

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.AGR/2017

MEMOIRE DE FIN DE CYCLE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie appliquée

Présenté par :

CHIHANI Selma & OUKAS Amel

Thème

*Évaluation de l'activité anti hémolytique et antibactérienne
des extraits de Ajuga iva et de Allium cepa, et recherche
d'interaction synergique avec des antibiotiques.*

Soutenu le : 01/ 07/ 2018

Devant le jury composé de :

<i>M. CHERGUI A.</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>M. ADRAR N.</i>	<i>MAB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>Mme. MEDBOUA C.</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examinatrice</i>

Année Universitaire : 2017/2018

"Les deux guerriers les plus puissants sont la patience et le temps. N'oublie pas que les grandes réalisations prennent du temps et qu'il n'y a pas de succès du jour au lendemain."

« *LEON Tolstoï* »

"Tout vient à point à qui peut attendre."

« *FRANÇOIS Rabelais* »

Remerciements

Nous remercions dieu le tout puissant qui nous a aidés à faire ce travail.

Nous voudrions remercier notre promoteur, Monsieur **ADRAR Nabil** d'avoir accepté d'encadrer ce travail ainsi que pour sa gentillesse, son confiance, son soutien moral, ses conseils constructifs et ses orientations scientifiques tout au long de ce travail.

Nous remercions aussi Monsieur **CHERGUI Achour** et Madame **MEDBOUA Chafia** pour leur collaboration, et d'avoir accepté de juger notre travail.

On tient à exprimer notre gratitude à Madame **BOUDAWAD Nabila** de nous avoir accueillis au sein du laboratoire de biochimie, pour son assistance et ses idées. Par ailleurs, on remercie Mademoiselle **MAAMRI Amel** pour son aide précieuse.

Nous voudrions aussi faire part de toute notre gratitude à Monsieur **BOUADAM Said** (Maitre de conférences à l'université de Bejaïa) d'avoir identifié les espèces de plantes.

Nous remercions Monsieur **CHERGUI Achour** et Madame **BEN BARA Tassadite** pour les souches qu'ils nous ont fournies.

Nous tenons vivement à remercier Mme **BRIKI Akissa** et Mr **NAILI DWAWDA Rabah** et Mr **HASSINI Mohamed**, de nous avoir accueillis dans leurs laboratoire de l'entreprise Nationale des Détergents et Produits d'Entretien (ENAD), de la confiance qu'ils nous ont accordée et aussi pour leurs sympathie, leurs rigueur scientifique, leurs conseils et leurs encouragements.

Nous tenons aussi à remercier Mr **CHAUCHE Arezki** pour l'antibiotique qu'il nous a fourni.

Merci également au **personnel technique des laboratoires** de la faculté des SNV.

Merci aussi a nos camarades : **NEZLA Soraya**, **DERNANI Hadjer** et **HADOUCHE Nawel** et **BEN HARIZ Hassina** pour leur aide tout au le long de ce travail.

Enfin nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin, d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

C'est avec l'aide et la grâce de dieu que nous avons achevé ce modeste travail que je dédie :

A ma très chère mère « Malika »

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

A mon très cher père « Ahmed »

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

A mes frères « Nasreddine et Yasser » et ma sœur « Tassadite »

En signe d'amour, de reconnaissance et de gratitude pour le dévouement et les sacrifices dont vous avez fait toujours preuve à mon égard.

A mes chères amies « Amel, Hadjer, Nawal, Soraya, Soumia »

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs sur qui je peux compter.

A tous les membres de ma famille, petits et grands.

A tous les enseignants qui ont contribué à ma formation.

Chihani Selma



Dédicaces

C'est avec l'aide et la grâce de Dieu que nous avons achevé ce modeste travail que je dédie :

À la bougie qui est la source de la lumière de ma vie, qui se fond toujours pour éclairer ma route, à mon cher père je dédie ce travail;

À la fleur qui rehausse et aromatise mes jours, qui garde les nuits pour que je me rendorme, à ma très chère mère je dédie ce travail et je lui souhaite une longue belle vie

*À mes sœurs; **Amira et Ahlem**; À mes frères; **Djamel et Zakaria** ;*

*À mon fiancé **Abd El rezzak***

À tous mes enseignants de l'université

À mes collègues de la promotion de master "Biochimie appliquée

*À toute ma famille de près ou de loin et mes copines **Najia, Soumia, Houda** et les Merveilles **Selma, Nour el Iman, Hasina, ...***

À toutes mes amies

Je dédie ce modeste travail

Oukas Amel



Table des matières

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste d'abréviations

Introduction

Etude Bibliographique

Chapitre 1 : monographie des plantes

I.1.L'oignon (<i>Allium cepa</i>)	3
I.1.1. Généralités sur l'oignon.....	3
I.1.2.Classification.....	3
I.1. 3. Description botanique	4
I.1.4. Composition chimique	4
I.1.5. Utilisations en médecine traditionnelle.....	4
I.1.6. Propriétés biologiques d' <i>Allium cepa</i> issues de l'expérimentation scientifique.....	5
I.1.6. 1. Activité antioxydant.....	5
I.1.6. 2.Activité antibactérienne et antifongique :	5
I.1.6. 3.Activité hypoglycémiante (antidiabétique)	5
I.1.6.4.Activité insecticide.....	6
I.1.6.5. Activité hypocholestérolémiante	6
I.1.6. 6.Activité anti-inflammatoire et analgésique d'extraits d'oignon	6
I.2.l'ivette musquée (<i>Ajuga iva</i>).....	7
I.2.1. Généralités sur l'ivette	7
I.2.2. Classification.....	7
I.2.3. Description botanique :	8
I.2.4. Composition chimique	8
I.2.5. Utilisations en médecine traditionnelle.....	9

I.2.6. Propriétés biologiques d' <i>Ajuga iva</i> issues de l'expérimentation scientifique	9
I.2.6. 1.Activité Antioxydant.....	9
I.2.6.2. Activité antibactérienne	9
I.2.6. 3.Activité hypoglycémiant (antidiabétique)	10
I.2.6. 4.Activité insecticide.....	10
I.2.6. 5. Activité hypocholestérolémiant (hypolipidémiant).....	10

Chapitre 2 : la résistance bactérienne

II.1.L'antibiorésistance.....	12
II .1.1 L'origine de l'antibiorésistance	12
III.1.1 Résistance naturelle	12
II .1.1.2 Résistance acquise	12
II .1.2.Conditions d'activité des antibiotiques.....	13
II .1.3.Les mécanismes de la résistance bactérienne	13
II.1.3.1.Les mécanismes génétiques.....	13
II.1.3.2.Les mécanismes biochimiques	14
III.4.Les facteurs contribuant à la résistance aux antibiotiques	17

Matériels Et Méthodes

I.1.Objectifs.....	18
I.1.1.Objectif général.....	18
I.1.2.Objectifs spécifiques	18
I.2.1.Matériels	18
I.2.1.1.Matériels végétal.....	18
I.2.1.2.Matériel microbiologique.....	19
I.2.1.3.Equipements et solvants.....	20
II. 2.2.Méthodes	20
I.2.2.1. Extraction par ultrasons	21
II.2. 2.2.Calcul du rendement.....	23
II. Etude phytochimique des extraits	23
II.1.Tests de caractérisations chimiques.....	23

II.2 .Dosage biochimique	24
II.2.1.Dosage des polyphénols (phénols totaux)	24
II.2.2. Dosage des flavonoïdes	25
III. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits.....	26
III. 1.Technique de diffusion en puits sur milieu solide	26
III. 1.1. Principe.....	26
III. 1.2. Mode opératoire	27
III. 2.Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu liquide :	29
III.3.Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) en milieu solide :	30
III.4. Recherche d'effet synergique	30
III.4.1.Principe.....	30
III.4.2.Mode opératoire:	31
IV. Evaluation de l'activité anti hémolytique des extraits.....	31
IV. 1.Principe :	31
IV. 2.Mode opératoire	31

Résultats Et Discussion

I. Rendement d'extraction.....	33
I.1. Etude phytochimique des extraits.....	34
I.2.Taux des phénols totaux	35
I.2.2.Taux de flavonoïdes.....	36
II.1. Activité antibactérienne.....	37
II.2. Détermination de la CMI et CMB	41
II.4. Recherche d'effet synergique.....	42
III. Activité anti-hémolytique	43
Conclusion et perspectives.....	45
Références bibliographiques	46

Annexe

Résumé

Liste des abréviations

A. cepa : *Allium cepa*

EAG : Equivalent d'acide gallique

EAQ : Equivalent de quercétine

A. iva: *Ajuga iva*

ATCC: *Collection de culture de type américain*

CA SFM : *comité d'antibiogramme d'une société française de microbiologie*

CMB : concentration minimale bactéricide

CMI : concentration minimale inhibitrice

DO: Densité optique

E. coli : *Escherichia coli*

E. faecalis : *Enterococcus faecalis*.

FeCl₃ : Chlorure ferrique

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₂SO₄ : Acide sulfurique

IC₅₀ : concentration donnant 50% d'inhibition

PBS : tampon phosphate salin

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

UFC : unité formant colonie

UI : unité international

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les antibiotiques, qui ont sauvés tant de vies humaines, risquent de devenir inefficaces en raison d'une inquiétante augmentation de la résistance des bactéries à leur rencontre et de la raréfaction des nouveaux produits mis sur le marché (Carlet et al., 2012). Cette résistance est actuellement considérée par l'organisation mondiale de la santé comme une menace grave pour la santé humaine et la médecine moderne (Tebano and Pulcini, 2016). Certaines bactéries sont naturellement résistantes aux antibiotiques mais souvent cette résistance est acquise par l'incorporation dans leurs génomes d'un "facteur résistant" qui rend les antibiotiques inefficaces (Benzeggouta, 2005).

Le regain d'intérêt aux plantes médicinales et leurs extraits, vient essentiellement d'une prise de conscience des malades et de leur désir profond de revenir aux moyens naturels et efficaces. Car les plantes offrent un espoir de guérison dans le domaine des maladies contemporaines, et le besoin d'information sur les nouveaux produits phytothérapeutiques s'accroît. Le malade tend de plus en plus à fuir les substances chimiques et à éviter les dangers qu'elles peuvent induire (Benzeggouta, 2005) dans l'objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé de l'homme, sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques (Bendif 2017).

La fluidité membranaire des globules rouge devient plus sensible, surtout avec l'âge, à différentes agressions comme le stress oxydatif, l'hypotonicité, des pH extrêmes, ainsi que la présence de certains solutés (ex : éthanol, urée, guanidine). Des composés naturels peuvent restaurer cette fluidité et de prévenir ainsi l'hémolyse (de Freitas et al., 2008).

Ce travail vise à étudier l'activité anti hémolytique et antibactérienne de l'extrait brut de deux plantes médicinales, *Ajuga iva* (plante endémique qui pousse en Algérie) et *Allium cepa* (plante culinaire cultivée). Elles sont considérées parmi les plantes les plus populaires et médicinales utilisés en monde entier (Bendif 2017, Bellamine, 2017).

Ce manuscrit comporte deux parties, la première est un recueil sur la résistance bactérienne et les deux plantes étudiées. La deuxième partie présente les travaux expérimentaux comportant deux chapitres. Le premier rassemble les matériels et les méthodes utilisés pour l'appréciation de l'activité antibactérienne et anti hémolytique des extraits des deux plantes ainsi que la caractérisation des différents

groupes chimiques présents. Le second chapitre est une présentation des résultats obtenus ainsi que leur discussion.

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

**Monographie des plantes
utilisées**

I.1.L'oignon (*Allium cepa*)

I.1.1. Généralités sur l'oignon

L'oignon (figure 1) est une plante herbacée, vivace à bulbe (Benmeddour et al., 2015), monocotylédone appartenant à la famille des *Alliaceae* (Ouedraogo et al., 2015), avec un cycle cultural annuel pour la production des bulbes, bisannuel pour celle des graines, cultivée pour l'alimentation humaine depuis des milliers d'années dans les régions tempérées et subtropicales (Rabiou et al., 2015). Elle comprend plus de 700 espèces (Mnayer et al., 2014) et elle est considérée comme l'un des légumes les plus importants au monde en raison de son utilisation en alimentation et en médecine (Rabiou et al., 2015). En Algérie, de nombreuses variétés sont cultivées: doux, blanc ou jaune, rouge fort, hâtif, ou extra hâtif (Benmeddour et al., 2015).

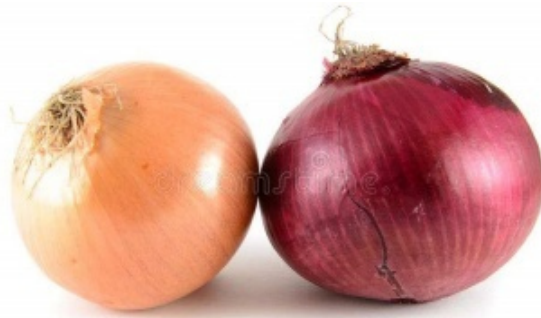


Figure 1 : photo montrant l'espèce de *Allium cepa* (Bellamine, 2017).

I.1.2. Classification

- Royaume : Plante
- Sous royaume : Trachéophyte = plantes vasculaires
- Embranchement : Spermatophytes ou Phanérogames = plantes à graines
- Sous embranchement : Angiospermes = plantes à fleurs
- Classe : Monocotyledonae
- Sous classe : Liliidae
- Ordre : Liliales
- Famille : Liliaceae ou Liliacées
- Genre : *Allium*
- Espèce : *Allium cepa* L.
- Nom commun : Oignon
- Nom en anglais : Onion (Benzeggouta, 2005).

I.1. 3. Description botanique

L'oignon est une plante herbacée, glabre, relativement haute selon les variétés. La taille peut atteindre 80 cm de haut. À tige florifère dressée et creuse, fortement renflée fusiforme (Benzeggouta, 2005) sur laquelle s'insèrent des feuilles allongées, cylindriques et creuses d'où partent des racines adventives avec un bulbe surmonté par une fausse tige ou collet. Le bulbe d'oignon est composé d'écaillés charnues et est recouvert extérieurement d'une ou de plusieurs couches d'écaillés desséchées qui sont aussi appelées tuniques (Rabiou et al., 2015).

I.1.4. Composition chimique

Le bulbe d'oignon contient divers composés chimiques soufrés et non soufrés, mais les composés soufrés sont les plus caractéristiques tel que le dipropyl trisulfide (Mnayer et al., 2014), allylmethyl trisulfide (Benmeddour et al., 2015) et dipropyl disulfide qui est le constituant majeur (Mnayer et al., 2014) et des acides aminés cystéine et méthionine (Breu, 1996).

D'autres composés ont également été caractérisés dans les extraits: les cépaènes (α -sulfinyl disulfures), zwiebelanes (dérivés disoufrés bicycliques), di- et tripeptides soufrés (Benmeddour et al., 2015) et l'acide thiocyanique et l'allylthiocyanate et sulfoxyde de propanethial un facteur lacrymogène résultant de l'action de l'alliinase (Benzeggouta, 2005) sur l'isoalliine (trans-S-(1-propenyl) cycteine sulfoxide) (Kyung, 2012). Elle renferme aussi des composés non soufrés tels que: les terpénoïdes (Gîtin et al., 2012), et les anthocyanes (Ouedraogo et al., 2015) les flavonoïdes principalement la quercétine (Bellamine, 2017) les fructanes de faible degré de polymérisation (10 à 40 %), et des polysaccharides hétérogènes, des saponosides, des stérols, des vitamines (A, C, B1 et B2), des pectines (Benzeggouta, 2005), et de l'eau environ 88% et des protéines environ 1,5%, glucose 2%, fructose 0,9% et saccharose 3,2% (Breu, 1996).

I.1.5. Utilisations en médecine traditionnelle

Actuellement, de nombreux médicaments tirent leur origine des plantes médicinales. Cette forme de médecine ne s'oppose pas aux autres thérapies, elle augmente l'efficacité d'un traitement ou atténue ses effets secondaire (Medjdoub 2013). *Allium cepa* est une espèce exploitée comme plante médicinale avant de devenir un condiment ou légume (Rabiou et al.,

I. Monographie des deux plantes utilisées

2015), elle est très utilisée dans la médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies telles que les maladies cardio-vasculaires, le cancer, l'obésité, les troubles de tractus gastro-intestinal, l'hypertension artérielle, le diabète (Gîtin et al., 2012) et d'autres maladies dégénératives (Ouedraogo et al., 2015). Et elle est utilisée en cas de furoncle de panaris et de pelade (Bellamine, 2017) et d'anthrax (Benzeggouta, 2005) et comme antispasmodique, carminatif, diurétique, expectorant, anthelminthique, etc.(Benmeddour et al., 2015).

I.1.6. Propriétés biologiques d'*Allium cepa* issues de l'expérimentation scientifique

I.1.6. 1. Activité antioxydante

Des extraits alcooliques de bulbes d'oignons ont révélé une forte corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et la capacité antioxydant (Ouedraogo et al., 2015). Ces derniers sont considérés comme antioxydants efficaces en raison de leur capacité à éliminer les radicaux libres des acides gras et de l'oxygène (Lachman et al., 2003). De même, les anthocyanes sont caractérisés aussi par leurs propriétés antioxydants, favorables à la santé et permettant aux végétaux supérieurs de se protéger des ultraviolets (Ouedraogo et al., 2015).

