicinale et de ces deux espèces (*Terminalia bellirica* et *Terminalia chebula*).

# *Références Bibliographiques*

**Références Bibliographiques**

**A**

- **Aalikhani Pour M, Sardari S, Eslamifar A, Rezvani M, Azhar A, Nazari M. (2016)** Evaluating the anticoagulant effect of medicinal plants in vitro by cheminformatics methods. *Journal of herbal medicine*.
- **Acket S. (2015).** Implication du métabolisme carboné pour une production différentielle d'huile chez les plantes oléagineuses-Lin : modélisation des systèmes. Thèse de doctorat, Université de Technologie, Compiègne.
- **ALachaherFatima Zohra. (2018).** Effet de la supplémentation des grains brunes de lin sur le profil lipidique et les statuts redox et inflammatoire, chez les rats rendus diabétique par streptozotocine. Thèse de Doctorat, Université d'AhmedBenbella, Oran, Alger.
- **Ammar R. B., Bhourri W., Sghaier M. B., Boubaker J., Skandrani I., Neffati A., Bouhlel L., Kilani S., Mariotte A. M., Chekir-Ghedira L., Dijoux-Franca M. G. D. and Ghedira K. (2009).** Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. *Food Chem*; 116: 258-264.
- **Anonyme, (1974).** Encyclopédie-Le Grand Médical. L'histoire de la médecine et de la chirurgie, l'avenir de la médecine, les prix Nobel. Edition Service S.A., Genève (Suisse), 397 pp. 10. ANTHOULA
- **Atefeibu E.S.I. (2002).** Contribution à l'étude des tanins et de l'activité antibactérienne d'*Acacia Nilotica* Var *Andesonii*. Thèse de doctorat, Université cheikh Anta Diop de Dakar. 33p.
- **Athukorala Y., Lee K W., Kim SK., Jeon Y.J. (2007).** Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Bioresource Technology*. 98 : 1711-1716.
- **Aubréville A. (1959),** Terminalia. In : "La flore forestière de la Côte d'Ivoire" Tome III. Centre technique Forestier Tropical, Nogent sur marne, France.
- **Avril J.L., Dabernat H., Denis, F., Monteil, H. (1992).** Bactériologie clinique. 2ème édition, 7p.

**B**

- **Bae J. (2011).** Antithrombotic and profibrinolytic activities of phloroglucinol. *Food and Chemical Toxicology*, 49 : 1572-1577.
- **Bahorun T. (1997).** Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and agricultural resarchcouncil, Réduit, Mauritius*.p. 83-94.
- **Balentine C.W., Crandall P.G., O'Bryan C.A., Duong D.Q., Pohlman F.W. (2006).** Thepre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*.73: 413-421.
- **Batty P. E.T., Smith G. (2010).** Anticoagulation. *Surgery*, 28 (6): 243-247.
- **Beddou F. (2015).**Étude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius*L. et *Anvillearadiata*Coss. & Dur. Thèse de doctorat, Université Abou BekrBelkaid, Tlemcen, Algérie.
- **Békro, Y.A., Békroj, A.M., Bouab B., Trab F.H. et Ehilé E.E. (2007).** Etude ethnobotanique et Screnning phytochimique de *Caesalpinibenthamiana*. (Bai) Herend et Zarucchi (caesalpinaceae). *Rev. Sci. Nat.* 4 (2): P 217-225.
- **Belluzzi A. (2002).** Fatty acids for the treatment of inflammatory bowel diseases.*Proceedings Nutrition Society*, 61(3) : 391-395.
- **Bahorun, T, Gressier B, Trotin F, Brunet C, Dine T, Luyckx M, Vasseur J, Cazin M, Cazin C, Pinkas M. (1996).**Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *ArzneiForschung*, 46: 1086-1089.
- **Benbrinis S,( 2012).**Evaluation Des Activités Antioxydante Et Antibactérienne Des Extraits De Santolina Chamaecyparissus. Thèse De Magister En Biochimie. Université Ferhat Abbas-Sétif. Algérie. 84p
- **Bloedon L.T., Szapary P.O. (2004).** Flaxseed and cardiovascular risk.*Nutrition Review*.62(1) : 18-27.
- **Boisseau M.R.(1996).** Données actuelles sur l'hémostase. *Phlébologie*, 42 (2) : 175-186.
- **Boizot, N., Charpentier J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en



composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour d'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, INRA p.79-82.

