

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Jijel

Faculté des Sciences Exactes et
Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie
Moléculaire et Cellulaire



MB.08/10

جامعة جيجل

كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة

قسم البيولوجيا الجزيئية والخلاوية

Mémoire De Fin D'études Pour L'obtention Du Diplôme
Des Etudes Supérieures en Biologie
Option : Microbiologie

Intitulé

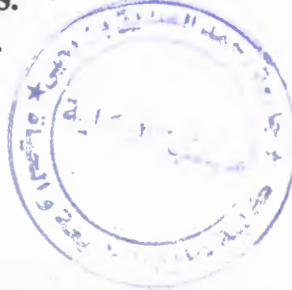
1
A

*Extraction et évaluation expérimentale in vitro de
l'activité antibactérienne des extraits de quelques
plantes médicinales*

Membres du Jury :

Examinatrice : M^{elle} Akroum S.

Encadreur : M^{elle} Boussouf L.



Présenté par :

Younsi Yamina
Meledjem Samira
Naïdja Khadidja



Année Universitaire : 2009/2010

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

On tient en premier lieu à remercier Dieu, le tout puissant, qui nous a permis d'accomplir ce travail.

Nous souhaitons exprimer notre plus vive gratitude à M^{elle} *Akrout Souâd* qui nous a fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail.

Nous remercions également M^{elle} *Boussouf Lyliâ* pour avoir accepté de diriger ce mémoire.

Nous la remercions pour sa disponibilité, ses conseils et surtout pour son sourire.

On tient également à remercier le Dr. *Sifour* pour ses conseils, ses encouragements et pour tout le temps qu'il nous a consacré.

Un grand merci à nos familles qui nous ont offert le soutien moral et matériel dont on avait besoin, et surtout de nous avoir supporté pendant la durée de ce travail

En fin, un grand merci à tous ceux qui nous ont aidé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Sommaire

Introduction	1
Partie bibliographique	
Chapitre I : les plantes et la médecine	
I.1. Historique.....	4
I.2. Domaines d'applications.....	4
Chapitre II : Substances actives	
II.1. Les composés phénoliques.....	9
II.1.1. Les huiles essentielles	9
II.1.1.1. Définition.....	9
II.1.1.2. Localisation et répartition	9
II.1.1.3. Classification.....	10
II.1.1.4. Pouvoir antimicrobien.....	10
II.1.2. Les flavonoïdes.....	11
II.1.2.1. Définition.....	11
II.1.2.2. Localisation et répartition.....	11
II.1.2.3. Classification.....	12
II.1.2.4. Pouvoir antimicrobien.....	12
II.1.3. Les tanins.....	13
II.1.3.1. Définition.....	13
II.1.3.2. Localisation et répartition.....	13
II.1.3.3. Classification.....	13
II.1.3.4. Pouvoir antimicrobien.....	14
II.2. Les composés azotés.....	15
II.2.1. Les alcaloïdes	15
II.2.1.1. Définition.....	15
II.2.1.2. Localisation et répartition.....	15
II.2.1.3. Classification.....	15
II.2.1.4. Pouvoir antimicrobien.....	16
Chapitre III : Les plantes médicinales sélectionnées	
III.1. <i>Achillea odorata</i>	18
III.1.1. Présentation et classification.....	18
III.1.2. Composition chimique.....	19
III.1.3. Utilisations thérapeutiques.....	19
III.2. <i>Satureja vulgare</i>	19

III.2.1. Présentation et classification.....	19
III.2.2. Composition chimique.....	20
III.2.3. Utilisations thérapeutiques.....	20
III.3. <i>Origanum vulgare</i>	21
III.3.1. Présentation et classification.....	21
III.3.2. Composition chimique.....	21
III.3.3. Utilisations thérapeutiques.....	22

Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal.....	25
I.1.1. Récolte des plantes.....	25
I.1.2. Les huiles essentielles.....	26
I.1.2.1. Procédé d'extraction.....	26
I.1.2.2. Détermination du rendement des huiles essentielles.....	28
I.1.2.3. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles par CPG/SM.....	28
I.1.3. Les extraits bruts.....	28
I.1.3.1. Principe d'extraction.....	28
I.1.3.2. Détermination du rendement des extraits bruts.....	29
I.1.3.3. Dosage des polyphénols.....	29
I.1.3.4. Dosage des flavonoïdes.....	29
I.2. Les souches bactériennes.....	29
I.2.1. Entretien	30
I.3. Les tests antibactériens.....	30
I.3.1. Préparation des inoculums.....	30
I.3.2. L'antibiogramme.....	30
I.3.3. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	30
I.3.3.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles.....	31
I.3.3.2. Activité antibactérienne des extraits bruts.....	31
I.3.3.3. Détermination des CMI pour les extraits bruts.....	31

II. Résultats

II.1. Le rendement des huiles essentielles.....	33
II.2. La composition chimique des huiles essentielles.....	33
II.3. Le rendement des extraits bruts.....	36
II.4. La teneur en polyphénols et en flavonoïdes.....	38
II.5. Résultats de l'antibiogramme.....	41
II.6. Résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles.....	42

II.7. Résultat de l'activité antibactérienne des extraits bruts	43
II.7.1. Extraits bruts d' <i>Achillea odorata</i>	43
II.7.2. Extraits bruts de <i>Satureja vulgare</i>	44
II.7.3. Extraits bruts d' <i>Origanum vulgare</i>	45
II.8. Résultats des CMI	
II.8.1. Les CMI des extraits bruts d' <i>Achillea odorata</i>	45
II.8.2. Les CMI des extraits bruts de <i>Satureja vulgare</i>	46
II.8.3. Les CMI des extraits bruts d' <i>Origanum vulgare</i>	47
III. Discussion	49
Conclusion	53
Références bibliographiques	55
Annexes	66

Liste des abréviations

%	:	Pourcentage
μl	:	Microlitre
μm	:	Micromètre
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
AlCl₃	:	Chlorure d'aluminium
C°	:	Degré Celsius
Cm	:	Centimètre
CPG/SM	:	Chromatographie en phase aqueuse / Spectrométrie de masse
DO	:	Densité optique
g	:	Gramme
HHDP	:	Hyxahydroxydéphénique
HIV	:	Virus de l'immunodéficience humaine (HIV)
J.C	:	Jésus Christ
Kpa	:	kilo pascal
m	:	Mètre
mg	:	Milligramme
min	:	Minute
ml	:	Millilitre
mm	:	Millimètre
NaCO₃	:	Carbonate de sodium
nm	:	Nanomètre
PIV	:	Virus para influenza
RSV	:	Virus respiratoire syncytial

Liste des figures

Figure 01 : Les poiles épidermiques sur le calice d'une fleur d'origan.....	10
Figure 02 : Glande simple, entièrement chargée d'huile et en forme de dôme (800x).....	10
Figure 03 : Squelette de base des flavonoïdes.....	11
Figure 04 : Les différentes classes des flavonoïdes.....	12
Figure 05 : <i>Achillea odorata</i>	18
Figure 06 : <i>Satureja vulgare</i>	19
Figure 07 : <i>Origanum vulgare</i>	21
Figure 08 : La carte géographique des trois stations de récolte.....	26
Figure 09 : Appareil d'hydrodistillation.....	26
Figure 10 : Pourcentage des rendements des trois plantes en huiles essentielles.....	33
Figure 11 : Le rendement des extraits bruts pour <i>Origanum vulgare</i>	37
Figure 12 : Le rendement des extraits bruts pour <i>Satureja vulgare</i>	37
Figure 13 : Le rendement des extraits bruts pour <i>Achillea odorata</i>	38
Figure 14 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols.....	39
Figure 15 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.....	39
Figure 16 : La teneur en polyphénols des trois plantes	40
Figure 17 : La teneur en flavonoïdes des trois plantes.....	40
Figure 18 : Effets des antibiotiques sur quelques souches testées.....	41
Figure 19 : Effets des trois huiles essentielles sur le développement de <i>Klebsiella oxytoca</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	42
Figure 20 : Effets des extraits bruts ethanoliques, méthanolique et aqueux des trois plantes sélectionnées sur la croissance bactérienne de quelques souches testées.....	43
Figure 21 : Structure schématique de la paroi bactérienne des Gram positif et Gram négatif....	51

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les espèces végétales utilisées dans l'expérimentation.....	25
Tableau 02 : Conditions opératoires d'hydrodistillation des trois plantes sélectionnées.....	27
Tableau 03 : Les composés majoritairement identifiés de l'huile essentielle d' <i>Achillea odorata</i>	34
Tableau 04 : La composition chimique de l'huile essentielle de <i>Satureja vulgare</i>	35
Tableau 05 : La composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i>	36
Tableau 06 : La sensibilité des souches étudiées avec les antibiotiques utilisés	41
Tableau 07 : Les diamètres des zones d'inhibitions en mm obtenus avec les huiles essentielles des trois plantes.....	42
Tableau 08 : Les diamètres des zones d'inhibitions en mm obtenus avec les extraits bruts d' <i>Achillea odorata</i>	44
Tableau 09 : Les diamètres des zones d'inhibitions en mm obtenus avec les extraits bruts de <i>Satureja vulgare</i>	44
Tableau 10 : Les diamètres des zones d'inhibitions en mm obtenus avec les extraits bruts d' <i>Origanum vulgare</i>	45
Tableau 11 : Les concentrations minimales inhibitrices en mg/ml des extraits bruts d' <i>Achillea odorata</i>	46
Tableau 12 : Les concentrations minimales inhibitrices en mg/ml des extraits bruts de <i>Satureja vulgare</i>	46
Tableau 13 : Les concentrations minimales inhibitrices en mg/ml des extraits bruts d' <i>Origanum vulgare</i>	47

Introduction

Introduction

Le traitement des infections bactériennes est en général basé sur l'utilisation des antibiotiques. La très grande utilisation souvent inadaptée de ces molécules antibactériennes a entraîné la sélection de souches bactériennes multirésistantes. C'est le cas par exemple des bactéries productrices de β -lactamases à spectre élargie, résistantes à toutes les β -lactamines et des bactéries qui présentent une résistance aux fluoroquinolones telles que l'acide nalidixique et la ciprofloxacine. En effet, les β -lactamines et les fluoroquinolones constituent les familles d'antibiotiques les plus utilisées en thérapeutique humaine [1]. La résistance des bactéries à ces antibiotiques désarme souvent les médecins face à certaines infections d'origine bactérienne [2].

Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère donc indispensable pour lutter contre ces germes résistants. Dans ce but, l'investigation des plantes médicinales très diversifiées et très répandues chez nous semble être un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances. Les plantes étaient et sont toujours, une source essentielle de médicaments.

Aujourd'hui encore, une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes.

L'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites.

Dans cet optique, nous avons réalisé notre travail dont les objectifs visent à :

- L'extraction des huiles essentielles et des extraits bruts d'*Achillea odorata*, de *Satureja vulgare* et d'*Origanum vulgare*.
- L'identification des constituants des huiles essentielles des trois plantes extraites par hydrodistillation.
- Le dosage des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits bruts.
- l'évaluation de l'activité antibactérienne *in vitro* des extraits sur des bactéries isolées à partir de patients hospitalisés.

Partie
bibliographique

Chapitre I :
Les plantes et la
médecine

I. Les plantes et la médecine

I.1. Historique

Les plantes médicinales font partie du savoir de base de toutes les sociétés humaines. La médecine par les plantes est née en Inde près de 5000 ans avant JC. et s'est propagée en même temps que le bouddhisme dans toute l'Asie. Le premier texte connu sur les vertus médicinales des plantes n'a été gravé que 2000 ans plus tard, sur des tablettes d'argile par les Sumériens, en basse Mésopotamie. Depuis, l'homme cherche inlassablement à percer leurs mystères et à en découvrir l'ensemble des qualités thérapeutiques.

En Chine, dès le premier siècle, 250 plantes médicinales étaient cataloguées suivant leurs lieux de production, leur mode de préparation et leur action sur un organe précis comme le ricin (*Ridnus communis*) [4].

A cette époque en Occident, le médecin grec Hippocrate avait déjà posé (au premier siècle avant JC.) les grands principes curatifs de plus de 200 variétés de plantes actives sur la beauté et la santé des femmes tel que la sauge (*Slavia officinalis*). Les premières boutiques d'apothicaires apparaissent en Europe au 13^{ème} siècle et les plantes locales s'utilisent massivement. L'ouverture de nouvelles routes maritimes vers l'Orient a permis d'enrichir la pharmacopée végétale occidentale de nouvelles plantes et épices qui ont apporté leur lot de vertus comme le ginseng (*Panax ginseng*) [5].

Le sixième siècle marque l'éveil de l'activité intellectuelle voire scientifique chez les Arabes. La phytopharmacologie arabe à cette époque trouve son origine dans le Coran, le hadith, chez les médecins non Musulmans : Juifs, Chrétiens et Sasanides, et aussi la participation de divers peuples qui adhèrent à l'Islam : Iranien, Indien, Turc, Kurde, Berbère et Africain..., qui ont tous contribué à cette phytopharmacologie arabo-musulmane [6].

Le travail des chimistes du XIX^{ème} siècle a permis par la suite une identification plus précise des agents actifs des plantes et une meilleure définition de leurs vertus. Les progrès de la science dans les années 30, ont permis également un rapprochement significatif entre la pharmacopée végétale et la médecine basée sur la chimiothérapie. Depuis quelques décennies, la phytothérapie, a proposé des remèdes à base de plantes adaptés au mal à traiter et pouvant être prescrits sous forme de tisane, de sirop ou encore d'inhalation. Ainsi, les recherches actuelles ont confirmé la pertinence des méthodes empiriques du passé appliquées aux plantes [4].

I.2. Domaines d'application des plantes médicinales

Depuis très longtemps, de nombreuses plantes sont utilisées pour leurs propriétés médicinales dans la conservation de la santé des hommes et dans la survie de l'humanité [7]. Les substances naturelles issues des plantes ont divers intérêts mis à profit dans l'industrie à

savoir en alimentation, en cosmétologie, et en pharmacie. A l'heure actuelle, l'utilisation des plantes médicinales connaît une certaine évolution dans différents domaines.

I.2.1. En médecine

Dans ce domaine, plusieurs applications des plantes médicinales sont connues grâce à leurs multiples actions thérapeutiques et grâce à leurs divers effets médicaux dont elles sont utilisées comme :

I.2.1.1 Agents antiseptiques

Il existe des plantes qui ont des propriétés antiseptiques importantes contre une grande variété de microorganismes et de virus [4]. L'activité antivirale, antibactérienne, et antiparasitaire est due essentiellement à l'efficacité des huiles essentielles et d'autres molécules que peuvent contenir les extraits de diverses plantes médicinales. Ainsi beaucoup de recherches ont pu confirmer leur activité sur un large éventail de bactéries à Gram positif et à Gram négatif, sur des levures, des parasites, et des virus qui sont fortement sensibles aux molécules aromatiques, par conséquent de nombreuses pathologies virales sévères montrent des améliorations importantes avec leur utilisation [8].

Dans ce cadre, on peut donner ce qui suit comme exemple de plantes à activité antiseptique :

Allium sativum

L'ail a été utilisé comme antiseptique contre la peste et le choléra, comme puissant vermifuge et désinfectant intestinal. Il est également employé pour renforcer l'action des antibiotiques chimiques [7].

Zingiber officinale

Plusieurs études ont confirmé l'activité antibactérienne du gingembre *in vitro* contre plusieurs bactéries tels que *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Yersinia enterocolitica* [9].

Melaleuca alternifolia

Les huiles essentielles du théier ont des effets antiseptiques qui sont bien établis, notamment dans le traitement de certaines maladies infectieuses, comme les mycoses, et les infections dermatologiques, telle que la candidose vaginale [10]. Elles sont également efficaces sur des bactéries pathogènes comme *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, et *Streptococcus spp* [11].

I.2.1.2. Agents immunostimulants

D'autres plantes ont une action immunostimulante qui permet de renforcer le système immunitaire et d'aider à prévenir les infections telle la plante *Uncaria tomentosa* qui peut concourir au traitement du SIDA [7].

I.2.1.3. Agents antidiabétiques

Certaines plantes médicinales ont des propriétés hypoglycémiantes, elles abaissent le taux de sucre dans le sang et dans les urines comme le cas de la plante *Azadirachta indica* [12].

Les plantes médicinales ont donc un grand pouvoir de soigner une large variété d'affections et de traiter certaines pathologies telles que les infections urinaires, les ulcères d'estomac, et les désordres nerveux [13].

I.2.2. En industrie pharmaceutique

Dans l'industrie pharmaceutique, la recherche des principes actifs des plantes médicinales est d'une importance capitale, car elle permet la mise au point de nouveaux médicaments qui sont apparus récemment dans notre thérapeutique moderne que ce soit des médicaments utilisés en cancérologie, en dermatologie, ou en infectiologie [7, 14]. Beaucoup de médicaments sont donc préparés à base de plantes ou de leurs extraits, ils sont commercialisés pour l'homme et pour les animaux (Daflon, ...).

I.2.3. En alimentation

L'homme et les plantes vivent cote à cote depuis des dizaines de milliers d'années. Il s'est habitué à consommer et à digérer différentes espèces de plantes, qui sont souvent appréciées pour leurs qualités aussi bien médicinales que nutritives [7].

Certaines plantes sont utilisées en nature comme des arômes pour ajouter aux aliments des odeurs et/ou des saveurs, et comme des épices ou des condiments pour relever le caractère gustatif des plats et des recettes culinaires (*Origanum vulgare*) [15].

D'un autre côté et grâce aux propriétés antioxydantes de certains extraits de plantes, qui associées à leur activités antimicrobiennes permet leur l'utilisation comme agents conservateurs et protecteurs des aliments contre la peroxydation et la modification de leurs caractères organoleptiques [16, 17, 18,19].

I.2.4. En agriculture

Dans ce domaine, les plantes sont utilisées pour leurs propriétés insecticides, c'est le cas par exemple d'*Azadirachta indica*. Cette plante médicinale est parmi les plus importantes au Bangladesh. Les huiles de cet arbre ont des utilisations dans l'agriculture comme des alternatives biologiques et naturelles aux insecticides chimiques [9, 12].

I.2.5. En cosmétologie

La cosmétologie et le secteur des produits d'hygiène sont aussi des consommateurs des plantes et leurs extraits, même si le coût élevé des produits naturels conduit à privilégier parfois les produits synthétiques [20]. Ils sont intégrés dans des analgésiques pour la peau, les produits solaires et les crèmes, ainsi que dans de nombreux produits d'ambiance [21]. On les retrouve

également dans les formulations de parfums, des préparations pour les bains et dans les huiles de massage [22].

