

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



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2020

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

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Présenté par :

Zaidi Melissa & Aloune Nadia

Thème

**Etude de l'activité antibactérienne de
l'extrait éthanolique des feuilles de *Pulicaria
odora***

Soutenu le: 13 /08/2021

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
Mme Metidji K.	MAA	Univ. de Bouira	Président
Mme Djouahra-Fahem	MCB	Univ. de Bouira	Promotrice
Mme Djenadi K.	MCB	Univ. de Bouira	Examinatrice

Année Universitaire : 2020/202

Remerciements

*On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté
d'entamer et de terminer ce mémoire.*

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour
sans l'aide et l'encadrement de Mme Djouahra Djamila, on le remercie pour la
qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa
disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.*

*Je tiens à remercier sincèrement les membres du jury qui me font le grand
honneur d'évaluer ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent au ingénieurs de laboratoire de la faculté science de
la nature et de vie pour leurs aide pratique.*

*Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs pour leurs
générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charge
académique et professionnelles.*

Dédicace

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut ...
Tous les mots ne sourient d'exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance... Du profond de mon cœur, je dédie ce travail :

À mes chers parents

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer la profondeur des sentiments d'affection, d'estime et de respect que je vous porte, pour l'amour dont vous m'avez toujours comblé, l'éducation et le bien être que vous m'assurez, pour votre soutien, vos sacrifices et vos prières, puisse dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

À mes chers frères : Lounes et Billal

À mes chers sœurs : Dihia et Kenza

À mon cher fiancé

Je voulais juste de dire merci, merci d'être cette personne qui croit en moi et que me donne du courage dans la vie de tous les jours. Je ne sais pas ce que je ferais sans toi.

À tous mes amis chacun par son nom

Leysih Ounissa, Safia Thiziri, Menasria Narimen, Zaidi Mélissa, Saoudi Thilelli,
Meziane Krime et Soualah Faouzi.

À tous mes amis de la promotion de master 2 Biotechnologie 2021
Je ne peux trouver les mots juste et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frères, sœurs et des amis sur que je peux compter.

ALOUNA

Dédicaces

A mon Dieu «ALLAH» avant tout et après tout

Je dédis ce modeste travail :

A :

Ma très chère famille en gratitude spécialement :

Mon père

Zui peut être fier et trouver ici le résultat de longue années de sacrifices pour m'aider à avancer dans la vie ; MERCI pour le soutien permanent venu de toi

Ma mère,

Aucune dédicace ne serait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de déployer depuis ma naissance, jus 'qua maintenant. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuits pour mon éducation et mon bien être, toute cette abnégation dont tu as fait preuve afin que je devienne ce que je suis. Que Dieu le tout puissant, te préserve et t'accorde une bonne santé, longue vie et bonheur.

Mon cher frère : Abd el Hamid

Zui nous a quitté en 2014, et qui toujours présent dans nos cœurs. J'aurais tant aimé avoir à mes côtés en ce moment. Que dieu le tout puissant te garde dans son vaste paradis.

Mes très chères sœurs : Nassima, Fadila, Dalila, Sabrina et Miassa

Mes chers frères : Naim et Mohamed

Mes aimables petites nièces : Roumaissa, selsabil, Lina, Nabila, Maroua, Yousra

Mes chers neveux : Yahia, Abd el moujib, Islam, Abd el moumen

Mes très chères collègues : Amira, Houdda, Mouna, Nadia

Tous ceux qui m'ont encouragée pendant la durée de la réalisation de ce travail

À tous la promo

MERCI

Melissa

Résumé

Le présent travail est une contribution à la caractérisation *in vitro* de l'effet inhibiteur de la plante *Pulicaria odora* récolté dans la région Drâa El Mizan (wilaya de Tizi ouzou). Cette plante est utilisée traditionnellement en Kabylie pour traiter les pathologies dermatiques. Le screening phytochimique a révélé une richesse en métabolites secondaires dans les feuilles de cette plante (Tannin gallique, mucilage, saponosides, amidon). L'extraction des polyphénols par la technique (solide-liquide) a donné un rendement de 6.06%. Le dosage des polyphénols et flavonoïdes a montré des teneurs respectives de 181,6mgEAG/g et 93,8 mgEq/g.

L'extrait de cette plante a été testé sur cinq souches microbiennes pathogènes à savoir trois souches bactériennes à Gram négatif il s'agit d'*Escherichia coli*, *Entérocooccus faecalis*, *klebsiella pneumoniase* et deux souches bactériennes à Gram positif *Bacillus cereus*, *Listeria innocua*. L'analyse de l'activité antibactérienne révèle que cet extrait éthanolique est efficace vis-à-vis des bactéries Gram+ et bactéries Gram-. La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de cet extrait a un effet antibactérien avec CMI= 0,8 mg/ml.

Mot clés : *Pulicaria odora*, activité antimicrobienne, screening phytochimique, polyphénols, flavonoïdes, CMI.

ملخص:

هذا العمل يشكل إسهاماً في توصيف التأثير المثبط لمحصول بوليكاريا أودورا النباتي في المنطقة دراا الميزان (ولاية تيزي وزو). يستخدم هذا النبات تقليدياً في كابيلى لعلاج الأمراض الجلدية. وكشف الفحص الكيميائي النباتي عن ارتفاع مستوى الأيض الثانوي في أوراق هذا النبات (التانين الغالي، المخاط، الصبغى، النجم). إن استخراج البولي فينولات بواسطة تقنية (السائل الصلب) أعطى حصيداً قدرها 6.06%. أظهر تحديد البولي فينولات والفلافونويدات محتويات 181,6 mgEAG/g و 93,8 mgEq/g على التوالي وقد تم اختبار مستخلص هذا النبات على خمس سلالات جرثومية مسببة للمرض، وهي ثلاث سلالات بكتيرية سلبية الغرام هي *Escherichia coli*، *Interocococcus fecalis*، *klebsiella preoniase* وسلالتين بكتيريتين مع Gram *Listeria inchnua*. ويكشف تحليل النشاط المضاد للبكتيريا أن هذا المستخلص الإيثانولي فعال ضد غرام + وبكتيريا غرام-. تحديد الحد الأدنى من التركيز المثبط (MIC) لهذا المستخلص للتأثير المضاد للأجسام مع MIC = 0.8 مغ/مل.

الكلمات المفتاحية: *Pulicaria odora*، النشاط المضاد للميكروبات، الفحص الكيميائي النباتي، البولي فينول، الفلافونويد،

MIC.

Abstract

This work is a contribution to the in vitro characterization of the inhibitory effect of the plant *Pulicaria odora* harvest in the region Drâa El Mizan (wilaya de Tizi ousou). This plant is traditionally used in Kabylie to treat dermal pathologies. Phytochemical screening revealed a high level of secondary metabolite in the leaves of this plant (Gallic tannin, mucilage, saponosides, starch). The extraction of polyphenols by the technique (solid-liquid) gave a yield of 6.06%. The determination of polyphenols and flavonoids showed contents of 181,6 mgEAG/g and 93,8 mgEq/g respectively.

The extract of this plant has been tested on five pathogenic microbial strains namely three bacterial strains with Gram negative are *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *klebsiella pneumoniase* and two bacterial strains with Gram positive *Bacillus cereus*, *Listeria innocua*. Analysis of antibacterial activity reveals that this ethanolic extract is effective against Gram+ and Gram-bacteria. Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of this extract for antibacterial effect with MIC = 0,8 mg/ml

Keywords: *Pulicaria odora*, antimicrobial activity, phytochemical screening, polyphenol, flavonoid, MIC.

Table de matière

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale.....1

Première partie : Etude biobibliographique

Chapitre I : Généralités sur les plantes médicinales

I. Les plantes médicinales 3

II. L'intérêt thérapeutique des plantes médicinales 3

III. La phytothérapie 3

III.1. La phytothérapie traditionnelle 4

III.2. La phytothérapie clinique 4

IV. Famille des Asteraceae 4

V. *Pulicaria Odora* 5

V.1. Définition 5

V.2. Classification 5

V.3. Description botanique 6

V.4. Distribution géographique 6

V.5. Caractère de climat et de sol de la plante 6

V. Utilisation en médecine traditionnelle 7

Chapitre II : les composés phénoliques

I. Généralité 8

II. Le rôle des composés phénoliques 8

III. Classification 8

III.1. Les acides phénoliques 9

III.2. Les stilbènes 10

III.3. Les lignanes et les lignines	10
IV. Composé phénolique obtenue à partir de la plante	11
IV.1. Les tannins galliques	11
IV.2. Les Flavonoïdes	11
IV.3. Les quercétines	11
IV.4. Les diterpènes	12
IV.5. Les sesquiterpène	12
V. Biosynthèse des composés phénoliques	12
VI. Localisation des composés phénoliques dans la plante	13
VII. Extraction des composés phénoliques	13
VII.1. Macération	13
VII.2. Extraction assistée par ultrasons	14
VII.3. Extraction assistée par micro-ondes	15
VII.4. Extraction par fluide pressurisé	16
VII.5. Extraction par eau subcritique	17
VII.6. Extraction par fluide supercritique	17
VII.7. Extraction assistée par des enzymes pectolytiques	17
VII.8. Prétraitement par champs électriques pulsés	18
VIII. Paramètres influençant l'extraction	18
VIII.1. Température	18
VIII.2. Temps d'extraction	18
VIII.3. Type de solvant	18
VIII.4. Puissance d'irradiation	19
VIII.5. Nature de la matrice	19
IX. Propriétés des composés phénoliques	19
X. Activité antibactérienne d'autre plantes de la famille <i>Asteraceae</i>	19

Chapitre III : la résistance bactérienne

I.	Résistance bactérienne	21
I.1.	Résistance naturelle	21
I.2.	Résistance acquise	21
II.	Les Antibiotique	21
III.	Méthode d'étude in vitro de l'activité antimicrobienne	22
III.1.	L'antibiogramme	22
III.2.	La concentration minimale bactéricide CMB	22
IV.	Caractéristique des quelques souches bactériennes utilisées	22
IV.1.	<i>Escherichia coli</i>	22
IV.2.	<i>Bacillus</i>	23
IV.3.	<i>Klebsilla</i>	23
IV.4.	<i>Listeria</i>	24
IV.5.	<i>Enterobacter</i>	25

Deuxième partie : Etude expérimentale

Chapitre I : Matériel et Méthode

I.	Matériel	26
I.1.	Matériel végétal	26
I.2.	Appareils et réactifs	26
I.3.	Les souches bactériennes utilisées	27
I.4.	Préparation de l'échantillon végétal	27
a.	Le séchage	27
b.	Broyage	27
c.	La conservation	27
I.5.	Screening phytochimique	27
a)	Préparation de l'infusé à 5%	28
I.6.	Extraction des polyphénols	29
I.7.	Dosage des polyphénols	30

I.8. Dosage des Flavonoïde	31
II. Activité antimicrobienne des extraits polyphénoliques de <i>Pulicaria odora</i>	32
II.1. Préparation de l'extrait éthanolique	32
II.2. Préparation de milieu de culture	32
II.3. Revivification des souches	32
II.4. Préparation de l'inoculum bactérien	33
II.5. Etude de l'effet antibactérien de l'extrait par la méthode de diffusion par puits sur gélose	34
II.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI	35
1. La méthode de dilution sur milieu solide	35
2. La Méthode de dilution sur milieu liquide	35

Chapitre II : Résultats et Discussions

II.1. Le screening phytochimique	38
II.2. Le rendement d'extraction des polyphénols	39
II.3. Dosage des polyphénols totaux	40
II.4. Dosage des flavonoïdes	41
II.5. Activité antibactérienne	41
II.6. Détermination de concentration minimale inhibitrice	45
Conclusion	48
Référence bibliographique	
Annexes	
Résumé	

Liste des abréviations

- P.Odora*** : *Pulicaria Odora*
- Atm** : Atmosphère
- FSC** : Fluide super critique
- MPa** : Méga pascal
- CEP** : champs électriques pulsés
- MAE** : extraction assisté par micro-onde
- PPT** : la teneur des polyphénols totaux
- CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- CMB** : Concentration Minimale Bactérienne
- ATB** : Anti Biotique
- MH** : Meller hinton
- ADN** : Adénosine désoxyribonucléique
- ARN** : Adénosine ribonucléique

Liste des figures

Figure 1 : Type d'inflorescence de la famille des <i>Asteraceae</i>	4
Figure 2 : Classification de la plante <i>Pulicaria odora</i>	5
Figure 3 : Illustration de la plante <i>Pulicaria odora</i>	6
Figure 4 : Caractéristiques du climat et du sol de la plante <i>Pulicaria odora</i>	7
Figure 5 : Structure de base des dérivés de l'acide benzoïque	10
Figure 6 : Structure de base des dérivés de l'acide cinnamique	10
Figure 7 : Structure de base des flavonoïdes	11
Figure 8 : Structure chimique des diterpènes	12
Figure 9 : Structure des sesquiterpènes	12
Figure 10 : Fréquences des ondes sonores et leurs applications	14
Figure 11 : Représentation des bulles de cavitation sous l'effet des ultrasons	14
Figure 12 : Destruction de membrane cellulaire par l'implosion de bulles de cavitation ...	15
Figure 13 : Les micro-ondes dans le spectre électromagnétique	15
Figure 14 : Schéma d'un système d'extraction par fluide pressurisé	16
Figure 15 : <i>Escherichia coli</i> observé sous le microscope électronique à balayage	23
Figure 16 : <i>Bacillus</i> au microscope électronique à balayage	23
Figure 17 : <i>klebsilla</i> sous le microscope électronique	24
Figure 18 : <i>Listeria monocytogenèse</i> observé sous le microscope	24
Figure 19 : Observation microscopique de <i>l'Entérobacter</i>	25
Figure 20 : Aspect de <i>Pulicaria odora</i> avant et après le séchage	26
Figure 21 : L'aspect final de la plante	27
Figure 22 : Protocole d'extraction des polyphénols	29
Figure 23 : Dosage des polyphénols totaux selon la méthode de FolinCiocalten	30
Figure 24 : dosage des flavonoïdes	31
Figure 25 : Préparation des boîtes de pétri	32
Figure 26 : La revivification des souches	33
Figure 27 : Préparation de la suspension bactérienne	33
Figure 28 : Ensemencement en stries serrées et la réalisation de la méthode de diffusion en puits	34
Figure 29 : La méthode de dilution sur milieu solide	36

Figure 30 : Aspect des cultures bactériennes sur gélose Muller Hinton (MH), en présence de doses croissantes de l'extrait brut polyphénolique de *Pulicaria odora* 46

Liste des tableaux

Tableau I : Les principales classes de composés phénoliques	9
Tableau II : utilisation d'autre plantes de même famille (<i>P.Odora</i>) qu'a une même activité antibactérienne	19
Tableau III : les souches bactériennes utilisées	26
Tableau IV : les différentes méthodes du screening phytochimique effectuées	28
Tableau V : résultat des tests phytochimiques de la plante <i>Pulicaria odora</i>	38
Tableau VI : Rendement d'extraction des composés phénoliques de <i>Pulicaria odora</i>	39
Tableau VII : Diamètre d'inhibition de différentes concentrations de l'extrait éthanolique de <i>Pulicaria odora</i>	42
Tableau VIII : Etat de croissance des souches bactériennes sensibles sur gélose Muller Hinton additionnée de différentes doses d'extrait polyphénolique de <i>Pulicaria odora</i>	45

Introduction

Introduction

Plus de 200 000 espèces végétales sur 300 000 recensées sur notre planète, existent dans les pays tropicaux d'Afrique **Sofowora, 2010**, et plus de 80% de la population de ces pays sont des utilisateurs potentiels de ces plantes. Donc, les plantes médicinales sont des ressources précieuses, pour assurer les soins de première nécessité. En outre, la majeure partie des thérapies implique l'exploitation du principe actif de plantes (**Pouka et al., 2015**). D'ailleurs, l'usage des extraits des plantes contenant des constituants bioactifs et devenu une approche très importante dans la médecine préventive (**Keita et al., 2004**).

La pharmacie utilise une forte proportion de médicaments d'origine végétale. La situation est davantage plus préoccupante à cause de l'émergence et la diffusion des résistances aux antibiotiques qui représentent une réelle menace pour la santé publique mondiale. En effet, les données récentes de la bibliographie abondent de descriptions de bactéries multi résistantes aux antibiotiques dont le nombre ne cesse de croître aussi bien dans les pays industrialisés que dans les pays en développement (**Ouedraogo et al., 2017**). Donc le recours aux plantes médicinales représente la plus intéressante piste à explorer.

Tous les végétaux contiennent des composés phénoliques, mais leurs répartitions qualitatives et quantitatives sont inégales, elle varie selon les espèces, les organes, les tissus et les stades physiologiques (**Machiex et Jay-allemend, 2005**). Ces composés sont devenue une approche très importante dans la prévention médicale. Par conséquent, ces espèces végétales, d'une grande importance pour la santé de la population, devrait être étudiée scientifiquement pour leur meilleure utilisation.

Le genre *Pulicaria* appartient aux familles des *Asteraceae* (*Compositae*), qui comprend 100 espèces. Différentes *Pulicaria* espèces ont été traditionnellement utilisés dans plusieurs pays. *Pulicaria jaubertii*, indigène du Yémen, localement connu sous le nom « Ansif » est utilisé dans la médecine populaire comme diurétiques, pyrétiques dans les organes orogéniques et aussi pour diminuer la fièvre. En Maroc est utilisé en médecine traditionnelle pour traiter les maux de dos, les troubles intestinaux et les crampes menstruelles. La plante est également un constituant du remède traditionnel appelé « Mssakhen », qui est donné aux femmes après l'accouchement, et aussi diverses activités biologiques ont été signalées pour certaines espèces de *Pulicaria*, comme l'activité neuroprotectrice in vivo contre les maladies neurodégénératives, antipyrétique et anti-inflammatoire dans les conditions hépatiques et néphrotiques. (**Touati et al., 2018**)

L'Algérie, grâce à sa situation géographique, son relief, sa grande variété de climats et de sols, possède une flore variée dans les régions côtières, les massifs montagneux, les hauts plateaux, la steppe et les oasis sahariennes.

Introduction

Dans ce travail nous nous sommes intéressées à l'étude d'une plante médicinale *Pulicaria odora*, de la famille des *Asteraceae*, collectée dans la région de Draa El Mizan, wilaya de Tizi-Ouzou

Les objectifs de cette étude visent à :

- ✓ Rechercher les composés secondaires présents chez *Pulicaria odora*
- ✓ Extraire ses composés polyphénoliques puis les doser;
- ✓ Evaluer l'activité antimicrobienne de l'extrait polyphénolique de *Pulicaria odora* sur différentes souches bactériennes.

Le manuscrit de ce mémoire comporte trois parties :

- ✚ La première partie est une étude bibliographique concernant généralité sur les plantes médicinales, généralités sur les composés phénoliques et leur méthodes d'extraction, et enfin l'étude de la résistance bactérienne aux antibiotiques.
- ✚ La deuxième partie est consacrée à l'expérimentation, elle englobe le matériel et méthodes utilisés au cours de ce travail ainsi que les résultats obtenus et leurs discussions.
- ✚ Enfin une conclusion générale et quelques perspectives.