- **Bossokpi I.P.L. (2003).** Etude des activités biologiques de *fagaranthoxyloides Lam*(Rutaceae). Thèse doctorat, Université de Bamako, p. 8-10.
- **Bruneton J. (1993).** Pharmacognosie phytochimie des plantes médicinales. 2<sup>ème</sup>Ed. Paris ; Tec & Doc Lavoisier, P. 207-211.
- **Bruneton J.(1999).** Pharmacognosie phytochimie des plantes médicinales. 3<sup>ème</sup>Ed. Paris ; Tec & Doc Lavoisier, P. 207-211.
- **Bruneton J.(2009).** Pharmacognosie phytochimie des plantes médicinales. 4<sup>ème</sup>Ed. Paris ; Tec& Doc Lavoisier, P. 207-211.
- **Butenaset S., Mann K. G.,(2002).***Biochemistry (Moscow)*, 67(1), p. 3-12
- **Bouras F., Houchi A.(2013).**Etude de l'activité antioxydant de la plante *Rumex Vesicarius* L. Mémoire master académique, 28p.
- **Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E.(2001).** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Review Plant Science* 161 : 839–851

### C

- **Cambus JP, (2002).** Physiologie de l'hémostase, p. 2-3.
- **Caquet R. (2004).** 250 Examens de laboratoire : prescription et interprétation (9<sup>ème</sup> Ed. Masson (Paris); p. 388-389.
- **Casa R., Russell G., Cascio B. L., Rossini F.(1999).** Environmental effects on linseed (*Linum usitatissimum*L.) yield and growth of flax at different stand densities.*European journal of agronomy*, 11(3) : 267-278.
- **Catier O. and Roux D. (2007).**Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie: Cahiers dupréparateur en pharmacie. 3<sup>ème</sup> Ed. France, Wolters Kluwer.
- **Cowan M,(1999).**Plantproducts As Antimicrobial Agent ,*Clinical Microbiology Reviews*
- **Cowan, M. M. (1999).** Plant Products As Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology - Reviews*12 (4), 564 – 582
- **Chambers H. F. (1997).**Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 10 : 781-791.

- **CHETLEY A. (2000).** Médicament à problèmes. Paris : édition. ReMed, 405p.
- **Chytilova M., Mudron̄ova D., Nemcova R., Gancarc̄ikova S., Buleca. V, Koš̄c̄ova. J, Tkac̄ikova. L̄. (2013).** Anti-inflammatory and immunoregulatory effects of flax-seed oil and *Lactobacillus plantarum*–Biocenol™ LP96 in gnotobiotic pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*. Department of Microbiology and Immunology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republ Research in Veterinary Science, 95: 103-109.
- **Collin S. and Crouzet J. (2011).** Polyphénolset procédés: Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire. Paris, Tec & Doc Lavoisier.
- **Coskuner Y., Karababa E. (2007).** Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Food Engineering*, 78, 3, p. 1067-1073.

## D

- **Dacosta Y. (2003).** Les phytonutriments bioactifs : 669 référencés bibliographiques. Edition. Yves Dacosta, Paris, 317p.
- **Daglia, M. (2011).** Polyphenols As Antimicrobial Agents. *Current Opinion In Biotechnology*, 1 – 8. Decock, P ; 1, Isbn-8041-1592-5.
- **DALLARAS C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et Documentation. Lavoisier, Paris. 654p.
- **Daun J., Barthet V., Chornick T., Duguid S. (2003)** Structure, composition, and variety development of flaxseed. dans: *Flaxseed in Human Nutrition*, Second Edition. Eds Thompson, L. U. and Cunnane, S. C., AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, p. 1-40.
- **De Catarina R., Husted S., Walentin L., Andreotti F., Arnesen H., Bachman F. Baigent C., Hubert K., Jespersen J., Kristensen SD., Goy HL., Morais J. Rasmussen LH., Siegbahn A., Verheugt FWA., Weitz JI. (2012).** General Mechanism of coagulation and targets of anticoagulant. *Thromb Haemos*, p. 569-579.
- **Diallo A. (2005).** Étude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd. (MYRTACEAE). Thèse de Doctorat, Mali.
- **Diederichsen A, Richards K. (2003).** Cultivated flax and the genus *Linum* L. *Flax: the genus Linum*, p. 32-38.