Chapitre II :
Les substances
actives



II. Les substances actives

La capacité d'un remède à base de plantes d'influencer les fonctions du corps humain est due à ses différents composants [15]. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent des réactions chimiques ultérieures on les appelle alors métabolites secondaires [23,24].

Nous vous présentons ci-après les différentes classes chimiques des principaux métabolites secondaires. Ces derniers sont répartis en deux classes chimiques :

II.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques constituent un des groupes les plus nombreux et largement distribués des substances dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues. Ils résultent biogénétiquement de deux voies synthétiques principales : la voie du shikimate et du malonate. Les principales classes des composés phénoliques sont les huiles essentielles, les flavonoïdes et les tanins [25,26].

II.1.1. Les huiles essentielles

II.1.1.1. Définition

Les huiles essentielles sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes, synthétisées par les cellules sécrétrices des plantes aromatiques, elles sont liquides à température ambiante et rarement colorées. Elles sont aussi peu miscibles à l'eau, voire non miscibles. En revanche, elles sont généralement assez solubles dans les solvants organiques. Ces produits odorants sont extraits par entraînement à la vapeur d'eau ou par pression [27].

II.1.1.2. Localisation et répartition

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Certaines familles en sont particulièrement riches : Coniferales, Myrtaceae, Umbelliferales et Lamiaceae [28].

Les sites producteurs des huiles essentielles peuvent se rencontrer dans tout type d'organe : fleurs, feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits ou graines [20]. La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement liées à la présence des structures spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante (figure 1, 2) :

- Les poils glandulaires épidermiques, rencontrés souvent chez les Lamiaceae, Geraniaceae et Rutaceae. Ils produisent des essences dites superficielles.
- Les organes sécréteurs sous-cutanés comprenant des cellules et des poches sécrétrices qui sont généralement disséminées au sein du tissu végétal chez les Myrtaceae, Aurantiaceae, ainsi que des canaux sécréteurs chez les Umbelliferales [29].

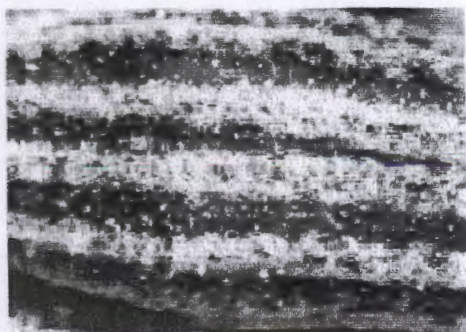


Figure 1 : Les poiles épidermiques sur le calice d'une fleur d'origan [30].



Figure 2 : Glande simple, entièrement chargée d'huile et en forme de dôme (800x) [31].

II.1.1.3. Classification

Les huiles essentielles ont une composition chimique très complexe. Ces extraits odorants appartiennent principalement à deux grands types chimiques :

- Les composés terpéniques : ils sont formés d'unité isoprénique (en C_5) et comprennent : les monoterpènes (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), les diterpènes (C_{20}), les sesterpènes (C_{25}), les triterpènes (C_{30}), les tetraterpènes et les polyterpènes.
- Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane dont la biogénèse est différente de celle des terpènes [20].

II.1.1.4. Pouvoir antimicrobien

Les vertus antimicrobiennes des huiles essentielles sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises [32]. On note l'étude faite par Chamberland en 1887 sur l'activité antimicrobienne des essences de cannelle, d'origan et de girofle [33], et qu'en 1919 Gatte Fosse a montré que le bacille de Koch était détruit en 5 minutes par une émulsion à 1% d'huile de pin. De nos jours, l'emploi des huiles essentielles se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche portent sur les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles des plantes aromatiques [34, 35, 36, 37].

In vitro, l'effet microbicide de certaines huiles essentielles a même été trouvé supérieur à celui des antibiotiques [38]. De plus, elles ont un champ d'action très large. Plusieurs travaux montrent que les huiles essentielles et leurs composés majoritaires ont un effet antimicrobien vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif [39, 40, 41, 42, 43, 44]. En effet, l'activité antifongique et antibactérienne des huiles essentielles et de leurs constituants est décrite par plusieurs études récentes [45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53] :

Ultée et coll. ont montré l'effet bactéricide du carvacrol sur *Bacillus cereus* dans les aliments [54, 55].

Didry a montré l'effet antimicrobien du thymol et du carvacrol, utilisé individuellement ou en combinaison sur des germes d'infections respiratoires [56].

Juven et coll. ont obtenu une diminution importante des cellules vivantes de *Salmonella typhimurum* en la traitant par l'huile de thym et ses constituants actifs [57].

Récemment, une étude *in vitro* a montré l'effet antiviral de l'huile essentielle d'origan et de girofle sur le virus type 1 de l'*Herpès simplex* ainsi que sur le virus de la maladie de Newcastle [58]. L'effet de l'huile de *Melaleuca alternifolia* et celle d'*Eucalyptus* d'origine australienne ont été aussi testés sur le virus de l'*Herpès simplex* dans des cultures cellulaires [59].

II.1.2. Les flavonoïdes

II.1.2.1. Définition

Le terme flavonoïde provient de flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange [60]. Les flavonoïdes sont des composés phénoliques, qui ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atome de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles (A et B) en C₆, reliés par une chaîne en C₃ (figure 3) [28].

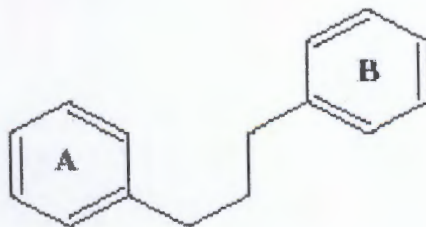


Figure 3 : Squelette de base des flavonoïdes [28].

II.1.2.2. Localisation et répartition

Les flavonoïdes sont présents dans de nombreux organismes végétaux, particulièrement dans les fruits et les légumes. Que ce soit au niveau de leurs feuilles, de leurs tiges, de leurs fleurs ou de leurs pollens.

Les végétaux les plus riches en flavonoïdes sont : le raisin, le thé, le cacao, l'oignon et la pomme.

Ils s'agissent de pigments colorés conférant la large palette de couleurs qu'ils empruntent aux végétaux [61].

II.1.2.3. Classification

La famille des flavonoïdes peut se diviser en six classes qui diffèrent par la disposition des OH sur le squelette de base : les flavanols, les flavones, les flavonols, les flavanones, les isoflavones et les anthocyanidines (figure 4) [62].

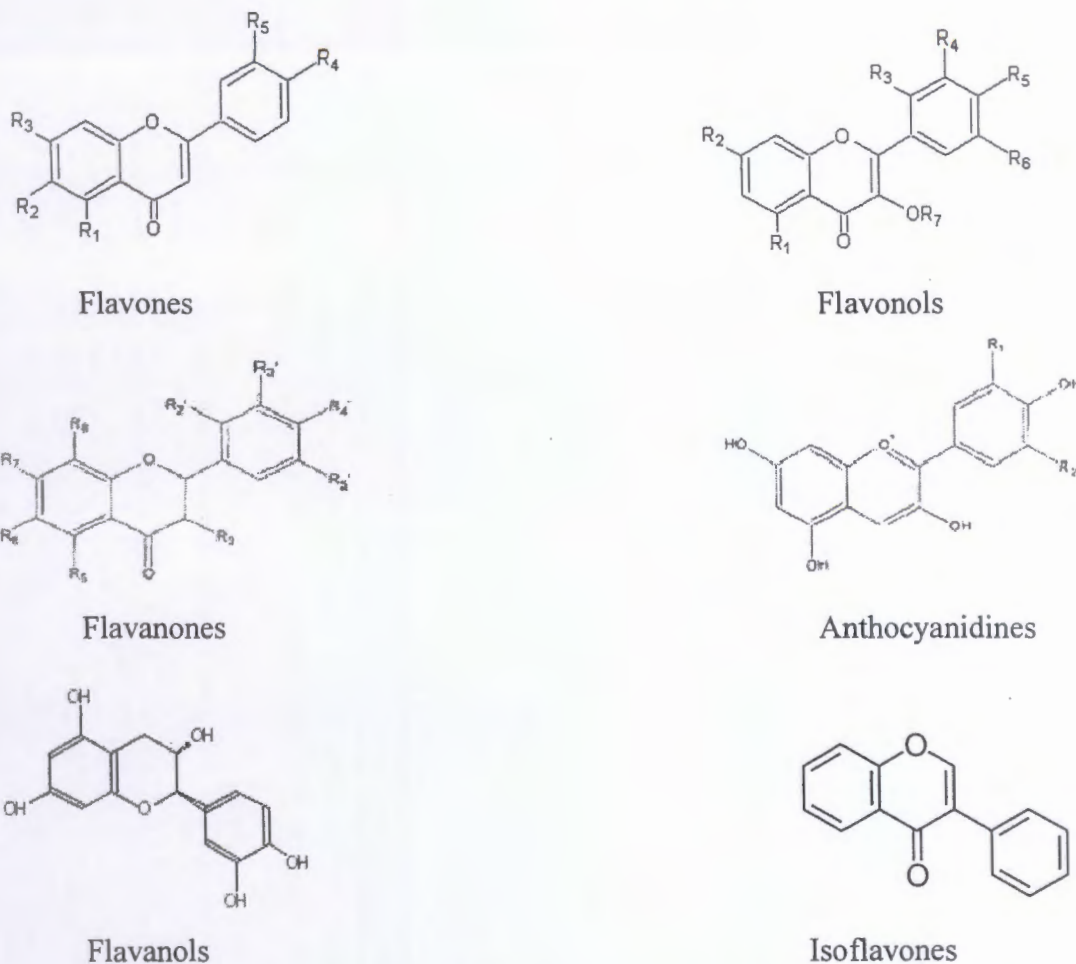


Figure 4 : les différentes classes des flavonoïdes [62].

II.1.2.4. Pouvoir antimicrobien

Les flavonoïdes montrent une importante activité antimicrobienne. Plusieurs travaux ont bien confirmé cette propriété.

Théoriquement, les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont de puissants inhibiteurs *in vitro* de l'ADN gyrase [63]. Cette propriété antibactérienne est confirmée par plusieurs études à savoir celle réalisée par Harikrishna et al en 2004 qui ont mis en évidence ce pouvoir antibactérien. D'autre part, une étude a montré l'effet bactéricide de différentes flavanones sur une souche de *Staphylococcus aureus*.

Une étude récente a montré l'effet antibactérien de certains flavonoïdes isolés de *Dorstenia barteri*.

Harikrishna et al en 2004 ont montré le pouvoir antibactérien d'un flavonoïde glucoside "prunine-6-O-p-coumarate" contre deux souches de bactéries Gram positif, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus albus*, et deux bactéries Gram négatif, *Escherichia coli* et *Proteus vulgaris* [64]. L'activité antifongique des flavonoïdes et aussi établie, une étude faite sur *Dianthus caryophyllus* a montré l'efficacité de ces flavonoïdes sur des souches fongiques [65].

Les flavonoïdes sont capables également d'agir au niveaux de la synthèse des protéines virales. Musci et Pragai en 1985 ont montré une corrélation entre l'effet inhibiteur de certains flavonoïdes sur le virus d'herpès et leur capacité à augmenter les taux intracellulaires en AMP_C dans les cellules infectées. Des travaux ont mis en évidence un impact des flavonoïdes sur le rétrovirus HIV responsable de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), aussi les flavonoïdes se sont avérés de bons inhibiteurs de la transcriptase reverse.

Une autre étude a montré que, les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface de virus HIV, empêchant ainsi la liaison de virus à la cellule hôte. Les flavonoïdes seraient susceptibles d'inhiber l'intégrase rétrovirale du virus HIV-1. Cette enzyme permet l'intégration du génome viral à celui de la cellule hôte [63].

II.1.3. Les tanins

II.1.3.1. Définition

Les tanins sont des molécules secondaires polyphénoliques, hydrosolubles de masse molaire comprise entre 500 et 2000 Dalton. Leur structure chimique leur confère une capacité très développée de se fixer sur des molécules telles que les alcaloïdes, la gélatine, les polysaccharides, et essentiellement les protéines [66].

II.1.3.2. Localisation et répartition

Les tanins sont très répandus dans le règne végétal et l'en on trouve des quantités importantes chez les arbres en générale, et surtout chez certaines familles telles que les *Rosaceae*, les *Ericaceae*, les *Sterculiaceae* et les légumineuses. Ils peuvent être présents dans tous les organes : les racines, les feuilles et les tiges.

Dans les plantes les tanins sont détectables dans les vacuoles végétales dont ils sont souvent associés à des protéines, à des alcaloïdes ou à des oses, sous forme de tannoïdes [67].

II.1.3.3. Classification

Il est possible de classer les tanins en deux groupes sur la base de leur caractéristique structurale :

A. Tanins condensés (proanthocyanidines)

Ce sont des polymères ou oligomères flavaniques, constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatechine et catéchine [68].

B. Tanins hydrolysables

Ce sont des oligo ou polyesters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable d'acide phénolique. Le sucre est très généralement le glucose. L'acide phénolique est soit l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, soit l'acide hexahydroxydéphénique (HHDP) et ses dérivés dans le cas des tanins éllagiques [61].

II.1.3.4. Pouvoir antimicrobien

L'activité antimicrobienne des tanins est importante. La croissance de plusieurs bactéries, virus, champignons et levures est inhibée par les tanins.

De nombreuses études ont bien montré l'activité antibactérienne des tanins. Ces molécules ont été rapportées comme bactériostatique ou bactéricide sur plusieurs souches bactériennes : *Aeromonas sobria*, *Bacillus anthracis*, *Desuomaculum nigrificans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Plesiomonas shigelloide*, *Pseudomonas aeroginosa*, *Pseudomonas maltophila*, *Solanacearum*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus lactis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sobrinus*.

Chung et ses collaborateurs ont trouvé aussi que l'acide tannique a inhibé la croissance des bactéries des aliments comme : *Alealigenes faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus feacalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Yersinia enterocolitica*.

Les bactéries intestinales humaines comme *Bacteroides fragilis*, *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium paraputrificum*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* sont aussi inhibées par l'acide tannique.

L'activité antifongique est aussi établie. Plusieurs types de champignons sont inhibés par les tanins. Les champignons filamenteux comme *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Chaetomium cupreum*, *Collectotrichum graminicola*, *Pinicillium* et *Trichoderma viride* sont inhibés par les tanins de différentes préparations.

De même, différentes levures incluant *Saccharomyces cerevisiae* sont aussi sensibles aux tanins. Les virus, sont aussi sensibles à l'effet des tanins, différents tanins ont été rapportées d'inactiver le virus *tabacco mosaïque*, et le poliovirus.

L'acide tannique est capable, d'inhiber la réplication de virus d'influenza, *Coxsackievirus*, *echovirus*, *reovirus* et le virus d'herpès [69].

Les oligomères proanthocyanidines présentent aussi une activité antiviral contre les virus respiratoire syncytial (RSV), le virus d'influenza A, le virus para influenza (PIV), et le virus de l'hépatite A et B [70].

II.2. Les composés azotés

Les composés azotés se caractérisent par le fait qu'elles contiennent de l'azote et que dans la plupart des cas celui-ci entre dans leur structure moléculaire sous la forme d'un acide aminé ou de son dérivé décarboxylé [71].

II.2.1. Les alcaloïdes

II.2.1.1. Définition

Les alcaloïdes sont des composés naturels et organiques d'origine végétal et contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique avec un degré variable de caractère basique important [7]. Ce sont des composés relativement stables qui sont stockés dans les plantes en tant que produit de différentes voies biosynthétiques, la plupart du temps à partir des acides aminés tels que la lysine, l'ornithine, la tyrosine et le tryptophane [72, 73].

II.2.1.2. Localisation et répartition

Les alcaloïdes dans leur grande majorité sont issus des plantes supérieures, mais leur répartition dans les familles botaniques est très irrégulière. Certaines plantes vasculaires sont riches en alcaloïdes, comme les *Apocynaceae*, riche en alcaloïdes atropiniques dans toutes les parties de la plante, les fruits, les feuilles et dans les écorces.

Les lieux d'élaboration des alcaloïdes dans les plantes sont variables suivant les espèces. Les tissus jeunes, en phase de croissance, et les tissus périphériques sont les sites privilégiés de production [74].

II.2.1.3. Classification

La classification des alcaloïdes est une tâche difficile, en raison du grand nombre de composés connus et surtout à cause de leur diversité structurale. L'atome d'azote dans les alcaloïdes provient, en générale, d'un acide aminé dont la structure carbonée reste intacte dans la structure finale de l'alcaloïde. Une façon raisonnable est alors de classer les alcaloïdes en groupe, selon leur précurseur biosynthétique. Ils existent cependant un grand nombre d'alcaloïdes qui n'ont pas forcément un acide aminé comme précurseur. Dans ces cas-là, l'atome d'azote est incorporé à un stade avancé de la biosynthèse par réaction d'amination sur des intermédiaires aldéhydes ou cétones [73].

II.2.1.4. Pouvoir antimicrobien

Les alcaloïdes, de façon générale, jouent un rôle important dans les structures biologiques et sont reconnus pour leur pouvoir antimicrobien élevé. Plusieurs études confirment cette activité.

Selon Moroh et al en 2008, la teneur très élevée en alcaloïdes de l'extrait acétatique de *Morinda morindoides* pourrait être en partie responsable de l'activité antibactérienne obtenue [75].

D'après R. Hocquemillier et al en 1982 et M. Leboeuf et al en 1982, l'étude des alcaloïdes totaux effectuée respectivement sur *Annona crassiflora* et *Xylopiya frutescens*, présentent diverses activités biologiques notamment analgésiques mais par contre ils ont tous deux observés des activités antibactériennes limitées à quelques germes Gram négatif pour les écorces et les feuilles de la première plante, et une modeste activité antibactérienne sur des souches de *Staphylococcus*, de *Streptococcus* et de *Bacillus subtilis* pour la seconde plante dont le macérat aqueux des feuilles présente aussi une activité antifongique [76, 77].

Les alcaloïdes sont généralement connus pour leur activité antipaludique et antibactérienne bien que le mécanisme d'action sur les microorganismes n'est pas bien connu. Selon C.N. Ezekiel et al en 2009, la sensibilité des seules bactéries Gram négatif à l'extrait d'alcaloïdes de *Acalypha wilkesiana* est intéressante car on peut suggérer qu'il pourrait y avoir une possibilité d'interaction entre ces alcaloïdes et certains constituants de la paroi cellulaire Gram négatif en y provoquant des dommages cytotoxiques pour ce groupe de bactéries [78].