I.1.6. 2. Activité antibactérienne et antifongique :

Virtanen a étudié en 1958 l'activité antibactérienne de l'oignon haché. Le jus est bactériostatique et antifongique, l'huile essentielle est antibactérienne et antifongique (Kyung, 2012). Ces activités dus principalement aux cyanines sulfoxides quand les tissus sont coupés, l'enzyme allinase est libérée, convertit les cystéines sulfoxydes en thiosulfates. Ces derniers sont réactifs, volatils, lacrymogènes produisant des odeurs (Benkeblia, 2004) et permettent d'inhiber la croissance des bactéries Gram-positives, Gram-négatives et acido-alcool-résistantes en réagissant avec les groupes sulfhydryle (SH) des protéines cellulaires. Généralement les bactéries Gram-négatives sont plus sensibles que les Gram-positives (Kyung, 2012). Selon (Benkeblia, 2004), l'activité antibactérienne de 1 mg d'allicine, qui est un (+) - S-méthyl-l-cystéine sulfoxyde, a été égale à celle de 15 UI de pénicilline.

I.1.6. 3. Activité hypoglycémiant (antidiabétique)

L'extrait aqueux d'*Allium cepa* testé à différentes doses chez le rat Wistar rendu diabétique par l'alloxane avait provoqué une réduction de l'ordre de 75,4% de la glycémie initiale. Cette réduction semble être due à l'allylpropyl disulfide un composé soufré (Medjdoub 2013). De même les polyphénols et les anthocyanes et la quercétine peuvent

I. Monographie des deux plantes utilisées

diminuer le taux de glycémie. En effet, lors d'un test de tolérance au glucose chez des rats rendus diabétiques par la streptozotocine par voie intraveineuse. De tels effets pourraient s'expliquer par une inhibition de glucosidases ou de transporteurs de glucose au niveau de la barrière intestinale qui limiterait ainsi l'absorption intestinale du glucose (Hamza, 2011).Ce qui diminue la glycémie post-prandiale (Medjdoub 2013).

I.1.6.4. Activité insecticide

Allium cepa a présenté des propriétés insecticides dus aux composés soufrés qui semblent être impliqués dans les systèmes de défense naturelle des *Allium* contre divers organismes comme les pathogènes et les ravageurs (Auger et al., 2002). Ces composés sont stockés dans le cytoplasme des bulbes intacts interagissent avec l'allinase lors de la rupture des tissus. Cela entraîne la formation des produits chimiques acides sulfiniques instables qui peuvent ensuite être convertis en thiosulfonates (Poojary et al., 2017) ayant des propriétés pharmacologiques inhibitrices et décroissantes, insecticides (Auger et al., 1993) et toxiques pour de nombreuses espèces d'insectes en milieu clos (Auger et al., 2002).

I.1.6.5. Activité hypocholestérolémiante

Allium cepa présente des propriétés hypocholestérolémiantes dues aux flavones qui permettent de diminuer considérablement les processus athérosclérotiques, par la réduction du cholestérol dans le sérum sanguin. Donc, Il est recommandé de consommer l'oignon cru dans les salades en raison de leurs teneurs élevés en polyphénols (Lachman et al., 2003).

I.1.6. 6. Activité anti-inflammatoire et analgésique d'extraits d'oignon

L'effet anti-inflammatoire du jus d'oignon frais a été évalué par une injection de carraghénine sous plantaire à des rats Sprague-Dawley. Les résultats obtenus illustrent une propriété analgésique par rapport au groupe témoin positif; les effets étaient similaires à ceux de la morphine comme traitement standard. Dans l'évaluation de l'inflammation du jus d'oignon frais a montré de meilleurs résultats que le traitement standard, le diclofénac. On peut conclure que le jus frais d'oignon est capable d'inhiber la douleur et l'inflammation (Sima, 2012) et il est souvent recommandé dans la médecine traditionnelle de différents pays pour la douleur et le gonflement après piqûres de guêpes ou d'abeilles (Dorsch, 1997).

I.2. L'ivette musquée (*Ajuga iva*)

I.2.1. Généralités sur l'ivette

Ajuga iva (figure 2) est une plante herbacée (Bennaghmouch et al., 2002), vivace, aromatique, appartenant à la famille des Lamiaceae (Bendif 2017). Elle est localement nommée Chendgoura (Diafat et al., 2016) avec un cycle culturale annuelle (Aly et al., 2011) à fleurs persistantes, rhizomateuses (Venskutonis et al., 2017), elle comprend au moins 301 espèces avec de nombreuses variantes (Bendif 2017). Elle se développe dans le sol profond dans la période étendue du printemps jusqu'à la fin de l'été (Venskutonis et al., 2017), pousse à une altitude de 0 à 1600 mètres, dans les régions arides ou dans les champs (Bendif 2017).

Elle est très rencontrée dans les clairières des forêts, les pâturages, les champs incultes, les rocailles siliceuses des plaines et des montagnes (Bennaghmouch et al., 2002) et elle est largement répandue dans la région méditerranéenne: Europe du Sud et Afrique du Nord, en particulier en Algérie, au Maroc, en Tunisie et en Egypte (Diafat et al., 2016).



Figure 2 : photo montrant l'espèce de *Ajuga iva* (Bendif 2017).

I.2.2. Classification

- Règne : Plantae
- Sous-règne : Tracheobionta
- Division: Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Sous-classe : Asteridae

I. Monographie des deux plantes utilisées

- Ordre : Lamiales
- Famille : Lamiaceae
- Genre : *Ajuga*
- Espèce : *Ajuga iva* L Schreb (Boudjelal, 2013)

L'espece *Ajuga iva* (Schreber) est appelée par plusieurs noms vernaculaires: Ivette, Petit if, l'ivette musquée, Bugle en français et Musky Bugle en anglais (Bendif 2017) et Chendgoura ou Shandgoura en arabe, Touf et-toulba en Berbère (Boumerfeg 2010).

I.2.3. Description botanique :

Ajuga est une petite plante vivace aromatique, de goût amer, et à odeur de musc (Bendif 2017), de 5 à 20 cm de long, à tiges vertes rampantes et velues (Boudjelal, 2013), très feuillues, à feuilles vertes sessiles de 14-25 mm de longueur, linéaires, lancéolées, et couvertes de duvets enroulées aux bords, entières ou un peu dentées au sommet. La floraison de la plante se fait entre Avril à Octobre (Bendif 2017). Les fleurs sont violettes, roses, ou jaunes, de 20 mm de longueur (Boudjelal, 2013), la lèvre supérieure de la corolle est absente ou réduite et la lèvre inférieure est divisée en trois lobes poilus (Boumerfeg 2010). A l'intérieur de la fleur il y a quatre étamines liées à quatre carpelles noirs (Bendif 2017). De nombreuses plantes d'*Ajuga* sont utilisées en horticulture comme couvre-sol, et dans les jardins de rocaille, mais certaines sont considérées comme des mauvaises herbes (Venskutonis et al., 2017).

I.2.4. Composition chimique

Les études phytochimiques ont révélé que les espèces d'*Ajuga* contiennent plusieurs composés bioactifs tels que les anthocyanes-glucosides, les terpénoïdes et les andanolides (Bendif 2017). Sept aglycones flavoniques ont été isolés et identifiés: quercétine, lutéoline, chrysoériol, 5,5'-dihydroxy 4',7-diméthoxy flavone, 5,7-dihydroxy 4',5'-diméthoxy flavone, apigénine et naringénine (Bennaghmouch et al., 2001). Et des phyto-ecdystéroïdes (ajugasterone C, cystérone, digestérite decystérone, 24,25-déhydrocystérone, 24-déhydroprécystérone, ecdysone, ecdysterone, 23-hydroxycy-stérone, 20-hydroxydésone, makisterone A, 22-oxo-cy-thérone, polypodine B) (Bendif 2017) et quatre diterpènes de type clérodane (Bennaghmouch et al., 2002) (14,15-dihydro-ajapapitine, ivain I, II, III et IV) (Bendif 2017) et trois iridoïdes (Harpagide, 6-désoxyharpagide, 8-O-acétylharpagide) et

I. Monographie des deux plantes utilisées

deux flavonoïdes (Naringine, Apigénine 7-O , néohespéridoside) (Bennaghmouch et al., 2002) et les stérols (stérols polyhydroxylés); l'ivaide A (1,3-di- (R) - β -hydroxy-glycéride glycérol), les huile essentielle, les tanins, les diacylglycérides, l'acide myristique, l'acide palmitique (Bendif 2017) , et des saponosides acides (Boudjelal, 2013).

I.2.5. Utilisations en médecine traditionnelle

Les espèces d'*Ajuga* sont utilisées dans la médecine traditionnelle dans le monde entier contre certaines maladies telles que la goutte, le rhumatisme, le paludisme, l'asthme et pour traiter le cancer, le diabète (Bendif 2017), l'hypertension, les gastralgies, la stérilité féminine, les hémorroïdes (Bennaghmouch et al., 2002), les troubles gastro-intestinaux, l'entérite, la fièvre, la sinusite et les maux de tête (Boumerfeg 2010) d'oreille et de dents (mâcher une feuille fraîche), la bronchite, phtisie, troubles mentaux, maladies de la peau, l'eczéma, morsures d'animaux (rage), tonic, la diarrhée (Bendif 2017), l'ulcère gastrique, la dysurie, les articulations douloureuses des membres (Baghiani et al., 2011) et pour calmer les douleurs (Bennaghmouch et al., 2002). Elle est aussi utilisée comme: dépuratif, antiarthritique, leishmanicide (Bendif 2017), anthelminthique et en tant qu'agent diurétique (El Hilaly and Lyoussi, 2002), antiseptique (Bendif 2017), antimittotique, vasorelaxant et cicatrisant (Chabane et al., 2013) , antifebriles (Wessner et al., 1992), antipyrétique et vulnéraire (Venskutonis et al., 2017).

I.2.6. Propriétés biologiques d'*Ajuga iva* issues de l'expérimentation scientifique

I.2.6. 1. Activité Antioxydante

Ajuga iva semble être une plante précieuse et pourrait être utilisée pour l'inhibition de piégeage des radicaux libres (Baghiani et al., 2011). Des extraits alcooliques d'*Ajuga* ont révélé une forte corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et l'activité antioxydant. Cette dernière a été plus élevée dans les extraits polaires, il s'agit en occurrence de l'eau et d'éthanol (Bendif 2017). Selon (Baghiani et al., 2011), l'extrait d'*Ajuga* représente une source importante de composés phénoliques qui peuvent jouer un rôle important en stabilisant la peroxydation des lipides.

I.2.6.2. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits d'*Ajuga* a été démontrée contre deux souches de référence, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* en utilisant la méthode de diffusion sur puits d'agar où les zones d'inhibition arrivaient à 17,5 mm contre *E. coli* et 21 mm contre *S. aureus* (Bouyahya, 2016). Une autre étude ethnopharmacologique a révélé que l'activité antibactérienne de la plante *Ajuga* est liée à son contenu en composés actifs qui ont une large gamme d'activité biologique et pharmacologique (Bendif 2017).

I.2.6. 3. Activité hypoglycémiant (antidiabétique)

Ajuga iva est capable d'induire une hypoglycémie chez les rats Wistar rendu diabétique par l'alloxane (Chabane et al., 2013), ou la streptozotocine avec une administration orale unique et répétée de l'extrait d'*Ajuga*. Ce dernier a réduit les niveaux de glucose plasmatique 6 h après l'administration et après 3 semaines de traitement (El Hilaly and Lyoussi, 2002). Des recherches récentes ont démontré que les hétérosides flavoniques en sont responsables (Chabane et al., 2013).

I.2.6. 4. Activité insecticide

Une découverte intéressante était la présence de composés qui interfèrent avec le développement normal des insectes. Parmi ceux-ci sont les phytoecdystéroïdes, qui sont analogues aux hormones stéroïdes (Aly et al., 2011) des arthropodes qui régulent la mue, la métamorphose, la reproduction et la diapause (Dinan and Lafont, 2006). Les phytoecdystéroïdes se trouvent dans plusieurs espèces du genre *Ajuga*, affectent un large éventail d'insectes à très faibles concentrations et ne sont pas nocifs pour les humains ou les cellules animales. Deux principaux phytoecdystéroïdes, l'ecdystérone et la cyastérone, ont été identifiés dans des extraits bruts d'*Ajuga* comme molécules ayant causé des effets significatifs sur les insectes, confirmant que ces les phytoecdystéroïdes semblent jouer un rôle important dans la défense chez plantes (Aly et al., 2011) ils sont considérés comme contribuant à la dissuasion des prédateurs invertébrés (Dinan and Lafont, 2006).

I.2.6. 5. Activité hypocholestérolémiant (hypolipidémiant)

L'administration orale unique et répétée de l'extrait d'*Ajuga* a entraîné une diminution des taux de cholestérol plasmatique (Baghiani et al., 2011) et des phospholipides chez les rats

I. Monographie des deux plantes utilisées

traités par rapport aux rats non traités (Taleb-Senouci et al., 2008). Ces activités peuvent être attribuées à un ou plusieurs composés (El-Hilaly et al., 2006).

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

La résistance bactérienne

II.1.L'antibiorésistance

L'antibiorésistance ou la résistance bactérienne aux antibiotiques est un concept qui fait de plus en plus parler de lui depuis quelques années (Weiss, 2002), elle se définit comme la capacité de la bactérie de continuer à croître ou à survivre en présence d'antibiotique (Diallo, 2013) et à supporter des concentrations inhibitrices supérieures aux concentrations que l'on peut obtenir dans l'organisme sans atteindre les doses toxiques. Il faut donc comprendre que la résistance est une réponse physiologique des bactéries à tout usage d'antibiotique, réponse liée à des « gènes de résistance » (Coustès, 2016).

II .1.1 L'origine de l'antibiorésistance

III.1.1 Résistance naturelle

C'est une insensibilité aux antibiotiques, existant naturellement chez tous les membres d'un genre bactérien. Elle fait donc partie du patrimoine génétique normal du germe (Yala et al., 2001). La résistance peut être due à la structure de la bactérie, ou à l'impossibilité pour l'antibiotique de pénétrer dans la cellule (Coustès, 2016). Dans tous les cas, la résistance naturelle fait partie des caractères normaux de l'espèce (Diallo, 2013). On dit que cette résistance est innée (Coustès, 2016) et stable, transmise à la descendance mais elle n'est pas ou peu transmissible sur un mode horizontal (d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes) (Lozniewski and Rabaud C, 2010). Elle délimite le spectre naturel de l'antibiotique et constitue une aide à l'identification, elle se traduit habituellement par des concentrations minimales inhibitrices (CMI) supérieures à la valeur critique basse de concentrations de l'antibiotique concerné (Khadir, 2014).

II .1.1.2 Résistance acquise

C'est l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotiques (Yala et al., 2001). Ce nouveau gène peut être obtenu soit par mutation (ponctuelles, délétions, inversions, insertions) dans le génome bactérien au niveau du chromosome soit par transfert d'ADN de plasmides ou de transposons (Khadir, 2014). Il s'agit donc d'une modification du code génétique

II. La résistance bactérienne

de la bactérie qui lui permet de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce (Lozniewski and Rabaud C, 2010); Elle n'est présente que chez certaines souches de la même espèce ou du même genre (Courvalin, 2008). Elle est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien (Lozniewski and Rabaud C, 2010).

II .1.2.Conditions d'activité des antibiotiques

Afin de pouvoir exercer une activité antibactérienne, un antibiotique doit :

- Atteindre et reconnaître sa cible, et donc pénétrer la membrane externe, la paroi, et la membrane cytoplasmique.
- Subsister à des concentrations suffisantes.

Certaines bactéries développent des mécanismes afin d'empêcher l'une ou l'autre de ces étapes, et ainsi permettre l'émergence de résistances aux antibiotiques (Ziai, 2014).

II .1.3.Les mécanismes de la résistance bactérienne

II.1.3.1.Les mécanismes génétiques

La résistance génétique peut être définie comme un changement dans le code génétique du micro-organisme (Weiss, 2002). Une bactérie peut acquérir une résistance aux antibiotiques par deux grands mécanismes génétiques. L'un a pour support le chromosome et définit une résistance chromosomique (Lozniewski and Rabaud C, 2010), on parlera alors de transmission verticale à la descendance (Courvalin, 2008) l'autre a pour support les plasmides ou les éléments transposables et ils définissent une résistance extra-chromosomique (Lozniewski and Rabaud C, 2010) en provenance d'autres bactéries, par transfert horizontal (Courvalin, 2008).

a) La résistance chromosomique

Les bactéries ont acquis des résistances aux antibiotiques par phénomène qui est rare c'est la mutation au sein de leur ADN modifiant la cible de l'antimicrobien, par hyperproduction de gènes initialement présents ou encore, par acquisition de gènes de résistance hétérologues (Muylaert and Mainil, 2012). Cette mutation aura pour conséquence la modification ou la perte d'un gène pouvant entraîner soit une modification de la perméabilité à un ou plusieurs antibiotiques (Hnich, 2007), soit une

II. La résistance bactérienne

modification de la cible pariétale ou intracellulaire de l'antibiotique. Ces résistances mutationnelles sont :

- Spontanées : elles préexistent à l'utilisation de l'antibiotique et sont donc indépendantes de celui-ci.
- Stables : se transmettent à la descendance (transfert vertical).
- Spécifiques : elles n'intéressent qu'une famille d'antibiotiques ou un seul antibiotique à la fois.
- Rares : le taux de mutation se situe habituellement entre 10^{-7} et 10^{-8} .