- **Dohou N.,Yani K., Thahrouch S., IdrissiHassani L. M., Badoc A., GmiraN.(2003).**Screeningphytochimiqued'uneendémiqueibéro-Marocaine,Thynelaealythroides.Bull.Soc, Pharm. Bordeaux.142:61-78.
- **Dybing C. D., Lay C. (1981).**Flax*Linum usitatissimum*.dans: *CRC handbook of biosolar resources*. Eds McClure, T. A., Lipinsky, E.S., CRC Press, Inc., Boca Raton, USA, II.Resource materials, p. 71-85

*E*

- **Ebrahimi, NS., Hadian J., Mirjalili MH., Sonboli A., YoucefZadi M. ( 2008).** Essential oil composition and antimicrobial activity of thymus caramanicus at different phonological stages.*Food chemistry*. 110: 927-931
- **Eloff, J.N., Katerere D.R., McGaw L.J. (2008)** The biological activity and chemistry of southern African Combretaceae. *Journal of Ethnopharmacology* 119, 686-699.
- **Elqaj M., Ahami A. Et Belghyti D,(2008)** (La Phytothérapie Comme Alternative A La Résistance Des Parasites Intestinaux Aux Antiparasitaires. Journée Scientifique
- **EbrahimiNS.,Hadian J., Mirjalili MH., Sonboli A., YoucefZadi M.( 2008).** Essential oil composition and antimicrobial activity of thymus caramanicus at different phonological stages.*Food chemistry*. 110:927-931
- **El AbdaliYouness.(2017).**Caractérisation phytochimique et activité antioxydante et immunostimulante de *Lavanduladentata*et *Linum usitatissimum*.Mémoire de Master, UniversitéSidi Mohamed ben Abdellah, Alger.
- **Elicoh-Middleton J.R., Chithan K. and Theoharis C. (2000).** Effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart diseases and cancer. *Pharmacology and Expérimental therapeutics*, 4(52): 673-751.
- **Erlund I. (2004).** Review of the flavonoids quecetin, hesperetin, and naringenin. Dietarysources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24 : 851-874.

*F*

- **FAOSTAT(2008)** Base de données statistique de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture.
- **FAO (2012)**. Guide pratique - Stockage et conservation des grains à la ferme. Site consulté le 13 mars 2012,
- **Fauchère JL., Avril JL. (2002)**. Bactériologie générale et médicale. Ed., Ellipse. p. 213-281.
- **Favier A. (2006)**. Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64(6) : 390-396.
- **Freeman T. P. (1995)**. Structure of flaxseed. Dans: Flaxseed in human nutrition. Cunnane S. C., Thompson L. U. eds., AOCS Press, Champaign, USA, pp
- **Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D. Et Guo Z. ,(1986)**. Places Des Plantes Médicinales Dans La Thérapeutique. *Bulletin De L'organisation Mondiale De La Santé.*, (2) : 159-164.

*G*

- **Garcia-Salas P., Morales-Soto A., Segura-Carretero A. and Fernández-Gutiérrez A. (2010)**. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, 15: 8813-8826.
- **Gangouépiéboji J. (2007)**. Caractérisation des bêta-lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. Thèse de doctorat, Liège.
- **Ghazi F., Sahraoui S. (2005)**. Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdestotaux au cours de la maturation de deux variétés de datte communes Tantboucht et Hamraia, mémoire d'ingénieur en agronomie, El Harrach.
- **Girardel J.M. et Samama C.M.(2006)**. Les nouveaux anti thrombotiques: une Thérapeutique en mutation, des perspectives d'avenir New anticoagulant agents: the present and the future. *Réanimation*, 15, p. 117-123.