*Chapitre III:
Les plantes
médicinales
sélectionnées*

III. Les plantes médicinales sélectionnées

Achillea odorata, *Origanum vulgare* et *Satureja vulgare* sont les trois plantes étudiées dans ce mémoire. Leur sélection s'est faite sur la base de leur très grande présence et très large utilisation traditionnelle dans les régions méditerranéennes et plus particulièrement en Algérie.

III.1. *Achillea odorata*

III.1.1. Présentation et classification



Figure 5 : *Achillea odorata*

Le genre *Achillea*, nommé à partir du méthique guerrier grec Achille, qui utilisait des espèces d'*Achillea* pour la guérison des blessures des soldats durant la guerre de Troie, comporte approximativement 85 espèces. La majorité d'entre elles sont endémiques en Europe et dans le bassin méditerranéen [79].

L'espèce *Achillea odorata* (figure 6) est une plante vivace, qui prolifère dans les bordures des chemins. Elle a des tiges dressées de 12 à 30 cm de hauteur. Les feuilles sont verte grisâtre à contour oblong, finement découpées, de petite taille. Cette achillée se reconnaît à ses petits capitules de 3 à 5 mm. Les fleurs sont d'un blanc sale ou un peu jaunâtre, à ligules courtes. La floraison se fait de Mai à Juillet. *Achillea odorata* est classée comme suit [80] :

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Asteridae

Super ordre : Euasteridées

Ordre : Asterales

Famille : Asteraceae

Genre : *Achillea*

Espèce : *Achillea odorata*

III.1.2. Composition chimique

Des études effectuées sur *Achillea odorata* ont démontré que l'extrait d'hexane des parties aériennes était constitué de deux dérivés de nérolidol, six dérivés de bisabolène ainsi que deux dérivés de flavones [81]. Trois terpanoïdes ont été aussi identifiés parmi lesquels l'achilléol A (terpène monocyclique) et l'achilléol B (terpène tricyclique) [82, 83].

III.1.3. Utilisations thérapeutiques

Les différentes espèces d'*Achillea* sont utilisées pour leurs propriétés anti-inflammatoires, analgésiques, spasmolytiques et hémostatiques [84]. Ces espèces sont bien connues en ethnopharmacologie et sont très utilisées comme remède contre les hémorroïdes, les douleurs abdominales, les diarrhées et les flatulences. Plusieurs études sur les activités biologiques de quelques espèces d'*Achillea* ont démontré la présence d'une activité antibactérienne, antioxydante et antispasmodique très intéressantes [85].

II.2. *Satureja vulgare*

II.2.1. Présentation et classification



Figure 6 : *Satureja vulgare* [86]

Il existe plus de 150 espèces du genre *Satureja* réparties dans plusieurs régions tempérées du monde, notamment dans le bassin méditerranéen et dans les Andes. En Afrique, *Satureja vulgare* (figure 7) est présente seulement au Maroc, en Algérie et en Tunisie. On la trouve plus particulièrement dans les régions vierges de toutes activités humaines comme dans les forêts mixtes, les broussailles, les prairies et les clairières [87]. Le basilic sauvage appartient à la famille des *Lamiaceae*, c'est une plante vivace à cours rhizomes rampant, sa hauteur varie de 20 jusqu'à 80 cm. Les tiges poilues, peuvent rester debout dans l'automne permettant au fruit d'être dispersé par le vent. Les feuilles sont à pétioles courts, poilus des deux cotés et dentés. *Satureja vulgare* porte des fleurs en verticille très denses, formant un hémisphère d'inflorescences partielles. La corolle est bilabée de 10 à 20 mm de long velue par dessus à 5

pétales soudées de couleur violette. Le fruit est un schizocarpe de quatre parties, globuleux, lisse, brun jaunâtre. La floraison se fait entre Juillet et Août. Contrairement au thym, le basilic sauvage a une odeur faible [7]. *Satureja vulgare* appartient à [88] :

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Satureja*

Espèce : *Satureja vulgare*

III.2.2. Composition chimique

La composition chimique diffère d'une espèce à une autre, mais toutes les espèces du genre *Satureja* se caractérisent par un taux élevé d'huile essentielle composée majoritairement de carvacrol ou de thymol [7]. Il y a aussi, à des concentrations moindre, d'autres composés comme le citral, l'eugénol, le bornol, le menthone, le pulégone, le carvone, ...[89]. Une étude de Baros I. et al a démontré que le produit végétal contient aussi une quantité importante d'acide caféique et d'acide rosmarinique. Les flavonoïdes contenus sont généralement glycosylés, mais il y a aussi des formes libres comme l'aglycone lutéoline [90]. Une autre étude de Kemertelidze et al, a montré que des flavonoïdes ainsi que des phénylpropanoïdes ont été isolés par chromatographie sur colonne. Après analyse approfondie de ces molécules, il s'est avéré qu'il y avait six types de flavones et deux types de phénylpropanoïdes [91]. Chez l'espèce *Satureja vulgare* Bianco et al, ont signalé la présence, en outre, des glycosides iridoïdes [92].

III.2.3. Utilisations thérapeutiques

Très employée par les populations locales en cuisine, la sarriette possède des vertus médicinales nombreuses. Elle est stimulante, anti-fatigue, tonique, carminatif, eupeptique, antiseptique, antiputride, antalgique et expectorante [93]. Elle combat les flatulences, stimule la digestion et traite les coliques. Elle a un effet "réchauffant" et on la préconise en cas d'infections des voies respiratoires (bronchite). L'huile essentielle est bactéricide puissant qui permet de traiter des infections dermatologiques (candidoses) ou les mycoses [7]. Elle possède aussi des vertus vermifuges.

III.3. *Origanum vulgare*

III.3.1. Présentation et classification



Figure 7 : *Origanum vulgare*

Le genre *Origanum*, appartient à la famille des *Lamiaceae*. Il comporte 38 espèces qui sont largement répandues dans les régions euro-sibérienne et irano-sibérienne. Cependant, la plupart des espèces, environ 75 %, sont concentrées dans le pourtour méditerranéen, en particulier dans les régions méditerranéennes de l'Est. L'origan est souvent considéré comme une forme sauvage de la marjolaine, c'est l'ornement odorant des montagnes [94]. L'espèce *Origanum vulgare* (figure 8) est une plante vivace à tiges rouges anguleuses de 80 cm de haut, à feuilles elliptiques [7]. L'inflorescence est en épis denses, à fleurs restant contiguës après la floraison de couleur rose à pourpre. C'est une espèce endémique en Algérie et qui pousse au niveau des broussailles et des garrigues. La classification et comme suit [94] :

Règne : Plantae

Sous règne : plantes vasculaires

Embranchement : Magnoliophyta

Sous embranchement : Angospermes

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Origanum*

Espèce : *Origanum vulgare*

III.3.2. Composition chimique

L'étude phytochimique d'*Origanum vulgare* a montré que les huiles essentielles de cette plante ont une forte teneur en carvacrol (47 %), suivi de γ -terpinène (13,4 %), de p-cymène (11,2 %) et

de thymol (6,6 %) [94]. Aussi à pourcentage moindre, il y a du β -bisabolène, caryophyllène, linalol et bornéol [7].

En effet, les analyses chromatographiques effectués sur les huiles essentielles d'*Origanum vulgare* récolté dans 4 stations différentes dans la région de Sétif (Algérie) ont bien signalé la présence de deux chimiotypes : chimiotypes à thymol et chimiotypes à carvacrol [94].

A part les huiles essentielles, il y a aussi dans l'origan d'autres métabolites secondaires tels que *des tanins, des acides phénoliques et des flavonoïdes* [7].

III.3.3. Utilisations thérapeutiques

Cette plante est utilisée dans les préparations culinaires et est considérée essentiellement comme une plante médicinale pour traiter des maladies sévères. Elle jouit d'une grande faveur populaire en Algérie et en Tunisie comme remède contre la toux et les affections respiratoires telles que l'angine, la bronchite et l'asthme. En effet, cette plante expectorante, stomachique, stimulante, tonique possède des propriétés antiseptiques, antispasmodiques et antitussives [94]. Elle combat les flatulences et stimule la sécrétion biliaire, elle favorise aussi l'apparition des règles. En application, l'huile diluée soulage les douleurs dentaires et articulaires [7]. Les espèces d'*Origanum* sont utilisées également comme des désinfectants puissants et comme des agents odoriférants dans les parfums [94].

*Partie
expérimentale*

*Matériel et
méthodes*

I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal

Nous présentons ci-dessous les informations relatives à la récolte, l'extraction des huiles essentielles, la préparation des extraits bruts, le dosage des polyphénols et des flavonoïdes ainsi que l'analyse des huiles essentielles par CPG/SM des trois plantes médicinales choisies.

I.1.1. Récolte des plantes

Les espèces choisies ont été collectées dans leur habitat naturel (tableau 1). Les échantillons des parties aériennes (tiges, feuilles et les fleurs) ont été récoltés entre le mois d'Avril et le mois de Juin 2010 (période de floraison) à la wilaya de Jijel dans la région de Taher pour *Satureja vulgare* (Lamiaceae), dans la région de Cheddia pour *Achillea odorata* (Asteraceae) et dans la région de Djimela pour *Origanum vulgare* (Lamiaceae). Les situations géographiques des trois stations de récolte figurent dans l'image (9).

Les échantillons récoltés ont été identifiés au niveau du laboratoire de botanique de l'Université de Jijel, puis séchés et conservés à l'ombre dans un endroit sec et aéré au laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de l'Université de Jijel où l'extraction des huiles essentielles et la préparation des extraits bruts ont eu lieu.

Le choix de ces espèces a été effectué sur la base des indications de la littérature (partie bibliographique) et les informations reçues des vendeurs d'herbes médicinales dans notre région. La plupart de ces plantes médicinales sont utilisées pour traiter diverses maladies telles que les infections de la peau et les maladies d'origine bactérienne.

Tableau 1 : Les espèces végétales utilisées dans l'expérimentation.

Nom botanique	Famille	Région de récolte	Période de récolte
<i>Origanum vulgare</i>	Lamiaceae	Djimela	Dernière semaine d'Avril 2010
<i>Satureja vulgare</i>	Lamiaceae	Taher	Première semaine de Mai 2010
<i>Achillea odorata</i>	Asteraceae	Cheddia	Première semaine de Juin 2010



Figure 8 : La carte géographique des trois stations de récolte

I.1.2. Les huiles essentielles

I.1.2.1. Principe d'extraction

L'extraction des huiles essentielles des trois plantes choisies a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil (figure 10) formé de quatre parties principales.

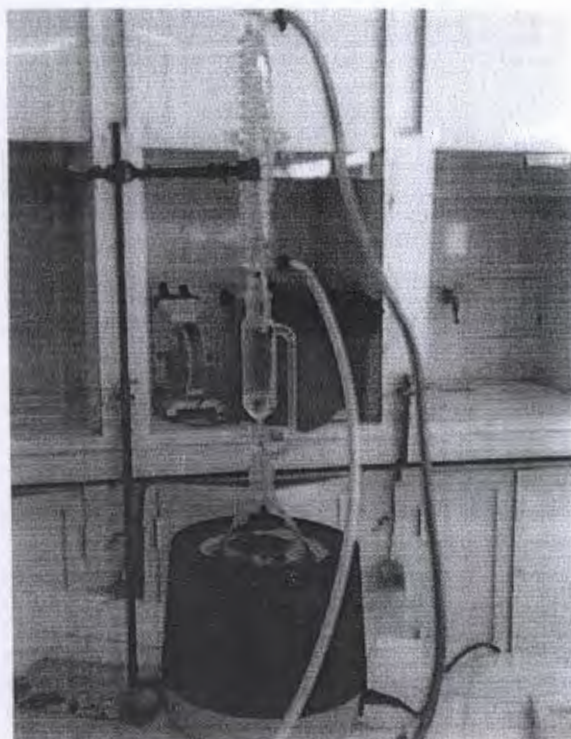


Figure 9 : Appareil d'hydrodistillation.

Le principe de cette méthode est donc basé sur un entraînement des constituants volatils de l'huile essentielle par la vapeur d'eau. Cette dernière chargée de principes volatils est condensée dans un réfrigérant pour donner de l'huile essentielle après décantation.

Les conditions opératoires d'hydrodistillation des spécimens sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Conditions opératoires d'hydrodistillation des trois plantes sélectionnées.

Conditions	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Satureja vulgare</i>	<i>Achillea odorata</i>
Partie utilisée	Partie aérienne	Partie aérienne	Partie aérienne
Quantité de matière végétale	30 grammes	30 grammes	30 grammes
Volume d'eau distillée	500 ml	500 ml	500 ml
Température	100 °C	100 °C	100 °C
Temps d'hydro-distillation	3h	3h	3h

I.1.2.2. Détermination du rendement des huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids d'huile extraite et le poids de la plante à traiter. Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formulation suivante :

$$R = P_A / P_B \times 100$$

R : Rendement de l'huile essentielle en pourcentage (%).

P_A : poids de l'huile en gramme (g).

P_B : Poids de la plante en gramme (g).

I.1.2.3. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles par CPG/SM

Les composants chimiques des huiles essentielles des trois plantes sont identifiés par une analyse chromatographique en phase gazeuse (CPG), couplée à la spectrométrie de masse (SM), en utilisant un chromatographe et un spectrographe de masse de type SHIMADZU QP 2010.

Le couplage CPG/SM permet de déterminer simultanément le nombre de constituants de l'essence, leurs pourcentages respectifs, leurs ordres de sortie ainsi que la nature et la masse des constituants de l'huile [94].

Les conditions expérimentales de cette analyse sont les suivantes : une colonne apolaire de 25 m de longueur et de 0.25 mm de diamètre. Le diamètre de la phase stationnaire est de 0.25 μm . La température de la colonne 60 °C (8 min) à 180 °C (3 °C / min), jusqu'à 230 °C (20 °C/ min), mode d'injection, Split, Split ratio 1:40, volume injecté de huile est 0.6 μl dilué dans l'hexane. Le gaz vecteur est l'hélium (122.2 Kpa).

I.1.3. Les extraits bruts

I.1.3.1. Protocole d'extraction

Le protocole suivie est le même pour tous les extraits (aqueux, ethanoliques et méthanoliques). Les organes récoltés ont été nettoyés et séchés pendant deux semaines, puis moulus. L'obtention d'extrait brut à partir de la poudre végétale se fait en mélangeant 25 g de la plante en poudre à 250 ml de solvant [91].

Pour les trois plantes, l'extraction s'est réalisée en trois macérations successives du matériel végétal sous agitation mécanique à température ambiante. Chaque macération a duré 24 heures et le mélange hétérogène a été filtré sur papier filtre plissé et le résidu a été de nouveau soumis à la macération dans les mêmes conditions. Les filtrats obtenus ont été réunis, le solvant était évaporé à sec à l'aide d'un rotavapor de type Büchi. Chaque extrait a par la suite été repris avec de l'eau de sorte à avoir les concentrations désirées.

Les extraits bruts végétaux ainsi constitués sont conservés au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation pour les différents tests.

I.1.3.2. Détermination du rendement des extraits bruts

Le rendement des extraits bruts est le rapport entre le poids de l'extrait sec et le poids de la plante en poudre utilisée. Il est exprimé en pourcentage selon la formulation suivante :

$$R = P_s / P_p \times 100$$

R : Rendement de l'extrait sec en pourcentage (%).

P_s : Poids de l'extrait sec en gramme (g).

P_p : Poids de la poudre en gramme (g).

I.1.3.3. Dosage des polyphénols

Les polyphénols ont été déterminés spectrophotométriquement par la méthode de Folin Ciocalteu. 0,125 ml de l'extrait méthanolique dilué (12,5 mg/ml) a été additionné avec 0,5 ml d'eau distillée et 0,125 ml du réactif de Folin Ciocalteu. Le mélange est laissé reposer 6 minutes à l'obscurité. Par la suite, 1,25 ml de la solution Na_2CO_3 (7%) a été ajoutée à l'ensemble. Après 90 minutes d'incubation à 23 °C, l'absorbance a été mesurée à 760 nm contre un blanc (sans extrait). La quantification des polyphénols a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($Y = aX + b$) réalisée par un extrait d'étalon, l'acide gallique à différentes concentrations

dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par millilitre de la solution utilisée [95].

I.1.3.4. Dosage des flavonoïdes

La méthode au $AlCl_3$ a été employée pour la détermination de la teneur en flavonoïdes des extraits.

Un millilitre (1ml) de l'extrait méthanolique a été ajouté à un volume égal d'une solution de 2% $AlCl_3$. Le mélange a été vigoureusement agité à l'aide d'un vortex, et l'absorbance a été lue à 430 nm, après 10 minutes d'incubation à température ambiante.

Une courbe d'étalonnage ($Y = a X + b$) réalisée par la rutine à différentes concentrations partiquée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons a servi pour la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes a été exprimée en mg équivalent rutine par millilitre de la solution utilisée [96].

I.2. Les souches bactériennes

Les souches testées font parties de deux groupes bactériens : les Gram positif représentés par *Staphylococcus aureus*, et les Gram négatif représentés par *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella sp*, *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ces isolats nous ont été fournis par le laboratoire de bactériologie de l'hôpital de Taher (Jijel). Ces différentes bactéries ont été isolées à partir d'échantillons pathologiques de patients hospitalisés. Les huit souches ont été conservées dans des tubes de conservation à 4°C. Avant les tests, les souches ont subis des séries de repiquâges pour s'assurer de leur vivacité et de leur pureté.

I.2.1. Entretien

L'entretien des souches se fait sur milieu Hektoen pour les enterobactéries, sur milieu Chapman pour *Staphylococcus aureus* et sur gélose nutritive pour *Pseudomonas aeruginosa*, par prélèvement des souches conservées et des repiquâges successifs tous les 15 jours.

I.3. Les tests antibactériens

I.3.1. Préparation des inoculums

Chaque suspension bactérienne était préparée dans un tube de 9 ml d'eau physiologie à 0.9 % par dilution d'une petite quantité de bactéries de la souche concernée, repiquée à partir d'une culture fraîche. L'opacité de la suspension doit être équivalente à 0.5Mc Ferland, pour cela la concentration bactérienne des différentes solutions ou inoculums est évaluée par turbidité et est exprimée par la mesure des densités optiques (DO. de 0.08 à 0.10 à une longueur d'onde de 625 nm) sur un spectrophotomètre (Shimadzu UV mini 1240). Pour les *Staphylococcus aureus* nous

avons effectué des ajustements pour la préparation des inoculums afin d'obtenir des colonies confluentes suffisamment denses (DO. de 0.15 à 0.25 à une longueur d'onde de 625 nm).

I.3.2. L'antibiogramme

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique.