La résistance par mutation est peu répandue en clinique. Elle concerne en effet moins de 20% des résistances acquises (Ziai, 2014).

b) La résistance extra-chromosomique

Aussi appelé transfert latéral de gènes, ce processus permet à un organisme d'intégrer du matériel génétique provenant d'un autre organisme sans en être le descendant. Ce mécanisme joue un rôle dans l'expansion de la résistance extra-chromosomique. Il s'oppose au transfert vertical. Les éléments échangés sont des éléments génétiques mobiles, des plasmides (cas le plus fréquent), des transposons ou des intégrons. Les résistances par acquisition de plasmides ou de transposons sont :

- Fréquentes : elles concernent plus de 80% des résistances acquises.
- Transférables entre bactéries, même de différentes espèces, par simple contact ou par l'intermédiaire d'un bactériophage.
- Non spécifiques : elles peuvent toucher plusieurs groupes d'antibiotiques.
- Epidémiques et explosives (Ziai, 2014).

Cette résistance est liée à la synthèse de protéines additionnelles et non à une modification des constituants normaux de la bactérie (Lozniewski and Rabaud C, 2010).

II.1.3.2. Les mécanismes biochimiques

Les mécanismes biochimiques sont d'origine soit extra-chromosomique ou inscrits dans le chromosome bactérien et sont souvent impliqués simultanément dans la résistance aux antibiotiques (Ziai, 2014). (Figure 3)

a) Désarmement

Par ce mécanisme, la bactérie acquiert la capacité d'inactiver l'action des antibiotiques par la sécrétion d'enzymes avant même qu'ils n'aient pénétrés au sein du microorganisme (Bevilacqua, 2011). Ce mode de résistance touche essentiellement deux familles d'antibiotiques majeures sont les β -lactamines (lactamases) et les aminosides (aminoside O phosphotransférases (APH)) (Diallo, 2013). On peut voir ce mécanisme de défense comme un champ de mines autour de la bactérie empêchant l'antibiotique d'atteindre sa cible (Weiss, 2002).

Ces enzymes permet de modifier le noyau actif de l'antibiotique par clivage ou par addition d'un groupement chimique, qui empêche la fixation de l'antimicrobien sur sa cible et provoque une perte d'activité. Parmi les réactions biochimiques catalysées, on peut citer des hydrolyses, des acétylations, des phosphorylations, des réductions et des réactions d'addition d'un glutathion (Muylaert and Mainil, 2012). Par exemple, les *β -lactamases*, comme leur nom l'indique, elles inactivent les antibiotiques de la famille des β -lactamines. Ces enzymes sont capables d'hydrolyser le cycle β -lactame entraînant ainsi l'inactivation de l'antibiotique (Ziai, 2014).

b) Blindage

Permet de soustraire la cible de l'antibiotique à son action sans détruire la molécule mais en diminuant sa concentration aux abords direct de la cible. Deux mécanismes principaux permettent d'atteindre ce but :

○ **La diminution de perméabilité**

Un phénomène observé chez les bactéries à Gram négatif (Diallo, 2013). Rendue possible grâce à une mutation des gènes codant les porines membranaires, portes d'entrée des antibiotiques, réduisant leur diamètre et leur nombres en empêchant leur passage dans le milieu intracellulaire (Coustès, 2016).

○ **Efflux actif**

Un mode de résistance intrinsèque des bactéries (Bevilacqua, 2011), qui consiste à rejeter directement les antibiotiques à l'aide de pompes membranaires spécifiques (Coustès, 2016). Ces derniers sont des éléments bactériens de nature protéique enchâssés dans la membrane cytoplasmique capable de limiter

II. La résistance bactérienne

l'accumulation de certaines molécules et qui assure l'homéostasie cellulaire (Bador, 2013). Conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique (Lozniewski and Rabaud C, 2010).

c) Camouflage

Se produit lorsqu'un antibiotique donné ne peut plus se lier à la cible sur laquelle il agit habituellement (Weiss, 2002). Ce mode de résistance touche plusieurs classes d'antibiotiques et notamment les β -lactamines, les quinolones et les macrolides respectivement par modification des protéines liant les pénicillines (PLPs), des gyrases ou des ribosomes bactériens (Diallo, 2013).

Par exemple, les PLPs sont des enzymes qui catalysent l'étape finale de la biosynthèse du peptidoglycane (paroi bactérienne) et qui sont la cible des bêta-lactamines (en se fixant aux PLP les bêta-lactamines les empêchent de jouer leur rôle ; la synthèse du peptidoglycane est donc entravée). Les bactéries sont capables de piéger un antibiotique par trois mécanismes :

- En augmentant la production de sa cible (PLP) chez les *Enterococcus* spp ce qui conduit à une impossibilité pour une même dose de bêta-lactamines de les bloquer.
- En produisant une autre molécule possédant une affinité pour ce dernier : par la synthèse d'une nouvelle PLP, la PLP 2a qui est capable d'assurer chez *Staphylococcus aureus* une résistance à toutes les bêta-lactamines.
- diminution de l'affinité des (PLP) pour les bêta-lactamines chez les *Streptococcus pneumoniae*, donc les bêta-lactamines ont du mal à se fixer aux PLP qui restent disponibles pour la synthèse du peptidoglycane (Lozniewski and Rabaud C, 2010, Muylaert and Mainil, 2012)

Il s'agit là d'une résistance par échappement puisque l'antibiotique n'est ni soustrait ni détruit mais simplement rendu inefficace (Diallo, 2013).

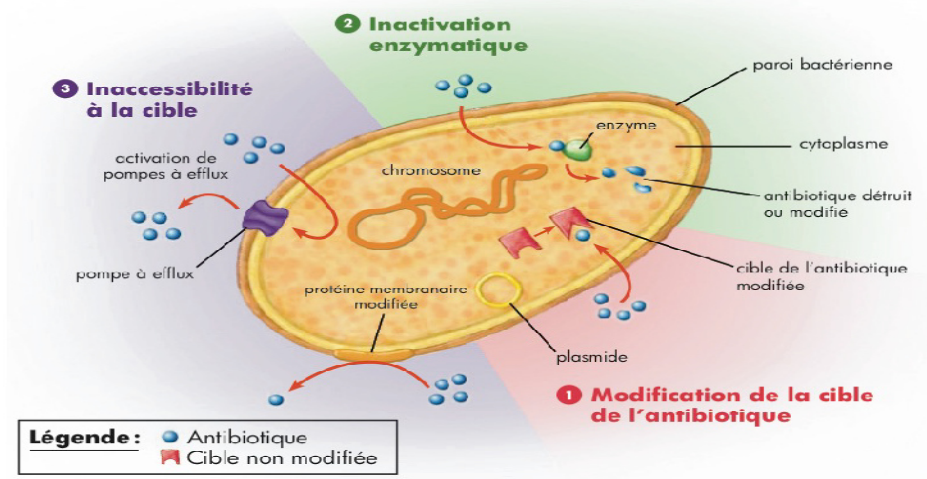


Figure 3 : les mécanismes de résistances biochimiques aux antibiotiques (Coustès, 2016).

III.4. Les facteurs contribuant à la résistance aux antibiotiques

L'émergence et la propagation de la résistance aux antibiotiques sont le résultat d'un :

- Usage abusif d'antibiotiques.
- Manque de fidélité au traitement.
- Durée trop courte ou dose sous-thérapeutique.
- Utilisation inadéquate d'antibiotiques dans les pays en voie de développement.
- Mesures d'hygiène inadéquates dans les hôpitaux.
- Non-respect des directives de lutte contre les infections.
- Déplacements accrus des patients (transferts de patients colonisés ou infectés entre hôpitaux et milieu communautaire).
- Voyages internationaux.
- Utilisation d'antiseptiques et de désinfectants dans les produits d'entretien ménager, le dentifrice, les pastilles contre le mal de gorge, les savons, etc. (Sylvie, 2009).

Les causes de la résistance bactérienne sont multiples. L'équation la plus simple consiste à relier la résistance bactérienne à la consommation d'antibiotiques, mais la complexité du phénomène laisse encore de grands volets à découvrir (Weiss, 2002).

ÉTUDE EXPERIMENTALE

Matériels et méthodes

I.1.Objectifs

I.1.1.Objectif général

L'objectif général de notre travail est d'étudier les activités anti hémolytique et antibactérienne des extraits *d'Allium cepa et Ajuga iva*.

I.1.2.Objectifs spécifiques

1. Extraction par ultrasons à partir *d'Allium cepa et Ajuga iva*.
2. Analyse phytochimique de l'extrait total.
3. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes.
4. Recherche d'activité anti hémolytique *in vitro* des deux extraits.
5. Recherche d'activité antibactérienne *in vitro* des extraits vis à vis de trois souches de références : *E. coli ATCC 25922*, *S. aureus ATCC 25923*, *E. faecalis ATCC 49452*.
6. Etablir pour les extraits actifs, la relation entre concentration et effet biologique.
7. Déterminer pour chaque extrait actif, la concentration minimale inhibitrice vis à vis des germes étudiés.
8. Recherche d'effets synergiques entre les extraits et certains antibiotiques.

I.2.Matériel et méthodes

Notre étude a été réalisée aux laboratoires pédagogiques de la faculté des sciences de nature et de vie et des sciences de la terre de l'université Akli Mohand Oulhaj de Bouira. Pendant la période allant de 1 avril vers la fin mai 2018, le laboratoire biochimique a servi pour les extractions et le laboratoire microbiologique pour les tests bactériologiques des extraits.

I.2.1.Matériels

I.2.1.1.Matériels végétal

a) Le choix des plantes

Les deux plantes ayant fait l'objet de notre étude ont été choisies d'une part pour leur caractère médicinaux, et leur grande utilisation par la population et leurs

vertus thérapeutiques intéressantes et d'autres parts sur la base d'une recherche bibliographique qui a montré que ces espèces végétales sont très peu étudiées.

b) Echantillonnage des espèces végétales

La partie aérienne d'*Ajuga iva* (figure 4) a été récoltée durant la période entre le mois de mars et le mois d'Avril 2018 dans la région d'Ain Bessame et a été identifiée par M. le Dr. Bouadam Said, botaniste de l'Université Abderrahmane Mira - Bejaïa. La plante a été nettoyée pour éliminer les impuretés, séchée à l'abri de la lumière ensuite broyée et stockée dans des boîtes en plastique jusqu'à leur utilisation.

Allium cepa (figure 5) a été achetée de marché de Bouira au mois d'avril 2018.



Figure 4: Photographie d'*Ajuga iva*, prise en mars 2018.



Figure 5 : Photographie d'*Allium cepa*, prise en mars 2018.

I.2.1.2. Matériel microbiologique

L'évaluation in vitro de l'activité antibactérienne a été réalisée par la technique de diffusion en milieu gélosé. Les souches bactériennes utilisées sont : 3 souches qui sont fournies généreusement par Mme Ben Bara et M. Chergui. (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 49452). Quelques caractéristiques générales de ces bactéries sont présentées dans le (**Tableau I**).

Tableau I : caractéristiques générales des bactéries testées.

Nom de la souche	Références	Gram	Famille
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Négatif	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Positif	<i>Staphylococcaceae</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 49452	Positif	<i>Enterococcaceae</i>

I.2.1.3. Equipements et solvants

L'ensemble du matériel non biologique utilisé pour réaliser cette étude est résumé dans (Annexe 1).

I. 2.2. Méthodes

Pour l'analyse phytochimique et l'évaluation des activités biologiques *in vitro* des espèces étudiées, une extraction des principes totaux comportant les grands groupes chimiques a été nécessaire. L'extraction a été faite dans le Laboratoire 4. Les différentes étapes réalisées pendant notre travail sont résumés dans le diagramme suivant (figure 6):

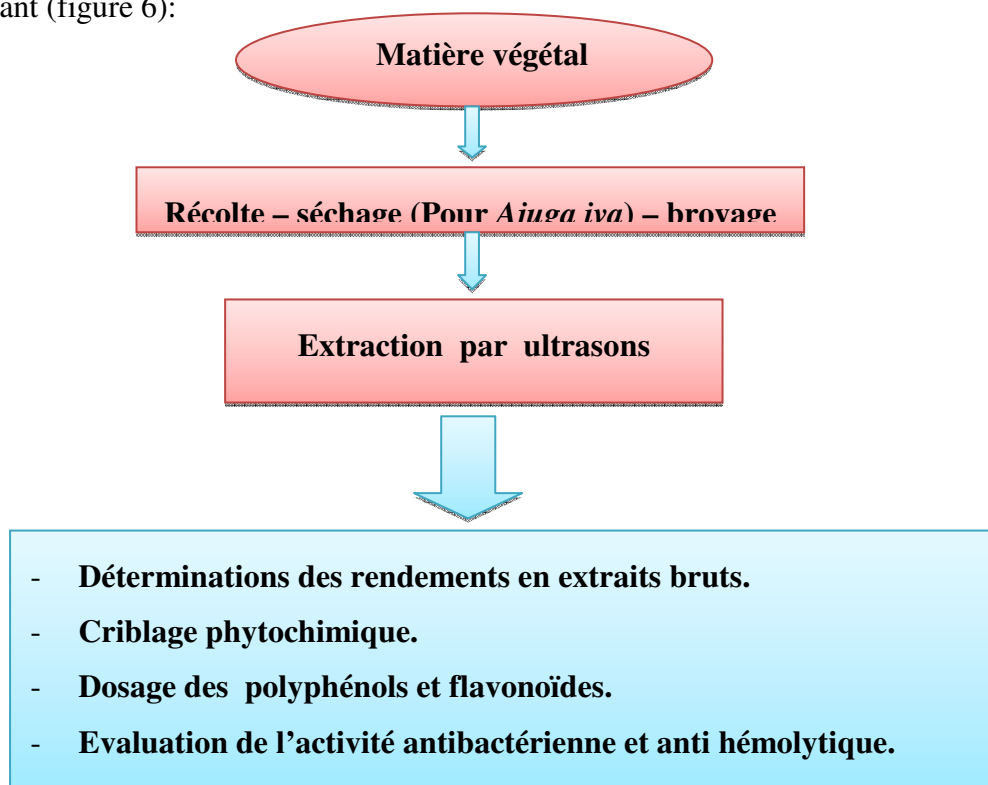


Figure 6 : Schéma illustrant la démarche expérimentale suivie.

I.2.2.1.Extraction par ultrasons

a. Principe

L'extraction par sonication est une méthode simple, efficace et peu coûteuse. Cette technique utilise des ondes sonores à fréquences supérieures à 20 KHz. La vibration se propage dans le milieu en transportant de l'énergie mécanique sous forme rapide. Le milieu de propagation de l'onde ultrasonore est soumis à une succession de compression et de décompression provoquant la formation des bulles. Les ultrasons entraînent de très fortes modifications de la température et de la pression à l'intérieur des bulles. Au moment où la dimension critique est atteinte les bulles implosent (figure 7) libérant une grande quantité d'énergie et l'implosion qui en résulte produit des jets de liquide projetés à très grande vitesse vers la surface du solide. Dans le cas d'une matrice végétale, ces jets de liquides vont percer les parois végétales et permettre ainsi la libération des molécules dans le milieu liquide (Galvan D'Alessandro, 2013, Hammoudi, 2015).



Figure 7 : Génération des bulles de cavitation par l'action des ultrasons.

b. Protocol

Le Protocol d'extraction par sonication a été inspiré de ceux de (Wei et al., 2015, Albu et al., 2004) avec modification.

La partie aérienne d'*Ajuga iva* a été séchée puis broyée tandis que les bulbes d'*Allium cepa* ont été broyés frais. 10g de chacune des matrices végétales ont été placées dans un erlen de 250 cm³. A cela 100 ml éthanol à (75 % pour *A. iva* et 99% pour *A. cepa*) ont été ajoutées. Les erlen et leur contenu ont été immergés dans un bain sonicateur à 40 kHz (figure 7) pendant 45 min. La plage de température était maintenue entre 30 ± 02 C°. Du papier aluminium a été utilisé pour éviter que les gouttelettes d'eau retombent dans l'erlen. Enfin les extraits ont été filtrés en utilisant du papier filtre et le filtrat était mis dans l'étuve à 40 C° jusqu'à l'évaporation totale du solvant.



Figure 8 : ultrason utilisé pour l'extraction

La poudre obtenus ou l'extrait sec a été caractérisé par une couleur vert-foncé pour *Ajuga iva* et rose pour *Allium cepa* avec un aspect solide. Ces derniers sont conservés jusqu'à l'analyse à basse température. Les étapes ont été résumées dans la (figure 9).