- **Girondon E., Ganzengel C., Ghanem N., Gossen M.(1995).** Aspect moléculaire desHémophilies, Encyclopédie Médico-chirurgicale, Paris, France, Hématologie, F.a 13.021- B -10,8p.
- **Ashutosh Gupta, Ramesh Kumar, Abhay K. Pandey,(2020),** Antioxidant and antidiabetic activities of Terminalia bellirica fruit in alloxan induced diabetic rats ,South African Journal of Botany 130 .308315

### *H*

- **Hall C. I., Tulbek M. C., Xu., Y. (2006).** Flaxseed. *Advances in Food and Nutrition Research*, 51, p. 1-97.
- **Halliwell B, Gutteridge J.M.C. (1999).** *Free radicals in biology and medicine*, Oxford, UK..
- **Hopkins W.G. (2003).**Physiologie végétale. Ed. De Boeck Université, Bruxelles, 514p.
- **Huang D., Ou B, Prior R.L. (2005).** The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays.*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6): 1841-1856.
- **Hayes, A. and B. Markovic. 2002:** Toxicity of australian essential oil Backhousia citriodora Part 1 antimicrobial activity and invitro cytotoxicity.*Food Chem. Toxicol.*, 4: 949-964.
- **Hellal Z., 2011.** Des Propriétés Antibactériennes Et Antioxydants De Certaines Huiles Essentielles Extraites Des Citrus Application Sur La Sardine (Sardina Pilchardus). Magistère, Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou. Pp1-8-45-78.
- **Hegnauer R. Combretaceae. In : Chemotaxonomie Der Pflanzen III. Birkhäuser Verlag Basel, (1964), Stuttgart 437.**
- **Harborne, J.B, (1998).** Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition. ISBN: 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB). 203-214.

### *I*

- **Irshad, M., Aziz, S., ur-Rehman, H., Shahid, M., Naeem Ahmed, M., Minhas, F.Ribéreau Garyon.P.(2012).**Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod, Paris, 254p.

**J**

- **Julien K. (2013).** Les huiles végétales c'est malin. Leduc.s Éditions, 22 août 2013 – 256 pages. p.13, 19, 20, 21, 35.

**K**

- **Kaddem S.D, (1999).** Les Plantes Médicinales De L'Algérie.
- **Kasote D.M.(2013).** Flaxseed phenolic as natural antioxidants.*Int Food ResJournal*.20:27-34.
- **Karleskind A. (1992).** Détermination des caractéristiques physiques. Dans : Manuel des corps gras. Karleskind A. ed., Lavoisier Tec & Doc, Paris, France, vol. 2, p. 1290-1311.
- **Kaithwas G., Mukerjee A., Kumar P., Majumdar D.K. (2011).** *Linum usitatissimum (linseed/flaxseed) fixed oil: antimicrobial activity and efficacy in bovine mastitis.* *InflammoPharmacology*. 19: 45-52.
- **Koffi N et al., (2009).** In vitro antibacterial activity of some plant essential oils.*Journal of complementary and alternative medicine*. Vol. (9): 6-39.
- **Krisa S., Waffo Teguo P., Decendit A., Deffieux G., Huguet F., Fauconneau B. and Mérillon JM. (1997).** Production, purification et activité biologique des picéïdes (stilbènes) extraits de cultures cellulaires de *vitis vinifera* L. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*, 136 : 7-18.
- **Konemann.(1999).**"Guide illustré du Bien-être, phytothérapie". Édition française. P 6, 10.[10] Pelt J.M.2004. "Les vertus des plantes". Ed du Chêne, France, 183 p. cité par Julie Nguyen Pouplin "plantes antipaludiques du Vietnam Etude ethnopharmacologique et chimique" Thèse de doctorat, 2007

**L**

- **Labalette F., Landé N., Wagner D., Roux-Duparque M., Saillet E. (2011).** La filière lin oléagineux française : panorama et perspectives. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 18(3) : 113-122
- **Lay C. L. and C. D. Dybing.(1989).** Linseed. 416p - 430 In: *Oil Crops of the World* edited by G. Röbbelen, R. K. Downey and A. Ashri. McGraw-Hill, New York.