Introduction

PARTIE I : Etude bibliographique

Dès la naissance, l'Homme a cherché un moyen pour satisfaire sa faim. Il a trouvé des nutriments et des remèdes à ses maux dans les plantes, mais il a trouvé des difficultés pour identifier les plantes toxiques. Ces connaissances, transmises d'abord oralement, ensuite été dans les écrits et il y a des traces de l'utilisation des plantes comme médicaments par les anciens dans les premières civilisations.

Aujourd'hui, les traitements par les plantes et les produits naturels reviennent au premier plan dans la médecine traditionnelle. Si la médecine par les plantes connaît une extase à travers le monde, il est inaccessible de ne voir là qu'un phénomène de mode. Bien sûr, notre époque est profondément marquée par la recherche d'une vie plus saine, mais avec un retour à la nature et aux valeurs fondamentales (**Jean-louis, 1989**).

I. Les plantes médicinales

Ce sont toutes des plantes qui contiennent une ou plusieurs substances utilisables à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles. Le groupe consultatif de l'OMS qui a formulé cette définition affirme également qu'une telle description permet de distinguer les plantes médicinales dont les propriétés thérapeutiques et les composants ont été établis scientifiquement des plantes considérées comme médicinales (**Sofowora, 2010**).

II. L'intérêt thérapeutique des plantes médicinales

D'après **Noureddine et al., 2010**, l'intérêt est dû à la présence d'une catégorie de molécules synthétisées par la plante et considérées pratiquement sans rôle spécifique dans le développement de la plante. Ces molécules, appelées métabolites secondaires, sont divisées en trois grandes familles en fonction de leur structure chimique: les composés phénoliques, les isoprénoides et les composés azotés. Parmi ces molécules, certaines possèdent des propriétés médicinales très intéressantes comme les alcaloïdes, les flavonoïdes, les saponines et les tanins.

III. La phytothérapie

« Du grec phyton 'plante' et thyrapuein 'traitement' » (**Moatti, 1990**).

La Phytothérapie peut donc se définir comme étant une règle allopathique ensorcellement à délibérer et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou nous états pathologiques au accommodement de plantes, de parties de plantes ou de préparations à base de plantes, qui

sont soit consommées ou utilisées en voie externe. Ces plantes on peut les utilisées fraîches ou séchées.

On distingue deux types de phytothérapie (**Chabrier, 2010**).

1) La phytothérapie traditionnelle

C'est une thérapeutique de substitution qui a pour but de traiter les symptômes d'une infection. Ses origines sont très anciennes et elle se base sur l'utilisation de plantes conformément les vertus découvertes empiriquement (**Chabrier, 2010**). On peut citer comme exemple les feuilles de (*Pulicaria odora*) qui sont utilisés pour traiter les troubles intestinaux.

2) La phytothérapie clinique

C'est une approche globale du patient et de son environnement dans le but de réguler les déséquilibres physiologiques du terrain spécifique à l'individu. Elle tient compte d'un examen clinique complet et approfondi de l'état de l'organisme du patient, elle privilégie l'usage des plantes médicinales prescrites sous forme d'extraits totaux, tout en s'appuyant sur l'arsenal médicamenteux disponible (**Carollin, 2009**).

IV. La famille des Asteraceae

La famille des Astéracées (asteraceae) ou Composées (Compositae) est la famille la plus large des plantes à fleurs qui comprend près de 23 000 espèces réparties en 1535 genres (**Sharifi-Rad et al., 2014**). Les feuilles sont alternes, opposées ou basilaires, simples ou composées. Les inflorescences sont en capitule (s), simulant une fleur unique entourée de bractées formant l'involucre (**Fig.3**). Les fleurs sont tubulées actinomorphes ou ligulées zygomorphes (**Fig. 3**). Elles sont hermaphrodites ou unisexuées. Le calice est réduit avec un réceptacle du capitule nu, ou avec des paillettes entre les fleurs (**Rameau et al., 2008**).

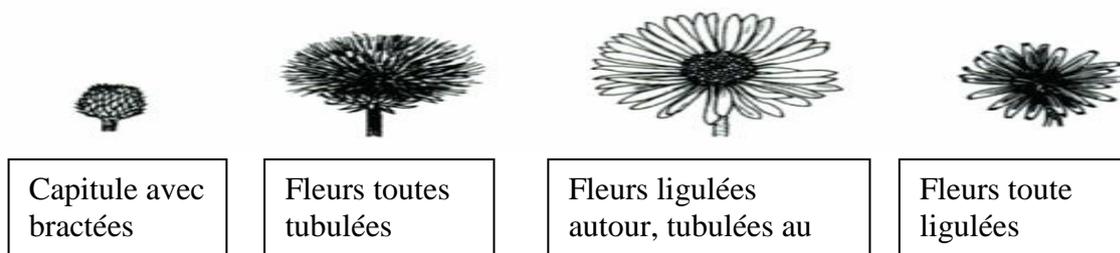


Figure 01 : Type d'inflorescence de la famille des *Asteraceae* (**Rameau et al., 2008**)

V. *Pulicaria Odora*

1. Définition

Pulicaria odora ou *Inulaodora*. Est une plante aromatique appartenant à la famille des *Asteraceae*, tribu *Inuleae* avec environ 100 espèces (Touati *et al.*, 2017), largement diffusées en Europe, l'Afrique du Nord et en Asie (Liu *et al.*, 2010). L'espèce *Pulicaria odora* Connus dans la région kabyle sous le nom « Amezough eggillef » et en Maroc elle est connu sous le nom « Ouden El hallouf » (Hanabali *et al.*, 2005).

2. Classification



Sous classe : *Dicotylédones*

Ordre : *Astérales*

Famille : *Astéraceae*



Règne : *Plantae*

Embranchement : *Spermatophyte*

Classe : *Angiosperme*



Genre : *Pulicaria*

Espèce : *Pulicaria odora* (L)

Figure 02 : Classification et photographie de la plante *Pulicaria odora* (Cronquist *et al.*, 1972 ; Lavagne, 2006)

3. Description botanique

Pulicaria odora est une plante vivace de 30-60 cm (**Rameau et al., 2008**), très odorante à odeur camphrée, velue à laineuse, Tige dressée en général simple, peu ramifiée seulement au sommet **Quezel, 1963**, Feuilles pubescentes, laineuses en dessous entières ou obscurément denticulées, de forme ovale oblongue, les inférieures atténuées en pétiole, persistants à la floraison, les caulinaires embarrassantes (**Fig 3**) (**Lavagne, 2006**).

Floraison : juin à août, dispersées par le vent Espèce thermophile, à pH neutre ou plus au moins acide (**Rameau et al., 2008**).

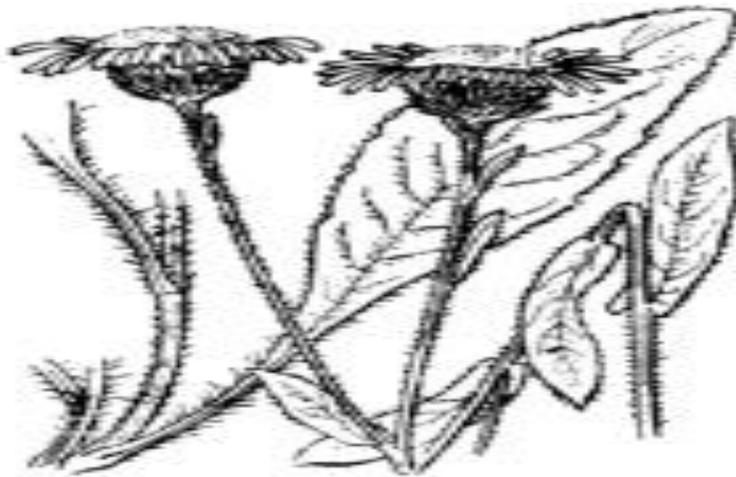


Figure 03 : Illustration de la plante *Pulicaria odora* (**Lavagne, 2006**).

4. Distribution géographique

D'après **Rameau et al., 2008** *P.odorae* est l'une des espèces les plus distribuée dans la région méditerranéenne. Elle est commune dans les Alpes-Maritimes, le Var et la Corse. Ainsi Présente en : Espagne, Portugal, Italie Afrique.

5. Caractères du climat et du sol de la plante

L'espèce *Pulicaria odora* pousse dans un climat chaud proche de la mer plus ou moins sèche qui a besoin de lumière, dans un sol plus ou moins sec à texture argileuse, prosaïquement riche en nutriments, indigent en matières organiques et intolérante à la salinité pH proche à la basicité (**Lavagne, 2006**).

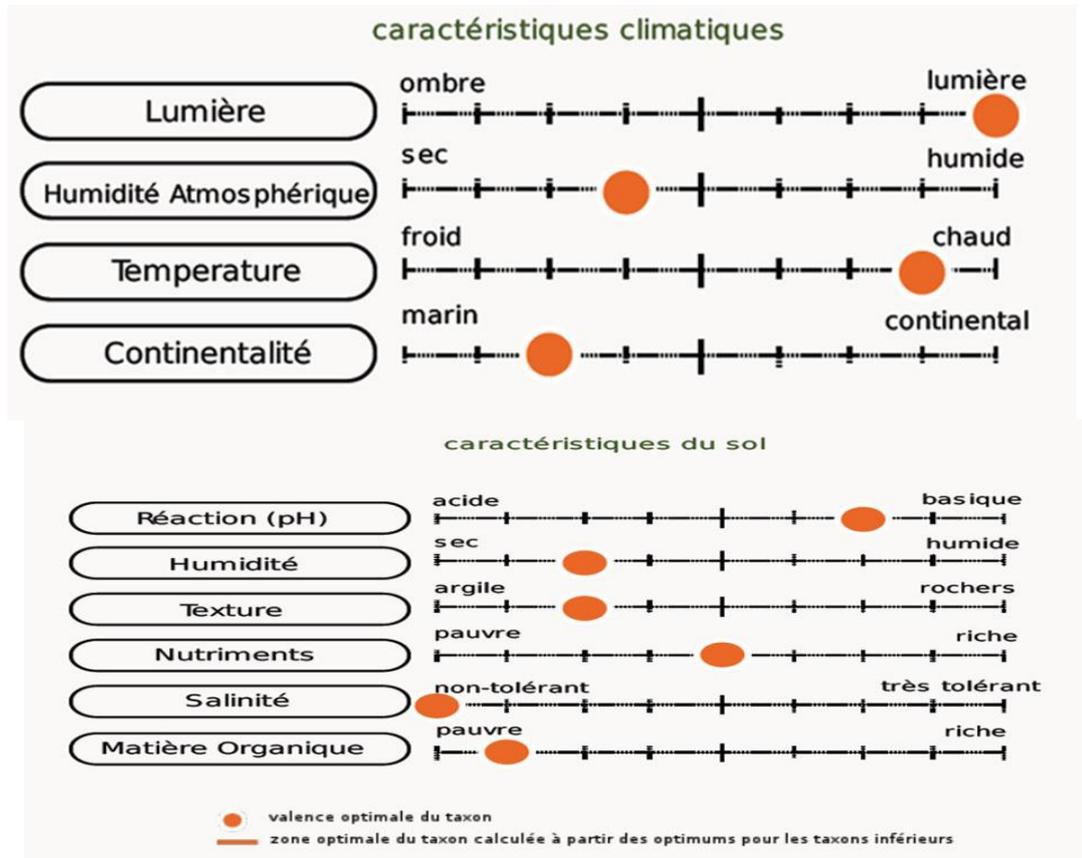


Figure 4 : Caractéristiques du climat et du sol de la plante *Pulicaria odora* (Lavagne, 2006).

VI. Utilisation en médecine traditionnelle

D'après **Gonzalez-Romero et al., 2001**, La totalité des espèces du genre *Inula* sont traditionnellement employé en thérapeutique populaire compte tenue grâce à ses propriétés antipyrétique, anti inflammatoire et hépato protective. L'espèce *Pulicaria odora* est utilisée en Maroc pour traiter les maux de dos, troubles intestinaux, crampes menstruelles et comme un remède naturel qui s'appelle « Mssakhen » pour les femmes après l'accouchement (**Ezoubeiri et al., 2005**). C'est aussi une épice appréciée pour sa saveur, qui sert à parfumer le pain et la viande.

En Algérie et surtout dans la région kabyle *Pulicaria odora* n'est utilisée que pour traiter les pathologie dermique (**Meddour et al., 2009**).

CHAPITRE II : Les Composés Phénolique

I. Généralités

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles (OH) libres ou engagés avec un glucide. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, feuilles, tiges, fleurs, fruits, pollens, graines et bois) (**Boizot et Charpontier, 2006**). Les polyphénols jouent un rôle essentiel dans la physiologie végétale et possèdent des propriétés potentiellement saines sur l'organisme humain (**Carle, 2009**).

II. Le rôle des composés phénoliques

Les composés phénoliques interviennent :

- Dans certains aspects de la physiologie végétale (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasite...)
- Dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV), soit directement dans la nature ou bien dans la conservation de certains végétaux après récolte.
- Dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualité nutritionnelles...) qui orientent les choix humains lors de la consommation d'organes végétaux (légumes, fruits, tubercules...) et des produits qui en dérivent par transformation.
- Dans les variations de certaines caractéristiques des végétaux dans les traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentées...) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui affectent la qualité du produit final.
- Dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (**Machiex *et al*, 2005**)

III. Classification

Tableau I: Les principales classes de composés phénoliques (Machiex, 1996 ; Crozier *et al*, 2008).

Nombre d'atome de carbone	Squelette de base	Classe	Composé (Exemple)	Végétale (exemple)
6	C6	Phénols simple	Catéchol	
7	C6-C1	Acide Hydroxybenzoïques	<i>p</i> -Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
9	C6-C3	Acide Hydroxycinnamiques	Acide Caféique	Pomme, P. de terre
		Coumarines	Scopoline	Citrus
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone	Noix
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiférine	Mangue
14	C6-C2-C6	Stilbène	Resvératrol	Vigne
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes	Quercétol, cyanidol	Fruits, légumes
		Isoflavonoïdes	Daidzéine	Soja, pois
Nombre de Carbone	(C6-C3) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
Nombre de Carbone	(C6-C3) _n	Lignines		Fruits à noyau
Nombre de Carbone	(C15) _n	Tannins		Raisin rouge, Kaki

III.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont divisés en deux groupes : les dérivés de l'acide benzoïque et ceux de l'acide cinnamique.

Les dérivés de l'acide benzoïque sont généralement sous forme libre. Ils peuvent être incorporés dans des structures complexes telles que certains tannins.

Les dérivés de l'acide cinnamique sont rarement présentés à l'état libre. Ils existent généralement sous une forme estérifiée (par le glucose, l'acide quinique, tartrique, shikimique, malique...) ou bien glycosylées (Peroumal, 2014).

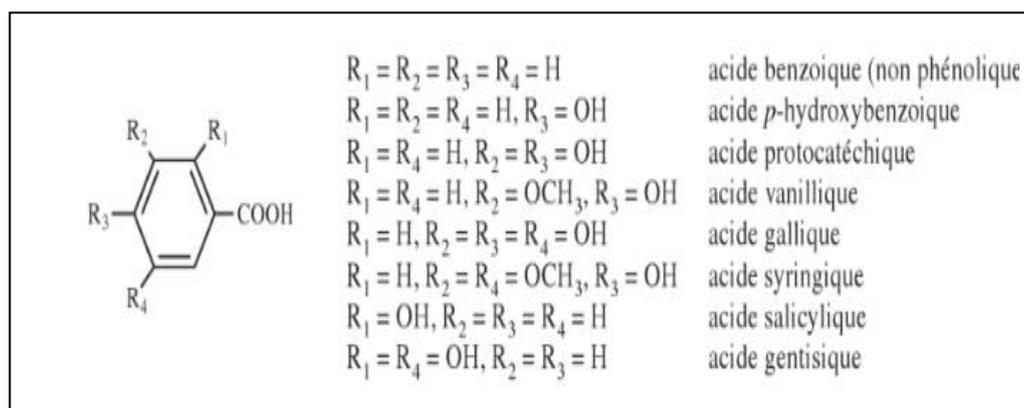


Figure 5 : Structure de base des dérivés de l'acide benzoïque (Machiex *et al.*, 2005)

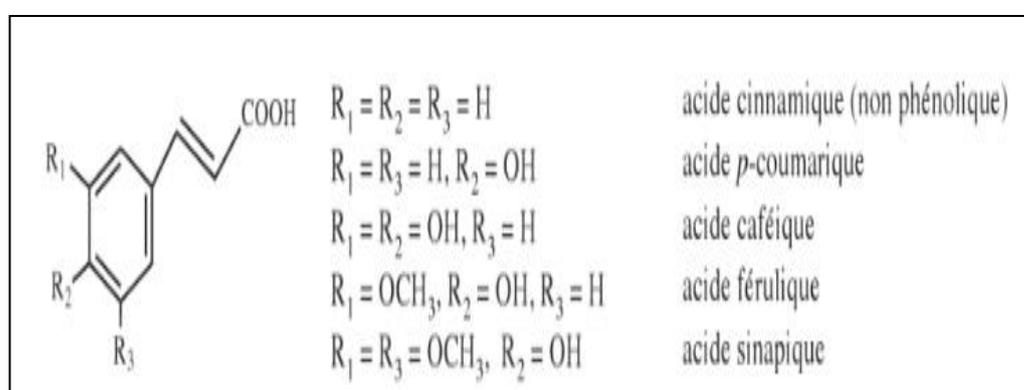


Figure 6 : Structure de base des dérivés de l'acide cinnamique (Machiex *et al.*, 2005).

III.2. Les stilbènes

Les stilbènes sont peu abondants dans les aliments, plus de 30 stilbènes et glycosides de stilbènes existent naturellement chez les végétaux. Les stilbènes sont composée de deux cycles aromatiques liés par un pont méthylène (Sonia et Jean, 2011).

III.3. Les lignanes et les lignines

Les lignanes sont des molécules qui résultent, le plus souvent, de l'établissement d'une liaison entre deux carbones de la chaîne latérale de deux acides hydroxy cinnamiques, ils sont impliqués dans les mécanismes de défense de la plante (Michel, 2011).

Les lignines sont des composants essentiels de la paroi de tous les systèmes conducteurs de la sève brute. Elles constituent 15 à 35% du bois des Gymnospermes et des Angiospermes. Les lignines sont le résultat de la polymérisation tridimensionnelle de trois molécules phénoliques monolignols (Machiex *et al.*, 2005).

IV. Composé phénolique obtenue à partir de la plante :

IV.1. Les tannins galliques

Les tanins sont responsables de l'astringence de nombreux fruits et légumes et de leurs produits dérivés (vin, thé...). Ce sont des composés à haut poids moléculaire. Les tanins on peut les considérer comme des formes phénoliques condensées capable de se lier aux protéines en solution et de les précipiter : gélatines, albumines, hémoglobine... (**Machiex et al., 2005**).