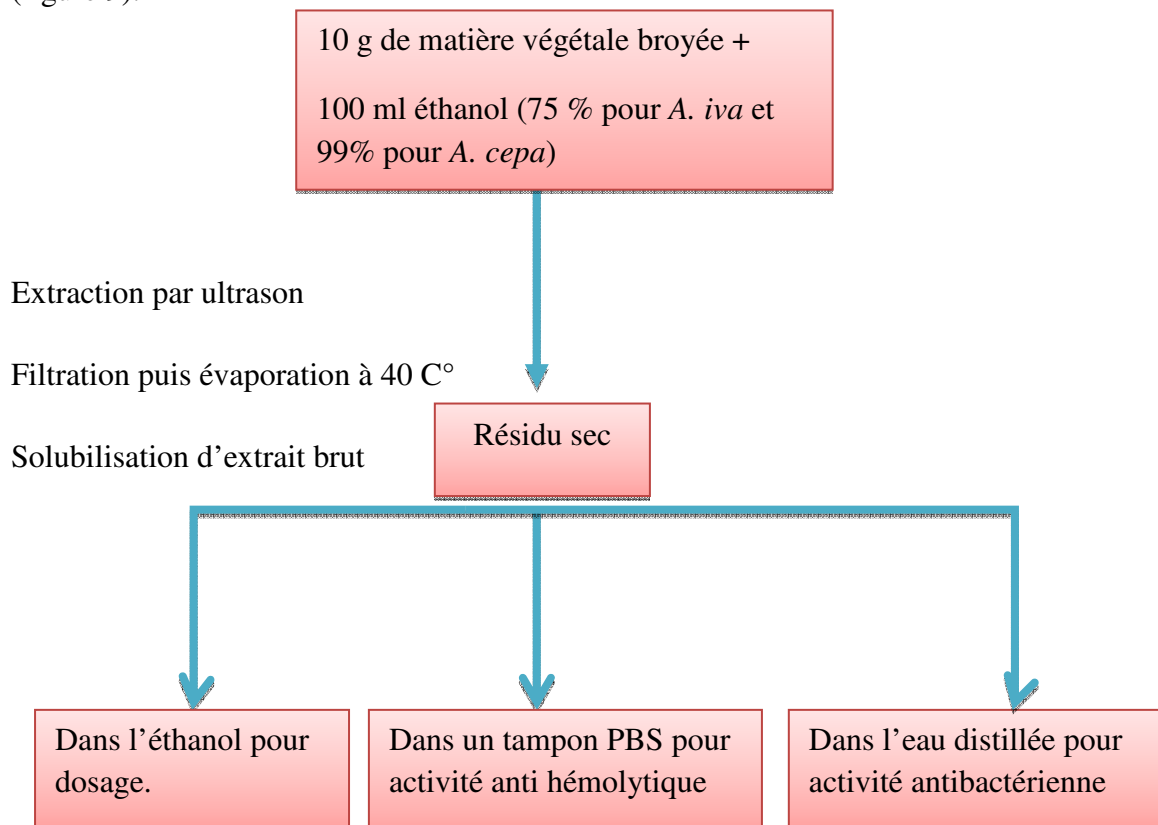


Figure 9: Schéma illustrant le protocole d'extraction.

I.2. 2.2. Calcul du rendement

Le rendement en pourcentage (%), est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait et celle de la plante sèche en poudre. Il est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{poids de l'extrait brut}}{\text{poids de la plante sèche en poudre}} \times 100$$

II. Etude phytochimique des extraits

Elle consiste à déterminer les caractéristiques phytochimiques des extraits du végétal par la recherche des différents groupes chimiques présent dans les extraits actifs pouvant être à l'origine de l'activité antibactérienne ou anti hémolytique (Oubougoué Brama, 2002). A cet effet, plusieurs types de réactifs ont été utilisés. La plupart des tests sont effectués selon la technique de Santanu et al. (2011). Les résultats ont été évalués comme suit :

+++ : Fortement positif

++ : Moyennement positif

+ : Faiblement positif

- : Négatif

II.1. Tests de caractérisations chimiques

a. Triterpénoïdes (test de Liebermann - Burchard)

2 mg d'extrait sec ont été dissous dans l'anhydride acétique, chauffés à ébullition, refroidis puis 1 ml de l'acide sulfurique concentré a été ajouté sur les côtés du tube à essai. La formation d'une couleur rose indique la présence de triterpénoïdes.

b. Stéroïdes (test de Liebermann-Burchard)

2 mg d'extrait sec ont été dissous dans l'anhydride acétique, chauffés à ébullition, refroidis puis 1 ml de l'acide sulfurique concentré a été ajouté sur les côtés du tube à essai. La formation de couleur verte indique la présence de stéroïdes.

c. Saponines

Dans un tube à essai contenant environ 5 ml d'un extrait éthanolique, une goutte de bicarbonate de sodium solution a été ajoutée. Le tube à essai a été agité vigoureusement et laissé pendant 3 minutes. La formation de mousse en forme de nid d'abeilles indique la présence de saponines

d. Tanins

1-2 ml de l'extrait à l'éthanol, quelques gouttes de solution de $FeCl_3$ à 5% en poids /volume ont été ajoutées. Une couleur verte indique la présence de gallotannins, tandis que la couleur brune indique la présence de pseudotannins.

II.2 .Dosage biochimique

II.2.1.Dosage des polyphénols (phénols totaux)

a. Principe

Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué d'un mélange de deux acides: acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et l'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). En milieu alcalin, Il est réduit lors de l'oxydation des phénols (Bouchouka, 2016) pour former un complexe bleu stable. La coloration produite est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans les extraits végétaux (Muanda, 2010).

b. Mode opératoire

La méthode adoptée pour le dosage des composés phénoliques totaux est celle décrite par Wong et al. (2006). Une courbe d'étalonnage (Annexe 2), a été obtenue à partir de solution d'acide gallique préparés à différentes concentrations dont la solution mère a été préparé par mélange de 2 mg d'acide gallique /ml d'éthanol.

Une quantité de 0,25 ml d'extrait mélangé avec 0,25 ml de réactif du Folin Ciocalteu, 3 min plus tard, 0,25 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium ($NaCO_3$) à 20 % est ajoutée. La solution est immédiatement diluée avec de l'eau

distillée jusqu'à 2 ml dans chaque solution. Par la suite les tubes sont maintenues à l'obscurité pendant 30 min 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 765 nm. Les lectures sont faites par rapport à un témoin (eau distillée additionnée des deux réactifs). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalents de l'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g E)

II.2.2. Dosage des flavonoïdes

a. Principe

Le dosage des flavonoïdes totaux est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ avec lequel ils forment des complexes acides stables soit avec le carbonyle ($C=O$) en position C-4, soit avec le groupe hydroxyle en C-3 ou C-5 des flavones et des flavonols. Par ailleurs, $AlCl_3$ peut également former des complexes acides labiles avec les groupements orthodihydroxyyles éventuellement présents sur le noyau A et /ou B des flavonoïdes (Bouchouka, 2016).

b. Mode opératoire

La teneur totale en flavonoïdes a été déterminée en utilisant la méthode adaptée par Azzahra Lahlou et al. (2014), Une courbe d'étalonnage (Annexe 2), a été obtenue à partir de solution de quercétine préparées à différentes concentrations dont la solution mère a été préparée par mélange de 1mg quercétine /ml d'éthanol

1 ml de solution (200 μ l d'extrait +800 μ l de méthanol) a été mélangé avec 1ml de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) à 2%. Après 10 minutes, La lecture de l'absorbance de chaque solution a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde 415 nm contre un échantillon blanc constitué d'un extrait de 1 ml trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) avec 1 ml de méthanol. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalents de la quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g E)

III. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits

La détermination du pouvoir antibactérien des extraits fait appel à plusieurs techniques expérimentales. Les différents protocoles peuvent ainsi être classés selon la nature du contact de l'extrait avec le germe : (diffusion sur disque ou en puits).

L'effet antibactérien des extraits de *Ajuga iva* et *Allium cepa* vis-à-vis les trois souches testées a été évalué en utilisant la méthode des puits sur gélose Mueller Hinton. Par la suite, les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) ont été déterminées sur bouillon Mueller Hinton.

III. 1. Technique de diffusion en puits sur milieu solide

III. 1.1. Principe

Cette méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide, dans une boîte de Pétri, à partir d'un point précis, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition et en fonction du diamètre d'inhibition, ainsi la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante (Mansour-Djaalab, 2014).

Dans cette technique il y a une compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester (Mansour-Djaalab, 2014). Les étapes sont résumés (RIOS et al., 1988) de la manière suivante :

- Une culture du microorganisme, diluée à une concentration donnée, est mise en route.
- Le milieu de culture est inoculé de microorganismes à l'aide d'un écouvillon.
- Le milieu ainsiensemencé est gardé de manière à ce qu'aucune croissance notable ne commence jusqu'à ce que les produits à tester soient déposés dans la boîte de Pétri.
- Les produits à tester sont préparés dans des excipients adéquats (le solvant étant choisi de manière à ce que lui-même n'ait pas d'activité) et mis en contact avec le microorganisme par emplissage de puits.
- Les boîtes sont alors incubées à 37 C°, les zones d'inhibition sont alors mesurées.

III. 1.2. Mode opératoire

a. Revivification et repiquage des germes

La revivification des différentes espèces bactériennes est faite par passage successif sur bouillon nutritif et sur gélose nutritive. Des cultures actives ont été préparées en transférant une boucle de cellules de l'agar incliné à un tube à essai contenant 5 ml de bouillon nutritif pour les bactéries, ils ont ensuite été incubés pendant la nuit pour atteindre la phase logarithmique de croissance; pendant environ 6-10 heures à 37 ° C (Bensizerara et al., 2013). Après croissance, les souches sont repiquées sur gélose nutritive (Annexe 3) en boîtes de pétries puis incubés à 37 C° pendant 24h afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées. Les colonies isolées ont servi à préparer l'inoculum (Moroh J.-L. et al., 2018).

b. Préparation de l'inoculum bactérien

Chaque souche a été ensemencée au préalable sur une gélose nutritive, pour obtenir une culture de 18 à 24 h. Ensuite, Une parcelle de colonies a été prélevée à l'aide d'une pipette pasteur puis homogénéisée avec 9 ml d'eau physiologique (à 0,9 % NaCl) stérile dans un tube à essai. Puis cette suspension est ajustée au standard Mc Farland 0,5 à l'aide d'un spectrophotomètre, correspondant à une densité optique DO entre 0,08 à 0,1 lue à 625 nm, ce qui correspond à une suspension contenant environ 1 à 2 x10⁸ UFC/ml. Cette concentration a subit une dilution décimale afin d'atteindre une concentration finale de 10⁷ UFC/ml. Cet inoculum a servit à ensemencer les boîtes en expérimentation. On peut également comparer à l'œil nu la turbidité de la suspension bactérienne par rapport à l'eau physiologique (CA-SFM, 2017).

c. Préparation des boîtes pétries

La gélose de Muller-Hinton stérile prête a l'usage (Annexe 3) a été remplie dans des boîtes de pétries stériles. L'épaisseur de la gélose était de 4 mm réparties uniformément dans les boîtes.

d. Ensemencement :

Les milieux de cultures préalablement préparés, sont ensemencés par étalement à l'aide d'un écouvillon stérile imbibé de la suspension bactérienne (à partir

d'un inoculum dilué au 1/10 (Environ 107 UFC/ml) déjà préparée et essoré contre la paroi interne du tube, réaliser des stries parallèles et aussi serrées que possible à la surface d'une boîte de la gélose. L'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries sur le milieu. l'opération est répétée deux fois en tournant la boîte 60° et en tournant l'écouvillon sur lui-même (CA-SFM, 2017).

e. Préparations des extraits

Les extraits secs ont été solubilisés dans de l'eau distillée pour avoir une concentration initiale 100 mg/ml.

f. Dépôts des extraits

Un puits (d'environ 6mm) creusé par l'embout dans lequel sera coulée 50 µl de l'extrait à l'aide d'une micropipette. Des puits témoins sont inclus dans les essais, Il s'agit de puits d'eau distillée stérile (Kuetze et al., 2014).

g. Incubation

les boîtes ont été mises à 4C° pendant 2h pour permettre la diffusion de l'extrait testé dans le milieu ensemencé, puis incubé dans l'étuve à 37C° pendant 24h .

h. Lecture des résultats

Après l'incubation, les puits s'entourent des zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. La lecture se fait en mesurant le diamètre d'inhibition avec une règle graduée. Selon une échelle de notation symbolique allant de – à +++ et dont la lecture d'après se fait comme suit :

$\emptyset < 8$ mm : résistante

$8 > \emptyset \geq 14$ mm : sensibilité intermédiaire

$14 > \emptyset \geq 20$ mm : très sensible (Lakhdar, 2015).

III. 2.Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu liquide :

La CMI est considérée comme la plus faible concentration de la substance pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu après un temps d'incubation

de 18 à 24 h. Sa détermination a été faite par observation du trouble induit par la croissance des germes testé dans chaque tube. La CMI a été la plus petite concentration pour laquelle il n'y a pas eu de trouble observé à l'œil nu (Toty et al., 2013).

a. Mode opératoire

A partir d'une culture jeune, 3 à 5 colonies ont été prélevées, délayées dans 10 ml de bouillon puis incubées à 37°C pendant 3 à 5 heures. Pendant ce temps d'incubation et parallèlement à cela, les gammes de concentration de chaque extrait végétal ont été préparées selon la méthode de la double dilution en milieu liquide avec une progression géométrique des concentrations des extraits de raison 1/2.

Pour chaque gamme de concentration, 0,2 ml a été prélevé puis déposé dans un tube précis d'une série de tubes expérimentaux. Dans cette série appelée série test, un tube a servi de témoin de contrôle de croissance (contenant 0,2 mL d'eau distillée stérile).

Après 3 à 5 heures d'incubation, 0,2 ml du bouillon inoculé a été prélevé, puis homogénéisé à l'aide d'un agitateur vortex dans 20 ml de bouillon nutritif stérile. Ensuite, 1,8 ml de ce dernier bouillon ont été prélevés pour compléter le volume (0,2 ml) des tubes de la série test à 2 ml. L'ensemble des tubes expérimentaux de la série test ont été homogénéisés à l'aide d'un agitateur vortex puis incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures. Un jour après l'incubation, la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée par lecture directe, à l'œil nu, à la lumière du jour. Pour la détermination de ce paramètre, nous avons comparé concentration par concentration, les tubes de la série test avec le témoin à la recherche d'absence de turbidité (Obou Constantin et al., 2018).

III.3.Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) en milieu solide :

La concentration minimale bactéricide a été déterminée par la méthode de (Makut et al., 2008). Tous les tubes qui n'ont pas montré de croissance après 24 h d'incubation ont été repiqués sur les surfaces de gélose Mueller-Hinton et incubées à 37°C pendant 24 h. La CMB était considérée comme la concentration la plus faible de

l'extrait qui n'a pas permis une croissance bactérienne visible sur le Gélose Mueller Hinton après incubation bactérienne de 24 h.

III.4. Recherche d'effet synergique

Pour combattre la résistance des bactéries aux antibiotiques une association des principes actifs issus des extraits de plantes avec les antibiotiques a été faite. Ces associations sont caractérisées par quatre types d'interactions.

- Indifférence : l'activité n'est pas affectée par la présence de l'autre.
- Addition : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chacun étudié séparément à la même concentration que dans l'association.
- synergie : l'effet de l'association est significativement supérieur à la somme des activités de chacun étudié séparément à la même concentration. La traduction arithmétique est : $1 + 1 > 2$
- antagonisme : l'association diminue l'effet de l'un des deux. L'activité de cette association est inférieure à la somme des effets de chacun étudié isolément à la même concentration. De façon arithmétique : $1 + 1 < 2$ (Denes and Hidri, 2009).

III.4.1.Principe

Ce test consiste à rechercher une augmentation de la zone d'inhibition entre l'extrait et la pénicilline G qui sont placés côte à côte sur la gélose MuellerHinton et seront comparés à une autre boîte portant la pénicilline G et l'extrait de plante étudié séparément à la même concentration.

III.4.2.Mode opératoire:

On place deux puits sur gélose de Mueller Hinton : un pour pénicilline G et l'autre pour l'extrait à une distance bien précise. Les boîtes ont été mises à 4C° pendant 2h pour permettre la diffusion de l'extrait et l'antibiotique testés dans le milieu ensemencé, puis incubé dans l'étuve à 37C° pendant 24h.

IV. Evaluation de l'activité anti hémolytique des extraits

Les tests d'activité anti hémolytique des extraits d'*A.iva* et *A. cepa* ont été réalisés in vitro sur une suspension du sang humain dans le tampon phosphate salin(PBS) (Annexe 4).

Dans cette étude, nous avons utilisé un test biologique basé sur des lyses érythrocytaires induites par les radicaux libres dans le sang. L'oxydation des lipides de la membrane des globules rouge par l'intermédiaire de H₂O₂ provoque des lésions membranaires et par la suite une hémolyse (Ebrahimzadeh et al., 2010).

IV. 1.Principe :

Ce test permet de suivre l'évolution positive ou négative d'un antioxydant sur l'état des défenses d'un individu vis-à-vis des espèces radicalaires. Il s'agit de soumettre à une agression oxydante une suspension d'hématies. Les globules rouges vont donc mettre en jeu leurs équipements antioxydants pour lutter contre l'agression jusqu'à ce que la membrane soit modifiée et que la cellule laisse échapper son contenu. Ainsi l'évaluation de l'activité anti-hémolytique se fait par mesure spectrophotométrique de l'hémoglobine à 540 nm. Dans ce test, la lyse érythrocytaire est induite par le H₂O₂ (CHEhtit-Hacid 2016).