- **Lemaoui A.(2011).** Activités antioxydants et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigellasativa*.L Algérienne. Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Magister en Biochimie, Université Ferhat Abbas, Sétif.72p.
- **Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., Lee C.Y.,(2003).** Cacao has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chemistry*, 51: 7292-7295.
- **Lhuillier A. (2007).** Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches:*Agauriasalicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauriapolyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambourissatrichophylla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embeliaconcinna* Baker (*Myrsinaceae*). Thèse de doctorat, Toulouse.
- **Li H.B.,Cheng K.W., Wong C. C., Fan K. W., chen F., Tian Y.(2007).** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae.*Food Chemistry*, 102,p.771-776.
- **Lisu W., Jui-Hung Y., Hsiao-Ling L, Ming-Jiuan W. (2003).**Antioxydant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbonucifeca*Gertn). *Journal of food and drug analysis*, 11(1): 60-66.
- **Llaneza, Coalla H., Blanco Fernández J.M., MorísMorán M.A. et López Bobo M.R. (2009).** Biogas generation apple pulp.*Bioresource technology* 100.17: 3843-3847.
- **Lutge U ; Kluge M, Bauer G. (2002).** Botanique 3eme Ed : Technique et documentation.Lavoisier, Paris. p.211

## M

- **Marambe, P., Shand, P. J., &Wanasundara, J. P. D. (2008).**An In-vitro Investigation of Selected Biological Activities of Hydrolysed Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) Proteins. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 85(12) : 1155-1164.
- **MESSAOUDI A. (2017).**Contribution à l'étude de la qualité de l'huile de lin (*linum usitatissimum*)par des méthodes physico-chimique. Mémoire de Master, Université de Tlemcen ABOU BEKR BELKAID, Alger.
- **Mieszczanek J., Harrison L. M., Vlasuk G.P., Cappello M.( 2004).** Anticoagulant peptides from *Ancylostomacanthum* are immunologically distinct and localize

to Separate structures within the adult hookworm. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 133: 319-323.

- **Milane H.(2004).** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat, Strasbourg.
- **Miliauskas G., Venskutonis P.R., Van Beek TA. (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry*, 85:231-237.
- **Miller N.J., Sampson J., Candeias L.P., Bramley P.M., Rice-Evans C.A.(1996).** Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS letters*, 384(3): 240-242.
- **Morikawa T., Xu F., Ninomiya K., Matsuda H., Yoshikawa M.(2004).** Nigellamines A3, A4, A5 and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids with lipid metabolism-promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin. *Chem. Pharm. Bull.*; 52(4):494-497.
- **Mueller K., Eisner P., Yoshie-Stark. Y., Nakada R., Kirchhoff, E. (2010).** Functional properties and chemical composition of fractionated brown and yellow linseed meal (*Linum usitatissimum*), *J. Food Eng.* 98:453-460.
- **Muir A. D., Neil D. (2003).** Flax the genus *linum* Westcott Agriculture and Agri-Food Canada, Saskatoon, Saskatchewan, Canada.
- **Muir A. D., and Westcott N. D. (2003).** Flax, The genus *Linum*. Taylor & Francis Group. Canada, p.22-25.
- **Muylaert A. et Mainil JG. (2012).** Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». *Annales de Médecine Vétérinaire*. 156 : 109-123.
- **Ma W. G., Tan R. X., Fuzzati N., Li Q. S., Wolfender J. L., Hostettmann K., (1997).** Natural Occurring And Synthetic Polyene Glycosides. *Phytochemistry*, 45(2): 411-415
- **Macheix J., Fleuriet A., Jay C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux, un exemple des métabolites secondaires. Collection Biologie, pp.1-11.