Il existe deux catégories de tanins: les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

IV.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent le principal groupe de composés phénoliques. Ces composés sont largement répandus dans les fruits, les légumes, le cacao, le thé et le vin (**Heim et al., 2002**).

Tous les flavonoïdes possèdent quinze atomes de carbone et une même structure de base formé de 2noyaux benzéniques A et B reliés par un noyau C qui est un hétérocycle pyranique (**Boubekri, 2014 (Fig.7)**). Ces composés existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides (lier à des oses et autres substances) (**Peroumal, 2014**).

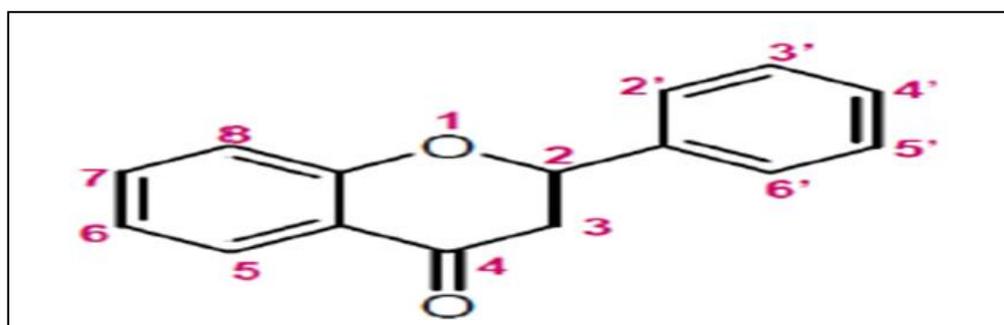


Figure 7 : Structure de base des flavonoïdes (**Peroumal, 2014**).

IV.3. Les quercétines

La quercétine est un composé organique de la très grande famille des flavonoïdes. On la trouve dans certaines plantes médicinales, dont l'efficacité est précisément liée à leur teneur en quercétine. Il se présente sous la forme hétéroside. La quercétine est l'un des nombreux pigments à l'origine de la coloration des végétaux, que ce soit des légumes, des fruits ou des fleurs (**El Kabouss et al., 2001**).

IV.4. Diterpène

Ils sont une classe diversifiée de substances structurellement complexes qui ont une large application thérapeutique. Les plantes constituent la principale source de ces produits et ils présentent un riche réservoir de nouveaux produits pharmaceutiques (Andersen-Ranberg *et al.*, 2016).

Un type de terpènes constitué de quatre unités d'isoprène (Fig 8), à la base d'une catégorie de molécules de grande importance biologique, telles que le rétinol (vitamine A), le rétinol et le phytol, et connus pour être antimicrobiens et anti-inflammatoires (Su, 2018).

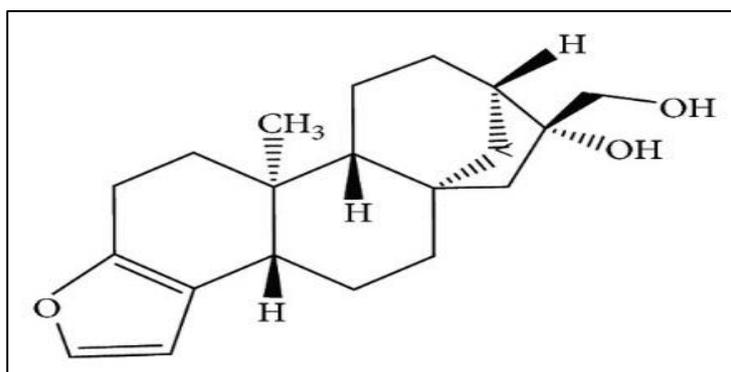


Figure 8 : Structure chimique des diterpènes (Andersen-Ranberg *et al.*, 2016).

IV.5. Les sesquiterpènes

Les sesquiterpènes sont une classe de terpène constituée de 3 unités isoprènes et ils ont comme formule moléculaire $C_{15}H_{24}$ (Fig 9). Ils sont présents dans les essences végétales aromatiques ou les huiles essentielles (Liu et chan, 1982).

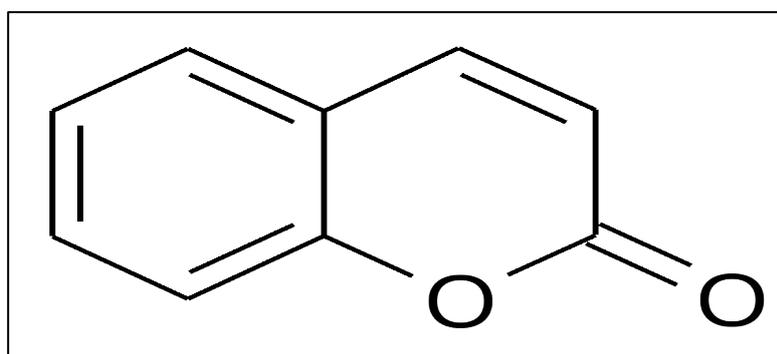


Figure 9 : Structure des sesquiterpènes (Liu et chan, 1982).

V. Biosynthèse des composés phénoliques

- La voie de l'acide shikimique : permet la formation de la phénylalanine et la tyrosine Machiex, 1996. La désamination de ces acides aminés conduit à la formation de l'acide

cinnamique, molécule non encore phénolique mais qui est directement à l'origine de la séquence biosynthétique dénommée voie des phénylpropanoïdes, qui permet la formation des acides hydroxycinnamiques (**Machiex *et al.*, 2005**).

- La voie d'acétate : permet la formation des poly- β -cétoesters de longueur variable (**Bruneton, 2009**).

VI. Localisation des composés phénoliques dans la plante

La répartition des composés phénoliques au niveau cellulaire est très caractéristique. Ils s'accumulent principalement à deux sites : la paroi cellulaire dans laquelle sont présents les lignines et certains flavonoïdes, et la vacuole dans laquelle sont stockés les phénols solubles (anthocyanes, flavonols, tanins...). Certains flavonoïdes comme (quercétine, kaempférol) pourraient être présents au niveau du noyau et de la membrane plasmique (**El Darra, 2013**).

A l'échelle tissulaire, il y a une répartition très inégale des différents composés phénoliques (Ainsi les anthocyanes et les flavanols sont généralement présents dans les couches cellulaires externes des organes végétaux (les épidermes des fruits et des feuilles) mais chez certains fruits comme les fraises et les cassis on trouve les composés phénoliques dans les tissus profonds (**Macheix *et al.*, 2005**).

VII. Extraction des composés phénoliques

VII.1. Macération

La macération est la méthode la plus simple d'extraction solide-liquide. Elle consiste à mettre le matériel végétal en contact avec le solvant avec ou sans agitation, à température ambiante ou à température élevée pour une durée déterminée. Cette technique est basée sur la solubilité de composés bioactifs dans un solvant d'extraction et elle est influencée par une série de facteurs incluant la nature du solvant, la concentration en solutés de l'échantillon, la nature du matériel végétal, la durée d'extraction etc. La macération commence avec le choix d'un solvant d'extraction approprié. Après une étape de diffusion du solvant à l'intérieur des cellules végétales le processus se poursuit avec la solubilisation des composés bioactifs qui migrent de la matrice végétale vers le solvant environnant jusqu'à ce que l'équilibre de partage de concentration soit atteint (**Grigora, 2012**).

Le solvant « vert » le plus connu est l'éthanol, qui est obtenu par fermentation de matière riche en sucres telle que la betterave et les céréales. L'éthanol est un solvant largement utilisé

dans l'industrie chimique pour sa disponibilité, sa pureté, son faible prix, son caractère non toxique et parfaitement biodégradable (Chemat, 2015).

VII.2. Extraction assistée par ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons peut convenir utilisée sur diverses matrices végétales pour l'extraction des antioxydants (vitamine, oligoéléments), en particulier les composés phénoliques. Généralement, le rendement et la cinétique d'extraction sont améliorés avec les ultrasons (Fig 10) (Chemat, 2015).

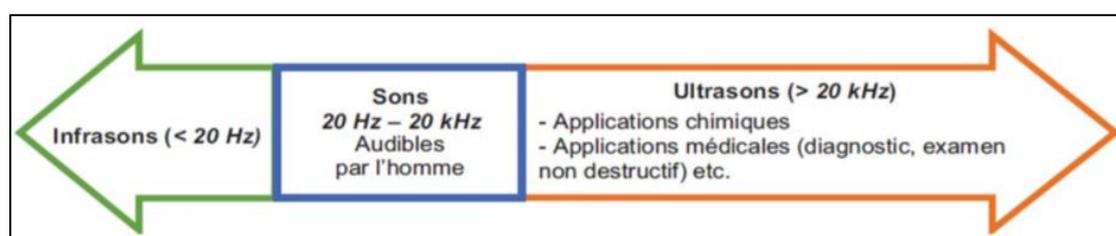


Figure 10 : Fréquences des ondes sonores et leurs applications (Grigoraș, 2012).

Dans les liquides, la propagation des ondes conduit à des cycles successifs de compression (haute pression) et de raréfaction (basse pression). Cette différence de pression induit un mouvement au sein du fluide. Au cours d'un cycle de raréfaction, les bulles de cavitations se forment à partir de noyaux gazeux existant dans le fluide (Fig. 11). L'effet de tension sur le liquide produit de nouvelles cavités. Lorsque les bulles atteignent une dimension instable, elles implosent pendant le cycle de compression libérant des énergies très importantes (Peroumal, 2014).

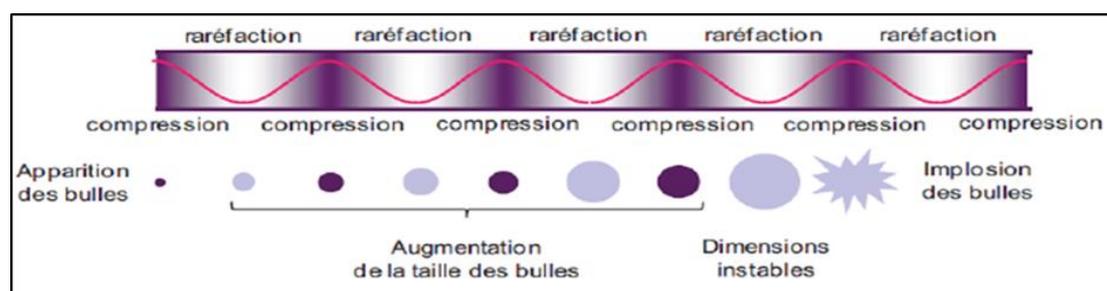


Figure 11: Représentation des bulles de cavitation sous l'effet des ultrasons (Mason et Paniwnyk, 2000).

Lorsque les bulles de cavitation sont de la surface du matériel végétal, l'implosion des bulles au cours du cycle de compression (Fig.12). Une augmentation locale de la pression (1000 atm) et de la température (5000 K) aboutit à la destruction des parois cellulaires de la

matrice végétale permettant ainsi la libération des molécules d'intérêt dans le milieu environnant (Grigoras, 2012).

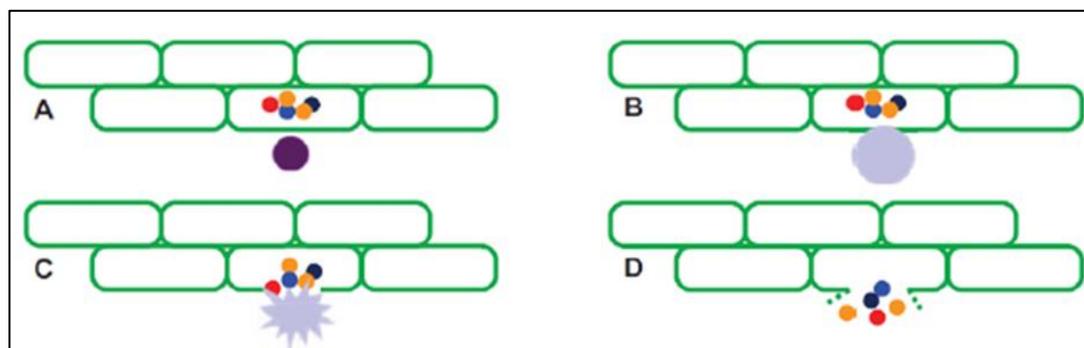


Figure 12 : Destruction de membrane cellulaire par l'implosion de bulles de cavitation (Grigoras, 2012)

VII.3. Extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes est une technique appropriée pour obtenir des composés antioxydants, notamment les polyphénols, à partir de diverses matrices végétales. Plusieurs études comparatives ont montré que la technique d'extraction par micro-ondes (Fig 13) permet de réduire le volume de solvant utilisé tout en assurant un meilleur rendement par rapport aux méthodes d'extraction classiques (Chemat, 2015).

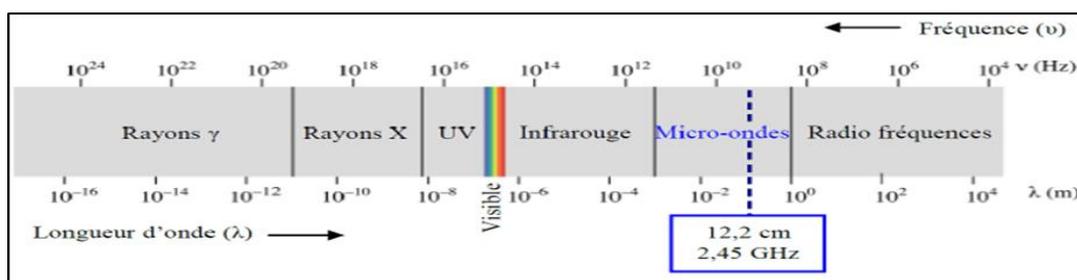


Figure 13 : Les micro-ondes dans le spectre électromagnétique (Michel, 2011)

Sous l'action des micro-ondes, les molécules vibrent et dégagent rapidement de la chaleur, ce qui conduit à une augmentation significative de la température dans la matière végétale et conduit finalement à la rupture des cellules. Les composés à extraire sont alors libérés vers l'extérieur et peuvent former directement l'extrait (cas de l'extraction assistée par micro-ondes sans solvant) ou se mélanger au solvant environnant (cas de l'extraction assistée

par micro-ondes avec solvant). L'échauffement rapide de la matière constitue l'une des particularités du chauffage micro-onde. Le transfert de chaleur a lieu de l'intérieur vers l'extérieur du matériel végétal, contrairement au chauffage classique par conduction, ce qui induit une cinétique d'extraction plus courte pour le chauffage par micro-ondes (Chemat, 2015).

VII.4. Extraction par fluide pressurisé

Cette technique d'extraction solide-liquide s'emploie à des pressions (100 à 140 atm) et à températures plus élevées (40 à 200°C) pendant un temps court (5 à 15 minutes). Dans ces conditions, le solvant présente des propriétés favorisant le processus d'extraction telles qu'une viscosité réduite, des coefficients de diffusion élevés conduisant à de bonnes cinétiques de dissolution et plaidant la désorption de solutés de la matrice végétale (Fig 14). (Garcia-Salas *et al.*, 2010).

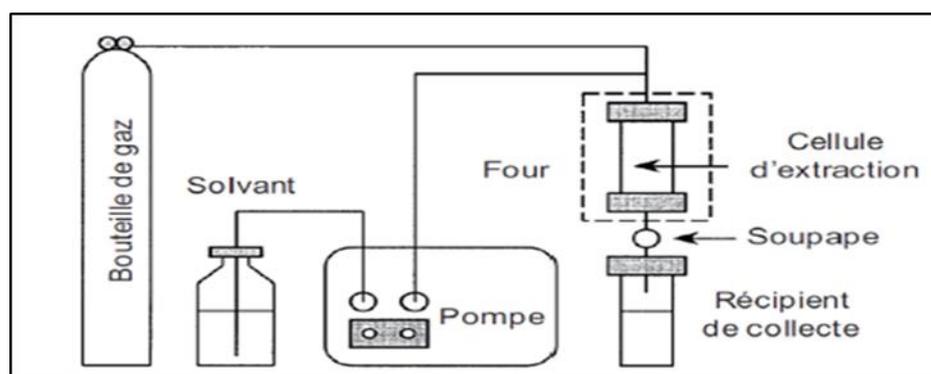


Figure 14 : Schéma d'un système d'extraction par fluide pressurisé (Bjorklund et Bowadt, 2000)

L'échantillon solide est placé dans une cellule d'extraction et mis en contact avec le solvant d'extraction pendant une durée définie. Le processus d'extraction peut être effectué en mode :

- Statique : un volume fixe de solvant d'extraction est utilisé
- Dynamique : le solvant est constamment en contact avec l'échantillon
- Statique-dynamique : les deux modes précédents sont combinés (Luque-García et Luque de Castro, 2003).

A la fin de l'extraction, l'extrait est récupéré dans un récipient de collecte par un flux de gaz comprimé, généralement de l'azote. Le processus d'extraction peut être répété plusieurs

fois avec du solvant frais, ce qui permet d'améliorer le transfert des composés à extraire et le rendement d'extraction (Grigoras, 2012).

VII.5. Extraction par eau subcritique

L'extraction par eau subcritique est une variante de la technique d'extraction par fluide pressurisé. Il peut également fonctionner en mode statique ou dynamique. L'eau chaude maintenue sous sa forme liquide grâce à l'utilisation de hautes pression et température est appelée eau subcritique. Si l'eau est chauffée à 250 °C à une pression supérieure à 40 atm, sa constante diélectrique ($\epsilon=27$) est comparable à celle de l'éthanol ($\epsilon=24$) et du méthanol ($\epsilon=33$) (Luque-García et Luque de Castro, 2003). Par conséquent l'extraction par eau subcritique permet d'extraire des composés moyennement polaires à non polaires contrairement à l'eau à température et pression ambiantes (Michel, 2011).

VII.6. Extraction par fluide supercritique

Dans des conditions de températures et de pressions supérieures aux valeurs de ses points critiques, le fluide est dit supercritique et présente un état à la fois proche d'un gaz et d'un liquide. Le dioxyde de carbone est le (FSC) le plus utilisé en raison de ses conditions critiques facile à atteindre (31,1 °C et 73,8 MPa), sa non toxicité, sa disponibilité. Il est également peu couteux, non combustible et chimiquement inerte (Garcia-Salas *et al.*, 2010). Lors de l'extraction, le solvant passe de manière continue à travers l'échantillon et les molécules d'intérêts sont obtenues sous forme concentrées après élimination du CO₂ sous forme gazeuse. Ce type de solvant n'est pas adapté à l'extraction des polyphénols en raison de leur faible polarité. L'ajout d'un co-solvant tel que l'alcool (éthanol) est nécessaire.

Les principaux domaines d'application de cette technique sont: l'agro-alimentaire, la pharmacie, la chimie et l'environnement (Chemat, 2015)

VII.7. Extraction assistée par des enzymes pectolytiques

Les préparations enzymatiques commerciales contiennent principalement des pectinases, des cellulases, des hémicellulases, des glucanases ou encore des tannases. Ces enzymes sont couramment utilisées pour affaiblir ou dégrader les parois cellulaires facilitant ainsi la libération du contenu intracellulaire. Par conséquent Elles sont principalement utilisées pour améliorer l'extraction des polyphénols. Cependant, il s'agit d'une technique coûteuse en raison du coût des enzymes utilisées (El Darra, 2013).