IV. 2.Mode opératoire

a. Préparation des érythrocytes :

Pour nos expériences, nous avons utilisé du sang humain prélevé à partir de donneur sain. L'activité anti-hémolytique des extraits a été déterminée selon le protocole décrit par (Alinezhad et al., 2012, Ebrahimzadeh et al., 2010, CHEhtit-Hacid 2016). Brièvement, le sang récolté sur héparine a été centrifugé à 1500 g pendant 10 min. Le surnageant constitué de plasma, de plaquettes et de la couche de globules blancs a été délicatement ôté au moyen d'une micropipette, Les érythrocytes contenus dans le culot ont été repris dans le tampon PBS (à 0,2 M et pH 7,4). Après mélange par retournement, les échantillons ont été à nouveau centrifugés à 1500 g pendant 10 min et les surnageants ont été éliminés à l'aide d'une micropipette. Le lavage du culot a été répété 3 fois dans les mêmes conditions. Les érythrocytes lavés sont re-suspendus dans le PBS (1 /1), (v/v) et seront conservés à 4° C dans les limites de 6 heures de leur préparation.

b. Préparation des extraits :

Les différentes concentrations d'extraits sont préparées dans le PBS à pH 7,4. Les concentrations utilisées sont (250µg/ml ; 125µg/ml ; 62 ,5µg/ml et 31,2 µg/ml).

c. L'effet anti hémolytique

Une suspension érythrocytaire à 4 % a été préparée dans le PBS à pH 7,4.

2 ml de cette suspension ont été ajoutés à 0,5 ml de chaque extrait à tester à différentes concentrations déjà préparés dans le PBS. Puis, le milieu a été dilué en le complétant avec le PBS jusqu'à avoir 5 ml dans chaque tube à essai. Le mélange obtenu a été incubé pendant 5 min à température ambiante. 0,5 ml de H₂O₂ à 1M préparés dans du PBS ont été ajoutés pour induire la peroxydation des lipides membranaires des érythrocytes. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 2h dans un bain marie à 37° C. Ensuite, les échantillons ont subi une centrifugation à 1000 g pendant 10 min. Enfin, les surnageants obtenus dans chaque tube ont été aspirés et les lectures des DO ont été réalisées à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Afin d'avoir une hémolyse totale (100 %) un contrôle contenant 2 ml de suspension érythrocytaire à 4 % ont été incubés avec 2 ml d'eau distillée (Nabavi et al., 2013). Une solution standard d'acide ascorbique a été utilisé comme un témoin réalisé dans les mêmes conditions.

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé selon la formule décrite en dessous :

$\% \text{ d'inhibition de l'hémolyse} = (Ac - Ae / Ac) * 100.$ Dont :

- Ac: c'est l'absorbance obtenue après hémolyse totale.
- Ae : c'est l'absorbance obtenue en présence de l'extrait.

Pour chaque test, nous avons réalisé 3 essais.

ÉTUDE EXPERIMENTALE

Résultats et discussion

CHAPITRE II : Résultats Et Discussion

II .1. Rendement d'extraction

En termes de rendements d'extraction, une étude comparative des extraits d'*A. iva* et *A. cepa* par deux solvants de polarités différentes (hexane, éthanol) a été effectuée. Les résultats des rendements d'extraction (%) sont présentés dans le (tableau II).

Tableau II: Rendement d'extraction (%) d'*A. iva* et *A. cepa* par ultrasons.

Solvant d'extraction	Plantes	Résidus (g)	Rendement (%)
éthanol	<i>A. cepa</i>	6.28	6.28
	<i>A.iva</i>	1.62	8.1
hexane	<i>A. cepa</i>	4.5	4.5
	<i>A.iva</i>	0.8	4

L'extraction avec l'éthanol (figure 10) montre le meilleur rendement (6.28 % et 8.1%) que l'hexane (4.5% et 4%) pour *A. cepa* et *A.iva* respectivement. la plus grande valeur du rendement d'extrait éthanolique est obtenu par *A.iva* (8,1%). La plus faible valeur a été obtenue par *A. cepa* (6,28%). Cela veut dire que l'extrait d'*A.iva* présente une quantité de molécules solubles dans le solvant d'extraction élevé par rapport à celui d'*A. cepa*.

Nos résultats sont en concordance avec ceux de (Bendif, 2017) qui a signalé l'effet des solvants sur le rendement d'extraction et il a montré que la polarité du solvant a une grande importance, ainsi, la variation des rendements des divers extraits peuvent être attribués aux polarités des différents composés.

Nous pouvons conclure que le rendement d'extraction est fortement influencé par le solvant d'extraction et il augmente avec la polarité des solvants et que l'éthanol est le solvant qui permet une bonne extraction des différentes familles chimiques.

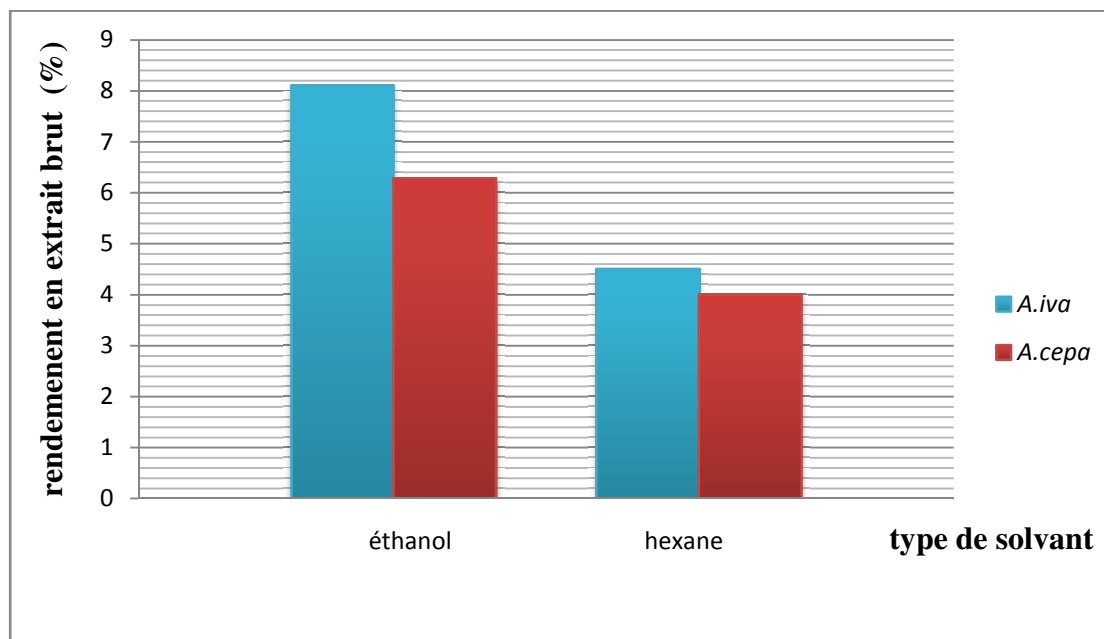


Figure 10 : le rendement en extraits bruts d'*A. iva* et *A. cepa* par deux solvants.

II.2. Etude phytochimique des extraits

Le screening phytochimique réalisé sur les extraits d'*A. cepa* et *A. iva* nous a permis d'avoir les résultats présentés dans le (tableau III).

Tableau III : Résultats des criblages phytochimiques des extraits d'*A. iva* et *A. cepa*.

Groupe chimique	plantes	
	<i>A. cepa</i>	<i>A. iva</i>
Triterpènes	-	-
Stéroïdes	-	-
Saponines	-	-
Tanins	++	+++

++ : Réaction moyennement positive. +++ : Réaction fortement positive. - : Négatif

C'est principalement les tanins qui sont détectés dans les deux plantes. Les triterpénoïdes, les stéroïdes, les saponines n'étaient pas mises en évidence.

Nos résultats sont en concordance avec ceux de (Mangambu et al, 2014) sur *A. cepa*. Et sont partiellement similaire à ceux de (Bendif 2017) qui a rapporté la

présence des tanins et des saponines dans les extraits d'*A. iva* cela peut dû à la différence de technique d'extraction utilisé macération et ultrason dans la présente étude.

II.3.Taux des phénols totaux

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe 2) et exprimé en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG / g E). L'équation obtenue de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique est utilisée pour déduire la concentration des phénols totaux de nos échantillons : $Y = 45 x + 0,05$. Les résultats obtenus sont présentés dans le (Tableau IV).

Tableau IV : Teneur en phénols totaux des différents extraits.

L'extrait	Phénols totaux (mg EAG/g E)
<i>Allium cepa</i>	0.396 ± 0.023
<i>Ajugaiva</i>	4.310 ± 0.030

A partir des résultats du (tableau VII), on 'aperçoit que l'extrait d'*A.iva* est le plus riches en polyphénols (4.310 ± 0.030 mg EAG /g E) que l'extrait d'*A. cepa* (0.396 ± 0.023 mg EAG/g E).

Ces résultats sont nettement inférieurs à ceux trouvés par (Bendif 2017, Mnayer et al,2014) pour *A.iva* et légèrement inférieurs à ceux trouvés par (Ouedraogo et al., 2015) pour *A. cepa*. Cela peut être attribué à la zone géographique, la période de la récolte (pendant l'hiver pour la présente étude) ainsi que les conditions climatiques où poussent les deux plantes. Cela pourrait être aussi relié aux conditions d'extraction.

La différence de teneur en polyphénols pour les deux extraits peut être attribuée à la richesse en polyphénols des espèces appartenant à la famille des *Lamiaceae* (de 21,18 jusqu'à 84,26 mg/g) par rapport aux plantes de la famille des *Alliaceae* (de 4 jusqu'à 69,92 mg/g) (Fecka and Turek, 2008, Moumene 2016).La (figure11), montre la différence dans la teneur en polyphénols entre les deux extraits étudiés.

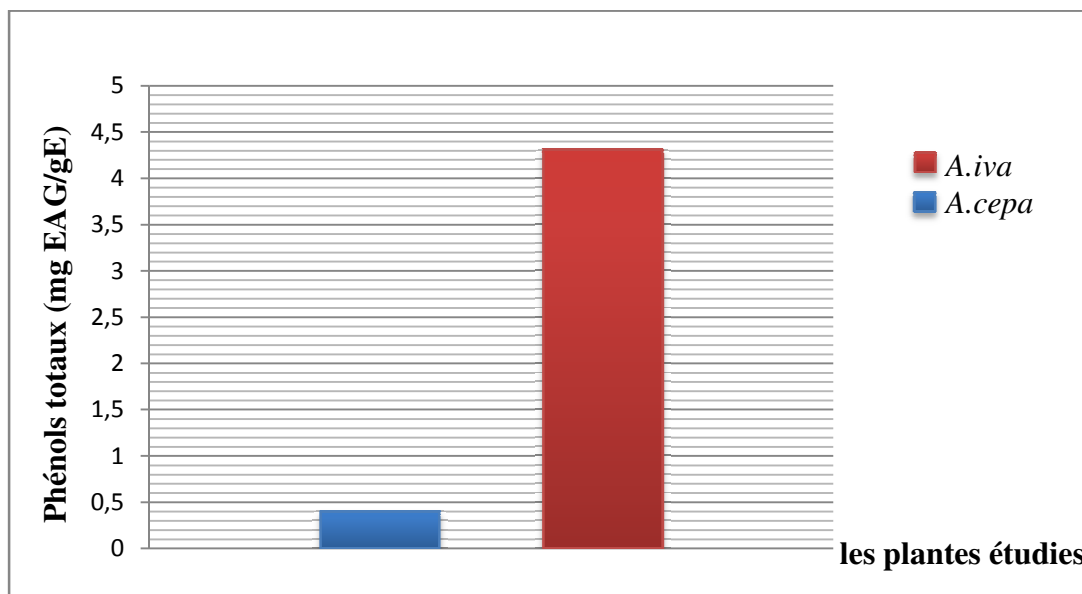


Figure 11 : Comparaison de la teneur en polyphénols totaux entre les deux extraits.

II.4.Taux de flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe 2) et exprimée en milligramme équivalent de la quercétine par gramme d'extrait (mg EQ /g E). L'équation obtenue de la courbe d'étalonnage de la quercétine est utilisée pour déduire la concentration des flavonoïdes de nos échantillons : $Y = 0,03 x$. Les résultats obtenus sont présentés dans le (Tableau V).

Tableau V : Quantité des flavonoïdes dans les deux extraits.

L'extrait	Flavonoïdes (EQ mg /g E)
<i>A. cepa</i>	$0,054 \pm 0,001$
<i>A.iva</i>	$2,83 \pm 0,006$

Selon les résultats du tableau, la teneur en flavonoïdes dans l'extrait *A. iva* est plus importante ($2,83 \pm 0,006$ mg EQ /g E) que celle d'*A. cepa* ($0,054 \pm 0,001$ mg EQ /g E). On remarque que la teneur en flavonoïdes ne présente pas une similitude avec celle obtenue par Bouyahya (2016) pour la même plante. Ces différences pourraient être dues aux mêmes raisons expliquées précédemment dans le cas des polyphénols car les flavonoïdes font partie de ces derniers. La (figure 12) présente une comparaison de la teneur en flavonoïdes entre les deux plantes étudiés.

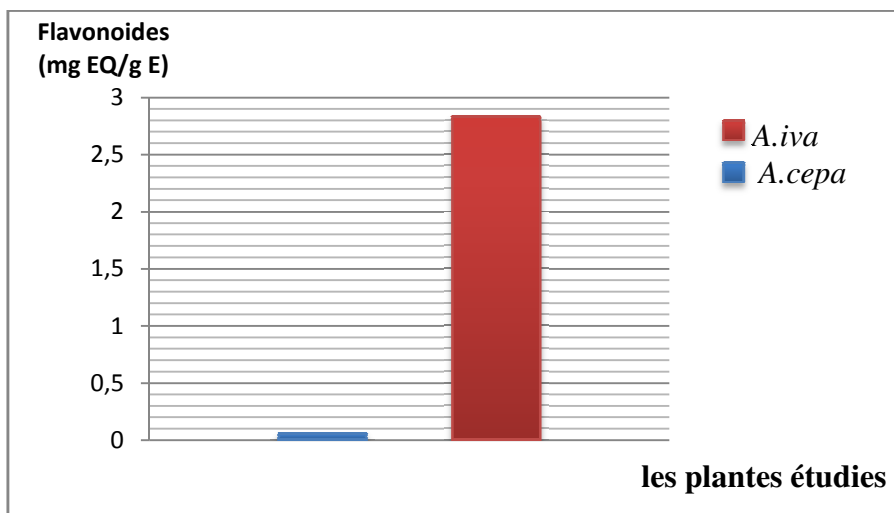


Figure 12 : Comparaison de la teneur en flavonoïdes entre les deux extraits.

III. Activité antibactérienne

Dans cette étude, l'activité antibactérienne des extraits d'*A. iva* et *A. cepa* a été évaluée sur la croissance *in vitro* de trois souches bactériennes à savoir, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*. Les résultats des tests sont regroupés dans le (tableau VI) et illustrés par les figures 13, 14 et 15. Nous avons remplacé nos extraits par de l'eau distillée, comme témoins négatif.

Tableau VI: Diamètres des halos d'inhibition de la croissance des souches bactériennes testées vis-à-vis d'extraits d'*A. iva* et *A. cepa* (en mm, puits inclus).

Les souches	Témoins		Les extraits	
	L'eau	Pénicilline G (100mg/ml)	<i>A.iva</i> (100 mg /ml)	<i>A. cepa</i> (100 mg /ml)
<i>S. aureus</i>	6 (R)	6 (R)	8	6 (R)
<i>E. coli</i>	6(R)	6 (R)	22	6 (R)
<i>E. faecalis</i>	6 (R)	12(R)	20	14

R : croissance bactérienne (Résistant) ,8 : légèrement inhibitrice, 14 : sensibilité moyenne, 20 et 22 : très sensible

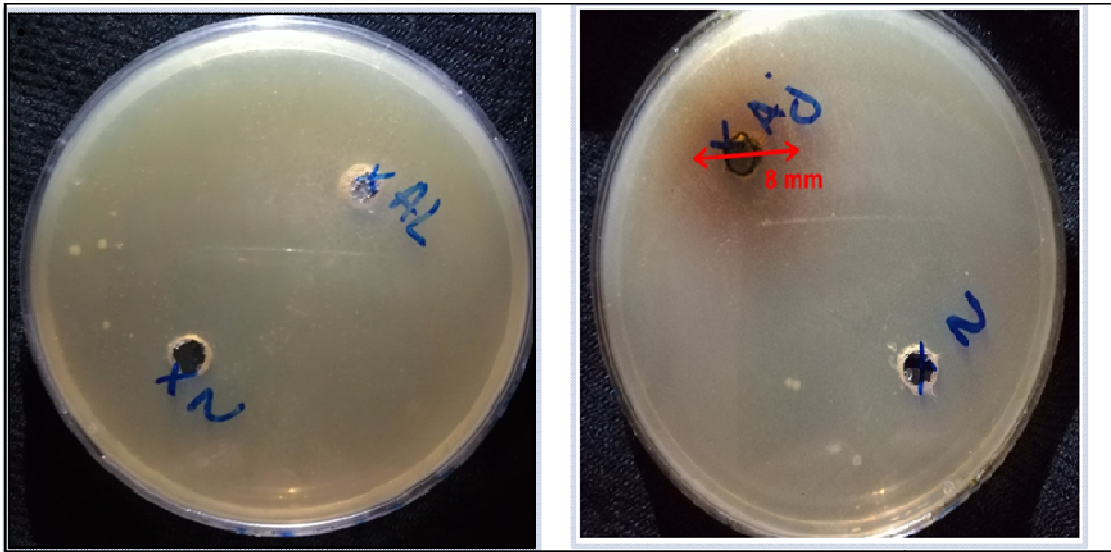


Figure 13 : effet des extraits sur la croissance de *S. aureus*
Al : *A. cepa* et Aj : *A. iva* ; N : témoin négatif (eau distillé).