- **Mann A., Amupitan J. O., Oyewale A. O., Okogun J. I., Ibrahim K(2009).** Antibacterial activity of terpenoidal fractions from *Anogeissus leiocarpus* and *Terminalia avicennioides* against community acquired infections. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3(1), 022-025.
- **Maurice, N. (1997).** L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXI<sup>e</sup> siècle. Ed. Tec etDoc, Paris, p: 12-14
- **Maurin O. (2009).** Molecular phylogenetic study of African Combretaceae. In: A Phylogenetic study of the Family Combretaceae with emphasis on the Genus *Combretum* in Africa. Thèse de Doctorat, Université de Johannesburg Décembre.
- **Maurin O., Mark W, Chase M. J., Van Der Bank M. (2010),** Phylogenetic relationships of Combretaceae inferred from nuclear and plastid DNA sequence data: implications for generic classification. *Botanical Journal of the Linnean Society* 162, 453–476.
- **Meddour A., Yahia M., Benkiki N., Ayachi A, (2013).** Étude De L'activité Antioxydante et Antibactérienne Des Extraits D'un Ensemble Des Parties De La Fleur Du *Capparis Spinosa*L. *Lebanese Science Journal*. Vol. (14): 49-60
- **Miliauskas, G., Venskutonis P. R., Van Beek TA. (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry*, 85: 231-237.

*N*

- **Nahak, G., Sahu R.K, (2011)** evaluation in comparative antioxidant activity of *Curcuma Longa* & *Curcuma aromatic*". *Natural product: An Indian journal*; 7(2):57- 60
- **Najjaa, H., Neffati, M., Zouari, S., & Ammar, E .2007 :** Essential oil composition and antibacterial activity of different extracts of a North African endemic species. *ComptesRendus de Chimie*, 10, 820-826.
- **Nesbitt P.D.,Lam Y., and Thomposo L.U.(1999).**Human metabolism of mammalian lignan precursors in raw and processed flaxseed .*American journal of clinical nutrition*, 69:549-555.

- **Nicola M.,et Daniel C. (1998).** Activité technologique en microbiologie-Téchniques de base et méthodologie. Editeurs CRDP D'aquitaine - Bordeaux, 152p.
- **Newman D.J., Cragg G.M. (2012).** Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. J. Nat. Prod. Vol. (75) : 311-335.

*O*

- **O'kenedy R., Thornes R.D. (1997).** Coumarins–Biology, Applications and Mode of Action, John Wiley & Sons Ltd., Chichester,Eds,315p.
- **Oloyede, OI. (2005).** Chemical Profile of Unripe pulp of Earica papaya, Pakistan journal of nutrition 4 :379-381.
- **Oomah B. D. (2001).**Flaxseed as a functional food source. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81, p. 889-894.
- **Oomah B. D., Mazza G. (1999).** Health benefits of phytochemicals from selected Canadian crops. Trends in Food Science &Technology, 10 : 6-7, p. 193-198.

*P*

- **Philippon A. (1995).** Quelques bacilles à Gram négatif aérobies stricts non fermentaires et sensibilité aux antibiotiques. Lett.Infectiol.10 : 619-630.
- **Pierce T.B.,Maruf M.B.A.,Razzuk L.A., Hoover S.J. (1999).** Acomprehensivereview of the physiology ofhemostasis and antithrombotic agents.BUMC, p. 39-49.
- **Pibiri M.C. ; (2005) ;** Assainissement Microbiologiques De L'air Et Des Systèmes De Ventilation Au Moyen D'huiles Essentielles ; Thèse De Doctorat De La Faculté Environnement Naturel, Architectural Et Construit Lausanne ; P: 28-42.
- **Poonkothai et al.(2014)** antimicrobial activity and phytochemical analysis of fruit extracts of terminalia bellirca Int J Pharm Pharm Sci, Vol 6, Issue 5, 639-642.
- **Prescott L., Harley J., Klein D.(2010).**Microbiologie 3ème Ed., De Boeck. p. 520-582.