VII.8. Prétraitement par champs électriques pulsés

Cette technique consiste à exposer les membranes des cellules végétales à un champ électrique de moyenne intensité (environ 0,1 kV/cm). Cette exposition provoque des pores au niveau de la membrane cellulaire. Ce phénomène est appelé « électroporation » ou « électroperméabilisation ».

Parmi les avantages des CEP : elle est du faible coût énergétique C'est-à-dire que le CEP est un traitement non thermique, la durée de traitement très courte, peu couteuse et permet de réduire l'utilisation de solvants nocifs pour l'environnement et la santé humaine (El Darra, 2013).

VIII. Paramètres influençant l'extraction

VIII.1. Température

La température est un facteur important qui contribue à améliorer les rendements d'extraction. L'augmentation de la température conduit à une diminution de la viscosité des solvants et par conséquent à une meilleure diffusion de celui-ci dans les parties internes de la matrice. Le rendement est ainsi meilleur à des températures élevées car la désorption des molécules d'intérêt est augmentée (Bjurkland et Nilsson, 2000). Lorsqu'ils sont maintenus au-delà de 60°C, ils sont dégradés thermiquement (Spigno *et al.*, 2007).

VIII.2. Temps d'extraction

Le temps d'extraction est l'un des avantages de la MAE car il est généralement court : de quelques secondes à plusieurs minutes. Et il a été démontré que des temps d'extraction plus longs n'améliorent pas forcément le rendement et qu'ils induisaient des risques de dégradation de molécules thermolabiles plus élevés (Michel, 2011).

VIII.3. Type de solvant

Un bon choix de solvant est important pour obtenir un processus d'extraction optimal. Ce choix est déterminé par la solubilité des molécules d'intérêt et par les interactions solvant-matrice (Bjurkland et Nilsson, 2000).

VIII.4. Puissance d'irradiation

La puissance d'irradiation est choisie en fonction de la température et du temps d'extraction que l'on veut appliquer. Elle est généralement minimisée pour éviter d'atteindre

des températures d'extraction trop élevées et à l'inverse, augmentée pour diminuer le temps d'extraction (Michel, 2011).

VIII.5. Nature de la matrice

La teneur en eau de la matrice à une grande importance dans le processus d'extraction, car les molécules d'eau, qui ont une forte capacité à absorber les micro-ondes, jouent un rôle important dans le processus de chauffage. Afin d'obtenir des résultats reproductibles, la teneur en eau de la matrice à extraire doit être préalablement contrôlée (Michel, 2011).

IX. Propriétés des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont actuellement l'objet de nombreuses études car ils sont reconnus pour leurs diverses activités biologiques Trabelsi *et al.*, 2010, et ils sont rapportés pour des propriétés pharmacologiques intéressantes et variées, à savoir leurs propriétés anti-inflammatoires, anticancéreuse, antiallergique, antioxydant, anti-hypertenseurs, anti-arthritiques Rodriguez *et al.*, 2007, anti athérosclérose Halliwell, 2008, anti-agrégation plaquettaire Martin et Andriantsitohaina, 2002, inhibitrice d'enzymes Manthey *et al.*, 2001, antivirale Nijveldt *et al.*, 2001, antifongique Harborne et Williams, 2000 et antibactérienne (Wallas, 2004).

X. Activité antibactérienne d'autre plantes de la famille *Asteraceae*

Tableau II: Utilisation d'autre plantes de même famille (*P.Odora*) qu'a une même activité antibactérienne.

Espèce	Activité Antibactérienne	Référence
<i>Tussilago farfara L.</i>	fait partie d'un groupe de plantes qui ont un effet antibactérien sur le <i>Staphylococcus aureus</i> et le <i>S. aureus</i> résistant à la méthycilline	Ghédira <i>et al.</i> , 2015
<i>Tridax Procumbens</i>	Extrait méthanolique et l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de <i>T. Procumbens</i> montrent une activité antimicrobienne significative sur <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>B.</i>	Agban <i>et al.</i> , 2013

	<i>ceruus.</i>	
<i>Chromolaena Odorata</i>	Les extraits éthanoliques des feuilles de <i>C. odorata</i> ont une activité inhibitrice sur <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas sp</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> et <i>Klebsiella sp.</i>	Agban et al., 2013
<i>Saussurea lappa</i>	L'extrait chloroformique de racine a une forte activité antibactérienne sur les bactérieram à Gram positif (<i>B.Subtilis</i> , <i>S.aureus</i>) que les bactérie à gram négative (<i>E.Coli</i> , <i>P. Aeruginosa</i> , <i>K.pneumoniae</i>).	Alaagib et Ayoub, 2015

CHAPITRE III : Résistance Bactérienne

Les infections bactériennes sont généralement traitées par des antibiotiques. Mais la très grande utilisation souvent inadaptée de ces molécules antibactériennes a entraîné la sélection de souches multirésistantes (**Abedini, 2013**).

I. Résistance bactérienne

Un micro-organisme est considéré « résistant » lorsque sa concentration minimale inhibitrice CMI est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (**Guillot, 1989**). Parfois, la résistance à un antibiotique confère de la résistance à un autre antibiotique, et c'est ce que l'on appelle la résistance croisée (**Carle, 2009**).

Il y'a 2 types de résistance bactérienne

I.1. Résistance naturelle :

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce bactérienne sont résistantes à un antibiotique donné. Elle est permanente et d'origine chromosomique et transmise à la descendance lors de la division cellulaire (**Carle, 2009**).

I.2. Résistance acquise :

Les bactéries peuvent développer de la résistance à un antibiotique pour lequel elle a été préalablement sensible, suite à des changements génétiques, qui peuvent être de deux types : soit une mutation spontanée, soit l'acquisition de gènes par un autre micro-organisme. Cette résistance est souvent instable (**Carle, 2009**).

II. Les Antibiotiques

Antibiotique : du grec « anti », contre et « bios », la vie.

On appelle « Antibiotique » toute substance naturelle d'origine biologique élaborée par un organisme vivant (champignon ou bactérie) ou substance chimique produite par synthèse ou substance semi synthétique obtenue par modification chimique d'une molécule de base naturelle et ayant les propriétés suivantes :

- Activité antibactérienne.
- Toxicité sélective.
- Activité en milieu organique.
- Bonne absorption et bonne diffusion dans l'organisme (**Rahal, 2017**).

III. Méthode d'étude *in vitro* de l'activité antimicrobienne

III.1. L'antibiogramme

C'est un test qui permet de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne, *in vitro*. Il renseigne, par conséquent, sur la sensibilité des germes vis-à-vis des agents anti-infectieux (Tascini *et al.*, 2016). Les paramètres qui définissent l'activité antibactérienne d'un ATB sont la CMI (voir matériel et méthode) et la CMB.

III.2. La concentration minimale bactéricide CMB

La CMB est définie, selon Touati *et al.*, 2018, comme étant la plus faible concentration d'ATB entraînant après 24h de contact à 37°C une destruction considérable des bactéries avec un pourcentage de 0,01% de survivant.

➤ Principe de la CMB

D'après Touati *et al.*, 2018, Ce test est une suite de test de CMI pour déterminer la concentration la plus faible pour laquelle aucune croissance n'est observée. La CMB se réalise par préparation des tubes de bouillon nutritif qui seront inoculés avec la souche bactérienne, puis incubé à 37°C pour une période de 24h. La plus petite concentration ne montrant aucune croissance des microorganismes est considérée comme CMB.

IV. Caractéristique des quelques souches bactériennes utilisées

1. *Escherichia Coli* :

E. coli ou « colibacille » est un bacille aéro-anaérobie facultatif à Gram négatif Camille, 2014, qu'on trouve couramment dans le tube digestif de l'être humain et des animaux à sang chaud (Fig 15) Abdini, 2013, caractérisé par :

- Bactérie non sporulée
- Bactérie anaérobie facultative
- Mobile
- Sa longueur varie de 2 à 6 µm et sa largeur est de 1.1 à 1.5 µm (Steven *et al.*, 2004)

E. coli a une résistance naturelle aux 3 antibiotiques majeurs de l'infection urinaire communautaire, Ampicilline Riméthoprime et Sulfaméthoxazole (El Bakkouri *et al.*, 2009) mais d'après Kaspar *et al.*, 1990 *E. coli* devient résistant aux antibiotiques de la famille des Bêta-lactamine.

S'il aura un changement dans les facteurs de virulence la bactérie devient pathogène (Nauciel et vildé, 2005),

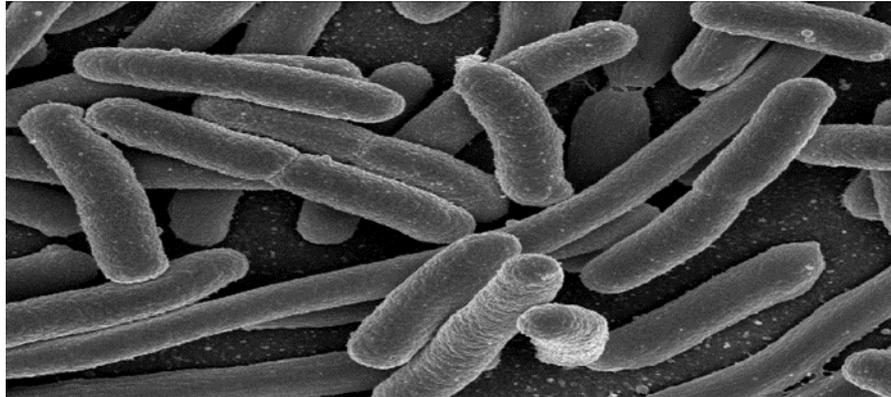


Figure 15 : *Escherichia coli* observé sous le microscope électronique à balayage (Niaid, 2019).

2. *Bacillus* :

Le genre *Bacillus* englobe des bactéries anaérobies facultatif à Gram positif, les cultures âgées peuvent apparaître à Gram négatif, sont des bâtonnets droits à extrémité carrée ou arrondie; de taille variable de 0.5-2.5 x 1.2-10 μm (Fig 16). Le plus souvent mobiles, à flagelles pérित्रiques (Sekhri *et al.*, 2005). Ces bactéries se trouvent largement dans le sol et l'eau (Britannica, 1993).

Les bacillus sont des bactéries qui résistent aux antibiotiques de la famille des β -lactamines (Lozniewski et Rabaud, 2010) et les études de Bernard, 2007 trouve que ce genre de bactérie peut acquérir une résistance aux Bacitracines.



Figure 16 : *Bacillus* au microscope électronique à balayage (Giraud, 2019)

3. *Klebsiella* :

Bacille aéro-anaérobie, immobile et Gram négatif. Il fait partie de la flore intestinale et peut être responsable d'infections urinaires et respiratoires (Abdini, 2013). Ce genre de bactérie est connu par sa résistance à Céphalosporine (Allouch *et al.*, 1995). D'après les études qui ont été faite par Brisse *et al.*, 2000 *klebsiella* développe une résistance aux Quinolones (Fig 17).

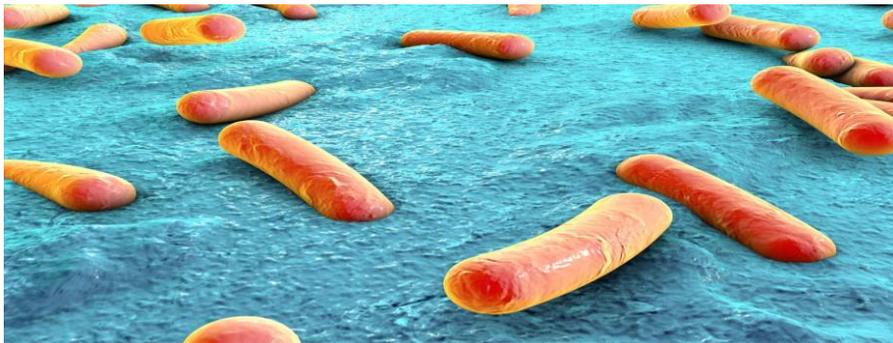


Figure 17 : *klebsiella* sous le microscope électronique (Helouard, 2020)

4. *Listeria*

C'est un petit bacille ($0,5 - 2 \mu\text{m} \times 0,5 \mu\text{m}$) (Fig 18), Gram positif, mobile à $20-25 \text{ }^\circ\text{C}$, non sporulé. Aéro-anaérobie facultatif, catalase positive sauf de rares souches. Le genre *Listeria* comporte 8 espèces dont l'espèce monocytogenes, cette bactérie est pathogène pour l'homme et les animaux. Elle est responsable d'une maladie touchant l'homme et les animaux appelée la listériose (Lailier *et al.*, 2015). Elle a une résistance au Céphalosporine et Fosfomycine, mais elle peut aussi développer une résistance aux Pénicillines, Aminoglycosides et Tétracyclines (Dabboussi *et al.*, 2013).

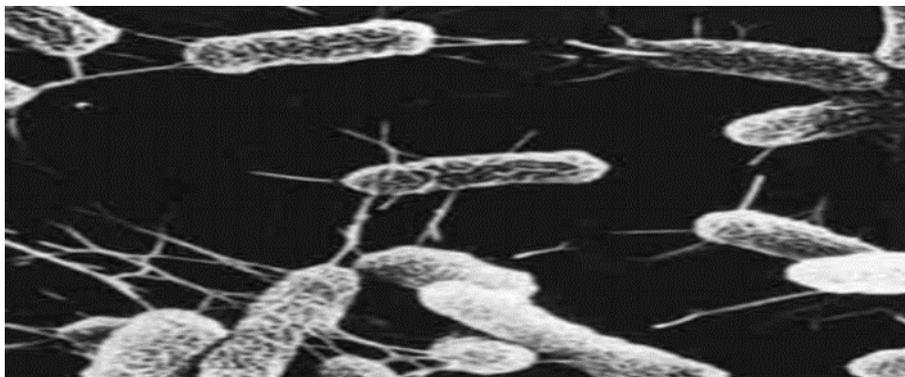


Figure 18 : *Listeria monocytogenèse* observé sous le microscope électronique (Lailier *et al.*, 2015)

5. *Entérobacter*

Les *entérobacter* sont des bacilles à Gram négatif de taille (2 - 4 μm longueur/0.4 – 0.6 μm largeur) (**Fig 19**), souvent mobiles par une ciliature péritriche ou immobiles, non sporulés et peuvent être capsulés, non exigeants, aéro-anaérobies facultatifs (capables de pousser en présence de dioxygène), sa croissance est facile sur les milieux ordinaire (**Hormaeche et Edwards, 1960 ; Niveau DCEM1, 2003**). Les espèces du genre *Enterobacter* sont naturellement résistantes aux aminopénicillines **Pagès, 2004**, ils sont retrouvés dans le sol, dans l'eau, les eaux usées (**Grimont et Grimont, 2015**). La plupart des espèces qui composent cette famille sont des hôtes normaux ou pathogènes du tube digestif de l'homme et des animaux, (**Gaston, 1988**).

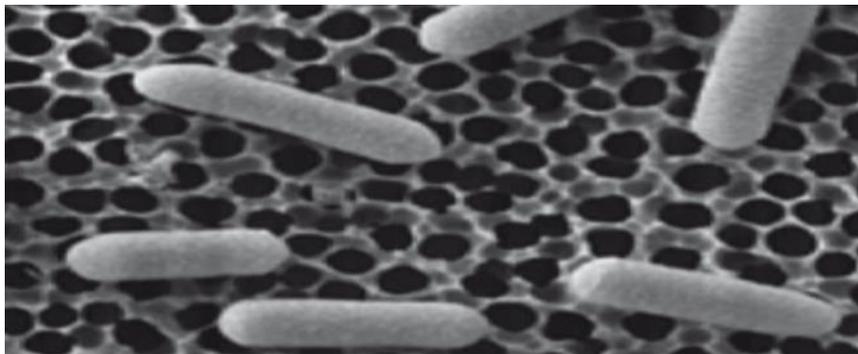


Figure 19 : Observation microscopique de l'*Entérobacter* (**Avril et al., 2000**).

PARTIE II : PARTIE PRATIQUE

La réalisation de notre travail a eu lieu au niveau des laboratoires de biochimie et de microbiologie de la faculté des sciences Biologique de l'Université AKLI MOUHAND OULHADJ, pendant la période allant du mois d'Avril au mois de Juin 2021.

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

Ce travail a été effectué sur la plante : *Pulicaria odora*, elle a été récolté afin d'étudier leurs propriétés antibactériennes après extraction des polyphénols.

Le matériel végétal est constitué de feuilles de la plante *Pulicaria odora* collecté de la région de Draa El Mizan, de la wilaya de Tizi ousou (Algérie) en Mois d'Avril 2021. La figure 12 montre l'aspect de la plante avant et après le séchage.

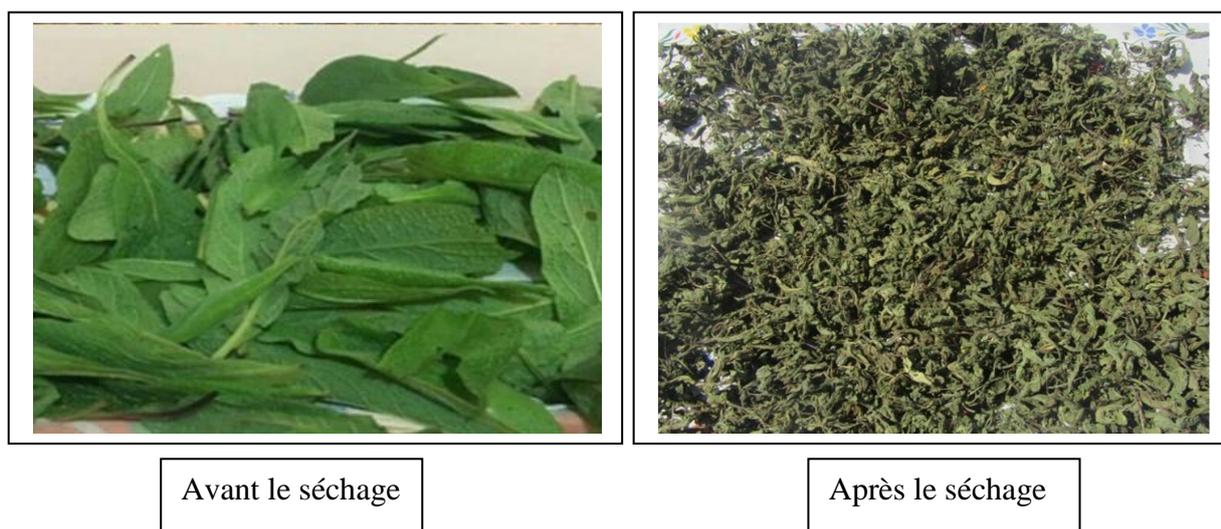


Figure 12 : Aspect de *Pulicaria odora* avant et après le séchage.

I.2. Appareils et réactifs

Le matériel et les différents réactifs utilisés pour l'extraction et les différents tests sont reportés dans les annexes (**Annexe I**).

I.3. Les souches bactériennes utilisées

Tableau III : Les souches bactériennes utilisées

Type de Gram	Les souches bactériennes
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876

Les bactéries Gram positif	<i>Listeria innocua</i> CLIP 74915
Les bactéries Gram négatif	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
	<i>Entérocooccus faecalis</i> ATCC 49542
	<i>Kleibsiella pneumonaise</i> ATCC 700603

I.4. Préparation de l'échantillon végétal

- Le séchage

La partie aérienne de la plante a été séchée à l'air libre, à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant trois semaine.

- Le broyage

L'échantillon végétal a été broyée dans un broyeur électrique (ENIEM) pour obtenir une poudre fine.

- La conservation

La poudre de la plante a été conservée dans des boîtes métalliques, à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité.

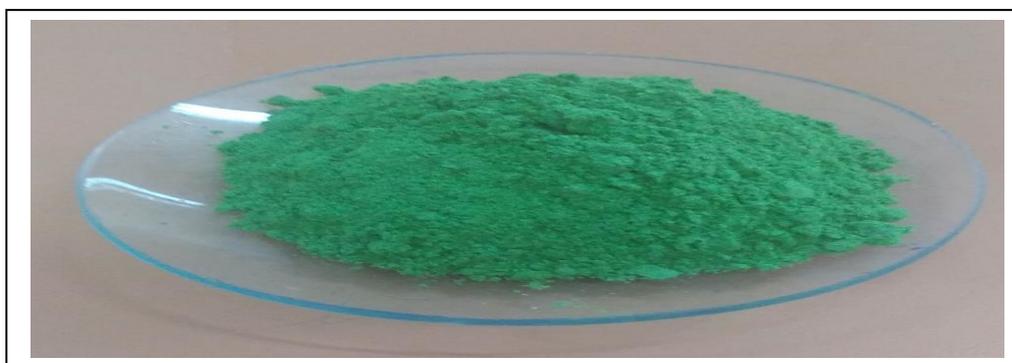


Figure 13 : L'aspect final de la plante

I.5. Screening phytochimique

Le screening phytochimique qui est effectué sur la plante *P. odora* L. a pour but de déterminer les métabolites secondaires existants dans cette plante (Bruneton *et al.*, 1999). Il est réalisé pour quelque test sur la poudre de plante et pour d'autres sur leur infusé. Les méthodes de caractérisation utilisées sont celles décrites par (Boizit et charpentier, 2006).

a) Préparation de l'infusé à 5%

5 g de la poudre *Pulicaria odora* L. sont mélangées dans 100 ml d'eau distillée chaude.

Après 15 à 20 minutes d'infusion, le mélange est filtré. Le filtrat ainsi obtenu est ajusté à un volume de 100 ml par l'eau distillée.

Les différentes méthodes du screening phytochimique effectuées sur la plante *Pulicaria Odora* sont représentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau IV: les différentes méthodes du screening phytochimique effectuées.

Type d'échantillon	Composé mis en évidence	Réactifs ajoutés	Résultat positif
Infusé	Tannins	5 ml de l'infusé + quelques gouttes de la solution FeCl ₃ à 5%	Apparition d'une coloration bleu noir
	Tannins galliques	5 ml de l'infusé + 2g d'acétate de sodium et quelque gouttes de FeCl ₃ à 5%	Apparition d'une coloration bleu foncé
	Anthocyanes	5 ml de l'infusé + quelque gouttes d'acide chlorhydrique (HCL)	Apparition d'une coloration rouge
	Saponosides	1 ml de l'infusé est agité pendant 2 min	Formation de mousse
	Mucilages	1 ml d'infusé + 5 ml d'éthanol absolu, incubé à une température ambiante pendant 15 min	Apparition d'un précipité floconneux
	Iridoïdes	2 ml d'infusé + quelques gouttes d'HCL puis chauffer sur plaque chauffante	Apparition d'une coloration bleue
Poudre végétal	Amidon	2g de poudre imbibé par quelques gouttes d'iode	Formation d'une coloration bleue violette
	Quinone libre	2g de poudre humecté par 2 ml d'HCL, mis en contact avec 20 ml de chloroforme pendant 3h	Apparition d'une coloration rouge

I.6. Extraction des polyphénols

Une quantité de 60g de la poudre végétal a été macérée dans 250 ml d'éthanol pendant 72 heures sous agitation magnétique. Une deuxième macération est effectuée sur le résidu qui est récupéré de la première macération, dans un volume de 125ml d'éthanol pendant 48h. Les filtrats des deux macérations ont été évaporés en utilisant un rotavapeur à 40 C° (Fig 13).

➤ Calcul du rendement de l'extraction

Le rendement de l'extraction est calculé par la formule suivante

Avec :

$$R\% = (P_1 - P_0) / p * 100$$

P₀ : la masse du pilulier vide

P : la masse du pilulier après l'extraction

(P-P₀) : la masse de l'extrait sec

p : la masse totale de la poudre végétal utilisée dans l'extraction

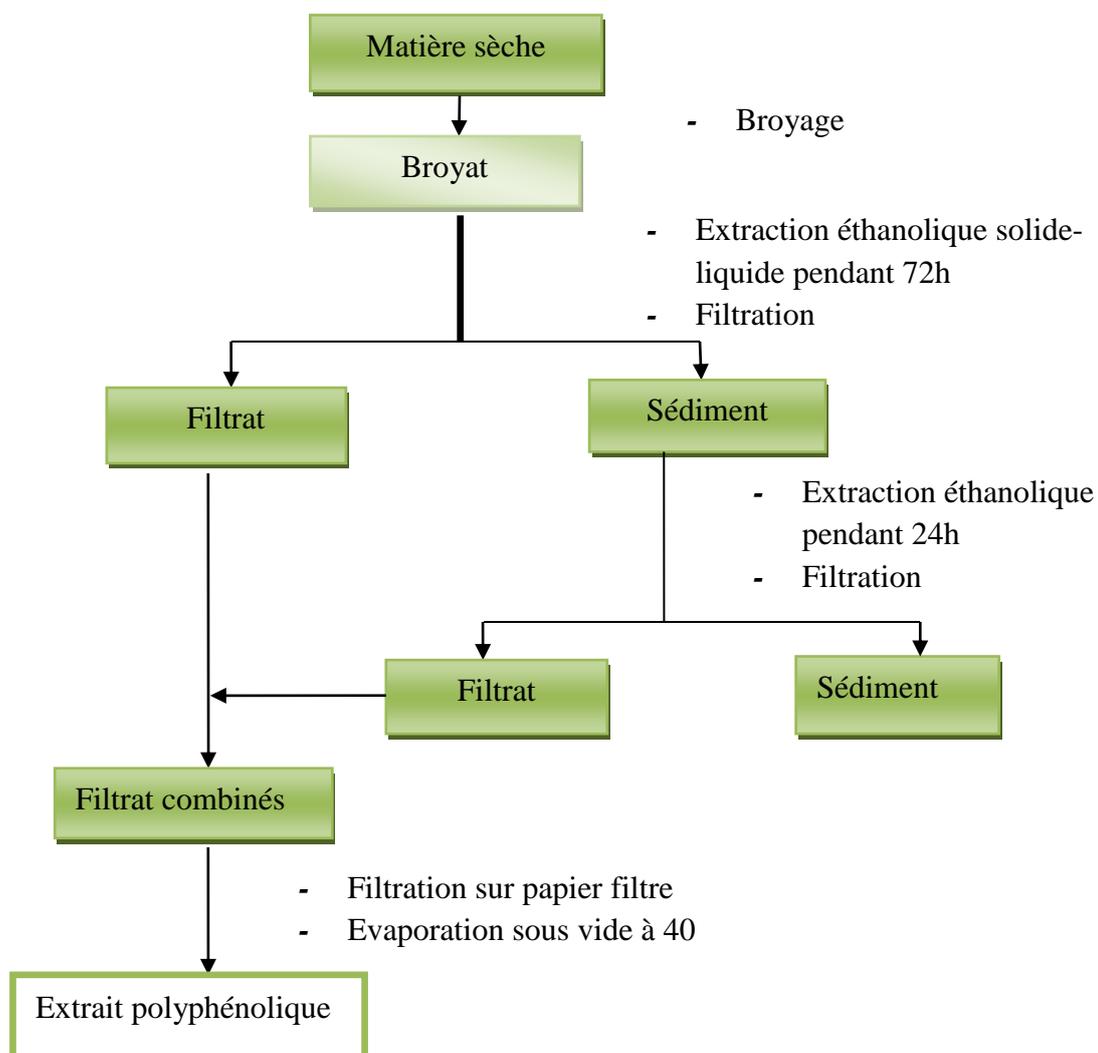


Figure 13 : Protocole d'extraction des polyphénols (Owen et John, 1999)

I.6. Dosage des polyphénols

❖ Principe

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin-Ciocalteu selon la méthode décrite par (Wong *et al.*, 2006). Ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). L'intensité de la couleur mesurée à 765 nm est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés (Boizot et charpentier, 2006). (Fig 14)

❖ Mode opératoire

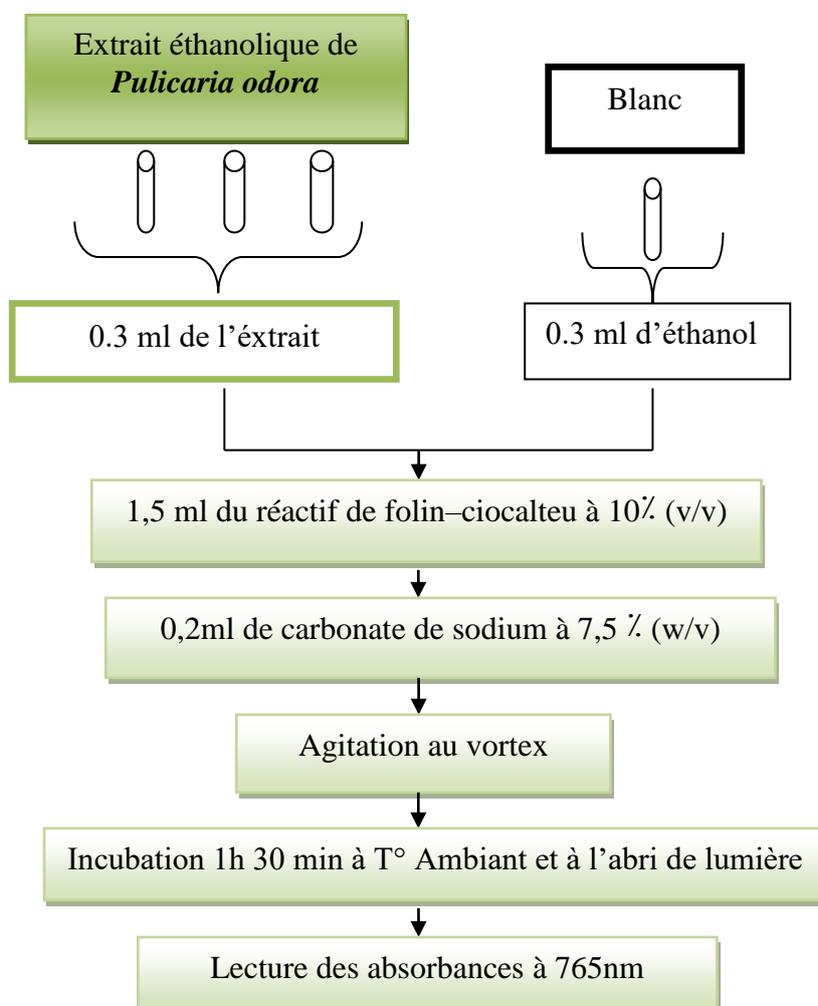


Figure 14: Dosage des polyphénols totaux selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Boizot et charpentier, 2006).

❖ Expression des résultats

La concentration des polyphénols totaux a été déterminée en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée avec "l'acide gallique" comme standard. Les résultats sont exprimés en (mg EAG/ g MS)

Les teneurs en polyphénols totaux (PPT) sont calculées selon la formule suivante (**Bentabet-lasгаа, 2015**).

$$\text{PPT} = a \times f / b$$

a : concentration en polyphénols en mg/ml déterminée à partir de la courbe d'étalonnage

f : facteur de dilution

b : concentration initial de l'extrait (mg/ml)

I.6. Dosage des flavonoïdes

❖ Principe

Le dosage des flavonoïdes est déterminé par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) **Kosalec et al., 2004** avec quelque modification. Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Ils forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). (**Fig 15**)

❖ Mode opératoire

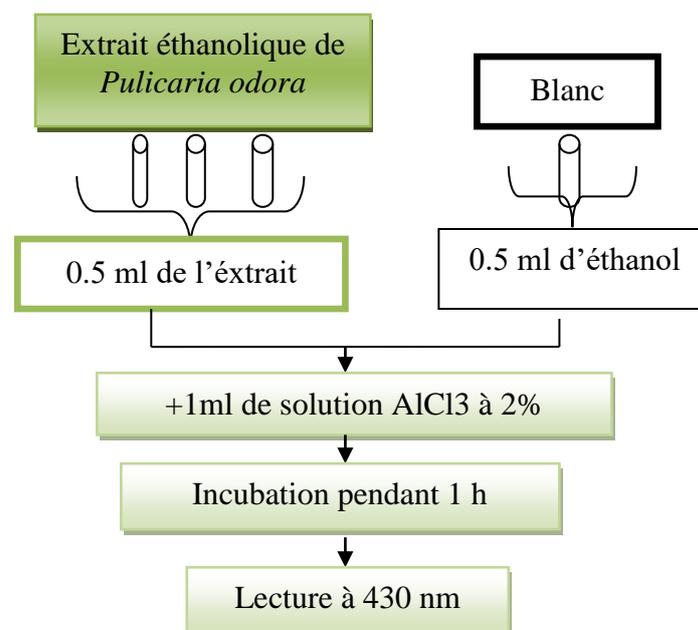


Figure 15 : dosage des flavonoïdes par la méthode de (**Kosalec et al. 2004**)

❖ Expression des résultats

Les concentrations des flavonoïdes contenus dans l'extrait de la plante ont été calculés en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard, les résultats sont exprimés en mg équivalent en quercétine/ g d'extrait.

II. **Activité antimicrobienne des extraits polyphénoliques de *Pulicaria odora***

Nous avons testé l'activité des polyphénols de la plante à différentes concentrations vis-à-vis de quelques souches bactériennes par la méthode des puits.

II.1. Préparation de l'extrait éthanolique

L'extrait de *Pulicaria odora* est solubilisé dans l'éthanol à une concentration de 1g/5ml.

II.2. Préparation de milieu de culture

Les milieux de cultures (Mueller Hinton) et la (gélose nutritive) en poudre sont été préparée par la dissolution de **28,5g** dans **750 ml** et **11,25g** dans **401, 78ml** est ensuite stérilisé dans l'autoclave pendant 20 min à 121 C°, des boites de pétri ont été coulé avec 4 mm de milieu, ensuite ont été laissé jusqu'a la solidification comme (**Fig 16**).



Figure 16 : Préparation des boites de pétri

II.3. Revivification des souches

Les souches bactériennes à tester sont repiquées par la méthode des stries la gélose nutritive, puis incubées à 37C° pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir des cultures jeunes comme (**Fig 17**).



Figure 17 : La revivification des souches

II.4. Préparation de l'inoculum bactérien

La suspension bactérienne a été préparée à partir des cultures bactériennes revivifiées. À l'aide d'une anse de platine, quelques colonies ont été prélevées puis introduites dans des tubes à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile (**Fig 18**). Après une homogénéisation des tubes pendant quelques secondes, une lecture de densité optique de chacune des suspensions préparées a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde de 625 nm. La densité optique doit être comprise entre 0.08 et 0.1, ce qui correspond à une concentration de 10^8 UFC/ml.

L'inoculum préparé est dilué au $1/100^{\text{em}}$ dans l'eau physiologique pour avoir une concentration finale de 10^6 UFC/ml, comme indiquée par le (**CASFM, 2001**).



Figure 18 : Préparation de la suspension bactérienne

II.5. Etude de l'effet antibactérien de l'extrait par la méthode de diffusion par puits sur gélose

Le milieu Mueller Hinton a été coulé sur boîte de pétri, après refroidissement, on réalise un ensemencement par la méthode de stries serrées, ensuite, on réalise sur chaque boîte 6 puits en utilisant un embout stérile. Dans chaque puits on met un volume d'extrait éthanolique (20, 40, 60, 80, 100 μ l). Un témoin contenant 100 μ l d'éthanol est utilisé dans chaque boîte comme (Fig 19).

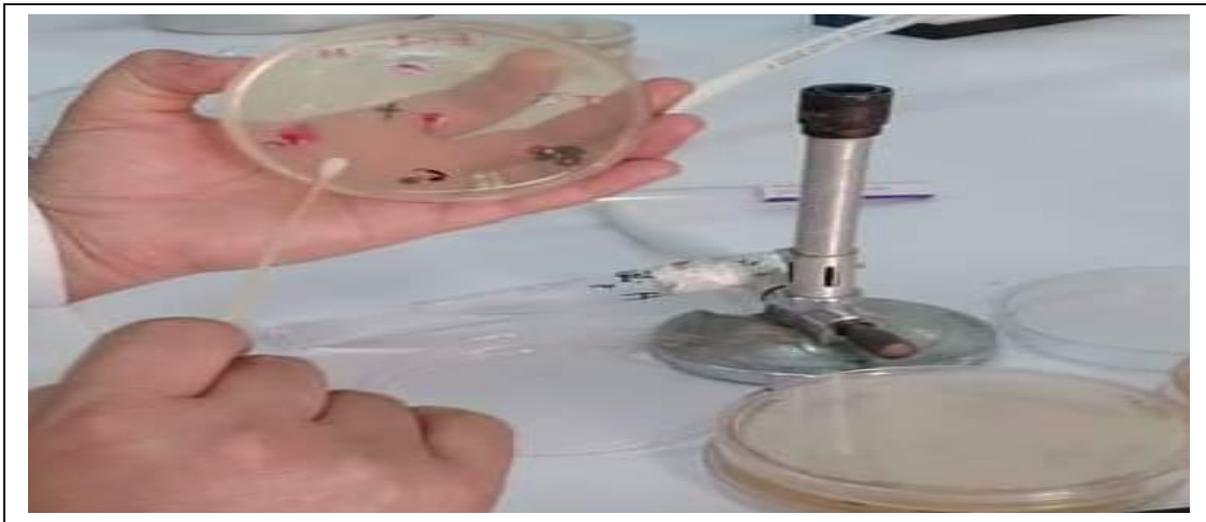


Figure 19 : Ensemencement en stries serrées et la réalisation de la méthode de diffusion en puits

Les boîtes ont été placées au réfrigérateur à 4C° pendant 24h. Puis incubé dans l'étuve à 37C° pendant 24h.