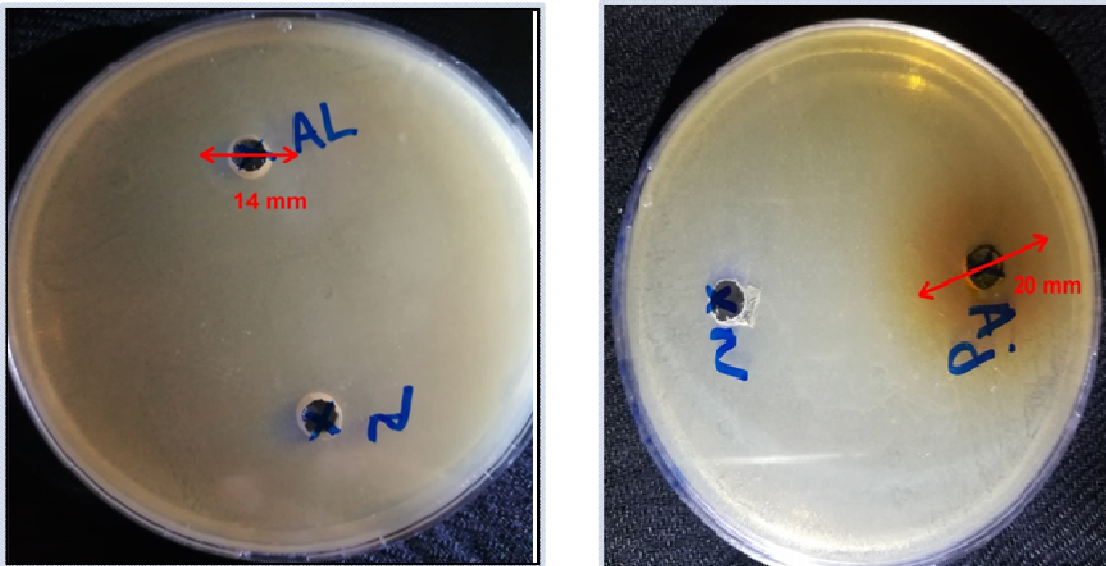


Figure 14 : effet des extraits sur la croissance d'*E. Faecalis*.
Al : *A. cepa* et Aj : *A. iva* ; N : témoin négatif (eau distillé).

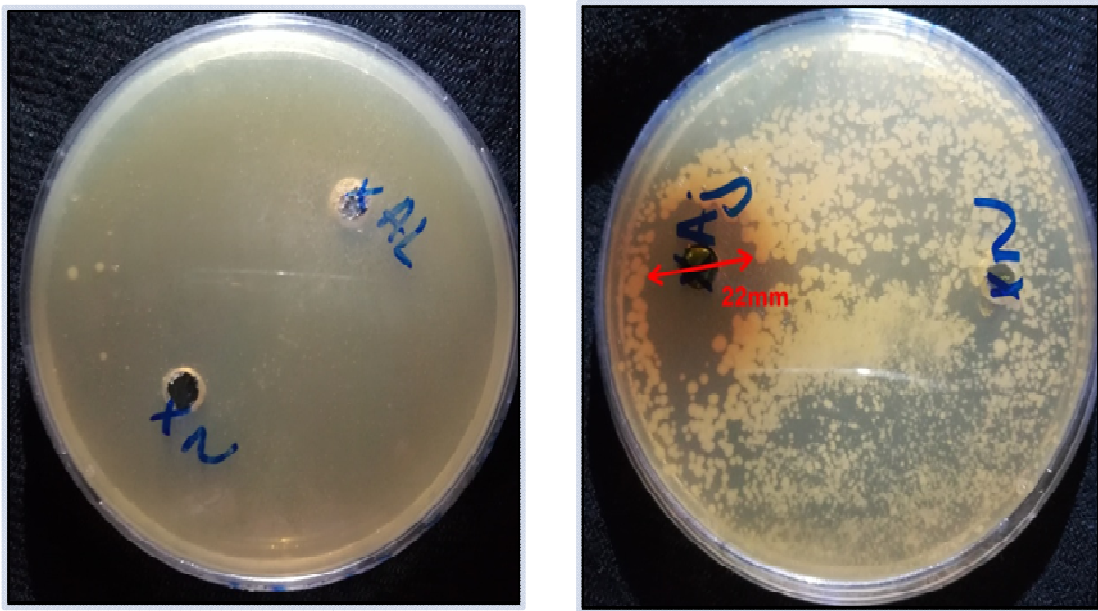


Figure 15 : effet des extraits sur la croissance d'*E. Coli*.

Ai : *A. cepa* et **Aj** : *A. iva*, **N** : témoin négatif (eau distillé)

Le test d'évaluation d'activité antibactérienne des extraits sur les 3 souches a confirmé un fort pouvoir antibactérien de ces dernières vis-à-vis de la souche *E. faecalis* (figure 16), par une zone d'inhibition de 20 mm de diamètre pour l'extrait d'*A. iva* et une zone d'inhibition de 14 mm de diamètre pour l'extrait d'*A. cepa* en incluant le diamètre du puits. Tandis que l'extrait d'*A. iva* est le plus active contre les souches *S. aureus* et *E. coli* avec une zone d'inhibition de 8 mm et 22 mm de diamètres respectifs ; par apport à l'extrait d'*A. cepa* qui n'a présenté aucun effet sur ces souches. Le témoin (eau distillé) présente des résultats négatifs, ceci implique que l'activité antibactérienne est due uniquement aux substances renfermées dans nos extraits.

Les polyphénols, tels que les tannins et les flavonoïdes sont des substances antibactériennes importantes (Athamena et al, 2010). La faible teneur en ces composés dans l'extrait d'*A. cepa* par rapport à celui d'*A. iva* pourrait expliquer l'inefficacité des extraits de l'une par rapport à l'autre.

Par ailleurs, la paroi des bactéries Gram+ (*S. aureus*) est riche en protéines. Un faible diamètre serait dû aux interactions des tannins avec la paroi des bactéries.

II. Résultats et discussion

Certains tannins sont connus pour se lier aux protéines, il pourrait donc probablement induire une modification de la perméabilité membranaire (Schmauch, 2010). Tandis que chez les souches Gram- (*E. coli*), elle est surtout assemblée en lipopolysaccharides (LPS), la membrane extérieure de ces dernières constitue une barrière de perméabilité efficace. Le LPS, grâce à ses charges négatives de surface, empêche la diffusion de molécules hydrophobes telles que les terpènes qui sont peu hydrosolubles (Basli et al. 2012). Pour *E. faecalis* et d'après la recherche bibliographique, il n'y a aucun travail portant sur l'activité antibactérienne des extraits des plantes choisies dans la présente étude.

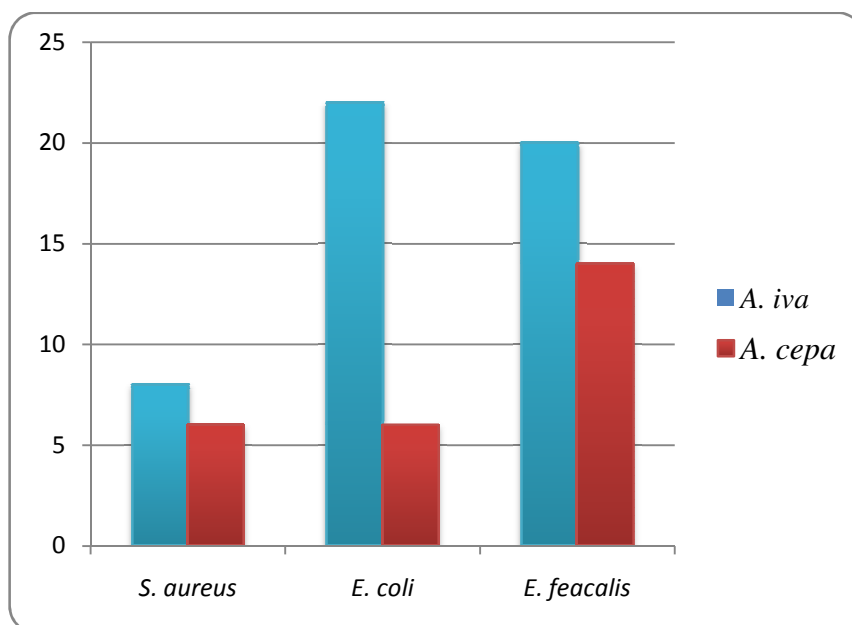


Figure 16 : diamètre d'inhibition des deux extraits sur les trois souches bactériens.

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'antibiotique sur les souches ont démontré des zones d'inhibition autour des puits contenant la pénicilline G dont les diamètres diffèrent d'une souche à une autre (en incluant le diamètre du puits) 12 mm pour *E. faecalis* (figure 17), 6 mm de diamètre pour *S. aureus* et 6 mm de diamètre pour *E. coli*. Globalement, les zones d'inhibition des extraits étaient relativement plus élevées que celles obtenues par la pénicilline G.

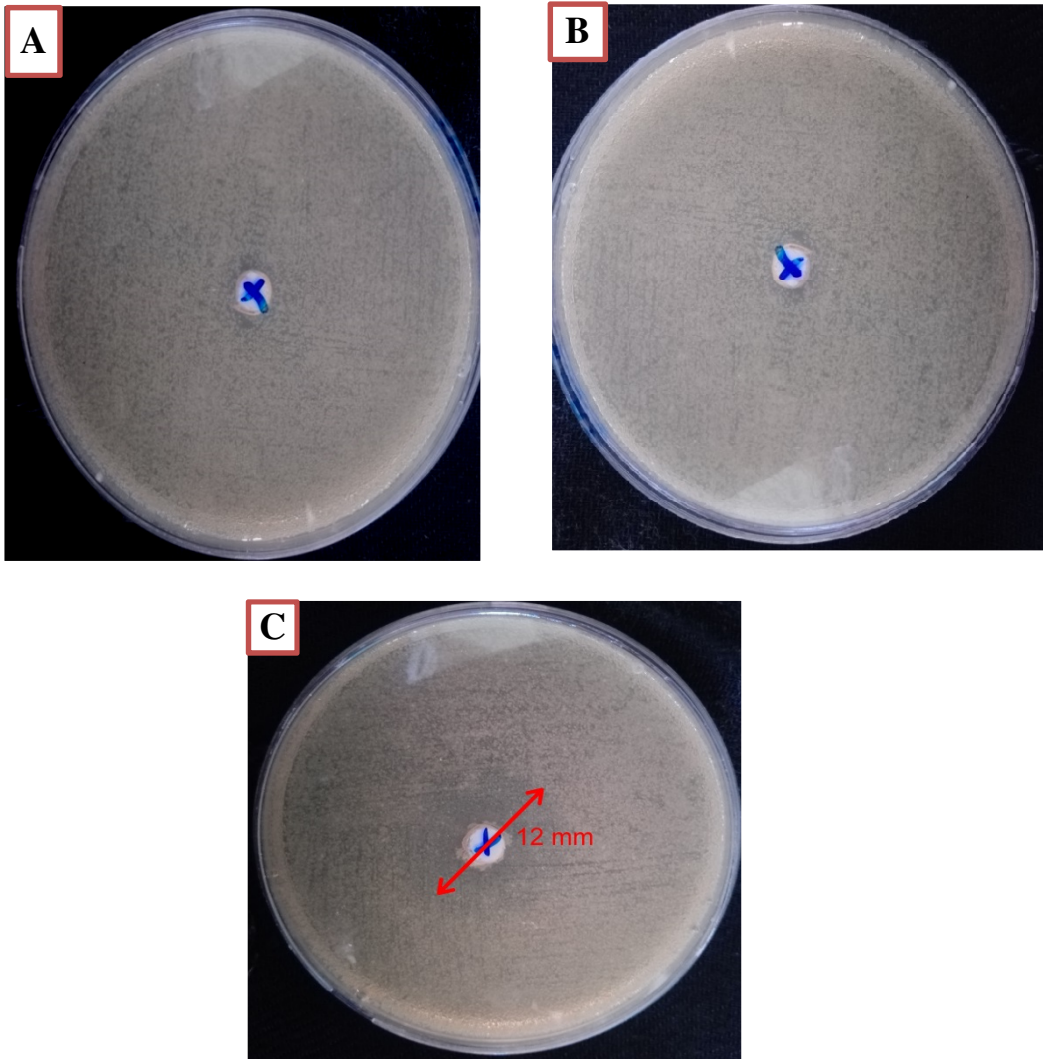


Figure 17 : effet de la pénicilline G sur la croissance de :
A : *S. aureus* ; B : *E. coli* ; C : *E. faecalis*.

III.1. Détermination de la CMI et CMB

Après la mise en évidence de l'activité antibactérienne de nos extraits bruts par la méthode des puits, nous avons essayé de déterminer les concentrations minimales inhibitrices CMI relatives aux extraits les plus actifs sur les bactéries. Par la suite, après avoir déterminé les CMI, nous avons procédé à la détermination des concentrations minimales bactéricides CMB. Les résultats donnant les valeurs de CMI et CMB en mg/ml de chaque extrait, sont consignés dans le (tableau VII).

Tableau VII: Valeurs des concentrations minimales inhibitrices et concentrations minimales bactéricides pour les souches *E. faecalis* et *E. coli*.

Les extraits	<i>E. faecalis</i>		<i>E. coli</i>	
	CMI mg/ml	CMB mg/ml	CMI mg/ml	CMB mg/ml
<i>A. cepa</i>	< CMI	< CMB		
<i>A. iva</i>	50	< CMB	25	< CMB

ND : non déterminé

En milieu liquide, l'absence de croissance a été observée à partir de 50 mg/ml et 25 mg/ml pour l'extrait d'*A.iva* sur *E. faecalis* et *E.coli* respectivement. En milieu solide, les ensemencements des inocula où la turbidité n'a pas été visible ont permis de voir de manière générale que, les épaisseurs des nappes de colonies diminuent au fur et à mesure que les concentrations des extraits testés augmentent. Cette diminution est le plus souvent suivie d'apparitions de quelques colonies isolées. Cela pourrait être dû aux contaminations du milieu par les extraits eux-mêmes car, malheureusement, nous n'avons pas pu stériliser ces derniers, chose qui a influencé fortement les résultats des tests sur milieux liquide par opposition à la technique des puits.

Pour *A. cepa*, on n'a pas pu déterminer leur CMI, cela peut être lié, en plus des raisons susmentionnées, à la perte d'activité dans le temps due à l'oxydation. En effet, cet extrait c'est avéré qu'il ne se concevait pas assez longtemps après extraction, ce qui corrèle avec sa faible teneur en polyphénols qui sont de très bons antioxydants.

III.2. Recherche d'effet synergique

Nous avons combiné chaque extrait avec la pénicilline G afin de déterminer d'une manière quantitative la capacité éventuelle des extraits à augmenter l'effet antibactérien de la pénicilline G.

Les résultats de l'effet synergique de la combinaison pénicilline G/extrait ont révélé un effet synergique avec l'extrait d'*A. iva* sur *E. faecalis* (figure 18). Cet effet

s'est traduit par l'observation d'une nouvelle zone d'inhibition entre les deux puits qui excède la somme des rayons d'inhibition des deux substances combinées.

Un effet synergique entre un antibiotique et une autre substance est un phénomène rare (Adrar et al., 2016) ce qui donne beaucoup de valeur à notre résultat et de son éventuelle exploitation dans l'industrie pharmaceutique, vu que les molécules agissant en synergie avec des antibiotiques, tels que l'acide clavulanique (inhibiteur de bêta-lactamases), sont restreintes et que certaines souches bactériennes n'y sont pas sensibles. Ces molécules agissent en inhibant une voie de résistance de la bactérie qui se traduit par une inhibition de la croissance bactérienne dans des gammes de concentration plus faibles que sans l'utilisation de ces substances (Gutmann, 1989).

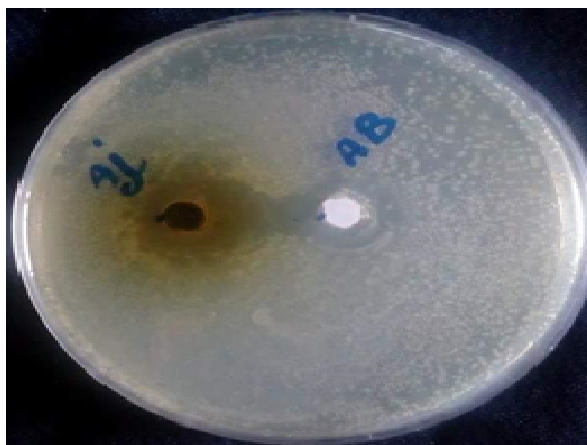


Figure 18 : Effet synergique entre pénicilline G et *A.iva*.

IV. Activité anti-hémolytique

La présence de composés phénoliques dans nos extraits nous a incités à étudier leur activité anti hémolytique. L'hémolyse *in vitro* des érythrocytes humains, induite par H₂O₂, a été utilisée pour évaluer l'effet protecteur des extraits d'*A. iva* et *A.cepa* vis-à-vis des radicaux libres causant des lésions sur les membranes érythrocytaires.

La (figure 18) montre que tous les extraits présentent une activité anti-hémolytique élevée qui augmente avec l'augmentation de la concentration. Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse le plus élevé a été enregistré par l'acide ascorbique quel que soit la concentration (IC₅₀= 1 ,901 µg/ml) suivie par les extraits *A. iva*, (IC₅₀ = 0,714 µg/ml) et *A. cepa* arrive en troisième position (IC₅₀ = 0,706

µg/ml). Il n'y avait pas de différences significatives entre le pouvoir inhibiteur des extraits et l'acide ascorbique.