*R*

- **Rapport L., Lockwood B. (2001).**Flaxseed and flaxseed oil.The Pharmaceutical Journal, 266, 3, p. 287-289.

- **Ribéreau-Garyon. P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod, Paris, 254p.
- **R.Rathinamoorthy et G.Thilagavathi.(2014).** Terminalia Chebula Review on Pharmacological and Biochemical Studies/Int.J.PharmTech Res., 6(1), pp 97-116.
- **Rubilar M., Gutiérrez C., Verdugo M., Shene C., & Sineiro J. (2010).** Flaxseed as a source of functional ingredients. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(3): 373-377.

**S**

- **Sakthipriya P. et Vidhya R. (2015).** Phytochemical and in-vitro thrombolytic Activity of *Pergulariadeamia*(forsk.) stem. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 4 (5): 1325-1337
- **Sarni-Manchado P. and Cheynier V.(2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec & Doc, Paris, p. 2-10.
- **Savoire R. (2008).** *Etude multi-échelles de la séparation solide-liquide dans la trituration du lin oléagineux*, Thèse de doctorat, Université de Technologie, Compiègne, 11p.
- **Scalbert, A. (1991).** Antimicrobial Properties Of Tannins. *Phytochemistry*, 3875 – 3883.
- **Shan B., Cai Y.Z., Brooks J.D., Corke H. (2007).** The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International J Food Microbiology*. 117: 112-119.
- **Shim Y.Y., Gui B., Arnison P.G., Wang Y. et Reaney M.J.T.(2014).** Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature. *Trends Food sics Technol*. 38:5-20.
- **Sherazi T. (2012).** Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Skimmeal aureola* growing wild in the state of Jammu and Kashmir. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6: 1680-1684.
- **Solène J. (2012).** La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse de diplôme d'état de docteur en pharmacie, Faculté de pharmacie, Université de Lorraine.

- **Stevens, P. F. (2012).** Angiosperm Phylogeny Website. Version 12., <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. [consulté le 20/01/2012).
- **Stöckigt J., SheludkY., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H. and Stöckigt D. (2002).** High performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of chromatography*, 967(1): 85-113.
- **Svoboda K.P., Hapson J.B. (1999).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Ayr (Scotland), *Plant Biology Department*

### *T*

- **Tadros S.H., (1979).** Pharmacognostical study of *entolobium cyclocarpum* griseb growing in Egypt. Ph. D. thesis. Faculty of pharmacy. Cairo university. Florida state horticultural society. 426p.
- **Teixeira Da Silva J. A, (2004).** Mining The Essential Oils Of The Anthemideae. *Afr. J. Biotechnol.* Vol. (3): 706-720.
- **Telli, A, Esnault M.A, El Hadj Khelil A.O (2010).** An ethnopharmacological survey of plants used in traditional diabetes treatment in south-eastern Algeria (Ouargla province). *Journal of Arid Environments*, 127 : 82-92.
- **Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. (2012).** Introduction à la microbiologie 2ème édition, Ed., ERPI Science. p. 141-145.
- **Trease, E. et Evans W.C. (1987).** Pharmacognosie, Billiaire Tindall. London 13th ed
- **Tresse E. et Evans W.C. (1987).** Pharmacognosy Billiaire. Ed. Tindall, London, 13, p. 61-62.
- **Troufflard S., Roscher A., Thomasset B., Barbotin J.N., Rawsthorne S., Portais J.C. (2007).** In vivo <sup>13</sup>C NMR determines metabolic fluxes and steady state in linseed embryos. *Phytochemistry*, 68: 16-18, p. 2341-2350.
- **Tzang B. S., Yang S. F., Fu S. G., Yang H.C., Sun H. L., Chen Y.C. (2009).** Effects of dietary flaxseed oil on cholesterol metabolism of hamsters. *Food Chemistry*, 114: 1450-1455.