Le choix des antibiotiques dans notre étude a été fait en fonction de la disponibilité des disques d'antibiotiques au laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et la Vie de l'Université de Jijel. Ces antibiotiques sont : l'oxacillin, le colistine, la streptomycine, la spiramycine, les compound sulphonamides et la pénicilline G.

Dans les boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre ensemencées préalablement par les souches à tester, on a déposé les disques d'antibiotiques sur la surface de la gélose Mueller Hinton. Les boîtes ont été ensuite incubées à 37 °C pendant 24 heures. La lecture des résultats s'est faite par la mesure des zones d'inhibitions. Les valeurs obtenues sont comparées avec les valeurs de référence.

I.3.3. Evaluation de l'activité antibactérienne

Pour tester l'activité antibactérienne *in vitro* des huiles essentielles et des extraits bruts on a utilisé, la méthode de diffusion en puits. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles et des extraits à l'intérieur d'une boîte de Pétri dans un milieu nutritif solide.

Cette technique a été appliquée par plusieurs auteurs [97, 98, 99], nous y avons apporté quelques modifications issues de notre pratique expérimentale.

I.3.3.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles

Le milieu Muller Hinton est le milieu utilisé pour tester la sensibilité des bactéries.

Le milieu de culture en surfusion est coulé dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre sur une épaisseur de 4 mm. Après solidification de la gélose, l'ensemencement de chaque inoculum est réalisé en frottant la surface du milieu à l'aide d'écouvillons stériles trempés dans les suspensions bactériennes. La totalité de la surface gélosée doit être ensemencée de bas en haut, nous avons répété l'opération trois fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. Trois puits de 6 mm de diamètre ont été par la suite perforés dans chaque boîte ensemencées et soudées à leur base. Ces puits sont remplis de 20 µl de l'huile essentielle à tester. Les boîtes de Petri sont ensuite fermées et mises à l'étuve à 37 C° pendant 24 heures.

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance bactérienne se traduit par un halo translucide (zone d'inhibition) autour de chaque puits, identique à de la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré et exprimé en millimètre (mm) [97, 98, 99].

I.3.3.2. Activité antibactérienne des extraits bruts

La même procédure a été appliquée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne *in vitro* des extraits bruts.

Dans chaque boîte on a confectionné quatre puits, dont 3 puits ont été remplis par 20 µl de la concentration mère de chaque extrait brut, et le quatrième puits, le puits central, était remplis par 20 µl du solvant utilisé. Pour les extraits aqueux on n'était pas obligé de faire le quatrième puits (témoin) car c'est de l'eau distillée [97, 98, 99].

I.3.3.3. Détermination des CMI pour les extraits bruts

Les extraits dont la zone d'inhibition a un diamètre supérieur ou égal à 10 mm sont sélectionnés pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices. Il s'agit de déterminer les plus petites concentrations aux quelles les extraits présentent encore une activité antibactérienne visible à l'œil nue. Des dilutions successives de progression géométrique de raison 2 ont permis de préparer une gamme de dilutions allant de 200 mg/ml à 1,56 mg/ml pour tous les extraits d'*Origanum vulgare* et de *Satureja vulgare* et de 500 mg/ml à 3.9 mg/ml pour tous les extraits d'*Achillea odorata*.

Résultats

II.1. Le rendement des huiles essentielles

Nous avons constaté que le rendement en huile essentielle vari selon la plante utilisée. Il est de 1 % pour *Satureja vulgare*, et de 0.67 % et 0.33 % pour *Origanum vulgare* et *Achillea odorata* respectivement.

La figure 11 présente les rendements en pourcentage des huiles essentielles pour les trois plantes.

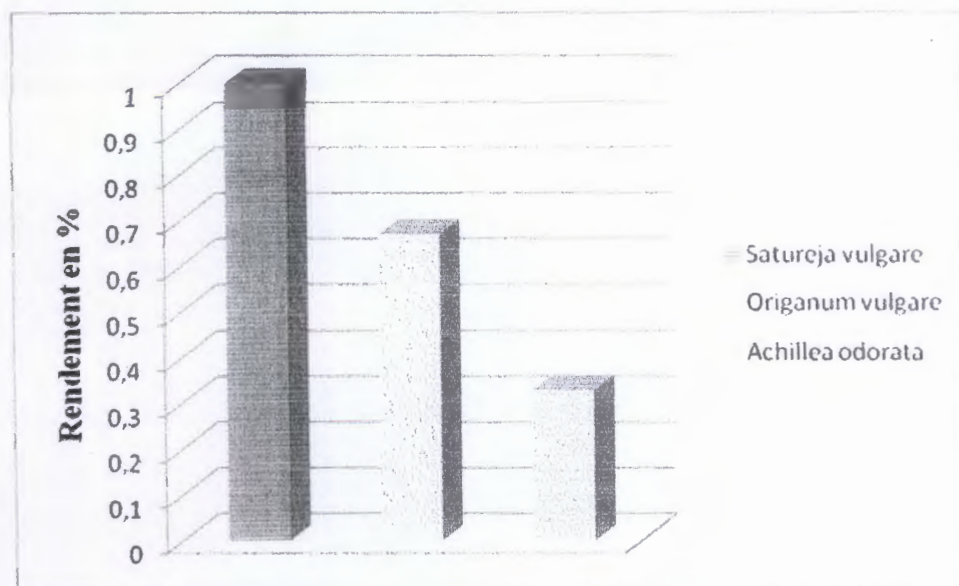


Figure 10 : Les rendements des trois plantes en huile essentielle en pourcentage.

II.2. La composition chimique des huiles essentielles

II.2.1. La composition chimique de l'huile essentielle d'*Achillea odorata*

Les résultats de l'analyse chimique par CPG/SM (tableau 3) de l'huile essentielle d'*Achillea odorata* montre que cette huile renferme plusieurs composés dont le composé majoritaire est le chrysanthénone (15,11 %), il y a aussi, l' α -pinène (2,06 %), le γ -terpinène (1,68 %), le thymol (0,69 %) et l' α -terpinéol (0,31 %).

Tableau 3 : Les composés majoritairement identifiés de l'huile essentielle d'*Achillea odorata*

Les composés de l'huile essentielle	Temps de rétention	%
α -tricyclène	3.327	0,39
α -pinène	3.493	2,06
Camphène	3.695	4,43
Sabinène	4.085	0,90
β -pinène	4.147	0,27
Mesitylène	4.345	0,12
3,5-heptadien-2-ol, 2,6-dimethyl-	4.425	0,31
α -phéllandrène	4.675	0,20
Benzène, (1,3,3-triméthylnonyl)-	4.878	0,07
O-cymène	5.038	4,91
γ -terpinène	5.946	1,68
Eucarvone	6.349	0,28
p-cymène	6.582	0,13
Chrysanthène	6.88	15,11
α -campholenal	7.445	0,12
Ethanone	7.518	0,29
1,3,3-triméthylcyclohex-1-ène-4-carboxaldehyde	7.775	0,39
Bornéol	7.843	1,01
Pinocarvéol	7.970	0,27
α -terpinéol	8.215	0,16
Bicyclo[2.2.1]heptan-3-one, 6,6-diméthyl-2-méthylène	8.451	0,27
L-4-terpinéol	9.372	3,57
L-carvone	9.489	0,25
α -terpinéol	9.707	0,31
Myrténol	9.918	0,13
Bornéol	10.236	0,12
Trans-3-carene-2-ol	10.315	0,18
Pipéritone	12.006	0,33
Verbenyl acetate	12.382	1,50
Bornyl acetate	13.222	2,10
Thymol	13.573	0,69
Ylangène	16.906	0,10
Chrysanthène	17.164	1,60
Caryophyllène	18.540	0,13
α -cis-himachalène	19.574	0,11
β -farnésène	20.394	0,10
β -cubébène	20.876	1,24
O-cardinène	22.960	0,14
Cyclohexaneméthanol, 4-éthényl- $\alpha,\alpha,4$ triméthyl-3-(1-méthylethényl)-	23.933	0,19
Alloaromadendrène	26.085	0,39

		Résultats
Torreyol	28.210	0,58
α -bisabolol	28.732	0,15
β -eudesmol	28.919	0,17

II.2.2. La composition chimique de l'huile essentielle de *Satureja vulgare*

La composition chimique de cette huile rapportée dans le tableau 4 comprend comme composés majoritaires le D-menthone et le S-pulégone avec des pourcentages de 60,14 % et 23,83 % respectivement. On note aussi la présence du thymol (0,28 %), γ -terpinène (0,71 %) et α -terpinéol (0,07 %).

Tableau 4 : La composition chimique de l'huile essentielle de *Satureja vulgare*.

Les composés de l'huile essentielle	Temps de rétention	%
α -thujène	7,611	0,16
β -pinène	8,986	0,50
β -mycène	9,788	0,24
3-octanol	9,908	0,23
Terpinolène	10,511	0,21
p-menthatriène	10,622	0,17
Cyclobutane, 1,2-bis(1-méthylethényl)-, trans-	10,933	1,86
O-cimène	11,386	0,66
γ -terpinène	11,948	0,71
Sabinène hydrate	12,098	0,49
4-carène	12,916	0,10
Menthone	14,562	0,78
D-menthone	14,839	60,14
Isopulégone	15,115	0,92
Terpinén-4-ol	15,464	1,05
Terpinéol	15,869	0,07
(S)-pulégone	17,010	23,83
p-menthan-3-one	17,358	3,34
Thymol	18,906	0,28
Benzène, 1-éthoxy-4-éthyl-	19,699	0,05
Bicyclo[4,1,0]heptan-3-one, 7,7-diméthyl-4-méthylène	20,298	0,14
Caryophyllène	22,342	1,12
α -caryophyllène	23,154	0,16
β -cubébène	23,813	1,40
Germacrène B	24,194	1,17
Diisobutylphthalat	31,807	0,09

II.2.3. La composition chimique de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*

L'huile essentielle d'*Origanum vulgare* contient 25 composés (tableau 5) dont le γ -terpinène est le composant majoritaire avec un pourcentage de (36,76 %) suivi de thymol (34,94 %), O-cymène (15,84 %) et l' α -terpinène (3,29 %).

Tableau 5 : La composition chimique de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*.

Les composés de l'huile essentielle	Temps de rétention	%
α -thujène	7,443	1,03
α -pinène	7,606	0,4
β -thujène	8,946	0,16
3-octenol	9,261	0,78
β -myrcène	9,778	1,56
α -phellandrène	10,044	0,19
α -terpinène	10,504	3,29
O-cymène	10,612	15,84
β -thujène	10,817	0,18
Cyclobutane, 1,2-bis(1-méthylethenyl)-, trans-	10,925	0,26
α -thujène	11,381	0,04
γ -terpinène	11,951	36,76
p- α -diméthylbenzylalcool	12,116	0,1
Linalool	13,292	0,87
Isomenthone	14,843	0,06
L-4-terpinéol	15,471	0,09
α -terpinéol	15,858	0,15
Anisol	17,230	0,13
Thymol	18,905	34,94
Carvacrol	19,100	1,56
Caryophyllène	22,339	0,45
β -bisabolène	24,643	0,22
β -sesquiphellandrène	24,927	0,35
1-iodononane	29,669	0,07
Diisobutylphthalate	31,793	0,45

II.3. Le rendement des extraits bruts

Le rendement des extraits bruts vari selon les plantes, et pour la même plante il vari selon le solvant utilisé.

Pour l'*Origanum vulgare*, le rendement de l'extrait méthanolique est le plus important (22,4 %) (figure 12). Pour *Satureja vulgare* et *Achillea odorata* les extraits ethanoliqes sont les plus importants avec des pourcentages de 15,6 % et 28,66 % respectivement (figure 13, 14).

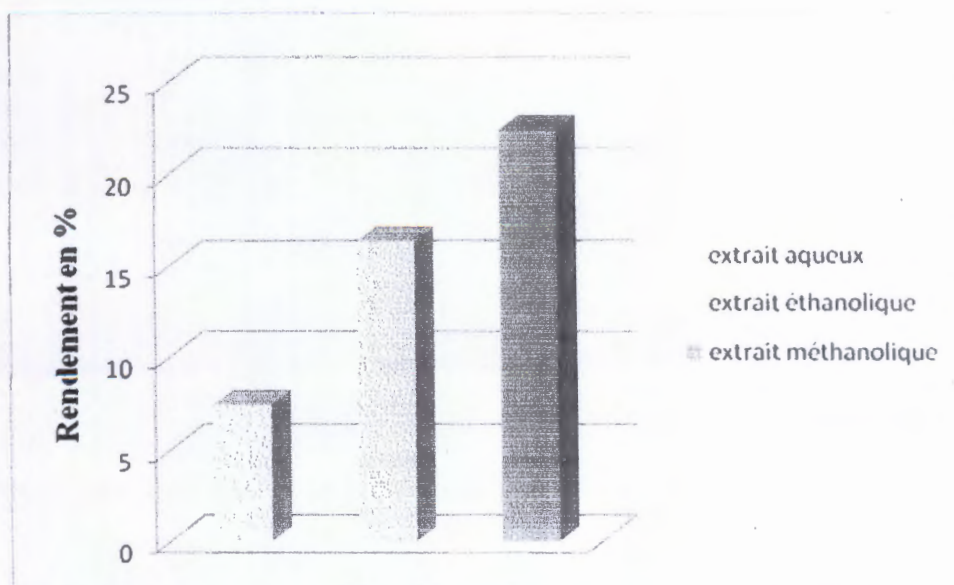


Figure 11 : Le rendement des extraits bruts pour *Origanum vulgare*.

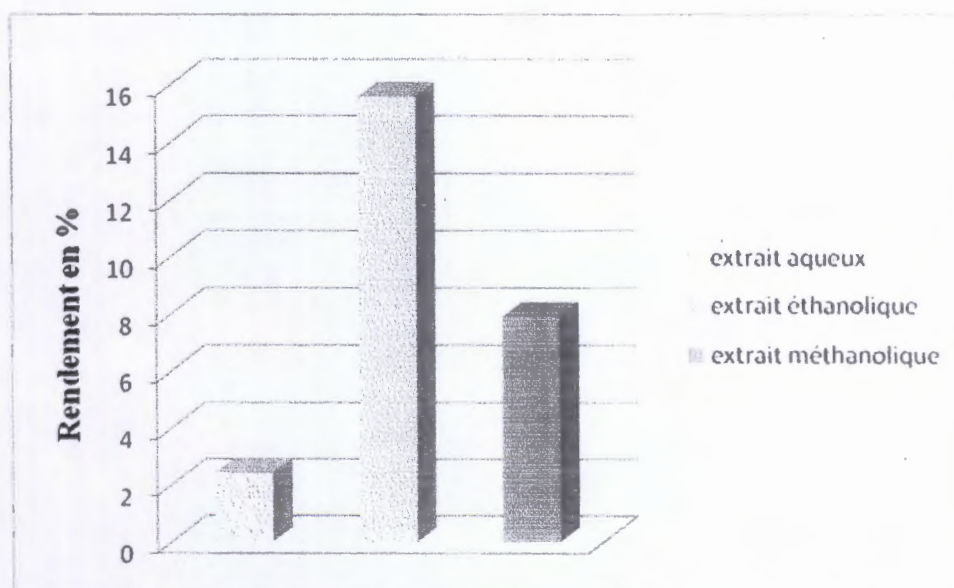


Figure 12 : Le rendement des extraits bruts pour *Satureja vulgare*.

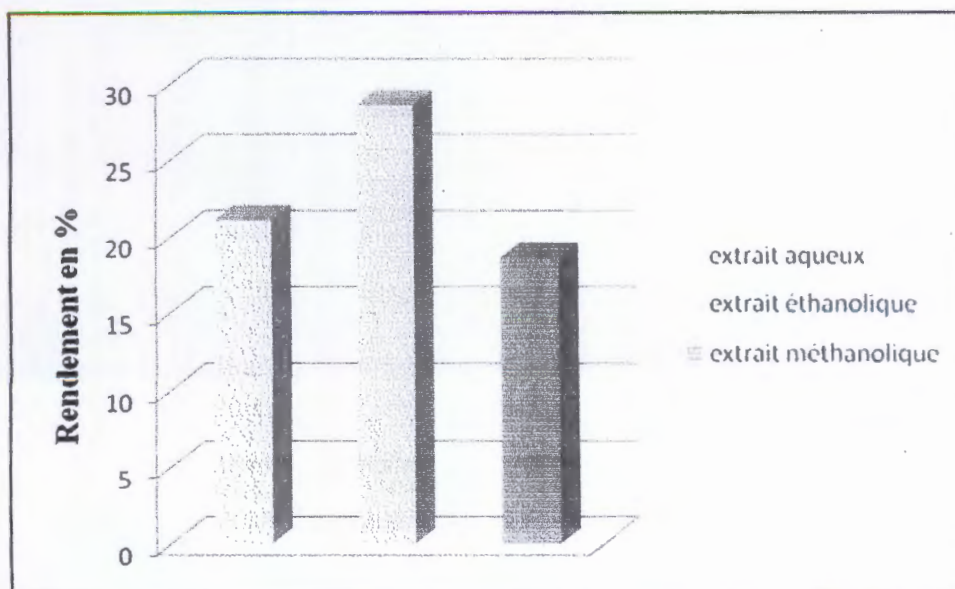


Figure 13 : Le rendement des extraits bruts pour *Achillea odorata*.

II.4. La teneur en polyphénols et en flavonoïdes

L'étude quantitative des extraits bruts méthanoliques au moyen des dosages spectrophotométriques, avait pour objectif la détermination de la teneur totale des polyphénols et des flavonoïdes. Deux courbes d'étalonnages (figures 15, 16) ont été tracées pour cette objectif, une réalisée avec un extrait d'acide gallique à différentes concentrations (dosage des polyphénols), l'autre avec un extrait de rutine (dosage des flavonoïdes). Des mesures de densité pour chaque extrait ce sont réalisées à 760 nm pour les polyphénols et 430 nm pour les flavonoïdes.