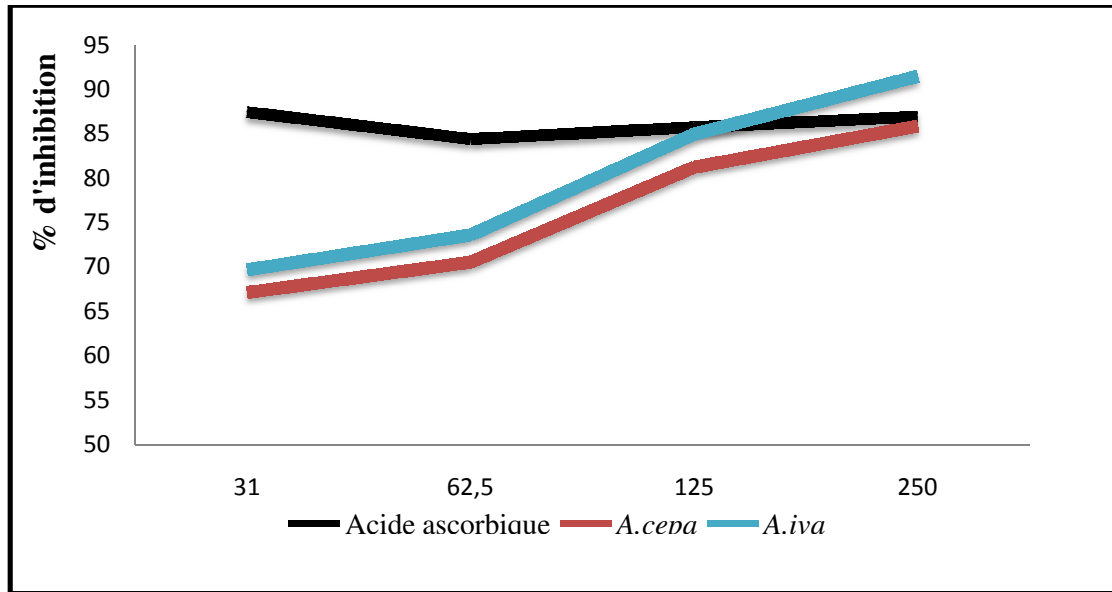


Figure 19 : pourcentage d'inhibition de l'hémolyse par les extraits d'*A. cepa* et *A. iva* et l'acide ascorbique

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Alinezhad et al, (2012) sur l'activité anti-hémolytique des extraits d'*Hyssopus angustifolius*. Cependant, l'acide ascorbique est le plus actif.

Nos résultats sont également en concordance avec ceux obtenus par Nabavi et al, (2013) sur l'activité anti-hémolytique des lipides d'avocat où l'acide ascorbique présente l'activité anti hémolytique la plus élevée.

L'efficacité de la protection contre l'hémolytique des extraits d'*A. cepa* et *A. iva* serait due à la capacité des composés phénoliques, dont les flavonoïdes, à neutraliser les radicaux libres générés par H₂O₂, protégeant ainsi les membranes érythrocytaires de la lyse.

Des études antérieures (Alinezhad et al, 2012) ont montré une corrélation entre l'activité anti hémolytique et le contenu en flavonoïde. En effet, *A. iva* est la plus riche en polyphénols dont les flavonoïdes que l'*A. cepa* ($2,83 \pm 0,006$ mg /g E et $0,054 \pm 0,001$ mg /g E) respectivement. Pour un effet anti hémolytique de 91,5% et 85,88% respectivement avec une concentration égale à 250 µg/ml). Il est donc évident que la forte activité anti hémolytique enregistrée dans certains de nos extraits est attribuée à leur richesse en composés phénoliques.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

L'objectif principal de ce travail consistait à l'évaluation de l'activité anti-hémolytique et antibactérienne des extraits actifs de deux plantes médicinales algériennes *Allium cepa* et *Ajuga iva*.

Les résultats de l'activité anti hémolytique ont montré que les extraits d'*A.iva* et d'*A. cepa* possèdent une activité anti hémolytique importante avec un pourcentage d'inhibition d'hémolyse induit par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) de 91,5 % et 85,88 % respectivement. Cette inhibition est supérieure ou comparable, selon la plante, à celle d'acide ascorbique (86.89%).

L'activité antibactérienne a été évaluée sur trois souches, à savoir : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* par la méthode de diffusion sur agar. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait d'*A. iva* est active sur toutes les souches bactérienne testées avec des zones d'inhibitions de diamètres variables. Néanmoins, L'effet inhibiteur qu'a montré l'extrait d'*A. iva* sur la croissance de la bactérie *E. coli* serait d'un grand intérêt car cette espèce est naturellement résistante à de nombreux antibiotiques et extraits de plantes. En effet, l'extrait d'*A. cepa* ainsi que la pénicilline G n'ont pas été efficaces aux doses testées.

L'élimination des tanins avant les tests d'activité antibactérienne serait nécessaire, car l'inefficacité de certains de nos extraits sur certaines souches pourrait être due un effet inhibiteur, par encombrement stérique, des tanins sur les molécules antibactériennes.

Toutes les activités étudiées ont montré une corrélation entre l'effet et la concentration en composés phénoliques. Ce qui mène à suggérer que les molécules bioactives responsables des activités étudiées pourraient être dues aux composés phénoliques. Par conséquent, une étude ciblant la fraction en question pourrait être d'une grande utilité pour tirer profit de nos résultats, que nous considérons préliminaires à ce stade.

Le résultat le plus intéressant de cette étude est sans doute l'effet synergique qu'a montré l'extrait d'*A. iva* en combinaison avec la pénicilline G, sur l'inhibition de la croissance de la bactérie *E. faecalis* sur milieu solide. Ce résultat très prometteur, pourrait être confirmé par la technique de micro-dilution sur milieu liquide. Des

recherches plus étayées pourront être entretenue à l'avenir en testant cette même combinaison sur un éventail plus large de bactéries. Par la suite, un fractionnement de l'extrait sera le début de la recherche de la (ou les) molécule responsable de cette synergie dans le but de mettre au point une nouvelle formulation médicamenteuse combinée, à l'instar de *l'augmentin*® (acide Amoxicilline /acide clavulanique).

Finalement, ces résultats pourraient également faire l'objet d'une démarche exploratoire systématique similaire sur d'autres plantes, car ces dernières constituent un réservoir inépuisable de composés bioactifs.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

-A-

ADRAR, N., OUKIL, N. & BEDJOU, F. 2016. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. *Industrial Crops and Products*, 88, 112-119.

ALBU, S., JOYCE, E., PANIWNKY, L., LORIMER, J. P. & MASON, T. J. 2004. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrason Sonochem*, 11, 261-5.

ALINEZHAD, H., BAHARFAR, R., ZARE, M., AZIMI, R., NABAVI, S. F. & NABAVI, S. M. 2012. Biological activities of ethyl acetate extract of different parts of *Hyssopus angustifolius*. *Pharm Biol*, 50, 1062-6.

ALY, R., RAVID, U., ABU-NASSAR, J., BOTNICK, I., LEBEDEV, G., GAL, S., ZIADNA, H., ACHDARI, G., SMIROV, E., MEIR, A. & GHANIM, M. 2011. Biological activity of natural phytoecdysteroids from *Ajuga iva* against the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* and the perseae mite *Oligonychus perseae*. *Pest Manag Sci*, 67, 1493-8.

AUGER, J., DUGRAVOT, S., NAUDIN, A., ABO-GHALIA, A., PIERRE, D. & THIBOUT, E. 2002. Utilisation des composés allelochimiques des *Allium* en tant qu'insecticides. *Use of pheromones and other semiochemicals in integrated production*, 25, 1-13.

AUGER, J., LECOMTE, C. & THIBOUT, E. 1993. Les composés soufrés des *Allium*: leurs activités biologiques chez les insectes et leur production. *Acta Botanica Gallica*, 140, 157-168.

AZZAHRA LAHLOU, F., HMIMID, F., LOUTFI, M. & BOURHIM, N. 2014. Antioxidant activity and determination of total phenolic compounds content of *Euphorbia regis-jubae* (webb and berth) from methanol and aqueous extracts. *Int. J. Pure App. Biosci.*, 2, 112-117.

-B-

BABA AHMED-KAZI TANI, Z. & ARLET, G. 2014. [News of antibiotic resistance among Gram-negative bacilli in Algeria]. *Pathol Biol (Paris)*, 62, 169-78.

BADOR, J. 2013. *Résistance aux antibiotiques par mécanisme d'efflux*. Université de Bourgogne.

BAGHIANI, A., BOUMERFEG, S., ADJADJ, M., AMENI, D., DJERMOUNI, M., KHELIFI-TOUHAMI, F., CHAREF, N., KHENNOUF, S. & ARRAR, L. 2011. Antioxidants, Free Radicals Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibitory Potentials of *Ajuga reptans* L. Extracts. *Free Radicals and Antioxidants*, 1, 21-30.

BELLAMINE, K. 2017. *La phytothérapie clinique dans les affections dermatologiques* Université MOHAMMED V – RABAT.

BENDIF, H. 2017. *Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro des extraits actifs de quelques...Université de M'sila.*

BENKEBLIA, N. 2004. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT - Food Science and Technology*, 37, 263-268.

BENMEDDOUR, T., LAOUAR, H., BENABDI, A. A. & BRAHIMI, S. 2015. Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits de trois espèces du genre *Allium* : *A. cepa*, *fistulosum* et *sativum* cultivées dans le périmètre agricole de Doussan (wilaya de Biskra). *Courrier du Savoir*, 19, 9-14.

BENNAGHMOUCH, L., HAJJAJI, N. & GMIRA, N. 2002. Flavonoïdes d'*Ajuga reptans* L. Schreb (Labiées). *BAecntneagsh Imnosut.c.h Aetg arl.o : nF.l aVvoento*, 22.

BENNAGHMOUCH, L., HAJJAJI, N., ZELLOU, A. & CHERRAH, Y. 2001. Etude pharmacologique d'*ajuga reptans* L. *Ann pharm fr*, 59, 284.

BENSIZERARA, D., MENASRIA, T., MELOUKA, M., CHERIET, L. & CHENCHOUNI, H. 2013. Antimicrobial Activity of Xerophytic Plant (*Cotula cinerea* Delile) Extracts Against Some Pathogenic Bacteria and Fungi. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 6, 266-271.

BENZEGGOUTA, N. 2005. *Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments*. Université Mentouri de Constantine.

BEVILACQUA, S. 2011. *Évaluation de l'impact d'une équipe opérationnelle en infectiologie sur la consommation et le coût des antibiotiques au CHU de Nancy. (Essai d'intervention contrôlé).* Université Henri Poincare.

BOUCHOUKA, E. 2016. *Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes.* UNIVERSITE BADJI MOKHTAR –ANNABA.

BOUDJELAL, A. 2013. *Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (Ajuga iva, Artemisia herba alba et Marrubium vulgare) de la région de M'Sila, Algérie.,* Université Badji Mokhtar Annaba.

BOUMERFEG , S. 2010. *Antioxydative properties of Tamus communis L., Carthamus caeruleus L. and Ajuga iva L. extracts.* UNIVERSITY FERHAT ABBAS SETIF.

BOUYAHYA, A. 2016. Determination of Phenol Content and Antibacterial Activity of Five Medicinal Plants Ethanolic Extracts from North-West of Morocco. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 07.

BRAMA, S. O. 2002. *Activité antibactérienne d'extraits d'Euphorbia hirta (Linn), une plante utilisée traditionnellement dans le traitement des infections urinaires.,* Université de Ouagadougou.

BREU, W. 1996. Allium cepa L. (Onion) Part 1: Chemistry and analysis. *Phytomedicine*, 3, 293-306.

-C-

CA-SFM 2017. comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie *la société française de microbiologie* 1, 1-127.

CARLET, J., RAMBAUD, C. & PULCINI, C. 2012. Alliance contre les bactéries multirésistantes : sauvons les antibiotiques ! *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 31, 704-708.

CHABANE, D., SAIDI, F., ROUIBI, A. & AZINE, K. 2013. Activité hypoglycémique de l'extrait aqueux d'Ajuga iva L. schreber chez les rats diabétiques induite par l'alloxane. *Afrique SCIENCE*, 9, 120-127.

CHEHTIT-HACID , F. 2016. *Etude de la variabilité biochimique, physiologique et évaluation des activités biologiques des polyphénols de deux espèces du genre Pistacia (P. lentiscus L. et P. atlantica Desf.).* Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

COURVALIN, P. 2008. la résistance des bactéries aux antibiotiques: combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. *Bull. Acad. Vét. France* 1, 7-12.

COUSTÈS, T. 2016. *Loi d'avenir agricole, réglementation du médicament vétérinaire et lutte contre l'antibiorésistance.* École nationale vétérinaire d'Alfort.

-D-

DE FREITAS, M. V., NETTO RDE, C., DA COSTA HUSS, J. C., DE SOUZA, T. M., COSTA, J. O., FIRMINO, C. B. & PENHA-SILVA, N. 2008. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicol In Vitro*, 22, 219-24.

DENES, É. & HIDRI, N. 2009. Synergie et antagonisme en antibiothérapie. *Antibiotiques*, 11, 106-115.

DIAFAT, A., ARRAR, L., DERRADJI, Y. & BOUAZIZ, F. 2016. Acute and chronic toxicity of the methanolic extract of *Ajuga iva* in rodents. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 9, 9-16.

DIALLO, A. A. 2013. *Escherichia coli pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale : Prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire.* Université Toulouse III - Paul Sabatier.

DINAN, L. & LAFONT, R. 2006. Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. *J Endocrinol*, 191, 1-8.

DORSCH, W. 1997. *Allium cepa* L (Onion): Part 2 chemistry, analysis and pharmacology. *Phytomedicine*, 3, 391-397.

-E-

EBRAHIMZADEH, M., NABAVI, S. & ESLAMI, B. 2010. Antihemolytic and antioxidant activities of *Allium paradoxum*. *Open Life Sciences*, 5.

EL-HILALY, J., TAHRAOUI, A., ISRAILI, Z. H. & LYOUSSEI, B. 2006. Hypolipidemic effects of acute and sub-chronic administration of an aqueous extract

of *Ajuga iva* L. whole plant in normal and diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 105, 441-8.

EL HILALY , J. & LYOUSSI, B. 2002. Hypoglycaemic effect of the lyophilised aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 80, 109-113.

-F-

FECKA, I. & TUREK, S. 2008. Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chem*, 108, 1039-53.

-G-

GALVAN D'ALESSANDRO, L. 2013. *Eco-procédés pour la récupération sélective d'antioxydants à partir d'Aronia melanocarpa et ses co-produits.* université de Lille 1.

GÎTIN, L., DINICĂ , R. & PARNAVEL, R. 2012. The influence of extraction method on the apparent content of bioactive compounds in romanian *Allium* spp. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40, 93-97.

GUTMANN, L. 1989. Spectre des inhibiteurs de beta-lactamases. *Mddecine et Maladies Infectieuses*, 52 - 56.

-H-

HAMMOUDI, R. 2015. *Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien.* Université Kasdi Merbah - Ouargla.

HAMZA, N. 2011. *Effets préventif et curatif de trois plantes médicinales utilisées dans la Wilaya de Constantine pour le traitement du diabète de type 2 expérimental induit par le régime « high fat » chez la souris C57BL/6J.* Université Mentouri de Constantine.

HNICH, H. 2007. *La résistance bactérienne: mécanismes et méthodes de détection au laboratoire* université Sidi Mohamed Ben Abdellah.

-K-

KHADIR, A. 2014.*Effet inhibiteur de certains extraits de plantes aromatiques sur des souches de Staphylococcus aureus résistantes à la méticilline SARM isolées du CHU de Tlemcen.* Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.

KUETE, V., PENLAP BENG, V., ETOA, F.-X., MODJO, S. L., BOGNE, P., ASSOUB, J. C.-. & LONTSI, D. 2014. ACTIVITES ANTIMICROBIENNES DE L'EXTRAIT TOTAL ET DES FRACTIONS DE JUS DE FRUIT DE CITRUS MEDICA LIN. (RUTACEAE). *Pharm. Méd. Trad. Afr*, 13, 91-101.

KYUNG, K. H. 2012. Antimicrobial properties of allium species. *Curr Opin Biotechnol*, 23, 142-7.

-L-

LACHMAN, J., PRONĚK, D., HEJTMÁNKOVÁ, A., DUDJAK, J., PIVEC, V. & FAITOVÁ, K. 2003. Total polyphenol and main flavonoid antioxidants in different onion (*Allium cepa* L.) varieties. *HORT. SCI. (PRAGUE)*, 30, 142-147.

LAKHDAR, L. 2015. *Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur Aggregatibacter Actinomycetemcomitans : etude in vitro.* université Mohammed V de Rabat.

LOZNIEWSKI, A. & RABAUD C, N. 2010. Résistance bactérienne aux antibiotiques. *CCLIN Sud-Est*, 1-4.

-M-

MAKUT, M. D., GYAR, S. D., PENNAP, G. R. I. & ANTHONY, P. 2008. Phytochemical screening and antimicrobial activity of the ethanolic and methanolic extracts of the leaf and bark of *Khaya senegalensis*. *African Journal of Biotechnology* 7 1216-1219.