*U*

- **Ulanowska, K., Traczyk, A., Konopa, G & Wegrzyn, G. (2008).** Differential Antibacterial Technological, Toxicological, and Health Perspectives, Marcel Dekker, Inc. New York, p.65

*V*

- **Vidal Dictionnaire. (2009).** Editions Vidal,3024p.

*W*

- **Warrand J. (2004).** Etude structurale et propriétés en solution des polysaccharides constitutifs du mucilage de lin (*Linum usitatissimum*), Thèse de l'Université de Picardie Jules Verne, Amiens, 220p.
- **Weill P. et Mairesse G. (2010).** Le lin, son huile, sa graine et notre santé *Article De synthèse. Phytothérapie* 8: 1–5.
- **Wegrzyn R. and Lamendinh H. (2005).** Huiles essentielles et aromathérapie bucco-dentaire. *Le Chirurgien-dentiste de France*, 1225 : 62-66.

*Y*

- **Youmbai A.(2015).** Contribution à l'étude des polysaccharides hydrosolubles de quelques plantes de la famille des Apiaceae récoltées dans la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Algérien). These magister, Université Kasdi Merbah. 38p.

*Z*

- **Zaika, L. L. (1988)-.** "Spices And Herbs - Their Antimicrobial Activity And Its Determination" *Journal Of Food Safety*, Pp97-118.
- **Zafar Javed Khan., Naeem Ahmad Khan., Imrana Naseem., Shahab A. A Nami. (2019).** Exploration of physicochemical potential of *Linum usitatissimum* Linn (Tukhm-e-Katan). *Asian journal of pharmacy and pharmacology*.5(3):551-558.
- **Zenk M.H., Juenger M. (2007).** Evolution and current status of the phytochemistry of Nitrogenous compounds. *Phytochemistry*, 68, (22-24), 2757-2772.

## *Références Bibliographiques*

---

- **Zhang H., Kong, B., Xiong Y.L., Sun X. (2009).** Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4°C. *Meat Science*.81: 686-692.
- **Zhou H.Y., Hong J.L., Shu P., Juan Ni Y., Qin M. J. (2009).** A new coumarin and Anticoagulant activity from *Viola yedoensis* Makino. *Fitoterapia*, 80:283–285.

# *Annexes*

Annexe 01: Matériel du laboratoire

1- Appareillages



Spectrophotomètre



Plaque chauffante  
agitatrice



Vortex



Bain marie



Balance de précision



Etuve





Rota vapeur



Agitateur mécanique



Plaque chauffante

## 2- Local de travail



Laboratoire de  
l'université de Mila

### Annexe 02:

#### 1- Verreries

Pipettes, Micro pipette, Boîtes de pétries en verre et en plastique, Tubes à visse, Flacons (250 ml), Erlenmeyer, Bécher, Spatule, Pipettes pasteur, Entonnoir, Balance, Agitateur, Spectrophotomètre, Les bandelettes, réactives Papier filtre, Fioles, barreau magnétique, papier aluminium, parafilme.

#### 2- Les produits chimiques

Méthanol ; Ethanol ; Ether de pétrole ; Acide gallique ; Folin Ciocalteu ; Iodure de potassium

; Iode ; Acide chlorhydrique (HCL) ; Hydroxyde d'ammonium ; Ether di- éthylique ; Alcool chlorhydrique ; Copeaux de magnésium ; Chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>) ; liqueur de Fehling ; KOH ; NAOH ; NH<sub>4</sub>OH ; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ; NH<sub>4</sub>OH ; Anhydride acétique ; Chloroforme ; Carbonate de sodium ; Chlorure de calcium.

**1. Réactifs utilisés :**

**Réactif de Wagner**

Iodure de potassium → 2 g

Iode → 1,27 g

Eau distillée → 100 ml

• **Réactif de Mayer**

Chlorure de mercure → 1,36 g

Iodure de potassium → 5 g

Eau distillée → 100 ml

• **HCL (10%)**

10 ml (HCL) → 90 ml d'eau distille

• **KOH (10%)**

10 g → 100 ml d'eau distille