Les quantités des polyphénols et des flavonoïdes ont été rapportées en mg équivalent de l'étalon utilisé par ml de la solution utilisée et sont déterminées par les deux équations de type :

$$Y = a X + b.$$

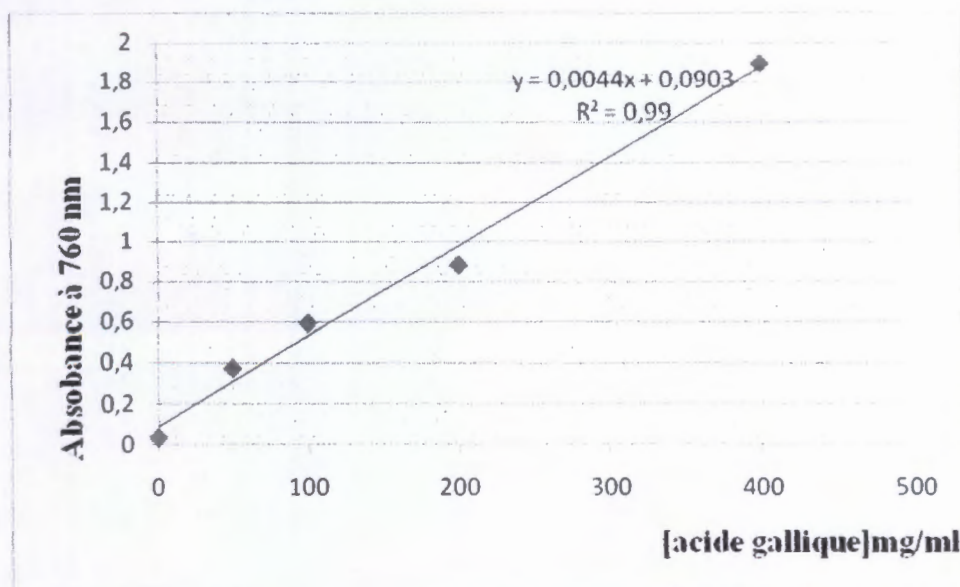


Figure 14 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols.

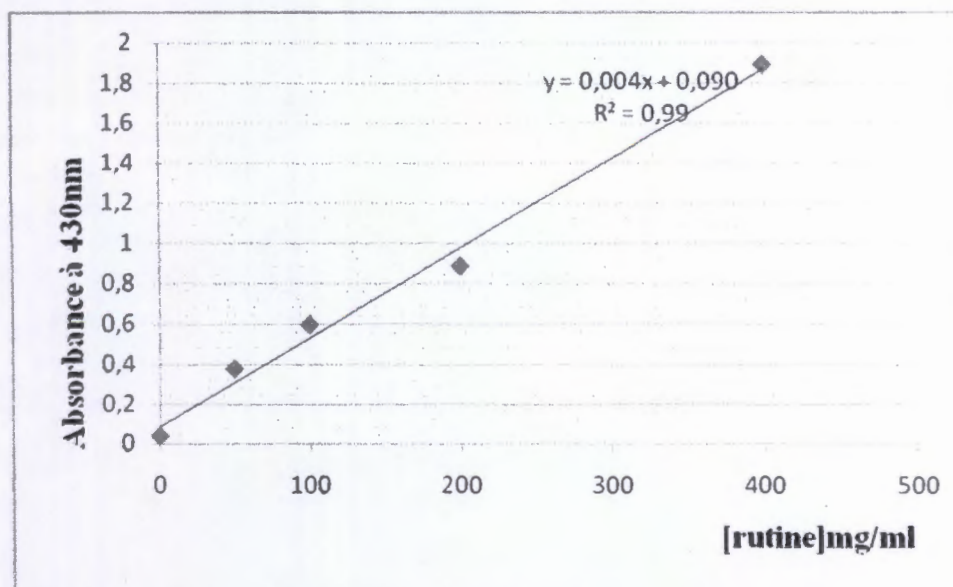


Figure 15 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.

Les résultats obtenus pour évaluer la teneur en polyphénols et en flavonoïdes sont présentés dans les figures 17 et 18.

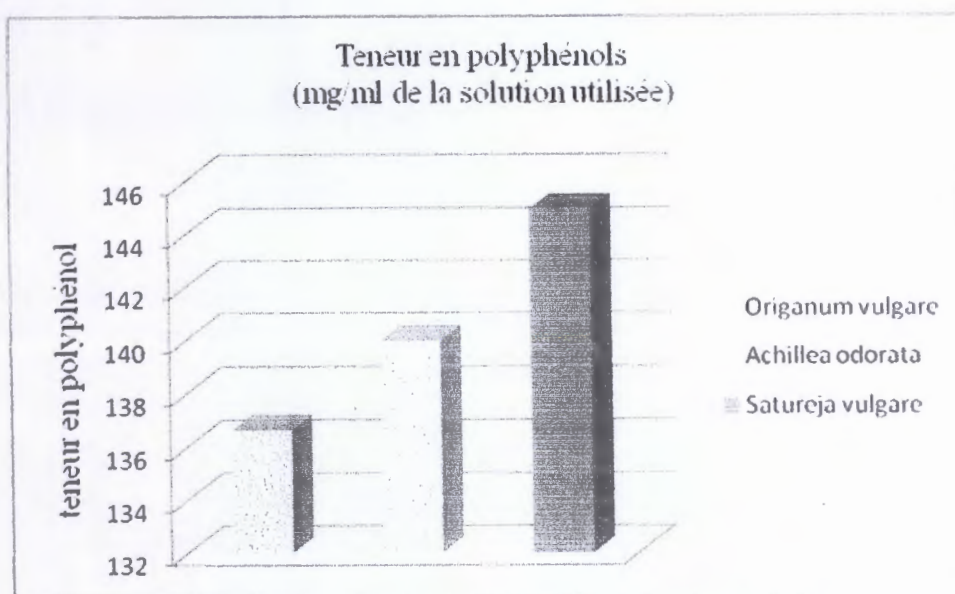


Figure 16 : La teneur en polyphénols des trois plantes.

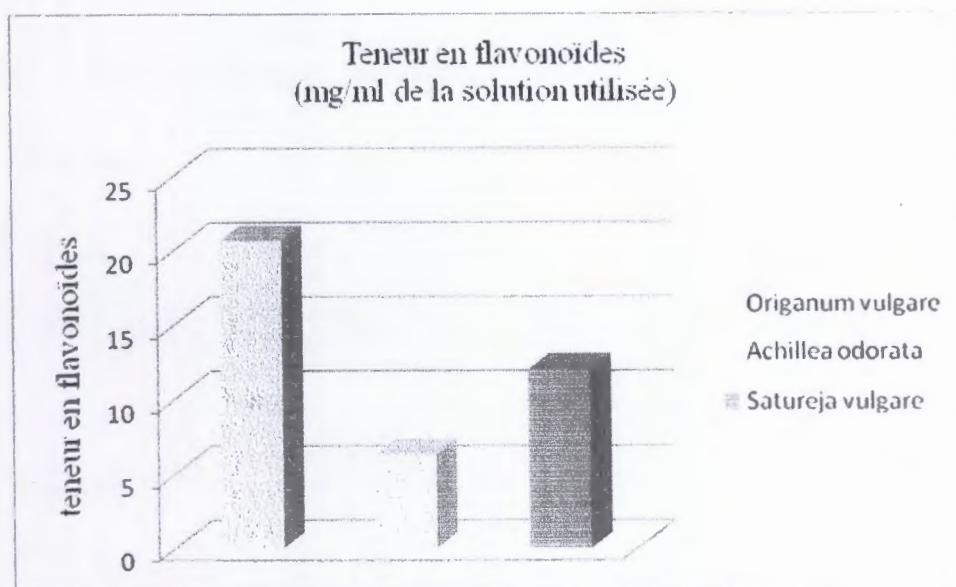


Figure 17 : La teneur en flavonoïdes des trois plantes.

Ces résultats montrent que l'extrait de *Satureja vulgare* est le plus riche en polyphénols (145 mg équivalent acide gallique par ml d'extrait utilisé), suivi d'*Achillea odorata* avec (140 mg équivalent acide gallique par ml d'extrait utilisé). La teneur la plus basse a été obtenue pour *Origanum vulgare* (136,66 mg équivalent acide gallique par ml d'extrait utilisé).

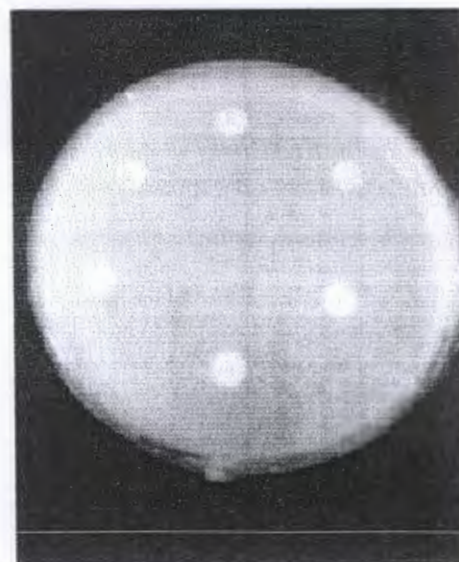
En ce qui concerne la teneur en flavonoïdes, l'extrait d'*Origanum vulgare* est le plus riche (20,66 mg équivalent rutine par ml d'extrait utilisé) suivi de *Satureja vulgare* avec 12 mg équivalent rutine par ml d'extrait utilisé. *Achillea odorata* représente la teneur la plus faible (6,33 mg équivalent rutine par ml d'extrait utilisé).

II.5. Résultat de l'antibiogramme

Les résultats de la sensibilité ou la résistance des bactéries testées avec les différents antibiotiques utilisés (figure 19) sont groupés dans le tableau 6.



Escherichia coli



Proteus mirabilis

Figure 18 : Effets des antibiotiques sur quelques souches testées.

Tableau 6 : La sensibilité des souches étudiées avec les antibiotiques utilisés.

Bactéries	OX	COL	S10	SP100	S3	P5
<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	S	R	R	R	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	S	R	R	R	R
<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	S	S	R	R	R
<i>Proteus mirabilis</i>	R	R	R	R	R	R
<i>Escherichia coli</i>	R	S	R	R	R	R
<i>Salmonella sp</i>	R	S	R	S	R	R
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	R	R	R	S	R	R

OX : Oxacilline, COL : Colistine, S10 : Streptomycine, SP100 : Spiramycine, S3 : Compound sulphonamides, P5 : Pénicilline G.

R : Résistante, S : Sensible

La majorité des souches sont multirésistantes.

II.6. Résultat de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

En milieu solide, l'action de l'huile essentielle se traduit donc par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits (figure 20).



Klebsiella oxytoca



Staphylococcus aureus

Figure 19 : Effets des trois huiles essentielles sur le développement de *Klebsiella oxytoca* et *Staphylococcus aureus*.

Les diamètres de ces zones d'inhibitions diffèrent d'une souche à une autre et d'une huile à une autre. Les diamètres des zones d'inhibitions obtenus pour les trois huiles sont regroupés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Les diamètres des zones d'inhibitions en mm obtenus avec les huiles essentielles des trois plantes.

Bactéries	huile essentielle d' <i>Achillea odorata</i>	huile essentielle de <i>Satureja vulgare</i>	huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	11	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	15
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	9	25
<i>Klebsiella oxytoca</i>	9	12	70
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	70
<i>Escherichia coli</i>	0	10	30
<i>Salmonella sp</i>	0	9	50
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	14	9	50

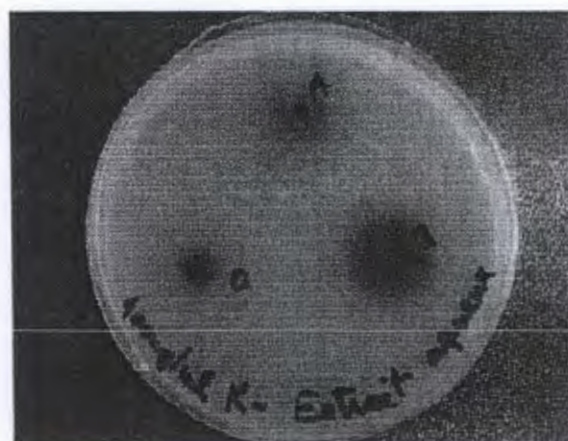
Les résultats montrent que l'huile d'*Origanum vulgare* est la plus active sur l'ensemble des souches testées avec des zones d'inhibition variant de 15 mm à 70 mm. Les autres huiles d'*Achillea odorata* et de *Satureja vulgare* présentent une activité modérée.

II.7. Résultat de l'activité antibactérienne des extraits bruts

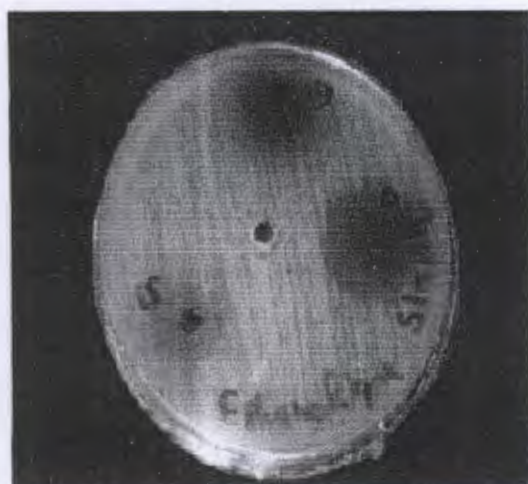
L'activité antibactérienne des extraits bruts sur les souches testées est observée aussi sous forme d'halos d'inhibitions de la croissance bactérienne comme le montre la figure 21.



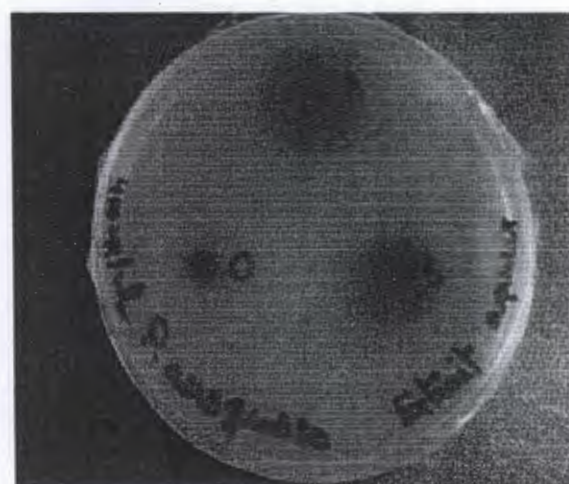
Proteus mirabilis



Klebsiella pneumoniae



Staphylococcus aureus



Pseudomonas aeruginosa

Figure 20 : Effets des extraits bruts ethanoliques, méthanoliques et aqueux des trois plantes sélectionnées sur la croissance bactérienne de quelques souches testées.

II.7.1 Extraits bruts d'*Achillea odorata*

Les diamètres d'inhibition obtenus avec les extraits bruts d'*Achillea odorata* sont rapportés dans le tableau 8.

Tableau 8 : les diamètres des zones d'inhibitions en mm obtenus avec les extraits bruts d'*Achillea odorata*.

Bactéries	Extrait aqueux 1 g/ml	extrait méthnolique 1g/ml	extrait éthanolique 1 g/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	16	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	10	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	8	8
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0	9
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	10	8	0
<i>Salmonella sp</i>	6	6	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	10	0

II.7.2 Extraits bruts de *Satureja vulgare*

Les diamètres des zones d'inhibitions obtenus avec les extraits bruts de *Satureja vulgare* sont présentés dans le tableau 9. Les extraits méthanoliques sont les plus actifs.

Tableau 9 : Les diamètres des zones d'inhibitions en mm obtenus avec les extraits bruts de *Satureja vulgare*.

Bactéries	Extrait aqueux 400 mg/ml	Extrait méthanolique 400 mg/ml	Extrait éthanolique 400 mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	17	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	14	8	8
<i>Escherichia coli</i>	0	7	0
<i>Salmonella sp</i>	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	0	0

II.7.3 Extraits bruts d'*Origanum vulgare*

L'action antibactérienne de ces extraits est aussi observée sous forme d'halos d'inhibitions. Les zones d'inhibitions obtenues pour les différents extraits préparés sont rapportées dans le tableau 10.

Tableau 10 : Les diamètres des zones d'inhibitions en mm obtenus avec les extraits bruts d'*Origanum vulgare*.

Bactéries	Extrait aqueux 400 mg/ml	Extrait méthanolique 400 mg/ml	Extrait éthanolique 400 mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	25	27
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	15	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	17	13
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	10	14
<i>Proteus mirabilis</i>	10	0	11
<i>Escherichia coli</i>	0	16	18
<i>Salmonella sp</i>	7	12	13
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	11	20

Pour l'ensemble des souches, on remarque que les extraits éthanoliques sont les plus actifs avec des zones d'inhibitions allant de 11 mm à 27 mm.

II.8. Résultats des CMI

II.8.1. Les CMI des extraits bruts d'*Achillea odorata*

Les concentrations minimales inhibitrices obtenues avec les différentes dilutions des extraits bruts d'*Achillea odorata* sont indiquées dans le tableau 11.

Tableau 11: Les concentrations minimales inhibitrices en mg/ml des extraits bruts d'*Achillea odorata*.

Bactéries	CMI des extraits aqueux (mg/ml)	CMI des extraits méthanolique (mg/ml)	CMI des extraits ethanologique (mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1000	31.25	15.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1000	1000	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	1000	1000
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	1000
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	500	1000	-
<i>Salmonella sp</i>	1000	1000	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	500	-

Les valeurs des CMI obtenues varient selon la sensibilité des souches testées vis-à-vis des différents extraits, elles sont comprises entre 1000 mg/ml et 15,6 mg/ml.

II.8.2. Les CMI des extraits bruts de *Satureja vulgare*

Le tableau 12 compare les résultats des CMI obtenus avec les différentes dilutions des extraits bruts de *Satureja vulgare*.

Tableau 12: Les concentrations minimales inhibitrices en mg/ml des extraits bruts de *Satureja vulgare*.

Bactéries	CMI des extraits aqueux (mg/ml)	CMI des extraits méthanoliques (mg/ml)	CMI des extraits ethanoliques (mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	6,25	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	50	400	400
<i>Escherichia coli</i>	-	50	-
<i>Salmonella sp</i>	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-

l'espèce *Staphylococcus aureus* est la plus sensible avec une CMI égale à 6,25 mg/ml.

II.8.3. Les CMI des extraits bruts d'*Origanum vulgare*

Les CMI des dilutions des extraits bruts d'*Origanum vulgare* sont représentées dans le tableau 13.

Tableau 13: Les concentrations minimales inhibitrices en mg/ml des extraits bruts d'*Origanum vulgare*.

Bactéries	CMI des extraits aqueux (mg/ml)	CMI des extraits méthanolique (mg/ml)	CMI des extraits éthanoliques (mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	3,125	6,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	25	50
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	50	25
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	50	50
<i>Proteus mirabilis</i>	400	-	200
<i>Escherichia coli</i>	-	50	50
<i>Salmonella sp</i>	400	100	50
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	50	50

La plus petite CMI constatée pour *Origanum vulgare* est celle avec l'extrait méthanolique avec la souche *Staphylococcus aureus* (CMI = 3,125 mg/ml).

Discussion

III. Discussion

L'examen des données bibliographiques fait apparaître d'emblé la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des extraits.