❖ Lecture de résultat

Après l'incubation, on mesure de diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque puits. Plus le diamètre de la zone est grand plus la souche est sensible.

L'échelle de l'estimation de l'activité antibactérienne est donnée par (Touati *et al.*, 2017).

- Résistante : $D < 8$ mm
- Intermédiaire : $15 \text{ mm} \geq D \geq 8$ mm
- Sensible : $D > 15$ mm

II.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI

Selon Muylaert et Mainil, 2013. La CMI est la plus faible concentration d'ATB capable d'inhiber la croissance des bactéries après une période d'incubation de 18 à 24 heures.

La détermination de la CMI se fait soit sur milieu liquide soit sur milieu solide

1. La méthode de dilution sur milieu solide

Cette méthode consiste à réaliser des dilutions de l'extrait dans un milieu de culture gélosé préalablement fondu et maintenu en surfusion à 45 C°.

L'ensemencement est effectué soit par inondation à partir d'une suspension de microorganisme préparé de façon homogène, soit par dépôt ponctuel à l'aide d'une anse de platine. La lecture de résultat se fait à l'œil nue par observation de la croissance ou de l'inhibition de la croissance du microorganisme testé par rapport à sa croissance sur une boîte témoin sans extrait (Kpemissi, 2007).

2. La Méthode de dilution sur milieu liquide

Cette méthode consiste à réaliser des dilutions successives, dans le milieu de culture à partir d'une solution mère de l'extrait à une concentration reconnue. On ajoute à ces dilutions une suspension de microorganismes. Après l'ensemencement, le tout est incubé pendant un temps et à une température donnée en fonction du microorganisme.

La lecture des résultats se fait visuellement ou par mesure de la turbidité au spectrophotomètre à 625 nm (Kpemissi, 2007).

- Dans notre travail la CMI a été réalisée sur un milieu solide, selon la technique de (Amhis *et al.*, 2001).

Cette technique consiste à répartir dans des tubes à essai un volume de 20ml de la gélose Mueller Hinton en surfusion. Des doses de l'extrait végétal sont ajoutés dans les milieux, pour avoir des concentrations croissantes finales dans le milieu de : 0.05 mg/ml ; 0.1 mg/ml ; 0.2 mg/ml ; 0.4 mg/ml ; 0.8 mg/ml dans chaque tube.

Une fois mélangé, on verse le contenu de chaque tube dans une boîte de pétri et on laisse à solidifier. On ensemence sur cette série de boîtes plusieurs souches microbiennes sous forme de bande parallèles.

Une boîte témoin contenant 0.8 ml d'éthanol et 20 ml de gélose Mueller Hinton en surfusion est ensemencée de la même manière. Comme (**Fig20**)

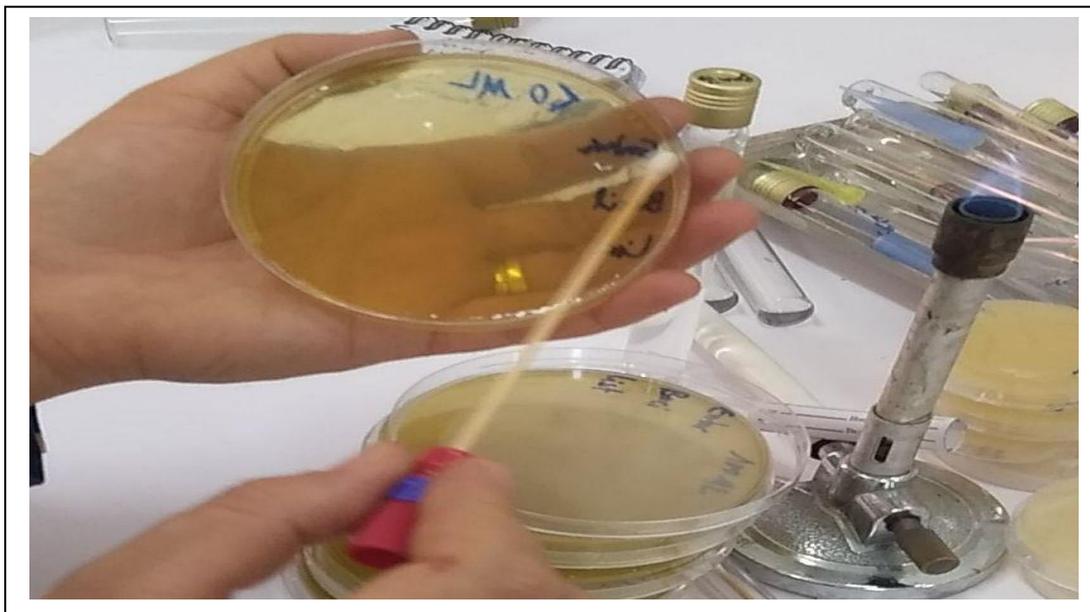


Figure 20 : La méthode de dilution sur milieu solide

❖ Lecture des résultats

La CMI est donnée par la première concentration qui supprime sur la gélose toute culture apparente. D'après **Yakhlef et al., 2011**, l'efficacité de l'extrait végétale sur la base de la CMI est comme suit :

- Forte inhibition : CMI inférieure à 500 $\mu\text{g/ml}$
- Inhibition modérée : CMI varie de 600 à 1 500 $\mu\text{g/ml}$
- Faible inhibition : CMI supérieure à 1 600 $\mu\text{g/ml}$.

CHAPITRE II : Résultats et discussions

II.1. Le screening phytochimique

L'ensemble des résultats du screening phytochimique de la plante *Pulicaria odora* sont présenté dans le tableau IV

Tableau V : Résultat des tests phytochimiques de la plante *Pulicaria odora*

Composés chimique	Résultats	
Tannins	+++	
Tannins gallique	+++	
Anthocyanes	--	
Saponosides	+++	
Mucilage	+++	
Iridoïdes	--	
Amidon	+++	

Quinone libre	--	
---------------	----	--

(-) : Test négatif (absence de métabolite)

(+) : Test positif (présence de métabolite)

Le screening phytochimique réalisé sur la poudre et l'infusé des feuilles de *Pulicaria odora* à démontrer que notre plante est riche en : Mucilage, Tannins, Tannins gallique, Saponoside, Amidon. Alors qu'elle est dépourvue des Irridoïdes, Anthocyanes et les quinones libres.

Nos résultats concordent avec l'étude de **Ezoubeiri et al., 2005** menée sur *Pulicaria odora* qui indique la richesse de cette plante en saponosides. De même **Kamkar et al., 2013** ont affirmé que les composants majeurs de *Pulicaria gnaphalodes* L, une espèce du genre *Pulicaria*, sont représentées par les Tannins et d'autres composés phénoliques.

II.2. Le rendement d'extraction des polyphénols

L'extraction des composés phénoliques par l'éthanol des feuilles de *P. odora* nous a permis de déterminer le rendement de l'extrait brut. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau VI.

Tableau VI: Rendement d'extraction des composés phénoliques de *Pulicaria odora*

	Masse de pilulier vide (g)	Masse de pilulier + l'extrait (g)	Masse de l'extrait sec (g)	Masse de poudre utilisée (g)	Rendement en %
<i>Pulicaria odora</i>	26.85	30.49	3.64	60	6.066

D'après ces résultats, on note que la valeur de rendement obtenue durant notre travail (6.066 %) est supérieure à celle rapporté par (**Cherifi et Hami, 2017**) qui est de l'ordre de 3,349 par macération aqueuses. Cette différence dans le rendement peut être probablement liée au type de solvant d'extraction utilisé et leur polarité. En effets, Selon **Spigno et al., 2007**,

l'extraction dépend de plusieurs paramètres y compris le volume et la nature de solvant utilisé, la température et le temps d'extraction.

II.3. Dosage des polyphénols totaux (analyse quantitative)

La méthode suivie pour doser les PPT de l'extrait des feuilles de *Pulicaria odora* est la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (Abdel-Hameed, 2009).

La quantité des polyphénols totaux est déterminée par l'équation de régression : $Y = ax + b$ exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de l'extrait sec (Annexe 4).

Les résultats du dosage des PPT de notre plante est de $181,6 \pm 0,07$ mg EAG/g de l'extrait sec.

Nos valeurs sont supérieures à celles enregistrées par (Touati *et al.*, 2018) qui ont indiqué pour les feuilles de la plante médicinale *Pulicaria odora* une teneur de $90 \pm 0,63$ mgEAG/g, en utilisant méthanol comme solvant d'extraction. D'autre part Marwah *et al.*, 2007, ont obtenu une teneur de 96,6 mgEAG/g pour l'espèce *Pulicaria crispa*. Ce résultat a été obtenu par extraction éthanolique à 20%, en utilisant toute la plante et non pas les feuilles uniquement.

Une autre étude réalisée par Petacci *et al.*, 2012, sur les feuilles de 12 espèces d'Asteraceae collecté en Brazil, ils ont trouvé $32,65 \pm 0,07$ mgEAG/g pour *Lychnophora ramosissima*, en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction.

De même Liu *et al.*, 2008, ont indiqué pour les espèces : *Flos chrysanthemi*, *Herba taraxaci*, *Herba cephalanoploris* de la famille des Asteraceae des teneurs en polyphénols de l'ordre de $21,93 \pm 1,36$; $11,52 \pm 0,89$; $16,85 \pm 0,41$ mgEAG/g respectivement en utilisant l'éthanol à 60% pour l'extraction.

D'autre part Wojdylo *et al.*, 2007, ont signalée que la famille des Asteraceae présente des teneurs élevées en composés phénoliques par rapport aux autres familles botaniques. D'ailleurs Miliauskas *et al.*, 2004 ont aussi indiqué que les polyphénols sont des constituants majeurs des plantes du genre *Pulicaria*.

Ces variations dans les résultats sont liées à plusieurs facteurs. D'après Touati *et al.*, 2018, le contenu phénolique varie en fonction des facteurs climatiques et environnementaux (la région, sol, salinité... etc.), facteurs génétique, la durée de stockage de la plante (Bouزيد *et al.*, 2011), la période et le stade de développement de la plante (Miliauskas *et al.*, 2004).

De plus **Lee *et al.*, 2003** a indiqué que la méthode d'extraction et de quantification peuvent influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux.

II.4. Dosage des flavonoïdes (analyse quantitative)

La teneur en flavonoïdes a été estimée par la méthode colorimétrique de trichlorure d'aluminium (**Bahorun *et al.*, 1996**).

La quantité des flavonoïdes est déterminée par l'équation de régression : $Y = ax + b$ (**annexe 5**) exprimés en mg d'équivalent de quercitine par gramme de l'extrait sec.

Notre plante présente une teneur en flavonoïdes de $93,8 \pm 0,06$ mgEq/g de l'extrait sec.

Dans une étude menée par **Touati *et al.*, 2018** sur les feuilles et les racines de la plante *Pulicaria odora*, une teneur de $11,34 \pm 3,15$ mgEc/g a été retrouvé en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction.

Une autre étude réalisée par **Conforti *et al.*, 2009**, sur les feuilles de cinq espèces de la famille des Asteraceae a mis en évidence des teneurs en flavonoïdes allant de 7,49 à 32,9 mgEq/g, en utilisant un mélange éthanol/eau à 70% comme solvant d'extraction.

De même **Liu *et al.*, 2008**, ont trouvée des valeurs inférieures à notre 24.26 ; 26.91 ; 28.35 mgEr/g dans trois espèces de la famille des Asteraceae en utilisant l'éthanol à 60% pour l'extraction.

D'autres études ont suggéré la richesse en flavonoïdes chez des espèces végétales appartenant à la famille des Astéracées (**Bohm et Tod, 2001**).

Les travaux menés par **Spigno *et al.*, 2007**, ont montré que l'éthanol extrait efficacement les flavonoïdes et les catéchols des matières végétales. La différence dans la polarité des solvants d'extraction, influence la solubilité des constituants chimiques d'un échantillon et aussi le rendement d'extraction (**Sulaiman *et al.*, 2011**).

II.5. Activité antibactérienne

L'activité antimicrobienne de l'extrait de la plante *Pulicaria odora* a été évaluée sur des souches bactériennes à Gram positif et Gram négatif par la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller Hinton.

Tableau VII: Diamètre des zones d'inhibition de différents volumes de l'extrait éthanolique de *Pulicaria odora*. (Concentration 1g/μl)

Les souches bactériennes	Volume de l'extrait éthanolique	Diamètre de la zone d'inhibition (mm) / Profil de sensibilité	Activité antibactérienne des polyphénols
<i>Enterococcus faecalis</i>	20	10 : moyenne	
	40	12 : moyenne	
	60	14 : moyenne	
	80	17 : sensible	
	100	24 : très sensible	
<i>E coli</i>	20	0	
	40	0	
	60	0	
	80	0	
	100	0	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	0	
	40	0	
	60	0	
	80	0	
	100	0	
<i>Bacillus cereus</i>	20	8 : moyenne	
	40	11 : moyenne	
	60	14 : moyenne	
	80	15 : moyenne	
	100	19: sensible	

<i>Listeria innocua</i>	20	15 : moyenne	
	40	17 : sensible	
	60	20 : sensible	
	80	24 : très sensible	
	100	25 : très sensible	

L'activité antibactérienne de l'extrait a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des puits contenant l'extrait éthanolique de *Pulicaria odora* à différentes concentrations tester.

D'après les résultats obtenus nous avons évalué que l'extrait de la plante à un effet inhibiteur sur presque toutes les souches bactériennes testées. L'effet inhibiteur augmente avec la concentration de l'extrait.

Contrairement à la souche d'*Escherichia Coli qui* n'a présenté aucun effet inhibiteur avec les différentes concentrations. Les souches de *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* et *Listeria innocua* qui ont été sensibles. D'ailleurs la souche *Bacillus cereus* a une zone d'inhibition de 19mm, *Entérocooccus faecalis* avec 24mm et *Listeria innocua* avec 25mm pour la plus grande concentration qui est de 100mg/ml.

L'étude de l'activité éthanolique des feuilles de *Pulicaria odora* montre un effet inhibiteur sur Pour la souche *Klebsiella pneumoniae*, on a observé une zone de sensibilité même avec le témoin ethanol donc, on ne peut prendre en considération l'effet de l'extrait.

Concernant notre plante *Pulicaria odora*, à notre connaissance, il n'existe aucune étude qui parle sur l'activité antimicrobienne des extraits polyphénoliques, très peu de données ont été retrouvées concernant sa composition chimique et ses activités biologiques. Le peu de travaux disponibles ont été accentués sur l'effet des huiles essentielles. D'ailleurs, des huiles essentielles extraites des racines de cette plante se caractérisent par une activité antibactérienne et antifongique (Hanbali *et al.*, 2005, Ezubeiri *et al.*, 2005). Pendant que, des travaux menés avec différentes espèces du genre *Pulicaria*, ont signalé que les extraits

éthanoliques et méthanoliques de l'espèce *Pulicaria undulata* sont actifs sur la souche *Bacillus subtilis* (El-kamali et Mahjoub, 2009) confirmant ainsi notre résultat.

La différence de sensibilité des souches microbiennes aux extraits biologiques peut être expliquées par une adaptation évolutive liée à bout aux conditions biotiques (l'espèce elle-même) et abiotique (milieu).

D'après Çolak *et al.*, 2009, la sensibilité d'un microorganisme à un extrait dépend des propriétés de type de polyphénols et du microorganisme lui-même.

Dans notre étude, les souches bactériennes testées à Gram positif sont plus sensibles que les souches à Gram négatif. Cette différence dans la sensibilité aux extraits peut être due à la différence de la structure entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Shtayeh *et al.*, 1998). Selon Çolak *et al.*, 2009, les bactéries Gram négatif sont généralement plus résistantes, l'absence d'activité chez ces bactéries est dû à la présence d'une membrane externe qui possèdent des polysaccharides, protéines et des phospholipides dans leur paroi cellulaire servant comme barrière aux agents bioactifs.

De plus, Trambetta *et al.*, 2005, ont conclu que l'effet antimicrobien des composés polyphénoliques est partiellement dû à une perturbation des fractions lipidiques de la membrane plasmique des bactéries. Alors que, ces composés phénoliques altèrent la perméabilité de la membrane et causant la perte de ses organites intracellulaires.

De même, les résultats obtenus par Hanbali *et al.*, 2005, lors de leur étude sur les huiles essentielles de *Pulicaria odora* ont démontré que cette dernière possède une très bonne activité sur *Bacillus cereus* avec un diamètre de 30mm pour une concentration de 5g/ml, ce qui correspond à nos résultats. De même Stayeh *et al.*, 1998, ont souligné que l'activité obtenue sur *Escherichia coli* par l'extrait éthanolique et aqueux de l'espèce *Inula viscosa* à une concentration de 200mg/ml a donné une zone d'inhibition de 6 mm (résistante). Ce résultat concorde avec le nôtre car aucune activité n'est observée même pour les concentrations élevées.

Cependant, l'extrait méthanolique et aqueux de *Pulicaria stephanocarpa* n'a donné aucune activité pour *Escherichia coli* (Mothana et Lindequist, 2005).

De plus **Stayeh et al., 1998**, ont démontré que l'activité obtenue sur *Klebsiella pneumoniae* par l'extrait éthanolique de *Inula viscosa*, une espèce qui appartient à la famille des Asteraceae, a donné une zone d'inhibition de 9 mm pour une concentration de 200mg/ml d'extrait. Dans notre étude, la souche *Klebsiella pneumoniae* à une zone d'inhibition dans le témoin donc on ne peut pas prendre en considération les autres zones d'inhibitions.

Ensuite l'étude de **Gherib et al., 2006**, sur *Pulicaria Mauritanica* a démontré que l'huile essentiel de cette dernière possède une activité sur *Enterococcus faecalis* avec un diamètre de 22,7±1,5mm. Il est en accord avec notre résultat, donc l'extrait éthanolique de notre plante à un effet inhibiteur sur la souche *Enterococcus faecalis*, qui est de Gram négatif.

L'étude de **Alzoreky et nakahana, 2003**, mené sur *Pulicaria orientalis* montre une inhibition de la croissance de *Listeria monocytogenes* avec une zone de 12 mm à 17 mm à une concentration de 800µg/ml. Ce résultat est inférieur au notre.

II.6. Détermination de concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice de l'extrait de *Pulicaria odora* sur les souches bactériennes sensibles est représentée dans le tableau VIII

Tableau VIII: Etat de croissance des souches bactériennes sensibles sur gélose Mueller Hinton additionnée de différentes doses d'extrait polyphénolique de *Pulicaria odora*

Doses de l'extrait en mg/ml	Témoin 0	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8
Les souches						
<i>Enterococcus faecalis</i>	+++	+++	+++	++	+	---
<i>Bacillus cereus</i>	+++	+++	+++	++	+	---
<i>Listeria innocua</i>	+++	+++	+++	++	+	---

+++ : Croissance bactérienne très abondante

++ : Croissance bactérienne moyennement abondante

--- : absence de la croissance bactérienne

L'analyse des données expérimentales montre que comparativement à la boîte témoin de contrôle négatif contenant l'éthanol à 95°, il ya une diminution du nombre de colonies des souches testés avec l'augmentation de la concentration de l'extrait.