MANSOUR-DJAALAB, H. 2014. *Evaluation chimique et activité antidermatophyte de quelques plantes médicinales d'Algérie.* Université de Constantine1

MEDJDOUB , H. 2013.*Contribution à la recherche d'éventuelles activités biologiques de Zygodhryllum geslini Coss.* Université ABOU BEKR BELKAID.

MNAYER, D., FABIANO-TIXIER, A.-S., PETITCOLAS, E., HAMIEH, T., NEHME, N., FERRANT, C., FERNANDEZ, X. & CHEMAT, F. 2014. Chemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Activities of Six Essentials Oils from the Alliaceae Family. *Molecules*, 19, 20034-20053.

MOROH J.-L., A., BAHY, C., DJE, K., LOUKOU, Y. G. & GUEDE-GUINA, F. 2018. Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) *milne redheat* (rubiaceae) sur la croissance in-vitro des souches d'*Escherichia coli*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 77, 44 - 61.

MOUMENE, F. 2016. *Valorisation des plantes condimentaires cultivées et spontanées dans l'ouest algérien : cas du genre allium* Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbès.

MUANDA, F. N. 2010. *Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydant et étude de leurs propriétés biologiques* Université Paul Verlaine-Metz.

MUYLAERT, A. & MAINIL, J. G. 2012. Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». *Ann. Méd. Vét.*, 156, 109 -123.

-N-

NABAVI, S. F., NABAVI, S. M., N. SETZER, W., NABAVI, S. A., NABAVI, S. A. & EBRAHIMZADEH, M. A. 2013. Antioxidant and antihemolytic activity of lipid-soluble bioactive substances in avocado fruits. *Fruits*, 68, 185-193.

-O-

OBOU CONSTANTIN, O., SOPIE EDWIGE-SALOMÉ, Y., KOUASSI ELISÉE, K., GUY LÉONCE, B., SYLVIA, M. & ALLICO JOSEPH, D. 2018. Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de feuilles de *Solanum torvum* Swartz (Solanaceae) sur la croissance in vitro de 3 souches d'entérobactéries. *Appl. Biosci.*, 122, 12282-12290.

OUBOUGOUÉ BRAMA, S. 2002. *Activité antibactérienne d'extraits d'Euphorbia hirta* (Linn), une plante utilisée traditionnellement dans le traitement des infections urinaires., Université de Ouagadougou.

OUEDRAOGO, R. A., KOALA, M., DABIRE, C., HEMA, A., BAZIE, V., OUTTARA, L. P., GNOULA, C., PALE, E. & NEBIE, R. H. C. 2015. Teneur en phénols totaux et activité antioxydante des extraits des trois principales variétés

d'oignons (*Allium cepa* L.) cultivées dans la région du Centre-Nord du Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9, 281.

-P-

POOJARY, M. M., PUTNIK, P., BURSAC KOVAČEVIĆ, D., BARBA, F. J., LORENZO, J. M., DIAS, D. A. & SHPIGELMAN, A. 2017. Stability and extraction of bioactive sulfur compounds from *Allium* genus processed by traditional and innovative technologies. *Journal of Food Composition and Analysis*, 61, 28-39.

-R-

RABIOU , A., YACOUBOU , B., TOUDOU, A., MAHAMANE, S. & JEAN-PIERRE, B. 2015. Biologie ,diversité et outils pour l'analyse de la diversité génétique de l'oignon, *Allium cepa* L. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 19, 184-196.

RIOS, J. L., RECIO, M. C. & VILLAR, A. 1988. Scening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journul of Ethnopharmacology*, 23, 127- 149.

-S-

SANTANU , S., E. V. S. , S., CHANDRASHEKAR , K. & SHASHIDHARA C., S. 2011. Isolation and characterization of triterpenoids and fatty acid ester of triterpenoid from leaves of *Bauhinia variegata*. *Der Pharma Chemica*, 3, 28-37.

SCHMAUCH, G. 2010. *Interactions tannins proteines en oenologie*. Université Bordeaux 2.

SIMA, N. 2012. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory effects of fresh onion juice in experimental animals. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6.

SYLVIE, C. 2009. La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important ! *Pharmactuel*, 42, 6-21.

-T-

TALEB-SENOUCI, D., KROUF, D., GHOMARI, H., LACAILLE-DUBOIS, M. A. & BOUCHENAK, M. 2008. Effect of an aqueous extract of *Ajuga iva* on glycaemia, reverse cholesterol transport and atherogenic ratios in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proceedings of the Nutrition Society*, 67.

TEBANO, G. & PULCINI, C. 2016. Bon usage des antibiotiques dans les établissements de santé : comment avancer ? *Journal des Anti-infectieux*, 18, 98-105.

TOTY, A. A., GUESSENND, N., BAH, C., KRA A, M., OTOKORE D, A. & DOSSO, M. 2013. Évaluation in-vitro de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harungana madagascariensis* sur la croissance de souches multi-résistantes. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 82, 12-21.

-V-

VENSKUTONIS, P. R., BOUDJENIBA, M., MIARA, M. D., HARIR, M., LAZALI, M. & BENDIF, H. 2017. Biological screening of *Ajuga iva* extracts obtained by supercritical carbon dioxide and pressurized liquid extraction. *Journal of Medicinal Botany*, 1, 33.

-W-

WEI, L., ZHANG, W., YIN, L., YAN, F., XU, Y. & CHEN, F. 2015. Extraction optimization of total triterpenoids from *Jatropha curcas* leaves using response surface methodology and evaluations of their antimicrobial and antioxidant capacities. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18, 88-95.

WEISS, K. 2002. La résistance bactérienne la nouvelle guerre froide. *Le Médecin du Québec*, 37, 41-47.

WESSNER, M., CHAMPION, B., GIRAULT, J.-P., KAOUADJI, N., SAIDI, B. & LAFONT, R. 1992. Ecdysteroids from *ajuga iva* *Phytochemistry*, 31, 3785-3788.
YALA, D., MERAD, A. S., MOHAMED, D. & OUAR KORICH, M. N. 2001. Résistance bactérienne aux antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, 91.

-Y-

YALA, D., MERAD, A. S., MOHAMED, D. & OUAR KORICH, M. N. 2001. Résistance bactérienne aux antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, 91.

-Z-

ZIAI, S. 2014.*la résistance bactérienne aux antibiotiques : apparition et stratégies de lutte..* Université de Limoges.

ANNEXES

Annexe 1 :liste du matériel et réactifs utilisés

A) Verrerie

- Bécher 100 ml, 10ml
- Erlenmeyer 250 ml, 100 ml, 1l
- Eprouvette 100 ml, 500 ml
- Entonnoir
- Tubes à essai
- Boîtes de pétries
- Pipette pasteur
- Flacons
- Cuve de spectres
- Verre de montre
- Cristallisoirs

B) Réactifs et milieux de culture

- Carbonate de sodium (NaCO_3)
- Folin-ciocalteu
- Acide gallique
- Quercétine
- Ethanol
- Methanol
- Aluminiumchloride (AlCl_3)
- Chlorure ferrique (FeCl_3)
- Acide acétique anhydrique
- Bicarbonate de sodium
- Acide sulfurique (H_2SO_4)
- Eau physiologique
- Eau distillée

- Poudre Muller-Hinton
- Gélose nutritive
- Bouillon nutritif

C) Appareillage

- Bain marie (Nuve bath)
- Agitateur magnétique (Labtech)
- Hotte chimique (Cruma 670)
- Balance analytique (Kern)
- Etuve (Venticell)
- Autoclave (Wise clave)
- Spectrophotomètre (Optizen 3220 uv)
- Ultrasons (Selecta)
- Agitateur vortex (Nahita)
- Centrifugeuse (Ez swing 3k)
- pH mètre (Mettlertoledo)

D) Autres matériels :

- Bec benzène
- Ecouvillon
- Papier filtre
- Portoir
- Pince
- Spatule
- Barreau magnétique
- Tubes d'hémolyse
- Embouts
- Tamis
- Micropipette

Annexe 2 : Courbes d'étalonnage

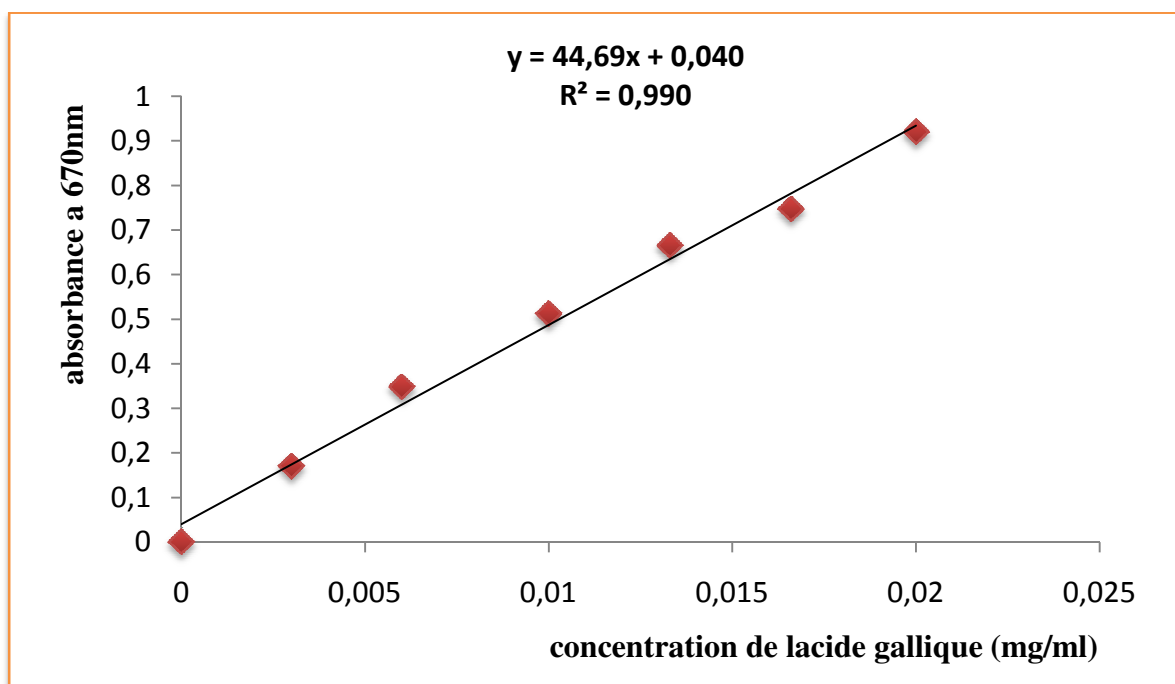


Figure 9: courbe d'étalonnage à l'acide gallique pour le dosage des polyphénols

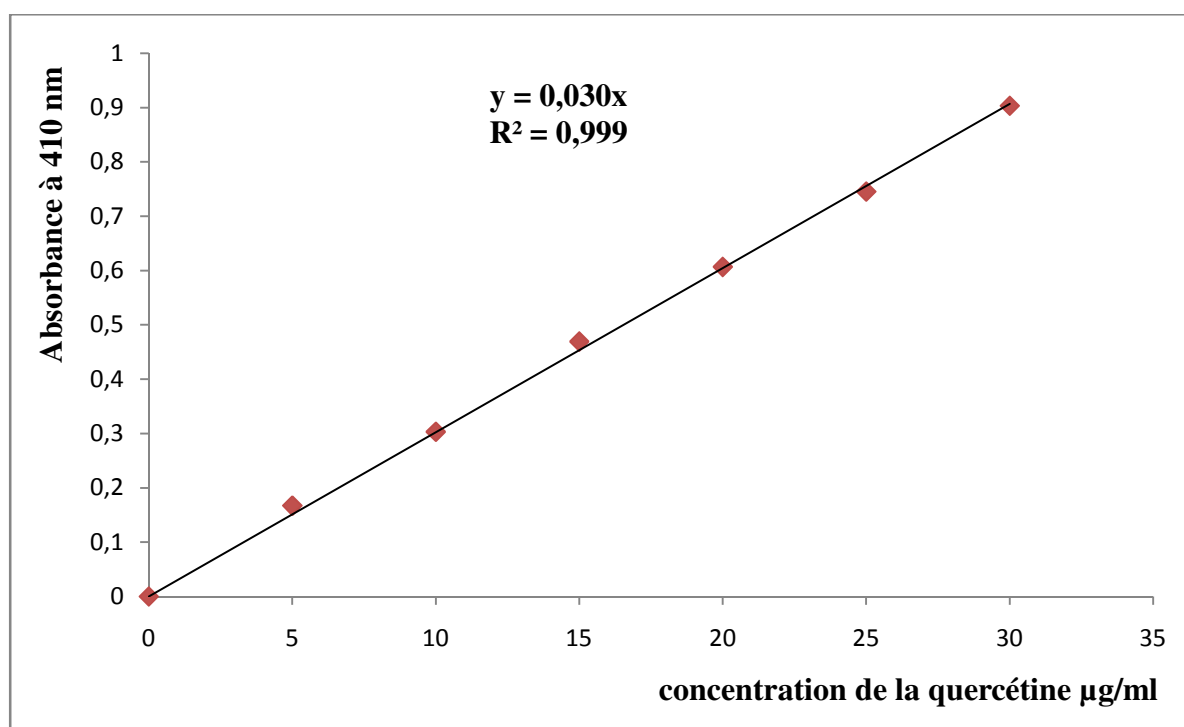


Figure 10: courbe d'étalonnage à la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

Annexe 3 : préparation des milieux de culture

Gélose nutritive (GN)

Dissoudre 23 g de gélose nutritif dans un 1l d'eau distillé, faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète. La solution obtenue est ensuite stérilisée à 121C° dans l'autoclave pendant 15 minutes.

Gélose Mueller Hinton (MH)

Dissoudre 38 g de gélose Muller Hintondans un 1l d'eau distillé, faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète.la solution obtenue est ensuite stérilisée a 121C° dans l'autoclave pendant 15 minute.

Ces milieux prêts à l'emploi ont été conservés dans des flacons bien fermés.

Annexe 4:Préparation de PBS (phosphate buffered saline) à pH = 7,4

Nous avons préparé 1 litre d'une solution tampon phosphate saline (PBS) par l'utilisationdes composés suivants : NaCl 8 g, KCl 0,2 g, Na₂HPO₄ 1,44 g, KH₂PO₄ 0,24g et le ph été maintenu par Hcl.

Résumé

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de molécules biologiquement actives. Dans ce contexte, nous avons tenté d'évaluer l'activité antibactérienne et anti-hémolytique des extraits préparés à partir de deux plantes : *Allium cepa* et *Ajuga iva*. L'analyse quantitative des polyphénols et des flavonoïdes des extraits éthanoliques a montré que la teneur en composés phénoliques était de 0.396 ± 0.023 mg EAG/g et 4.310 ± 0.030 mg EAG/g pour l'extrait d'*A. cepa* et *A.iva* respectivement, tandis que la teneur la plus élevée en flavonoïdes était celle de *A.iva* ($2,83 \pm 0,006$ mg EQ/g). L'analyse phytochimique avait également montré la présence de tanins dans les deux extraits. Les deux plantes ont montré une inhibition dose dépendante élevée de l'hémolyse, *in vitro*, induite par le H₂O₂, dont la plus importante était de *A. iva*. L'évaluation de l'activité antibactérienne, par la méthode de diffusion sur milieu solide, vis-à-vis les souches bactériennes : *E.coli*, *S.aureus* et *E. faecalis* a prouvé que les extraits des deux plantes ont une forte activité sur *E. faecalis* et une activité toujours plus importante pour l'extrait de *A. iva* (CMI : 50 mg/ml sur *E. faecalis* et 100 mg/ml sur *E.coli*). Enfin, la recherche d'un effet synergique entre les deux extraits et des antibiotiques a été fructueuse pour l'extrait de *A. iva* qui a montré une action synergique avec la pénicilline G sur l'inhibition de la bactérie *E. faecalis*.

Mots-clés : *Allium cepa*, *Ajuga iva*, activité anti-hémolytique, activité antibactérienne, synergie, pénicilline, polyphénols.

Abstract

Plant extracts contain a variety of biologically active molecules. In this context, we have tried to evaluate the antibacterial and anti-hemolytic activity of extracts prepared from two plants: *Allium cepa* and *Ajuga iva*. Quantitative analysis of the polyphenols and flavonoids of the ethanolic extracts showed that the phenolic content was 0.396 ± 0.023 mg EGA/g and 4.310 ± 0.030 mg EGA/g *A. cepa* and *A.iva* respectively, while the highest content of flavonoids was given by *A.iva* extract (2.83 ± 0.006 mg EQ/ g). The phytochemical analysis showed the presence of tannins in the both extracts. Both of the two plants extracts showed high dose-dependent inhibition of H₂O₂-induced *in vitro* hemolysis, which was higher for *A. iva*. The evaluation of the antibacterial activity, by the agar diffusion method, on three bacterial strains including *E.coli*, *S.aureus* and *E. faecalis* showed that both of the two plants have a strong activity on *E. faecalis* and a better one for *A. iva* extract (MIC: 50 mg/ml on *E. faecalis* and 100 mg/ml on *E. coli*). Finally, the search for a synergistic effect between the two extracts and antibiotics was successful for the *A. iva* extract which showed a synergistic interaction with penicillin G on the inhibition of the bacterium *E. faecalis*.

Keywords: *Allium cepa*, *Ajuga iva*, anti-hemolytic activity, antibacterial activity, synergy, penicillin, polyphenols.