Dans notre étude, nous avons évalué l'activité antibactérienne de nos extraits en utilisant la méthode de diffusion en puits, cette méthode est largement utilisée par plusieurs auteurs. L'analyse des données expérimentales montrent que nos huiles des trois plantes exercent une activité antibactérienne *in vitro* variable sur l'ensemble des souches bactériennes testées. L'huile essentielle d'*Origanum vulgare* était l'extrait le plus actif.

En effet, les propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* sont connues. Cette grande activité observée pour cette huile peut être liée à la présence d' γ -terpinène (36,76 %) et notamment la présence des composés phénoliques comme le thymol (34,94 %) et le carvacrol (1,56 %) qui sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes [55, 100]. Plusieurs études ont montré que la molécule de thymol a un effet inhibiteur et létal sur diverses souches dont *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* sur lesquelles elle provoque des fuites d'ions potassium (K^+) [101].

La fuite d'ions potassium (K^+) est le premier indicateur du dommage de la membrane des microorganismes [102]. Plusieurs études ont montré que la rupture membranaire contribue au mode d'action des phénols tel que le thymol [101, 103, 104, 105].

Cependant, les composés majoritaires ne sont pas les seuls responsables de l'intégralité de l'activité, la totalité de la composition chimique de l'huile doit être prise en compte [16, 106].

L' α -terpinéol par exemple ne présente que 0,15 % de la composition chimique de cette huile essentielle (*Origanum vulgare*) mais ce composé est l'un des composés terpéniques alcooliques connus pour leur activité létal et qui agit en dénaturant les protéines comme solvant ou comme agent de déshydratation [107].

A l'inverse, les huiles essentielles de *Satureja vulgare* et d'*Achillea odorata* apparaissent en revanche moins actives en comparaison avec l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*. Ce faible pouvoir inhibiteur de ces deux huiles essentielles pourrait s'expliquer par la très faible présence des terpènes oxygénés. Ils sont remplacés par des cétones; D-menthone (60,14 %) pour *Satureja vulgare* et chrysanthénone (15,11 %) pour *Achillea odorata*.

Ainsi dans une étude réalisée par Kutita et al [108, 109], ils ont classé les composés aromatiques purs selon leur activité antifongique vis-à-vis de sept champignons. Cette activité a été estimée selon la durée d'inhibition de la croissance déterminée par simple observation microscopique. Ils ont trouvé que cette activité antifongique décroît selon le type de la fonction chimique :

+ Phénols > Alcools > Aldéhydes > Cétones > Ethers > Hydrocarbures -

Tous comme les huiles essentielles, les extraits bruts aqueux, ethanoliqes et méthanoliqes des trois plantes médicinales exercent aussi une activité antibactérienne *in vitro* assez bien définie sur la croissance de moins une des bactéries testées.

Les extraits d'*Origanum vulgare* notamment ethanoliqes et méthanoliqes sont les plus actifs avec des diamètres allant de 10 à 27 mm pour l'ensemble des souches. Cette grande activité observée pour cette plante peut être expliquée par la présence d'une teneur élevée en flavonoïdes (20,66 mg équivalent de rutine par ml de solution utilisée de l'extrait méthanolique) en comparaison avec les deux autres plantes.

En effet, les flavonoïdes sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes. Ils pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont de puissants inhibiteurs *in vitro* de l'ADN gyrase [63].

Les extraits bruts de *Satureja vulgare* viennent en seconde position avec des diamètres allant de 14 à 18 mm. Les extraits méthanoliqes de cette plante présentent la teneur la plus élevée en polyphénols avec 145 mg équivalent d'acide gallique par ml de la solution utilisée en comparaison avec les extraits méthanoliqes d'*Origanum vulgare* et d'*Achillea odorata*.

Les polyphénols sont aussi connus pour leurs propriétés antimicrobiennes. Plusieurs études ont montré cette activité et ont pu aussi donner des hypothèses sur les mécanismes d'action des polyphénols sur les microorganismes dont :

- L'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes.
- La séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer.
- L'inhibition du métabolisme microbien [110].

A la lumière de nos résultats, nous avons constaté que nos extraits, que ce soit les huiles essentielles ou les extraits bruts, ce sont montrés plus actifs à l'égard de *Staphylococcus aureus* (Gram positif) par rapport aux autres bactéries Gram négatif. Même en déterminant les concentrations minimales inhibitrices, *Staphylococcus aureus* était la souche la plus sensible (CMI = 3,125 mg/ml pour l'extrait méthanolique d'*Origanum vulgare*). Ces résultats sont en corrélation avec la littérature qui confirme que les bactéries Gram négatif sont les plus résistantes aux différents extraits des plantes en particulier les huiles essentielles [106, 111, 112, 113]. Cette résistance des bactéries Gram négatif n'est pas surprenante, elle est en relation avec la nature de leur membranes externes qui leurs confèrent une résistance à la plupart des agents biocides [34, 114].

En effet, la paroi des bactéries à Gram négatif est composée de deux éléments: le péptidoglycane et une membrane externe qui est absente chez les Gram positif (figure 22). Cette membrane surmonte le péptidoglycane et comporte deux feuillets dont la constitution diffère l'un de l'autre. Alors que le feuillet interne est composé de phospholipides similaires à ceux de la membrane cytoplasmique, le feuillet externe est composé d'un complexe appelé: le lipopolysaccharide (LPS) [115]. Ce complexe présente une barrière contre les substances hydrophobes et les macrolides [116, 117, 118]. Ce qui permet aux bactéries Gram négatif de présenter une résistance à l'égard des détergents et les antibiotiques hydrophobes par rapport aux bactéries Gram positif [117].

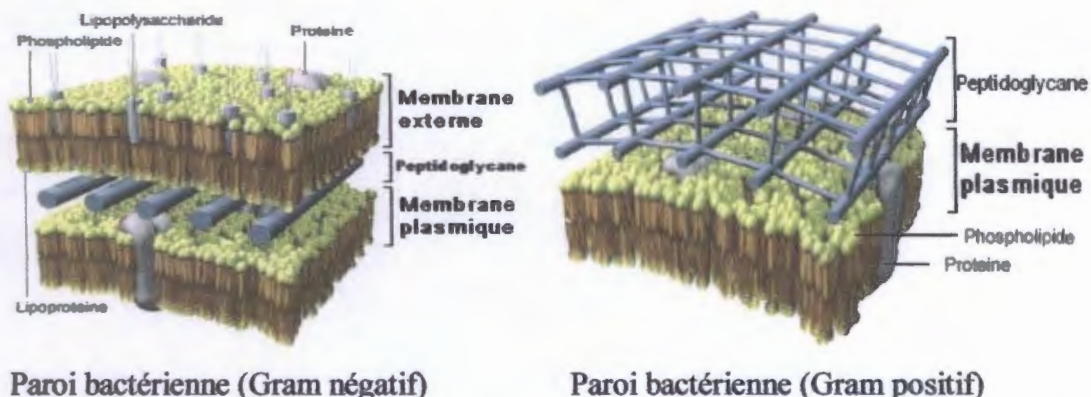


Figure 22 : Structure schématique de la paroi bactérienne des Gram positif et Gram négatif.

Conclusion

Conclusion

Les extraits des trois plantes médicinales, traités dans ce travail, et qui sont connus pour leurs vertus thérapeutiques, présentent des propriétés biologiques importantes dont une activité antibactérienne non négligeable.

Ces propriétés sont et seront toujours liées à leurs compositions chimiques. C'est ce que nous avons prouvé expérimentalement suite aux études faites sur les trois huiles essentielles et les extraits bruts que nous avons traité, notamment l'huile essentielle et les extraits bruts d'*Origanum vulgare* qui ont manifesté une plus grande activité antibactérienne. Une activité qui était loin d'être surprenante vu la présence des composés phénoliques tels que le thymol présent dans l'huile essentielle et les flavonoïdes présents dans les extraits bruts. Ces molécules sont traditionnellement connues pour leurs propriétés antibactériennes.

Il est clair, que les résultats de notre travail, nous paraissent d'emblée intéressants et apportent une validation à l'utilisation traditionnelle de ces espèces végétales.

Ainsi, notre étude a confirmé les propriétés antibactériennes *in vitro* de certains composés à travers la réelle efficacité des huiles essentielles et des extraits bruts, d'*Achillea odorata*, de *Satureja vulgare* et d'*Origanum vulgare* ce qui leur offre la possibilité d'être employées, par exemple à titre de complément d'une antibiothérapie ou être proposées comme matières actives dans des formulations contre les infections bactériennes.

Ces résultats *in vitro* ne constituent qu'une première étape de recherche de produits antibactériens nouveaux et naturels à proposer en médecine. En perspectives, il serait –peut être– intéressant de tester expérimentalement l'association de ces huiles essentielles, la séparation de leurs différents composants aromatiques et cela dans le but de vérifier l'effet obtenu, et d'autre part, la purification des molécules bioactives présentes dans les extraits bruts. D'autres études s'avèrent aussi nécessaires pour évaluer le potentiel *in vivo* de ces extraits sur des modèles animales.

*Références
bibliographiques*

- [1]. **Archibalt L., Phillips L., Monnet D., Mac Govan J. E., Tenover Jr F. et Gaynes R.,** (1997), antimicrobial resistance in isolates from in patients and out patients in the United States, Increasing importance of the intensive care unit. Ed. *Clinic. Infect. Dis.*, 24, (211-215).
- [2]. **Organisation mondiale de la santé (OMS),** (2002), Résistance aux antimicrobiens. Aide mémoire, 194.
- [3]. **Belaiche T.,** (1979), *L'aromatogramme, traité de phytothérapie et d'aromathérapie.* Ed. MSA, Editeur, Paris, 1, (204).
- [4]. **Rubin M.,** (2004), *Guide pratique de phytothérapie et d'aromathérapie.* Ed. ellipses, Paris, (5-64).
- [5]. **Keller-Didier C.,** (2004), *Les plantes médicinales.* Ed. ALS, France, (57-64).
- [6]. **Quieda F.,** (2006), *Médecine arabe et ethnopharmacologie, les plantes du Coran, faculté de pharmacie.* Ed. CNRSL Beyrouth, Liban.
- [7]. **Iserin P.,** (2001), *L'encyclopédie des plantes médicinales.* Ed. Larousse, Paris, (11-280)
- [8]. **Hammer K. A. et al.,** (1999), Antibacterial activity of essential oils and other plant extracts. Ed. *Journal of Applied Microbiology*, 43, (985-990).
- [9]. **Zhiri A.,** (2006), *Nutra News Science, Nutrition, Prévention et Santé.* Ed. Fondation pour le libre choix, (4-10).
- [10]. **Tramil.,** (1995), *Pharmacopée caribéenne.* Ed. Enda Caraïbes, (493).
- [11]. **Knight M. J., Hansen S. R. et Buck W. B.,** (1994), Toxicity of Melaleuca oil and related essential oils applied topically on dogs and cats. Ed. *Human toxicol*, 2, (139-142).
- [12]. **Amjad H. M.,** (2005), *Neem seed oil : Bangladesh. Examples of the Development of Pharmaceutical products from Medicinal Plants.* Ed. Bangladesh Council of Scientific and Industrial Research (BCSIR), 10, (59-63).
- [13]. **Svoboda K. P. et Hampson J. B.,** (1999), Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Ed. Auchincruive, Scotland, UK
- [14]. **Buelens L. et al,** (2006), *Phytothérapie et Aromathérapie Clinique.* Ed. Institut de Phytothérapie International, Bruxelles, (4).
- [15]. **Kothe H. W.,** (2007), *1000 plantes aromatiques et médicinales.* Ed. Terres, Toulouse, (223).
- [16]. **Cuvelier M. E., Berset C. et Richard H.,** (1990), Use of new test for determining comparative antioxidant activity of BHA, BHT, α - and γ - tocopherols and extracts from rosemary and sage. Ed. *Sci. Aliments*, 10, (797-806).

- [17]. **Cuvelier M. E., Berset C. et Richard H.**, (1992), Comparison of antioxidant activity of some acids phenols : structure activity relation ship. Ed. Biosci. Biotech. Biochem., 56, (324-325).
- [18]. **Cuvelier M. E., Berset C. et Richard H.**, (1996), Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary G-Am. Ed. oil chem. Soc, 73, (645-652).
- [19]. **Rubereto G. et Baratta.**, (2000), antioxidant activity of selected essential oil composents in two lipid model systems. Ed. Food chemistry, 4, (167-174).
- [20]. **Bruneton J.**, (1993), Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales. 2^{ème} éditions Tec & Doc Lavoisier, Paris, (410-915).
- [21]. **Richardson J. A.**, (1999), Potpourri hazards in cats. Ed. Toxicol Brief, USA, 94, (1010-1012)
- [22]. **Lis-Balchin M.**, (1999), Possible health and safety problems in the use of novel plant essential oils and extracts in aromatherapy. Ed. The Journal of The Royal Society for the Promotion of Health, 119, 4, (240-243).
- [23]. **Richter G.**, (1993), Métabolisme des végétaux. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, (267).
- [24]. **Sévenet T.**, (1995), Plantes, molécules et médicaments. Ed. CNRS, Paris, (9-47).
- [25]. **Tapiero H., Tew K. D., Nguyen Ba G., Mathé G.**, (2002), Polyphenol : do they play a role in the prevention of human pathologies?. Ed. Biomed Pharmacother, 56, (200-207).
- [26]. **Lugasi A., Hóvári J., Sági K. V. et Biról L.**, (2003), The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. Ed. Acta biologica Sz egidiensis, 47, 1 (4), (199-125).
- [27]. **Duquenois P.**, (1968), L'utilisation des huiles essentielles en pharmacie, leur normalisation et l'Europe du médicament. Ed. Parf. Cosm. Sov., 11, (414-418).
- [28]. **Bruneton J.**, (1999), Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Ed. Tec & Doc, Édition médicinales internationales, (1120).
- [29]. **Ntezurubanza L.**, (2000), les huiles essentielles de Rowanda. Ed. Chicoutimi, Québec.
- [30]. **Porter N.**, (2001), Essential oils and their production. Ed. Crop. Food Res., (39).
- [31]. **Shrama S., Sangwan N. S. et Sangwan R. S.**, (2003), Developmental process of essential oils glandular trichome collapsing in menthol mint. Ed. Current Sci., 84, 4 (25), (544-550).
- [32]. **Hala G. M., Christ H. et Carla K.**, (2000), Traditional uses of *Salvia libanotica* (East Mediterranean sage) and the effects of essential oils. Ed. Journal of Ethnopharmacology, 71, (3), (513-520).

- [33]. **Beylier-Maurel M. F.**, (1976), Activité bactériostatique des matières premières de Parfumerie. Ed. Rivista Italiana. E.P.P.O.S. 58, (283-286).
- [34]. **Cox S.D., Mann C. M., Markham J. L., Bell H. C., Gustafson J. E., Warmington J. R et Wyllie S. G.**, (2000), The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Ed. J. Appl. Microbiol., 88, (1), (170-175).
- [35]. **Dorman H. J. et Deans S. G.**, (2000), Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plants volatile oils. Ed. J. Appl. Microbiol., 88, (2), (308-316).
- [36]. **Flamini G. Cioni P. L., Puleio R., Morelli I. et Panizzi L.**, (1999), Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi. Ed. Phytother Res., 13, (4), (349-351).
- [37]. **Marino M., Bersani C. et Comi G.**, (1999), Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. Ed. J. Food Prot., 62, (9), (1017-1023).
- [38]. **Valnet J., Duraffourd C. H., Duraffourd P. et Cilapraz J.**, (1978), L'aromatogramme : nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques. Plant Med Phytother., 12, (43-52).
- [39]. **Carson C. F. et Riley T. V.**, (1995), Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. Ed. J. Appl. Bacteriol., 78, (3), (264-269).
- [40]. **Karaman S., Digrak M., Ravid U. et Ilcim A.**, (2001), Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *thymus revolutus* Celak from Turkey. Ed. J. Ethnopharmacology, 76, (2), (183-186).
- [41]. **Lis-Balchin M., Hart S et Simpson E.**, (2001), Buchu (*Agathosma betulina* and *A.crenulata*, Rutaceae) essential oils : their pharmacological action on guinea-pig ileum and antimicrobial activity on microorganisms. Ed. J. Pharm Pharmacol., 53, (4), (579-582).
- [42]. **Lis-Balchin M., Hart S. L. et Deans S. G.**, (2000), Pharmacological and antimicrobial studies on different tea- (*Melaleuca alternifolia*, *Leptospermum scoparium* or *Manuka Kunzea ericoides* or *Knuka*), originating in australia and New Zealand. Ed. Phytother. Res., 14, (8), (623-629).
- [43]. **Perez C., Agnese A. M. et Cabrera J. L.**, (1999), The essential oil of *Senecio graveolens* (Compositae) : Chemical composition and antimicrobial activity tests. Ed. J. Ethnopharmacol., 66, (1), (91-96).
- [44]. **Sow A. I., Koyalta D., Boye C. S., Diedhiou-Badiane D. et Bassene E.**, (1995), Antibacterial activity of essential oils from mint in Senegal. Ed. Dakar med, 40, (193- 195).

- [45]. **Conner D. E.**, (1993), Naturally occurring compounds. Ed. Antimicrobials in foods, New York, (441-468).
- [46]. **El Naghy M. A. Maghazy S. N. Fadel-Allah et El Gendy Z. K.**, (1992), Fungistatic action of natural oils and fatty acids on dermatophytic and saprophytic fungi. Ed. Zentralbl. Microbiol., 147, (214-220).
- [47]. **Inyoue S., Tsuruoka T., Uchida K. et Ymaguchi H.**, (2001), Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. Ed. Microbiol. Immunol., 45, (3), (201-208).
- [48]. **Juven B. J., Kanner J., Schved F., et Weisslowicz H.**, (1994), Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. Ed. J. Appl. Bacteriol., 76, (626-631).
- [49]. **Kim J. M., Mashall M. R., Cornell J. A., Preston III J. F, et Wei C. I.**, (1995), Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurum* in culture medium and on fish tubes. Ed. J. Food Sci., 60, (1364-1374).
- [50]. **Knobloch K., Weigand H., Weis N., Schwarm H. M. et Vigenschow H.**, (1986), Action of terpenoids on energy metabolism. Ed. Brunke, Berlin, Germany, (429 -445).
- [51]. **Lagouri V., Blekas G., Tsimidou M., Kokkini S. et Boskou D.**, (1993), Composition and antioxidant activity of essential oils from oregano plants grown wild in Greece. Ed. Forsch., Greece, 197, (20-23).
- [52]. **Remmal A., Tantaoui Elaraki A., Bouchikhi T., Rhayour K et Ettayebi M.**, (1993), Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in Agar Medium. Ed. J. Essent. Oil. Res., 5, (179-184).
- [53]. **Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou V., Kokkini S., Lanaras T. Et Arsenakis M.**, (1996), Antimicrobial and cytotoxic activities of *origanum* essential oils. Ed. J. Agric. Food., 44, (1202-1205).
- [54]. **Ultée A., Gorris L. M. G. et Smid E. J.**, (1998), Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Ed. J. Appl. Microbiol., 85, (211-218).
- [55]. **Ultée A., Slump R. A., Steging G. et Smid E. J.**, (2000), Antimicrobial activity of carvacrol towards *Bacillus cereus* on rice. Ed. J. Food Prot., 63, (5), (620-624).
- [56]. **Didry N., Dubreuil L. et Pinkas M.**, (1993), Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. Ed. Pharmazie., 48, (4), (301-304).