Nos résultats montrent que l'extrait éthanolique de *Pulicaria odora* manifeste une activité antibactérienne, en inhibant la croissance *in vitro* des germes bactériens (figure 21), ce qui nous permet de déterminer le paramètre antibactérien : la concentration minimale inhibitrice CMI qui est de 0.8mg/ml pour toutes les souches testées *Entérobacter faecalis*, *Bacillus cereus*, *Listeria innocua*

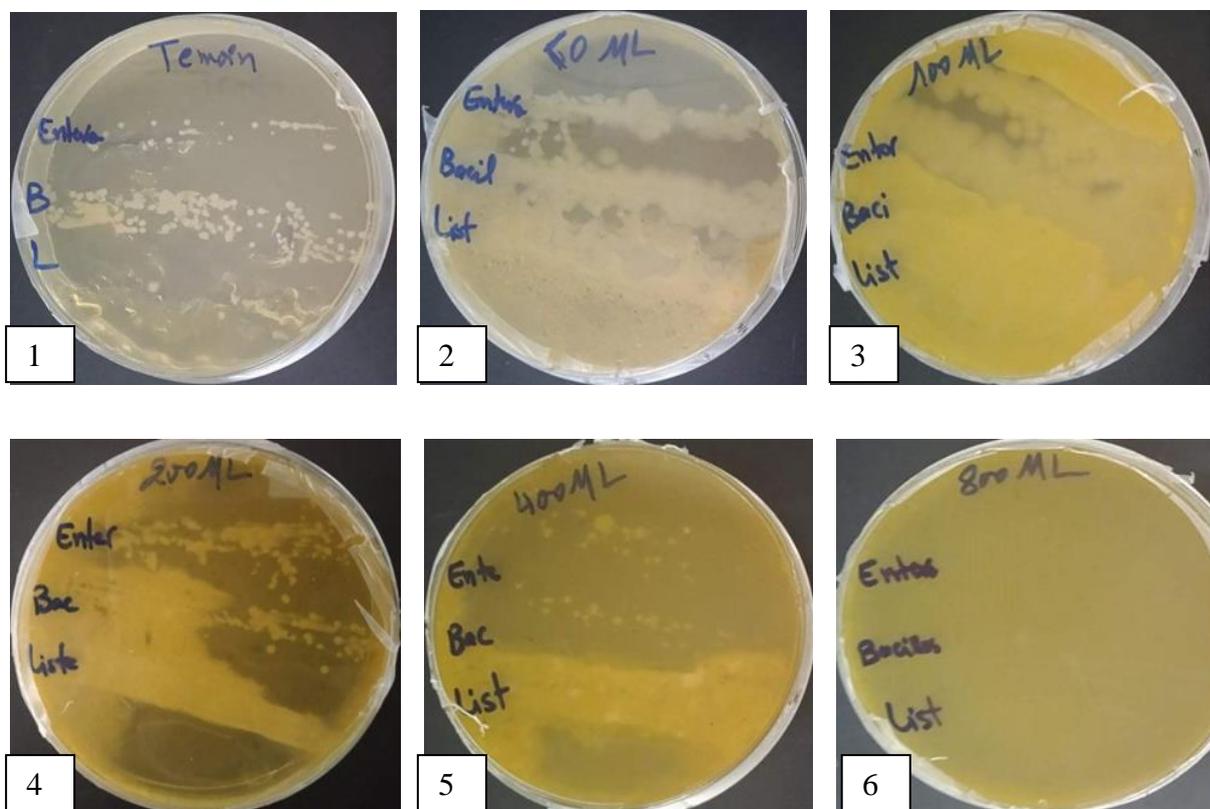


Figure 21 : Aspect des cultures bactériennes sur gélose Mueller Hinton (MH), en présence de doses croissantes de l'extrait brut polyphénolique de *Pulicaria odora*

Ent : *Enterococcus faecalis*, **Bac :** *Bacillus cereus*, **Lis :** *Listeria innocua*

(1) : Culture sur gélose MH+extrait éthanolique à 0 mg/ml, (2) : culture sur gélose MH+extrait éthanolique à 0,05 mg/ml, (3) : culture sur gélose MH+extrait éthanolique à 0,1 mg/ml, (4): culture sur gélose MH+extrait éthanolique à 0,2 mg/ml, (5) : culture sur gélose

MH+extrait éthanolique à **0,4** mg/ml, (6) : culture sur gélose MH+extrait éthanolique à **0,8** mg/ml.

Des études réalisées par **Touati et al., 2018**, montre que la CMI de l'extrait méthanolique des feuilles de *Pulicaria odora* sur la souche *Bacillus subtilis* est de 1,6mg/ ml. Nos résultats sont meilleurs car notre extrait à un effet inhibiteur avec une concentration inférieure.

Les polyphénols peuvent impliquer multiples modes d'actions tels que :

La privation des ions métalliques, action directe sur le métabolisme microbien par l'inhibition de la phosphorylation oxydative. Ainsi L'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes (**Scarlburt, 1991**). Aussi la dégradation de la paroi cellulaire et la perturbation de la membrane cytoplasmique. Les polyphénols influent également sur la synthèse de l'ADN et de l'ARN, des protéines et des lipides (**Zhang et al., 2009 ; Piéboji, 2007**).

Ces résultats nous laissent penser que les extraits polyphénoliques de *Pulicaria odora* peuvent être considérés comme des agents antibactériens, notamment contre les souches *Enterococcus faecalis* et *Listeria innocua* qui sont connues pour leur aptitude à provoquer des infections et leur pouvoir élevé à acquérir des résistances aux antibiotiques.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

Les plantes aromatiques restent toujours la source principale des molécules bioactives connus par leurs propriétés thérapeutiques.

Plusieurs études ont été réalisées sur les plantes appartenant à la famille des Asteraceae, ils ont montré la richesse de ces dernières en composés naturel bioactifs. Il existe peu de données sur la composition chimique et le potentiel antimicrobien de *Pulicaria odora*.

Au cours de ce travail, nous avons réalisé l'extraction de polyphénols de *Pulicaria odora*, puis on a testé leur effet antimicrobien *in vitro*.

Le screening phytochimique a mis en évidence la présence des tannins gallique, mucilage, saponoside et l'amidon, mais l'absence totale des Irridoïdes, anthocyanes et quinones libres.

La détermination de rendements en polyphénols de cette plante à montrer qu'elle possède un taux élevé en polyphénols (6,06%).

Après dosage de ces composés phénoliques par la méthode de Folin Ciocalteu, la teneur en polyphénols a été estimée à 181,6 mgEAG/g de l'extrait sec.

En effets, le dosage des flavonoïdes par la méthode colorimétrique de trichlorure d'aluminium à montrer que cette plante possède une teneur de 93,8 mgEq/g de l'extrait sec.

Les résultats de nos travaux sur l'effet antimicrobien ont montré une bonne activité de l'extrait ethanologique des feuilles de *Pulicaria odora* sur les souches de gram positif testés à savoir *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Listeria innocua* CLIP 74915, alors que les souches de Gram négatif, elles ont été toutes résistantes, sauf la souche d'*Enterococcus faecalis* ATCC 49542 pour laquelle on a remarqué une bonne sensibilité.

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à montrer que les polyphénols de notre plante ont un effet antibactérien avec une CMI de 0,8 mg/ml.

En perspectives, il est intéressant de continuer cette étude dans le but

- De bien identifier ces composés phénoliques par des techniques plus précises telles que l'HPLC, GS/SM.
- Elargir l'étude de l'activité antimicrobienne des extraits polyphénoliques sur d'autres espèces bactériennes pathogènes pour la santé humaine ;
- De déterminer le mode d'action des polyphénols sur les bactéries à Gram négatif et à Gram positif

Conclusion

- Il sera intéressant d'affiner cette étude par une étude *in vivo* afin d'évaluer le degré de la toxicité de ces polyphénols pour pouvoir cerner tout effet indésirable.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références

A

- Andersen Ranberg, J., Kongstad, K. T., Nielsen, M. T., Jensen, N. B., Pateraki, I., Bach, S. S., & Hamberger, B. (2016). Expanding the landscape of diterpene structural diversity through stereochemically controlled combinatorial biosynthesis. *Angewandte chemie internationale edition*, 55(6), 2142-2146.
- Agban, A., Gbogbo, K. A., Amana, E. K., Tegueni, K., Batawila, K., Koumaglo, K., & Akpagana, K. (2013). Évaluation des activités antimicrobiennes de *Tridax procumbens* (asteraceae), *Jatropha multifida* (euphorbiaceae) et de *Chromolaena odorata* (asteraceae). *European Scientific Journal*, 9(36).
- Abedini, A. (2013). Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes (Doctoral dissertation, Université du Droit et de la Santé-Lille II).
- Alaagib, R. M. O., & Ayoub, S. M. H. (2015). On the chemical composition and antibacterial activity of *Saussurea lappa* (Asteraceae). *The Pharma Innovation*, 4(2, Part C), 73.
- Allouch, P. Y., Labia, R., Pina, P., & Morin, E. (1995). Observatoires hospitaliers de la sensibilité de *E. coli* et de *Klebsiella* à l'association amoxicilline-acide clavulanique en 1994. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 25(8-9), 934-939.
- Ali-Shtayeh, M. S., Yaghmour, R. M. R., Faidi, Y. R., Salem, K., & Al-Nuri, M. A. (1998). Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethnopharmacology*, 60(3), 265-271.
- Alzoreky, N. S., & Nakahara, K. (2003). Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International journal of food microbiology*, 80(3), 223-230.
- Amhis, W., Benslimane, A., Tiouit, D., & Naim, M. (2001). Tests de sensibilité utiles au traitement antibiotique. *Médecine du Maghreb*, 91, 22-25.
- Amiot, M. J., Aubert, S., Gonnet, M., & Tacchini, M. (1989). Les composés phénoliques des miels: étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles. *Apidologie*, 20(2), 115-125..
- Avril J.L., Denis F., Dabernat H., Monteil H. (2000). *Bacteriologie clinique*. 2^{ème}.

B

Références

- Brisse, S., Milatovic, D., Fluit, A. C., Verhoef, J., & Schmitz, F. J. (2000). Epidemiology of quinolone resistance of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* in Europe. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(1), 64-68.
- Björklund, E., Nilsson, T., & Bøwadt, S. (2000). Pressurised liquid extraction of persistent organic pollutants in environmental analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19(7), 434-445.
- Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA*, 79-82.
- Bohm, B. A., & Stuessy, T. F. (2001). *Flavonoids of the sunflower family (Asteraceae)*. Springer Science & Business Media.
- Bouzi, W., Yahia, M., Abdeddaim, M., Aberkane, M. C., & Ayachi, A. (2011). Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of extract of *Crataegus monogyna* (hawthorn); Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'aubépine monogyne. *Lebanese Science Journal*.
- Britannica, E. (1993). *Encyclopædia britannica*.

C

- Camille, D. (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire? Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Lavoisier
- Carle, S. (2009). La résistance aux antibiotiques: un enjeu de santé publique important! *Pharmactuel*, 42.
- Carillon, A. (2009). Place de la Phytothérapie dans les systèmes de santé au XXIème siècle. Séminaire International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales. Djerba. *Mars*.
- CASFM, 2001. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
- Chabrier, J. Y. (2010). *Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse doctorat*, UHP-Université Henri Poincaré).
- Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G. A., Uzunov, D., ... & Menichini, F. (2009). The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: The role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. *Food Chemistry*, 112(3), 587-594.
- Çolak, F., Savaroğlu, F., & İlhan, S. (2009). Antibacterial and antifungal activities of Arum.

Références

-Crozier, A., Clifford, M. N., & Ashihara, H. (Eds.). (2008). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. John Wiley & Sons maculatum L. leaves extracts.

-Cronquist, A. (1972). *Intermountain flora: vascular plants of the Intermountain West, USA* (No. 581.973 C7). New York Botanical Garden.

D

-Dabboussi, F., El Omari, K., Mouzawak, M., Bayssari, C., & Hamze, M. (2013). Recherche de Salmonella, Listeria et de bactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération dans du fromage Akkawi au nord du Liban. *Lebanese Science Journal*, 14(1), 3-14.

-Derridj, A., Ghemouri, G., Meddour, R., & Meddour-Sahar, O. (2009, March). Approche ethnobotanique des plantes médicinales en Kabylie (wilaya de Tizi Ouzou, Algérie). In *International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants-SIPAM2009* 853 (pp. 425-434).

E

-El Bakkouri, J., Belabbes, H., Zerouali, K., Belaiche, A., Messaouidi, D., Perrier Gros Claude, J. D., & El Mdaghri, N. (2009). Résistance aux antibiotiques d'*Escherichia coli* uropathogène communautaire et consommation d'Antibiotiques à Casablanca (Maroc).

-El Darra, N. (2013). *Les composés phénoliques des raisins: étude du potentiel qualitatif et des procédés émergents d'extraction* (Doctoral dissertation, Compiègne).

-El Kabouss, A., Charrouf, Z., Oumzil, H., Faid, M., Lamnaouer, D., Miyata, Y., & Miyahara, K. (2001). Caractérisation des flavonoïdes des feuilles d'Arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels, Sapotaceae) et étude de leur activité antimicrobienne. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 21(3), 157-162.

-El-Kamali, H. H., & Mahjoub, S. A. T. (2009). Antibacterial activity of *Francoeuria crispa*, *Pulicaria undulata*, *Ziziphus spina-christi* and *Cucurbita pepo* against seven standard pathogenic bacteria. *Ethnobotanical Leaflets*, 2009(6), 6.

-Ezoubeiri, A., Gadhi, C. A., Fdil, N., Benharref, A., Jana, M., & Vanhaelen, M. (2005). Isolation and antimicrobial activity of two phenolic compounds from *Pulicaria odora* L. *Journal of ethnopharmacology*, 99(2), 287-292.

F

Références

-Federighi, M. (2005). Bactériologie alimentaire, Compendium d'hygiène des aliments (p. 290p). Lavoisier.

G

-Gaston, M. A. (1988). Enterobacter: an emerging nosocomial pathogen. *Journal of Hospital Infection*, 11(3), 197-208.

-Ghédira, K., & Goetz, P. (2015). Tussilage: Tussilago farfara L.(Asteraceae). *Phytothérapie*, 13(6), 406-409.

-Gherib, M., Chahrazed, B., El-Haci, I. A., Chaouche, T. M., & Bekkara, F. A. (2016). Antioxidant and antibacterial activities of aerial part essential oil and some organic extracts from the Algerian medicinal plant *Pulicaria mauritanica* coss. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(1), 76.

-Gonzalez Romero, M. A., Villaescusa Castillo, L., Diaz Lanza, A. M., Bartolome Esteban, C., & Fernandez Matellano, L. (2001). Phytochemistry and pharmacological studies of *Inula montana* L. *Recent research developments in phytochemistry*, 255-268.

-Grigoraş, C. G. (2012). *Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs* (Doctoral dissertation, Université d'Orléans)

-Grimont, P. A., & Grimont, F. (2015). Enterobacter. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-17

-Guillot, J. F. (1989). Apparition et évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques. In *Annales de recherches vétérinaires* (Vol. 20, No. 1, pp. 3-16).

H

-Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?. *Archives of biochemistry and biophysics*, 476(2), 107-112.

-Hanbali, F. E., Akssira, M., Ezoubeiri, A., Mellouki, F., Benherraf, A., Blazquez, A. M., & Boira, H. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Pulicaria odora* L. *Journal of ethnopharmacology*, 99(3), 399-401.

-Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504

-Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(10), 572-584.

Références

-Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3-6.

-Hormaeche, E., & Edwards, P. R. (1960). A proposed genus *Enterobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 10(2), 71-74.

I

-Iserin, P., Masson, M., & Reslellini, J. (2001). La rousse encyclopédie des plantes médicinales. 2^{ème} édition. Paris. 335p.

J

-Jean, B. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4^e éd.)*. Lavoisier.

Jain, P. K., & Joshi, H. (2012). Coumarin: chemical and pharmacological profile. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(6), 236-240

-Jean-louis Pousset. (1989). *Plantes médicinales Africaines*, Volume 1, Utilisation Pratique; Volume 2, Possibilités de développement, Ellipses, Paris, 1989, 1992. 156 pp. × 2. ISBN 2-7298-8918-3, 2-7298-9225-7.

K

-Kaspar, C. W., Burgess, J. L., Knight, I. T., & Colwell, R. R. (1990). Antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify sources of fecal contamination in water. *Canadian journal of microbiology*, 36(12), 891-894.

-Kpemissi Amana E. ,2007. Les Anacardiaceae du Togo : Etude botanique, Ecologiques et propriétés antifongiques, Thèse de doctorat de l'Université de Reims Champagne-Ardenne et de l'Université de Lome.

-Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S., & Vladimir-Knezevic, S. A. N. D. A. (2004). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *ACTA PHARMACEUTICA-ZAGREB*-, 54(1), 65-72.

-Keita, Y., Koné, O., Ly, A. K., & Häkkinen, V. (2004). Étude chimique et de l'activité antibactérienne des distillats de quelques variétés de mangue de Guinée. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10-11), 1095-1100.

L

Références

- Lailier, R., Moury, F., Leclerc, V., Bohnert, M., Cadel-Six, S., & Brisabois, A. (2015). Surveillance de Salmonella dans la chaîne alimentaire pour la détection d'émergences en France. *Bulletin épidémiologique, santé animale et ali mentation*, 68, 11-16.
- Lavagne.A - *La végétation des bas-marais du vallon du Lauzanier Larche (Alpes-de-Haute-Provence, France)* - 2006.06, p. 41- 57
- Lozniewski, A., & Rabaud, C. (2010). Résistance aux antibiotiques. CCLIN Sud-Es
- Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(25), 7292-
- Liu, H., Qiu, N., Ding, H., & Yao, R. (2008). Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. *Food Research International*, 41(4), 363-370.
- Liu, H. J., & Chan, W. H. (1982). Total synthesis of zizaane sesquiterpenes:(-)-khusimone,(+)-zizanoic acid, and (-)-epizizanoic acid. *Canadian Journal of Chemistry*, 60(9), 1081-1091.
- Liu, L., Yang, J., & Shi, Y. (2010). Phytochemicals and biological activities of Pulicaria species. *Chemistry & biodiversity*, 7(2), 327-349.
- Luque-García, J. L., & de Castro, M. L. (2003). Comparison of the static, dynamic and static-dynamic pressurised liquid extraction modes for the removal of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons from soil with on-line filtration-preconcentration. *Journal of Chromatography A*, 1010(2), 129-140.

M

- Macheix, J.-J. (1996). "Les composés phénoliques des végétaux: quelles perspectives à la fin du XXème siècle?" *Acta Botanica Gallica* 143(6): 473-479.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR presses polytechniques.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2006). Les composés phénoliques des végétaux. *Sciences des aliments*, 26, 189-190.

Références

- Malumba Kamba, P., Janas, S., Deroanne, C., Masimango, T., & Béra, F. (2011). Structure de l'amidon de maïs et principaux phénomènes impliqués dans sa modification thermique. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 15(2), 315-326.
- Manthey, J. A., Guthrie, N., & Grohmann, K. (2001). Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Current medicinal chemistry*, 8(2), 135-153.
- Martin, S., & Andriantsitohaina, R. (2002, December). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. In *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie* (Vol. 51, No. 6, pp. 304-315). Elsevier Masson.
- Marwah, R. G., Fatope, M. O., Al Mahrooqi, R., Varma, G. B., Al Abadi, H., & Al-Burtamani, S. K. S. (2007). Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food chemistry*, 101(2), 465-470.
- Muylaert, A., & Mainil, J. (2013). Résistance bactériennes aux antibiotiques, les mécanismes et leur " contagiosité". In *Annales de Médecine vétérinaire* (Vol. 156, pp. 109-123). ULg- Université de Liège.
- Michel, T. (2011). *Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: application aux molécules bioactives de l'argousier (Hippophae rhamnoides)* (Doctoral dissertation, Université d'Orléans).
- Mothana, R. A., & Lindequist, U. (2005). Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. *Journal of ethnopharmacology*, 96(1-2), 177-181.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., & Van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chemistry*, 85(2), 231-237.
- Moatti, R. (1990). La phytothérapie. *Revue des Deux Mondes*.

N

- Nauciel, C., & Vildé, J. L. (2005). Bactériologie médicale. Elsevier Masson. Steven, P., Rachel, C., Martha, E., Paul, H., Jane, S et Peter, W. (2004)., Microbiology of waterborne diseases (pp. 21-209). Ed. Elsevier academic press.71-132p.
- N'Guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G., Traoré, D., & Aké-Assi, L. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 6(1).

Références

Niveau DCEM1., (2003). Bactériologie. Université Pierre et Marie Curie, Paris. P: 72.

Noureddine Elmtili et Khadija Ben Larbi Zarki (2010). Les plantes Médicinales du Maroc : Quelle stratégie biotechnologique ? Cahiers Université Abdelmalek ESSAADI. N°4-5:1-4.

O

-Owen, P. L., & Johns, T. (1999). Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of ethnopharmacology*, 64(2), 149-160.

-Ouedraogo, A. S., Pierre, H. J., Banuls, A. L., Ouédraogo, R., & Godreuil, S. (2017). Émergence et diffusion de la résistance aux antibiotiques en Afrique de l'Ouest: Facteurs favorisants et évaluation de la menace. *Médecine et Santé Tropicales*, 27(2), 147-154.

P

-Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Saavedra, G., Murcia, M. A. ... & Codina, C. (2003). Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sciences*, 73(13), 1667-1681.

-Pagès, J. M. (2004). Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. *médecine/sciences*, 20(3), 346-351.

-Petacci, F., Tavares, W. S., Freitas, S. S., Teles, A. M., Serrão, J. E., & Zanuncio, J. C. (2012). Phytochemistry and quantification of polyphenols in extracts of the Asteraceae weeds from Diamantina, Minas Gerais State, Brazil. *Planta Daninha*, 30(1), 9-15.

-Pieboji, J. G. (2007). Caractérisation des beta-lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. *Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat s Sciences en Biochimie*.

-Pouka, M. K., Ngene, J. P., Ngoule, C. C., Ottou, P. M., Ndjib, R. C., Dibong, S. D., & Mpondo, E. M. (2015). Caractérisation des plantes médicinales à flavonoïdes des marchés de Douala (Cameroun). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(3), 1494-1516.

Q

-Quezel, P., & Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et Méridionales, Tome II. Edition CNRS, Paris.

Références

R

- Rahal, K., (2017). LES ANTIBIOTIQUE. Edition: 1.04. 5453.ISNB :5511 /2013
- Rameau, J. C., Mansion, D., & Dumé, G. (2008). Flore forestière française: guide écologique illustré. Région méditerranéenne (Vol. 3). Forêt privée française.

S

- Sonia, C. O. L. L. I. N., & Jean, C. R. O. U. Z. E. T. (2011). *Polyphénols et procédés*. Lavoisier.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12), 3875-3883.
- Sharifi-Rad, J., Miri, A., Hoseini-Alfatemi, S. M., Sharifi-Rad, M., Setzer, W. N., & Hadjiakhoondi, A. (2014). Chemical composition and biological activity of Pulicaria vulgaris essential oil from Iran. *Natural Product Communications*, 9(11), 1934578X1400901126.
- Sofowora, A. (2010). *Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique*. KARTHALA Editions
- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of food engineering*, 81(1), 200-208.
- Sulaiman, S. F., Sajak, A. A. B., Ooi, K. L., & Seow, E. M. (2011). Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. *Journal of Food Composition and analysis*, 24(4-5), 506-515.
- Su, P., Guan, H., Zhao, Y., Tong, Y., Xu, M., Zhang, Y., ... & Gao, W. (2018). Identification and functional characterization of diterpene synthases for triptolide biosynthesis from *Tripterygium wilfordii*. *The Plant Journal*, 93(1), 50-65.
- .

T

- Trabelsi, N., Megdiche, W., Ksouri, R., Falleh, H., Oueslati, S., Soumaya, B., ... & Abdelly, C. (2010). Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 632-639.
- Touati, N., Saidani, K., Boudries, H., Hammiche, H., Ouazene, N., & Bedjou, F. (2018). Antibacterial activity of phenolic compounds of *Pulicaria odora*, wild plant in northern Algeria. *International Food Research Journal*, 25(5), 2021-2030.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., ... & Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6), 2474-2478.

Références

-Touati.1, Hassaini Y.1, Kasri A.1, oomah D.2, Drover J.2, HarrissonJ.2, Bedjou F.1, Bekdouche F. polyphénols et activité antioxydante de *Pulicaria odora* Université Abderrahmane MIRA de Bejaia, Laboratoire de Biotechnologie Végétale et Ethnobotanique 2Pacific Agri-food 2012.

V

-Vaquero, M. J. R., Alberto, M. R., & de Nadra, M. C. M. (2007). Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(5), 587-593.

W

-Wong, C. C., Li, H. B., Cheng, K. W., & Chen, F. (2006). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food chemistry*, 97(4), 705-711.

-Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 105(3), 940-949.

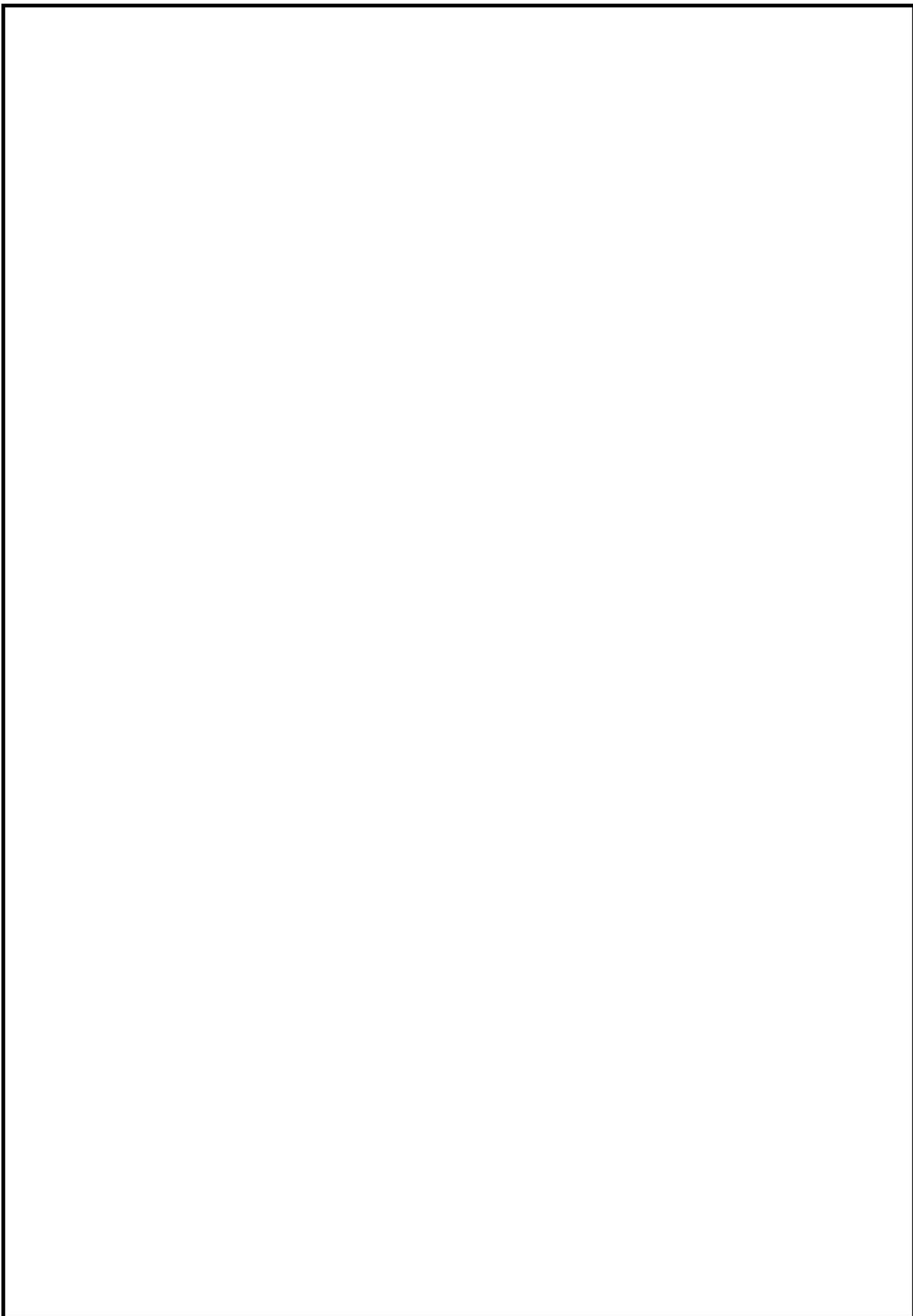
Y

-Yakhlef, G., Laroui, S., Hambaba, L., Aberkane, M. C., & Ayachi, A. (2011). Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. *Phytothérapie*, 9(4), 209-218.

Z

-Zefzoufi, M., Fdil, R., Bouamama, H., Mouzdahir, A., Sraidi, K., & Abouzaid, A. (2020). *Pulicaria odora* essential oil: a potential source of eco-friendly antioxidants and allelochemicals. *Mediterranean Journal of Chemistry*, 10(6), 608-618.

-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(4), 686-692.



ANNEXES

Annexes

Annexe 1 : Matériel utilisés en laboratoire

Appareils	Verreries et matériels plastiques	Solvants, réactifs et milieux de culture
<ul style="list-style-type: none"> • Balance • Spectrophotomètre • Rotavapeur • Etuve • Autoclave • Bec bunsen • Réfrigérateur • Haute 	<ul style="list-style-type: none"> • Becher • Erlenmeyer • Fioles • Tubes à essai • Ependorffs • Pilulier • Lames et lamelles • Cuvette • Ecouvillon • Pince • Anse de platine • Boîtes de pétri • Papier filtre • Embouts • Micropipette 	<ul style="list-style-type: none"> • Solvants et acides : Ethanol, Chloroforme, acétate de sodium, KI, ammoniacque, Iode, hydroxyde de potassium, acide sulfurique, chlorure de fer, carbonate de sodium, trichlorure d'aluminium, acide gallique, quercitine. • Réactifs : Folin-Ciocalteu. • Milieu de culture : Gélose nutritive, Gélose Mueller Hinton.

Annexe 2 : Composition des milieux de culture utilisés (Sodium Igor, 2002).

Gélose nutritive	Gélose Mueller Hinton
<ul style="list-style-type: none"> - 1g d'extrait de viande. - 2g d'extrait de levure. - 5g de chlorure de sodium. - 20g d'agar. - Eau distillé. (1L pour 28g du mélange). - PH 7,4. 	<ul style="list-style-type: none"> - 300 ml d'infusé de bœuf. - 17.5g peptone de caséine. - 17g d'agar. - Eau distillé. (1L pour 38g du mélange). - PH 7,4.

Annexe3 : Préparation des solutions.

❖ Solution d'iode

Dissoudre 2g dans 80ml d'eau distillé + 1g de KI.

Annexes

❖ Solution de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 2%

Dissoudre 0.5g d' AlCl_3 dans 25 ml d'éthanol.

❖ Préparation de réactif Folin-Ciocalteu

1ml de réactif Folin-Ciocalteu dans 9ml d'eau distillé.

❖ Solution de carbonate de sodium

7.5g de carbonate de sodium dans 100ml d'eau distillé.

❖ Dilution à partir de la solution mère

On applique la règle ($C_1V_1 = C_2V_2$)

Avec :

C_2 : la concentration de la solution diluée que l'on veut préparer

V_2 : le volume connu de la solution diluée

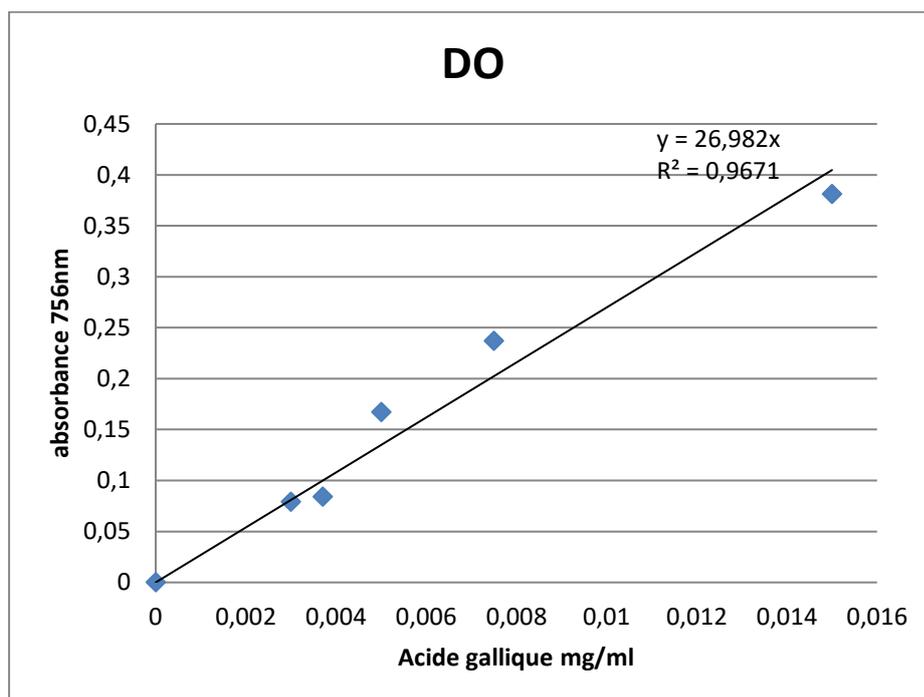
C_1 : concentration de la solution mère

V_1 : le volume inconnu de la solution mère qu'il faut prélever

Annexe 4 : Mode opératoire de l'acide gallique et la quercitine

- ❖ Solution mère contient 1mg d'acide gallique/ml d'éthanol
- ❖ 1ml de chaque solution a été introduit dans des tubes contient 1ml d'éthanol
- ❖ Un volume de 1,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué dans l'eau) a été additionné dans chaque tube contient 0.3ml de chaque solution dilué
- ❖ Après 3min, 0,2 ml de carbonate de sodium Na_2CO_3 ont été ajoutés.
- ❖ Les solutions sont maintenues à l'obscurité pendant 1h 30min à température ambiante.
- ❖ La lecture de l'absorbance de chaque solution a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 765 nm contre un blanc qui contient de l'éthanol à la place d'acide gallique.

Annexes

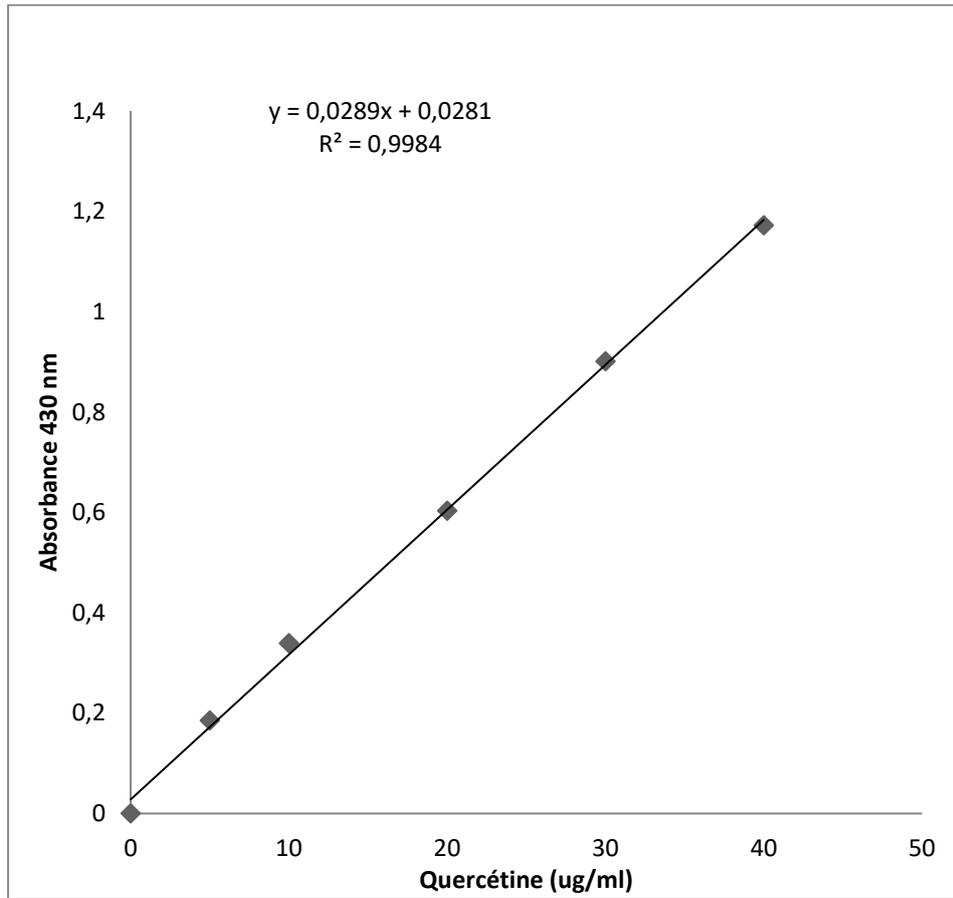


Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Annexe 5 : Mode opératoire de quercitine

- ❖ Solution mère contient mg quercitine/ml d'éthanol 1ml de chaque solution a été introduit dans des tubes contient 1ml d'éthanol
- ❖ Un volume de 1ml de trichlorure d'aluminium a été additionné dans chaque tube contient 0.5ml de chaque solution dilué
- ❖ Les solutions sont maintenues à l'obscurité pendant 1h à température ambiante.
- ❖ La lecture de l'absorbance de chaque solution a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 430 nm contre un blanc qui contient de l'éthanol à la place de quercitine.

Annexes



Courbe d'étalonnage de la quercétine