- [57]. **Juven B. J., Kanner J., Schved F., et Weisslowicz H.**, (1994), Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. Ed. *J. Appl. Bacteriol.*, 76, (626-631).
- [58]. **Joklik W. K., Willett H. P et Asmos D. B.**, (1980), *Zinser microbiology*. Ed. Appleton-Centry-Crofts, New York, (17).
- [59]. **Schnitzler P., Schon K. et Reichling J.**, (2001), antiviral activity of australian tea oil and eucalyptus oil against *herpes simplex* virus in cell culture. Ed. *Phamazie*, 56, (4), (343-347).
- [60]. **Deslauriers I.**, (2000), *Food science*. Ed. Université Mc Gill.
- [61]. *British journal of pharmacology*, (1999), 126, (673-680).
- [62]. **Medić-Šarić M., Josprica I., Smolčić-Bbalo A. et Mornar A.**, (2004), Optimization of chromatographic condition in Thin Layer Chromatography of flavonoids and Phenolic Acid. Ed. *Croatica Chemica Acta.*, 77, 1 (2), (361-366).
- [63]. **Mbaveng A. T., Ngameni A., kuete V., et al.**, (2008), Antimicrobial activity of crude extrats and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia bortei* (Moraceae). Ed. *Journal of Ehtnopharmacology*, 166, (483-489).
- [64]. **Narayana K. R., Reddy M. S. Chaluvadi M. R. et Krishna D. R.**, (2001), Bioflavonoids Classification, Pharmacological, Biochemical Effets and Therapeutic Potentiel. Ed. *Indian Journal of Pharmacology*, 33, (2-16).
- [65]. **Galeotti F., Barille E., Curir P., Dolci M., Lanzotti V.**, (2008), Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. Ed. *Photochemistry Letters*, 1, (44-48).
- [66]. **Zimmer N. et Cordesse R.**, (1996), Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. Ed. *INRA Prod. Anim.*, 9, (167-179).
- [67]. **BOUCHET P.**, (2004), Tanins. Ed. *Encyclopédie universalis*, (10).
- [68]. **Khanbaba K. et Ree T. R.**, (2001), Tanins : Classification and Definition. Ed. *Journal of Royel Society of chemistry*, 18, (641-649).
- [69]. **Chung K. T. et Wei C. I.**, (2001), Are tannins a double edged sword in biology and hearth ?. Ed. *Trends in Food Science et Technology*, 9, (168-175).
- [70]. **De Bruyne T. Pirters., Deelstra H. et Vlietink A.**, (1999), Condensed vegetable tannins : Biodiversity and Biological activities. Ed. *Biochemical Systematic and Ecology*, 27, (445-459).
- [71]. **Richter G.**, (1993), *métabolism des végétaux*, (267-287).
- [72]. **Hesse M.**, (2002), *Alkaloids – Nature's Curse or Blessin?*. Ed. VHCA, Zürich.

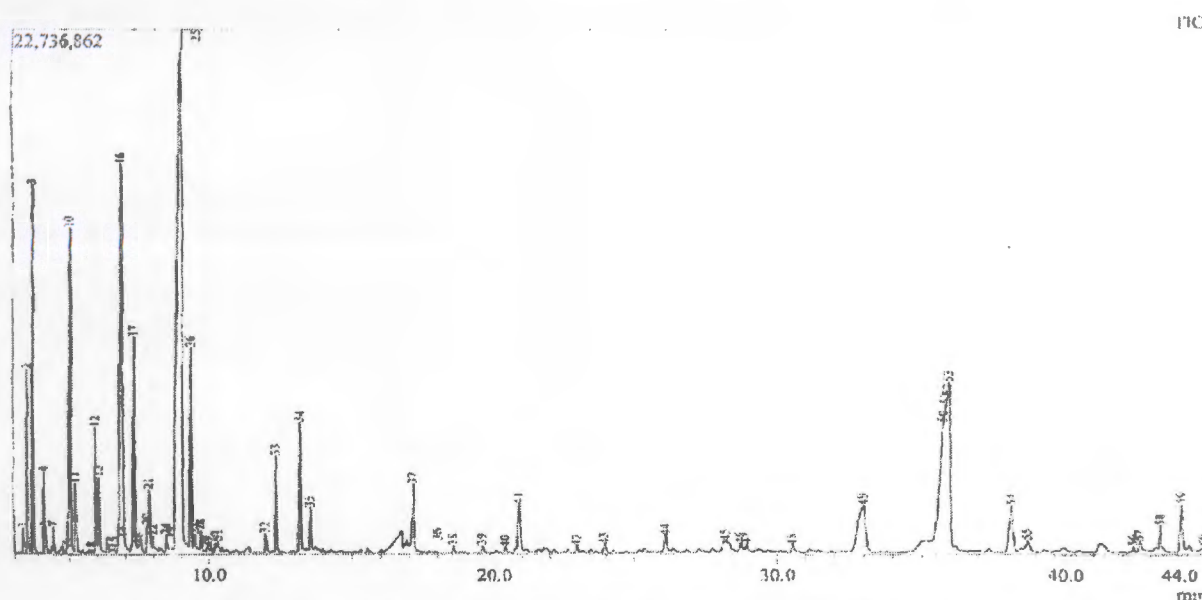
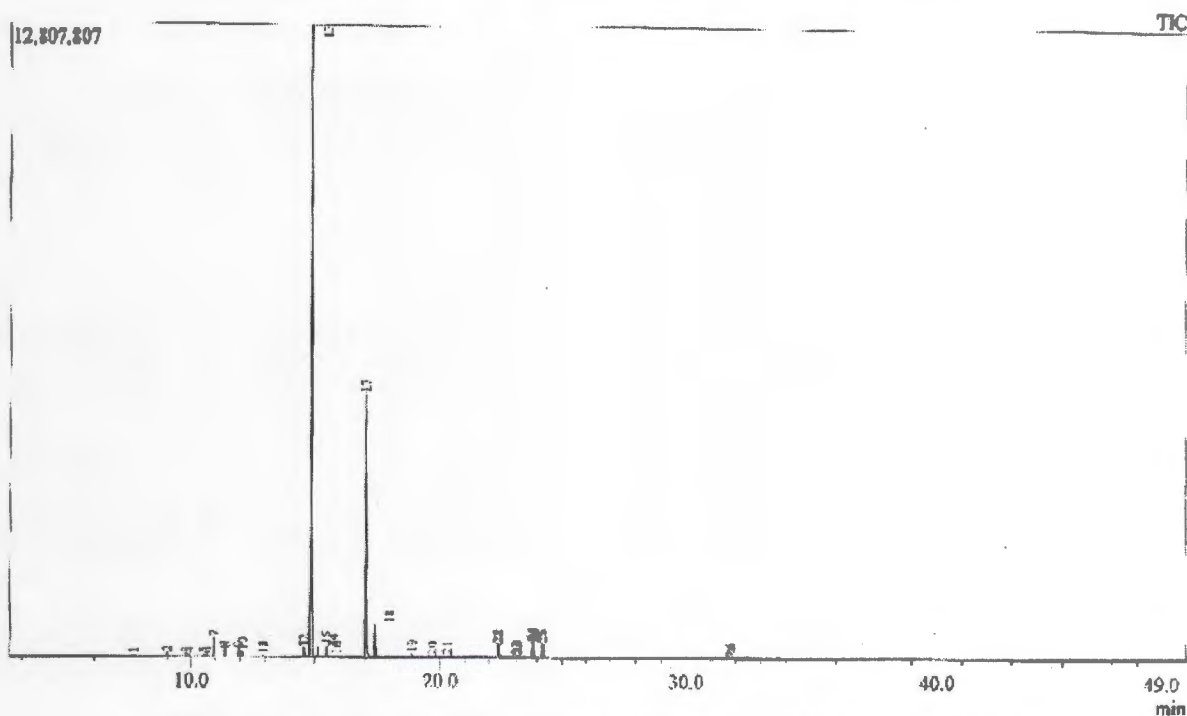
- [73]. Dewick P. M., (2001), The mevalonate and deoxyxylulose phosphate pathways : terpenoids and steroids. Ed. Medicinal Natural Products, 6, (291).
- [74]. Bhat S. V., Nagasampagi B. A. et Sivakumar M., (2005), Chemistry of Natural Products. Ed. Narosa, New Delhi, India, 4, (237).
- [75]. Harborne, J. B. et Herbert B., (1995), Phytochemical Dictionary : A Handbook of Bioactive Compounds from Plants. Ed. Bristol : Taylor & Francis.
- [76]. Moroh J. L. A., Bahi C., Dje K., Loukou Y. G. et Guede-Guina F., (2008), Etude 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*. Ed. Bulletin de la société royale des sciences de Liège, 77, (44-61).
- [77]. Hocquemiller R., Cavé A., Jacquemin H., Touché A. et Forgacs P., (1982), Alcaloïdes des annonacées. XXXVI(*) : Alcaloïdes de l'*Annona crassiflora* Mart. Ed. Plantes médicinales et phytothérapie, XVI, (1), (4-6).
- [78]. Leboeuf M., Cavé A., Provost J., Forgacs P. et Jacquemin H., (1982), Alcaloïdes des annonacées. XLIII(*) : Alcaloïdes du *Xylopiia frutescens* Aubl. Ed. Plantes médicinales et phytothérapie, XVI, (4), (253-259).
- [79]. Ezekiel C. N., Anokwuru C. P., Nsofor E., Odusanya O. A. et Adebajo O., (2009), Antibacterial activity of the methanolic and crude alkaloid extracts of *Acalypha wilkesiana* cv. Macafeeana copper leaf. Ed. Research journal of microbiology, 4, (7), (269-277).
- [80]. Davis P. H., (1982), Flora of Turkey and East Aegean Island. Ed. University press, Edinburgh, V.
- [81]. Benoit B., (2009), Base de données nomenclaturale de la flore de France. Ed. Tela Botanica, 4, (2).
- [82]. Barrero A., Alvarez-Manzaneda E. et Alvarez-Manzaneda R., (2001), Bisabolène derivatives and other constituents from *Achillea odorata*. Ed. Phytochemistry, Granada, Spain, 29, (3213-3216).
- [83]. Barrero A., Alvarez-Manzaneda E. et Alvarez-Manzaneda R., (1989), Achilleol A : a new monocyclic triterpene skeleton from *Achillea odorata*. Ed. Phytochemistry, Granada, Spain, 30, (25), (3351-3352).
- [84]. Barrero A., Alvarez-Manzaneda E., Alvarez-Manzaneda R., Arseniyadis S. et Guittet E., (1990), Achilleol B : a new tricyclic triterpene skeleton from *Achillea odorata*. Ed. Phytochemistry, Granada, Spain, 46, (24), (8161-8166).

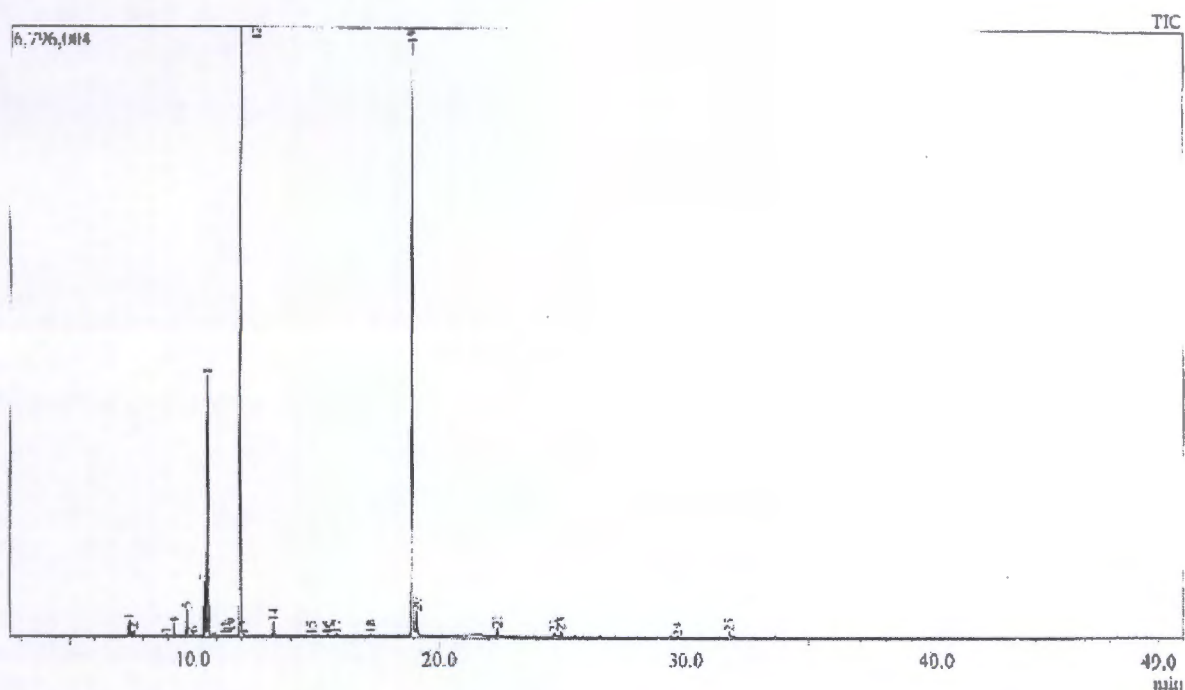
- [85]. **Küpelı E. et al.**, (2007), Evaluation of antiinflammatory and antinociceptive activity of five anatolian *Achillea* species. Ed. Journal of pharmacology science, Turkish, 4, (7), (89-99).
- [86]. **Küpelı E. et al.**, (2009), Evaluation of the wound healing potentiel of *Achillea biebersteinii afan.*(*Asteraceae*) by *in vivo* excision and incision models. Ed. eCam original article, Turkey, (1-7).
- [87]. **Pbase.com, Holopainen J.**, Identification of finnish Wild plants, plant identification for environmental scientists, Kuopio University.
- [88]. **Li X. W., Hedge I. C.**, (2009), *Lamiaceae* in flora of China. Ed. Science press, Beijing, China, 17, (50).
- [89]. **Adıguzel A., Ozer H., Kilic H. et Cetin B.**, (2006), Screening of Antimicrobial Activity of Essential Oil and Methanol Extract of *Satureja hortensis* on Foodborne Bacteria and Fungi. Ed. Czech journal of food science, 25, (2), (81-89).
- [90]. **Bros I., Soran M. L., Bricin R. D. et Cobzac S. C.**, (2009), HPLC quantification of some flavonoıdes in extracts of *Satureja hortensis* obtained by use of different techniques. Ed. Journal of planar chromatography, Budapest, Hongry, 22, (1), (25-28).
- [91]. **Kemertelidz E. P. et al.**, (2004), Chemical composition and pharmacological activity of Garden Savory (*Satureja hortensis*) occurring in Georgia. Ed. Pharmaceutical chemistry journal, 38, (6), (319-322).
- [92]. **Bianco A., Lamesi S. et Passacantilli P.**, (1984), Iridoıd glucoside from *Satureja vulgaris*. Ed. Phytochemistry, 23, (121-123).
- [93]. **Özkalp B. et Özcan M. M.**, (2009), Antibacterial Activity of Several Concentrations of Sater (*Satureja hortensis* L.) Essential Oil on Spoilage and Pathogenic Food - Related Microorganisms. Ed. World Applied Sciences Journal, 6, (4), (509-514).
- [94]. **Bekhechi C., Atik-Bekkara F. et Abdelouahid D. E.**, (2008), Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum vulgare* sub. *glandulosum* d'Algérie. Ed. Phytothérapie, 6, (153-159).
- [95]. **Heilerova L., Buckova M., Tarapcik P., Silhar S. et Labuda J.**, (2003), Comparison of antioxidative activity data for aqueous extracts of Lemon Balm (*Melissa officinalis*), Oregano (*Origanum vulgare*), Thym (*Thymus vulgaris*), and Agrimony (*Agrimonia eupatoria*) obtained by conventional methods and the DNA-based biosensor. Ed. Czech J. Food sci., 21, (2), (78-84).
- [96]. **Huang D. J., Lin C., Chen H. J., et Lin Y. H.**, (2004), Antioxidant and proliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57') constituents. Ed. Bot. Bull. Acad. Sin., 45, (179-186).

- [97]. **Forbes B. A., Sahm D. F., Weissfeld A. S. et Trevino E. A.**, (1990), Methods for testing antimicrobial effectiveness, In : Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. Ed. Mosby Co, St Louis, Missouri, (171-194).
- [98]. **Mujeeb-ur-Rahman et Shereen Gul.**, (2002), Antimicrobial activity of hydrodistilled essential oil of *Psammogeton canescens* N. O. Umbelliferae. Ed. Asian Network of Scientific Information, Biotechnology, 1, (55-60).
- [99]. **Mbata T. I. et Saikia A.**, (2005), Antimicrobial activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* on *Listeria monocytogenes*. Ed. Internet journal of food safety, 7, (15-19).
- [100]. **Bloch K., Chaykin A., Phillips A. H., et Waard A.**, (1959), Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenyle-pyrophosphate. Ed. J. Biol. Chem., 234, (2595-2604).
- [101]. **Walsh S. E., Maillard J. Y., Russel A. D., Catrenich C. E., Charbonneau D. L., et Bartolo R. G.**, (2003), Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram positive and negative bacteria. Ed. Journal of Applied microbiology, 94, (2), (240-247).
- [102]. **Lambert P. A. et Hammond S. M.**, (1973), Potassium fluxes, first indications of membrane damage in micro-organisms. Ed. Biochimical and Biophysical Research Communications, 54, (796-799).
- [103]. **Kopecka`lei`tmanova A., Devinsky F., Mlynarcik D. et Lacko I.**, (1989), Interaction of ADMAOs and quaternary ammonium salts with membrane and membrane-associated processes in *E.coli* cells: mode of action. Ed. Drug Metabolism and Drug Interactions, 7, (29-51).
- [104]. **Shapiro S. et Arigoni D.**, (1995), The action of thymol on oral bacteria. Ed. Oral Microbiology and Immunology, 10, (241-246).
- [105]. **Takasaki A., Hashida T., Fukiwara S., Kato K. et Nishihara T.**, (1994), Bacterial action of a quaternary ammonium disinfectant, didecyldimethylammonium chloride, against *Staphylococcus aureus*. Ed. Japanese Journal of Toxicology and Environmental health, 40, (344-350).
- [106]. **Cosentono S., Tuberoso C. I. G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E. et Palmas F.**, (1999), *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. Ed. Lett Appl Microbiol, 29, (2), (130-135).
- [107]. **Dorman H. J. et Deans S. G.**, (2000), Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. Ed. Journal of Applied Microbiology, 88, (2), (308-316).

- [108]. Kurita N., Miyaji M., Kurane R., Takahara Y. et Ichimura K., (1979), Antimicrobial activity of Dalmatian sage oil from different regions of the Yugoslav Adriatic coast. Ed. Agric. Biol. chem., 43, (11), (2365).
- [109]. Kurita N., Miyaji M., Kurane R. et Takahara Y., (1981), Antifungal activity of components of essential oils. Ed. Agric. Biol. Chem., 45, (4), (945).
- [110]. Milane H., (2004), La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère peroxydant ou thérapeutiques. Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg I, (115).
- [111]. De Blillerbeck G., (2000), Activité fongique de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* sur l'*Aspergillus niger*. Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur. Faculté des sciences pharmaceutiques, Institut national polytechnique de Toulouse, (236).
- [112]. Smith-Palmer A. et Stiwart J., (1998), Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Ed. Lett. Appl. Microbiol., 26, (2), (118- 122).
- [113]. Farag R. S., Daw Z. Y., Hewidi F. M et El-Baroty G. S. A., (1989), Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. Ed. Journal of Food Protection, 52, (665).
- [114]. Tassou C. C. et Nychas G. J. E., (1995), Antimicrobial activity of the essential oil of Mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. chia) on Gram negative bacteria in borth and model food systems. Ed. International Biodeterioration and biodegradation, 36, (411-420).
- [115]. Bousseboua H., (2005), Eléments de microbiologie. Ed. Campus Club, (46-47).
- [116]. Helander I. M., Makela P. H., Westphal O. et Rietschel E. T., (1996), Lipopolysaccharides. Ed. Encyclopededia of Moleculer Biology and Medicine, 3, (462-471).
- [117]. Nikaido H., (1989), Outer membrane barrier as a mechnism of antimicrobial resistance. Ed. Antimicrob. Agents Chemother., 33, (1831-1836).
- [118]. Helander I. M., Alakomi H. L., Latva-kala K. et koski P., (1997), Polyethyleneimine is an effective permeabilizer of Gram negative bacteria. Ed. Microbiology, 143, (3193-3199).

Annexes

Annexe 1 : Chromatogramme des composants des huiles essentielles des trois plantes sélectionnéesChromatogramme des composants de l'huile essentielle d'*Achillea odorata*.Chromatogramme des composants de l'huile essentielle de *Satureja vulgare*.



Chromatogramme des composants de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*.

Annexe 2 : L'antibiogramme

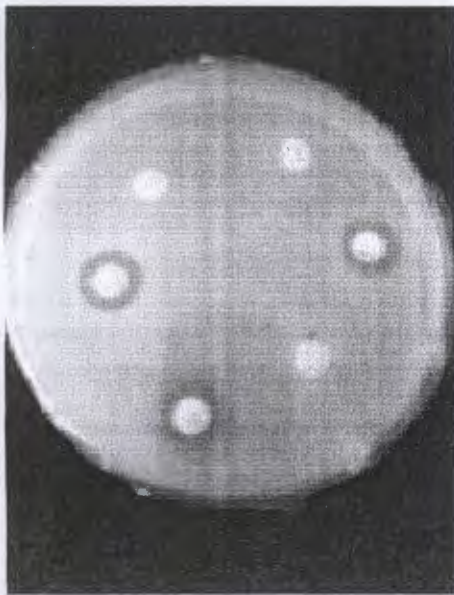
Tableau : Les diamètres des zones d'inhibitions en mm obtenu avec les antibiotiques utilisés.

Bactéries	OX	COL	S10	SP100	S3	P5
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	15	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	13	14	0	27	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	14	19	8	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	13	19	10	15	0
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	14	0	12	0	0
<i>Salmonella sp</i>	0	12	0	10	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0	16	21	14	0	0

OX: oxacilline, COL: colistine, S10: streptomycine, SP100: spiramycine, S3: compound sulphonamides, P5: penicilline G

Tableau : Test de l'antibiogramme par la méthode de diffusion (table de référence).

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
PENICILLINES					
Pénicilline G	6 µg (10 UI)	≤ 0,25	≥ 2	≥ 29	≤ 18
Ampicilline	10 µg	≤ 2	≥ 8	≥ 21	≤ 16
Ampicilline/sulbactam	10/10 µg	≤ 2/8	≥ 8/8	≥ 21	≤ 16
Amoxicilline	25 µg	≤ 2	≥ 8	≥ 23	≤ 16
Amoxicilline/ac. clavulanique	20/10 µg	≤ 2/2	≥ 8/2	≥ 23	≤ 16
Ticarcilline	75 µg	≤ 8	≥ 16	≥ 24	≤ 22
Ticarcilline/ac. clavulanique	75/10 µg	≤ 8/2	≥ 16/2	≥ 24	≤ 22
Pipéracilline	75 µg	≤ 4	≥ 16	≥ 22	≤ 18
Pipéracilline/tazobactam	75/10 µg	≤ 4	≥ 16	≥ 22	≤ 18
Sulbactam		≤ 8	-		
CARBAPENEMES					
Imipénème	10 µg	≤ 2	≥ 8	≥ 24	≤ 17
Méropénème	10 µg	≤ 2	≥ 8	≥ 22	≤ 15
Ertapénème	10 µg	≤ 0,5	≥ 1	≥ 28	≤ 26
Doripénème (H)	10 µg	≤ 1	≥ 4	≥ 24	≤ 19
MONOBACTAME					
Aztréonam	30 µg	≤ 4	≥ 8	≥ 23	≤ 21
AMINOSIDES					
Streptomycine					
- streptocoques, entérocoques	500 µg	≤ 250	≥ 500	≤ 14	≤ 12
- autres bactéries	10 UI	≤ 8	≥ 16	≤ 15	≤ 13
Gentamicine					
- streptocoques, entérocoques	500 µg	≤ 250	≥ 500	≤ 17	≤ 11
- autres bactéries	15 µg (10 UI)	≤ 2	≥ 4	≤ 18	≤ 16
Nétilmicine	30 µg	≤ 2	≥ 4	≤ 21	≤ 19
Kanamycine					
- streptocoques, entérocoques	1000 µg	≤ 250	≥ 500	≤ 14	≤ 10
- autres bactéries	30 UI	≤ 8	≥ 16	≤ 17	≤ 15
Tobramycine	10 µg	≤ 2	≥ 4	≤ 18	≤ 16
Amikacine	30 µg	≤ 8	≥ 16	≤ 17	≤ 15
Isépanamicine	30 µg	≤ 8	≥ 16	≤ 17	≤ 15
Specunomycine (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	100 µg	≤ 64	≥ 64	≤ 20	≤ 20
MACROLIDES					
Erythromycine	15 UI	≤ 1	≥ 4	≤ 22	≤ 17
Dirithromycine	15 µg	≤ 0,12	≥ 4	≤ 28	≤ 16
Azithromycine	15 µg	≤ 0,5	≥ 4	≤ 22	≤ 17
Spiramycine	100 µg	≤ 1	≥ 4	≤ 24	≤ 19
POLYPEPTIDES					
Bacitracine	130 µg	≤ 2	≥ 2	≤ 15	≤ 15
Colistine	50 µg	≤ 2	≥ 2	≤ 15	≤ 15
SULFAMIDES-TRIMETHOPRIME					
Sulfamides	200 µg	≤ 64	≥ 256	≤ 17	≤ 12
Triméthoprime	5 µg	≤ 4	≥ 8	≤ 16	≤ 12
Triméthoprime/sulfaméthoxazole	1,25/23,75 µg	≤ 2/38	≥ 8/152	≤ 16	≤ 10



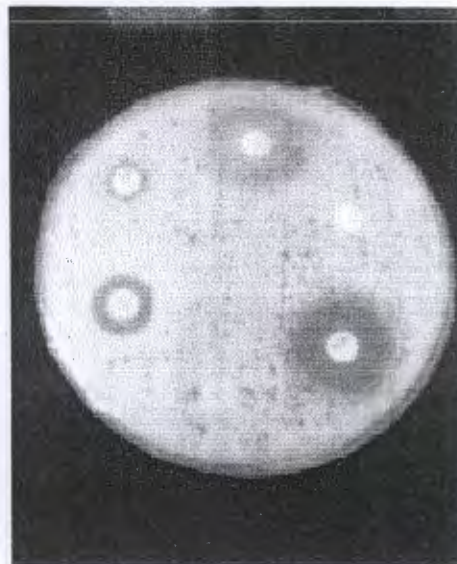
Salmonella sp



Staphylococcus aureus



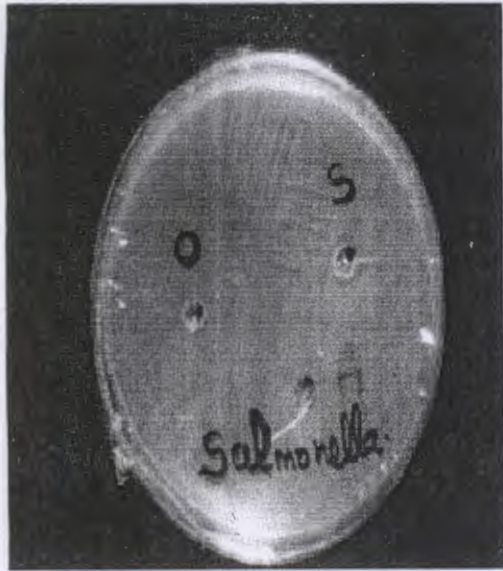
Escherichia coli ATCC 25922



Klebsiella oxytoca

Annexe 3 : Les tests antibactériens

1. L'activité antibactérienne des huiles essentielles



Salmonella sp



Klebsiella pneumoniae

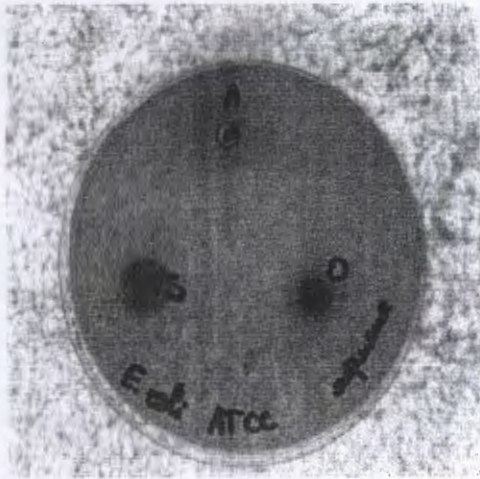


Escherichia coli ATCC 25922



Escherichia coli

2. L'activité antibactérienne des extraits bruts



Escherichia coli ATCC 25922



Escherichia coli



Proteus mirabilis

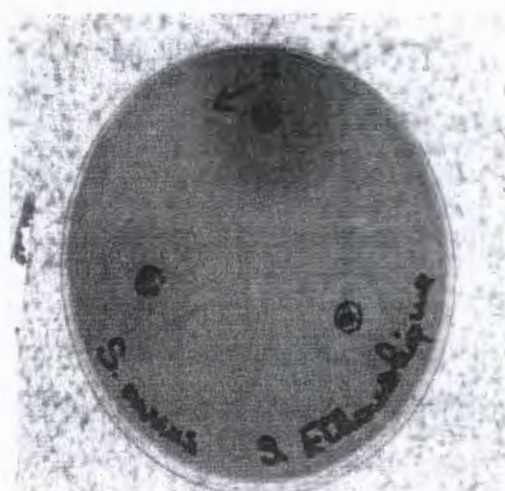


Escherichia coli

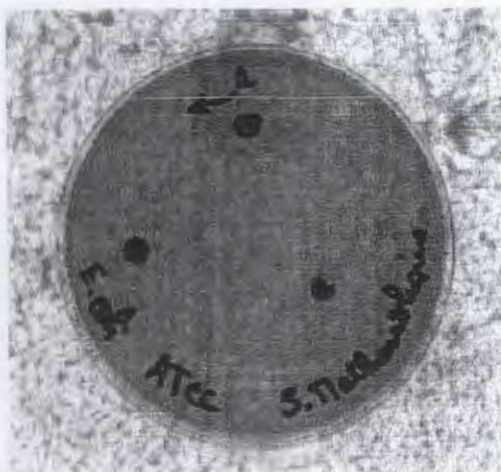
3. Les CMI



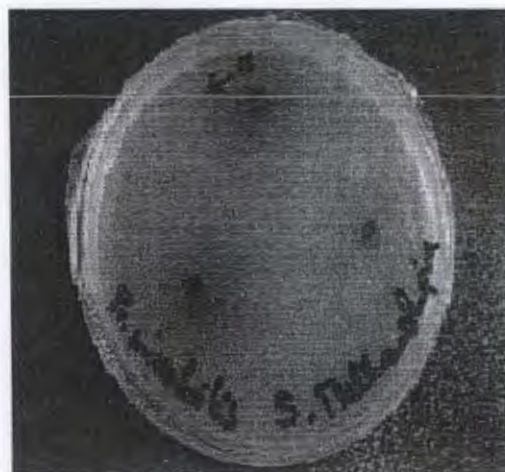
Staphylococcus aureus



Staphylococcus aureus



Escherichia coli ATCC 25922



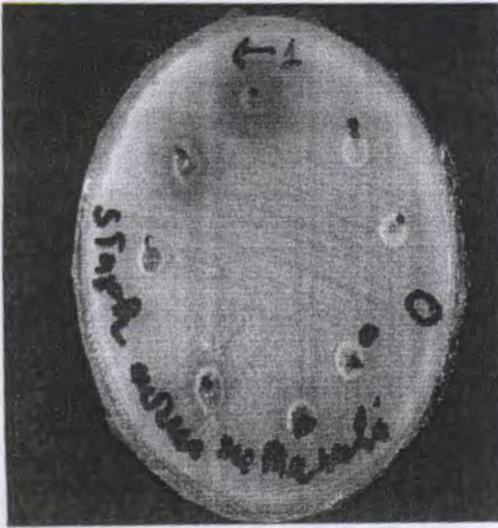
Proteus mirabilis



Escherichia coli



Pseudomonas aeruginosa



Staphylococcus aureus



Escherichia coli ATCCA 25922

Annexe 4 : Milieux de culture

Milieu Hektoen :

Peptone	12 g
Extrait de levure	03 g
Lactose	12 g
Saccharose	12 g
Salicine	02 g
Chlorure de sodium	05 g
Thiosulfate de sodium	05 g
Citrate ferrique ammoniacal	1,5 g
Bleu de bromothymol	0,065 g
Fushine acide	0,1 g
Agar	13 g
pH	7,5

Milieu Chapman :

Peptone	10 g
Extrait de viande de boeuf	01 g
Chlorure de sodium	75 g
Mannitol	10 g
Rouge de phénol	0,025 g
Agar-agar	15 g
pH	7,4

Gélose nutritive :

Peptone	05 g
Extrait de viande	01 g
Extrait de levure	02 g
Chlorure de sodium	05 g
Agar	15 g
pH	7,4

Bouillon nutritif :

Peptone	10 g
Extrait de viande	05 g
(eventuellement NaCl 5 g)	
pH	7,2

Milieu Muller Hinton :

Infusion de viande de boeuf	300,0 ml
Hydrolysate acide de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	01,5 g
Agar	17 g
pH	7,4



Extraction et évaluation expérimentale *in vitro* de l'activité antibactérienne des extraits de quelques plantes médicinales.

Présenté par : Meledjem Samira, Naïdja Khadidja, Younsi Yamina

RESUME

Les huiles essentielles et les extraits bruts des plantes médicinales : *Achillea odorata*, *Satureja vulgare* et *Origanum vulgare* ont été obtenus respectivement par hydrodistillation et macération. Les huiles essentielles ont été analysé par CPG/SM et les dosages des polyphénols et des flavonoïdes ont été effectués à partir des extraits bruts méthanoliques.

Le pouvoir antibactérien des extraits a été étudié *in vitro* par la méthode de diffusion en puits sur des souches bactériennes isolées à partir d'échantillons pathologiques de patients hospitalisés. Les extraits d'*Origanum vulgare* se sont révélés les plus actifs, les deux autres ont montré une activité modérée surtout sur les souches Gram négatif. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des trois plantes ont été obtenues par des dilutions réalisées à partir des extraits bruts.

Mots clés : plantes médicinales, huiles essentielles, extraits bruts, hydrodistillation, macération, activité antibactérienne, concentraion minimales inhibitrices (CMI).

ABSTRACT

Essential oils and crude extracts of the medicinal plants *Achillea odorata*, *Satureja vulgare* and *Origanum vulgare* were obtained respectively by steam distillation and maceration. Essential oils were analyzed using GC/MS and polyphenols and flavonoids were quantified from crude methanolic extracts.

The antibacterial activity of extract was studied *in vitro* by well diffusion method on bacterial strains isolated from pathological specimens of hospitalized patients. Extracts of *Origanum vulgare* have been most active, the other two showed a moderate activity on most Gram-negative strains. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of the three plants were obtained by dilutions made from crude extracts.

Keywords: medicinal plants, essential oils, crude extracts, steam distillation, maceration, antibacterial activity, minimum inhibitory concentrations (MIC).

ملخص

تم الحصول على الزيوت الطيارة والمستخلصات الخامة للنباتات الطبية *Achillea odorata*, *Satureja vulgare* و *Origanum vulgare* عن طريق التقطير بالبخار والتعطين على التوالي. تم تحليل الزيوت الطيارة عن طريق ال GC/MS و معايرة flavonoids و polyphenols من المستخلص المثلي.

تم دراسة النشاط المضاد للبكتيريا في المختبر بطريقة الانتشار على سلالات بكتيرية معزولة من عينات مرضية لمرضى في المستشفى. مستخلصات *Origanum vulgare* كانت أكثر فعالية، بالمقارنة مع المستخلصات الأخرى التي أظهرت فعالية أقل خاصة على معظم سلالات سالبة الجرام. تم الحصول على الحد الأدنى للتركيز المثبطة من تخفيفات المستخلصات الخامة. الكلمات المفتاحية: النباتات الطبية، الزيوت الطيارة، المستخلصات الخامة، التقطير بالبخار، التعطين، النشاط المضاد للبكتيريا، الحد الأدنى للتركيز المثبطة.

Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie