

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderahmane Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'état

En **Biologie**

Option : Génie Biologique

Thème

*Activité antibactérienne des extraits de
Pulicaria odora L.*

Présenté par :

M^{elle} HAMMICHE Hayet
M^{elle} OUAZENE Naima

Devant le jury :

Président : M^{elle} LAINCER F.

(M.A.B Université de Bejaia)

Promoteur : M^{elle} SAIDANI K.

(M.A.B Université de Bejaia)

Examineur : M^{me} KERAMANE B.

(M.A.A Université de Bejaia)

Année 2012/2013

Remerciement

Nous remercions profondément M^{elle} SAIDANI K. Pour l'intérêt constant qu'elle a porté a ce travail en acceptant de diriger cette étude, pour sa disponibilité, ses orientations et ses remarques fructueuses, qu'elle trouve ici nos profondes gratitudees.

Nous remercions vivement M^{elle} LAINCER F. pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

Nos remerciements s'adressent également à M^{me} KERAMANE, nous sommes très honorées qu'elle a accepté d'examiner ce travail.

Merci enfin, à tous nos collègues et ami(e)s présents ou absents.

Dédicaces

Avec l'aide et la grâce de Dieu est achevé ce modeste travail que je dédie

A

Mes très chers parents pour leur sacrifices et amour

*Mes très chères sœurs, Nabila, Hassiba, Yamina et à Razika, ainsi que
son mari et son enfant*

Mes très chers frères Rachid, Akli, Kaci et Nouredine

Ma grande mère, mes oncles et mes tantes

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

*Tout le personnel et tous mes collègues qui m'ont soutenu tout au long
de mes études*

Hayet

Dédicaces

Avec l'aide et la grâce de Dieu est achevé ce modeste travail que je dédie

A

Mes très chers parents pour leur sacrifices et amour

Mes très chères sœurs

Ma grande mère

Mes très chers frères et leurs femmes

Mon petit frère Zaid

Mes très chères nièces, Massine, Sabine, Samy et Ramy

Mes très chers amies et amis

*Ma meilleur amie Marina qui a été toujours à mes cotés, et avec elle j'ai
partagé les moments les plus difficiles*

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

*Tout le personnel et tous mes collègues qui m'ont soutenu tout au long
de mes études*

Naima

Sommaire

Liste des abréviations	
Table des illustrations	
Introduction	1
Synthèse bibliographique	
I. <i>Pulicaria odora</i> L. et les composés phénoliques	3
I.1. Définition et distribution de <i>Pulicaria odora</i>	3
I.2. Principales utilisations de <i>Pulicaria odora</i>	3
I.3. Métabolites secondaires de <i>Pulicaria odora</i>	3
I.3.1 Flavonoïdes	3
I.3.2 Huiles essentielles	4
I.4. Activité antibactérienne et mode d'action des composés phénoliques	5
I.4.1 Acides phénoliques	6
I.4.2 Flavonoïdes	6
I.4.3 Tannins	7
Matériel et Méthodes	
I. Matériel végétal	9
I.1 Echantillonnage	9
I.2 Traitement des échantillons	10
II. Extraction des composés phénoliques	10
II.1 Protocole d'extraction	10
II.2 Taux d'extraction	10
III. Dosage des composés phénoliques	10
III.1 Dosage des polyphénols totaux	10
III.2 Dosage des flavonoïdes	11
IV. Activité antibactérienne	12
IV.1 Souches cibles	12
IV.2 Evaluation de l'effet antibactérien	12
IV.2.1 Antibiogrammes	12
IV.2.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)	13
IV.2.3 Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB)	13
V. Etude statistique	13

Résultats et discussion

I. Taux d'extraction des composés phénoliques	14
II. Dosage des composés phénoliques	16
II.1 Dosage des polyphénols totaux	16
II.2 Dosage des flavonoïdes	17
III. Activité antibactérienne	18
III.1 Antibiogrammes	18
III.1.1 Activité antibactérienne vis-à-vis de <i>S. aureus</i>	19
III.1.2 Activité antibactérienne vis-à-vis de <i>B. subtilis</i>	21
III.1.3 Activité antibactérienne vis-à-vis d' <i>E. coli</i>	22
III.1.4 Activité antibactérienne vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i>	23
III.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI/CMB)	27
Conclusion	29
Références bibliographiques	
Annexes	
Glossaire	

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique.

AG : Acide Gallique.

ARN : Acide Ribo-Nucléique.

ATCC: Américain Type Culture Collection.

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

Cat : Catéchine.

CMB : Concentration Minimale Bactéricide.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

Eq : Equivalent.

Gyr : Gyrase.

LPS : LipoPolySaccharides.

N.A.R : Nalidixic Acid Resistant.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

PCA : Plate Count Agar.

PS : Poudre Sèche.

Quer : Quercétine.

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthéciline.

UAMB : Université Abderrahmane Mira de Bejaia.

UFC : Unité Formant Colonie.

Liste des tableaux

Tableau I: Caractéristiques botaniques de <i>Pulicaria odora</i> et sa classification. _____	9
Tableau II: Les différentes souches bactériennes testées. _____	12
Tableau III: Activité antibactérienne de quelques standards polyphénols. _____	25
Tableau IV: Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des différents extraits de feuilles et de racines de <i>Pulicaria odora</i> étudiée sur les souches bactériennes testées. _____	27
Tableau V: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des standards polyphénols utilisés sur les souches bactériennes testées. _____	28

Liste des figures

Figure 1: Structure de base des flavonoides _____	4
Figure 2 : Structure des huiles essentielle de <i>Pulicaria odora</i> _____	5
Figure 3: Photographie de <i>Pulicaria odora</i> _____	9
Figure 4: Représentation graphique du taux d'extraction de feuilles et de racines de <i>Pulicaria odora</i> , pour les différents solvants utilisés _____	14
Figure 5: Représentation graphique de la teneur en polyphénols totaux de feuilles et de racines de <i>Pulicaria odora</i> , pour les différents solvants utilisés _____	16
Figure 6: Représentation graphique de la teneur en flavonoïdes de feuilles et de racines de <i>Pulicaria odora</i> , pour les différents solvants utilisés _____	17
Figure 7: Activité antibactérienne des différents extraits de <i>Pulicaria odora</i> _____	19
Figure 8: Photographies de quelques zones d'inhibition de <i>S. aureus</i> obtenues par les différents extraits de <i>Pulicaria odora</i> _____	20
Figure 9: Photographies de quelques zones d'inhibition de <i>B. subtilis</i> obtenues par les différents extraits de <i>Pulicaria odora</i> _____	22
Figure 10: Photographies de quelques zones d'inhibition d' <i>E. coli</i> obtenues par les différents extraits de <i>Pulicaria odora</i> _____	23
Figure 11: Photographies de quelques zones d'inhibition de <i>P. aeruginosa</i> obtenues par les différents extraits de <i>Pulicaria odora</i> _____	24

Introduction

Introduction

Le recours aux ressources naturelles en général, et aux plantes médicinales en particulier devient une des plus importantes et intéressantes pistes à explorer pour la recherche de nouveaux produits antimicrobiens plus efficaces (**Chebaibi et al., 2011**).

L'utilisation des plantes comme remède pour le traitement de nombreuses maladies remontent à la préhistoire, et de nombreuses populations ont cette tradition. Plus de 25% des médicaments prescrits dans les pays industrialisés, proviennent directement ou indirectement des plantes (**Bousselsela et al., 2012**).

Les plantes médicinales et aromatiques sont à la fois un produit fini destiné à la consommation, et une matière première pour l'obtention de substances actives utilisées en phytothérapie, d'où l'augmentation de l'intérêt mondial de leur utilisation (**Bouzide et al., 2011**).

En Afrique, la médecine traditionnelle constitue le support fondamental pour la pratique de la médecine dans les zones rurales. L'usage d'extrait des plantes contenant des constituants bioactifs et devenu une approche très importante dans la médecine préventive (**Keita et al., 2004**). En effet, en 2002, l'OMS a estimé que, pour se soigner, 80% de la population africaine ont toujours recours à la médecine traditionnelle, pour laquelle la majeure partie des thérapies implique l'exploitation des principes actifs des plantes médicinales. Ces espèces végétales d'aussi grande importance pour la santé des populations méritent d'être étudiées scientifiquement pour une meilleure utilisation (**Karou et al., 2005**).

La découverte des antibiotiques constituait une véritable révolution dans la lutte contre les maladies infectieuses. Cependant, la consommation inappropriée et l'utilisation abusive d'antibiotique ont accéléré la sélection de bactéries multirésistantes, constituant actuellement un réel problème d'antibiothérapie et de santé publique. Les conséquences collectives et individuelles de ce problème sont sérieuses : la plupart des infections, qu'elles soient bénignes ou graves, sont de plus en plus difficiles à traiter (**Mtolera et Semesi, 1996**). Ceci exprime un besoin urgent pour la recherche de nouvelles molécules bioactives d'origine naturelle (**Choudhury et al., 2005**).

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'activité antibactérienne des différents extraits de feuilles et de racines de *Pulicaria odora* L. de la wilaya de Bejaia (Algérie).

- ✓ La première partie de ce document est consacrée à une synthèse bibliographique sur la plante *Pulicaria odora* L., ainsi qu'un aperçu sur ses composés phénoliques, suivie de l'activité antibactérienne de ces derniers.

- ✓ La seconde partie de ce document est consacrée à la partie expérimentale, à savoir :
 - Extraction des composés phénoliques à partir de feuilles et de racines de *Pulicaria odora* L. ;
 - Dosage des composés phénoliques de ces extraits ;
 - Evaluation de leurs activités antibactériennes.

- ✓ Enfin la troisième partie présente les résultats obtenus ainsi que leurs discussions.

Synthèse bibliographique

I. *Pulicaria odora* L. et les composés phénoliques

I.1 Définition et distribution de *Pulicaria odora*

Le genre *Pulicaria* appartient à la famille d'Asteraceae (Compositae), tribu des inuleae, qui contient 100 espèces (Ezoubeiri *et al.*, 2005). *Pulicaria odora* est une espèce méditerranéenne (Williams *et al.*, 2003), elle colonise des maquis, clairières et les essarts (Bayer *et al.*, 1990).

I.2 Principales utilisations de *Pulicaria odora*

Pulicaria odora est une plante médicinale qu'est largement utilisée, en médecine traditionnelle, pour traiter les douleurs de troubles intestinaux et les crampes menstruelles. Elle rentre dans la composition de "Mssakhen", remède traditionnel, qu'est donné aux femmes après l'accouchement. Elle est aussi utilisée comme épice pour parfumer le pain et la viande (Ezoubeiri *et al.*, 2005). Les racines de *Pulicaria odora* sont également utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs propriétés anti-inflammatoires (Hanbali *et al.*, 2005).

I.3 Métabolites secondaires de *Pulicaria odora*

I.3.1 Flavonoïdes

Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils ont des rôles variés dans les plantes. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Brunton, 1999). Ils sont impliqués dans les processus de défense contre les UV, la stimulation des nodules pour la fixation de l'azote et la résistance aux maladies (Chira *et al.*, 2008).

Les flavonoïdes comprennent 15 atomes de carbone formant une structure de base C6-C3-C6 (Chira *et al.*, 2008), constituée de deux cycles benzéniques (A et B) liés par un hétérocycle pyrane (C) (figure 1) (Cushnie et Lamb, 2005).

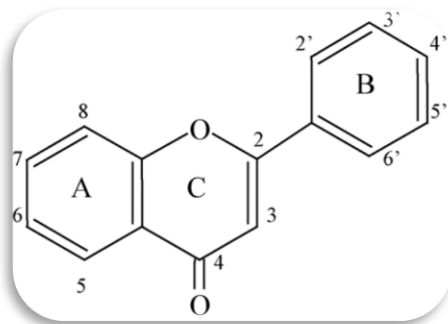


Figure 1: Structure de base des flavonoïdes (Cushnie et Lamb, 2005).

Une étude menée par **Williams *et al.* (2003)** sur quatre espèces du genre *Pulicaria*, afin d'identifier leurs flavonoïdes, a montré que *Pulicaria odora* diffère des autres espèces par la production fortement élevée d'une série de dérivés de 6-hydroxy-kaempferol méthyle, qui est un flavonoïde principal des feuilles, et un autre nouveau composé complètement méthylé, l'éther 3,5,6,7,4'-penta-méthyl.

Un autre composé qui est le 3,7,4'-triméthyl de 6-hydroxy-kaempferol éther a été aussi trouvé dans la feuille de *Pulicaria odora* en quantité importante, alors que des dérivés de la quercetagine et la quercétine 3-glucuronide ont été détectés sous forme de traces.

Parmi les espèces étudiées, seule *Pulicaria odora* qu'est capable de produire le 7-glucosides, de la patuletin (quercétine 6-méthyl éther) et le 6-hydroxy-kaempferol méthyle éther (**Williams *et al.*, 2003**).

I.3.2 Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires, de composition généralement assez complexe, renfermant les principes volatiles contenus dans les végétaux (**Bruneton, 1999**). Elles sont obtenues à partir de la fraction volatile de la plante par distillation par la vapeur. Les huiles essentielles ont une grande variété d'effets sur la santé, les plus importants sont les effets antiseptiques et antimicrobiens (**Calsamiglia *et al.*, 2007**).

L'extraction des huiles essentielles des racines de *Pulicaria odora* par la méthode de distillation à la vapeur permet de donner un composé de couleur jaune. Ce dernier est constitué principalement de thymol et de thymol isobutyrate. Ces huiles essentielles sont riches en composés oxygénés, ce qui explique leurs odeur parfumée (**Hanbali *et al.*, 2005**). Deux isomères de thymols sont identifiés pour la première fois chez *Pulicaria* par chromatographie sur colonne de gel de silice : 2-isopropyl-4-méthylphénol de composition chimique (C₁₀H₁₄O) et de isobutyric acide 2-isopropyl-4-méthyl-phénylester de composition

chimique (C₁₄H₂₀O₂). Ce dernier est considéré comme un composé principal des huiles essentielles de *Pulicaria odora* (figure 2) (Ezoubeiriet al., 2005).

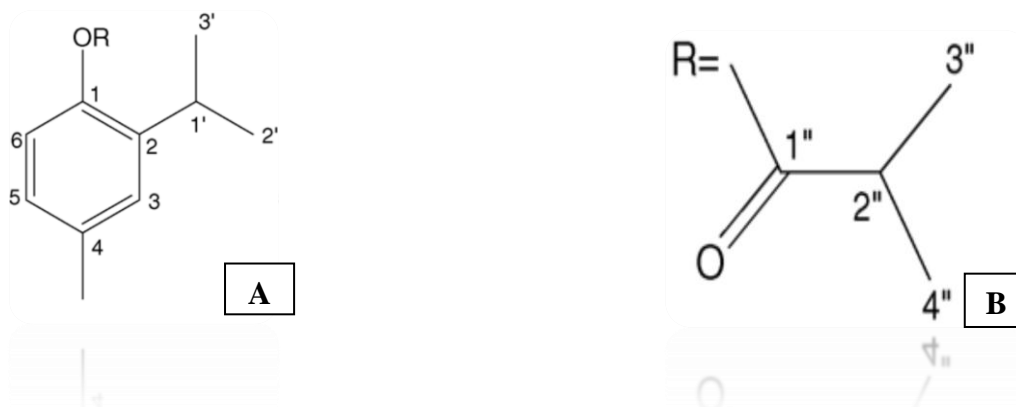


Figure 2: Structure des huiles essentielle de *Pulicaria odora* : (A) : 2-isopropyl-4-méthylphénol et (B) : isobutyric acide 2-isopropyl-4-méthyl-phénylester (Ezoubeiri et al., 2005).

I.4 Activité antibactérienne et mode d'action des composés phénoliques

Les espèces de *Pulicaria* présentent différentes activités biologiques comme anti-inflammatoire, antilukémique, chimopreventive potentiel de cancer (Algabr et al., 2012). D'autres activités sont révélées chez certaines espèces de *Pulicaria* telles que : l'activité cytotoxique pour *Pulicaria crispa* et *Pulicaria orientalis*, l'activité antibactérienne pour *Pulicaria undulata* et *Pulicaria dysenterica*, l'activité antispasmodique pour *Pulicaria glutinosa* et l'effet antihistaminique pour *Pulicaria dysenterica* (Ezoubeiri et al., 2005).

Les polyphénols constituent un groupe de composés phénoliques fortement hydroxylé, ils sont présents dans la fraction extractive de plusieurs matières végétales. Plusieurs études ont montré que les polyphénols ont une activité antimicrobienne contre un très grand nombre de bactéries pathogènes (Karou et al., 2005) par l'affection de leurs croissances et leurs métabolismes selon les constituants et les concentrations de composés phénoliques (Rodríguez-Vaquero et al., 2007).

L'activité des composés phénoliques vis-à-vis des microorganismes peut s'exercer selon des modalités extrêmement diverses. Certains exercent leur activité en oxydant ou en dénaturant les protéines bactériennes (Schiota et al., 2004), d'autre ont un pouvoir plus spécifique en altérant les structures membranaires ou en inactivant des composés ou des

fonctions essentielles à la cellule (**Song *et al.*, 2007**). De ce fait, ils sont bactéricides ou bactériostatiques selon les concentrations (**Alcaraz *et al.*, 2000**).

I.4.1 Acides phénoliques

L'action des phénols sur les microorganismes est liée aux sites et au nombre de groupements hydroxyles. En effet, l'augmentation d'hydroxylation augmente leur toxicité, les phénols les plus inhibiteurs sont ceux qui sont plus oxydés. Les mécanismes responsables de la toxicité phénolique peuvent être inclus, dans l'inhibition d'enzymes par les composés oxydés, par réaction de groupement sulfhydryles ou par des interactions non spécifiques avec les protéines (**Cowan, 1999**).

Les acides hydroxycinnamiques et ces dérivés, en raison de leurs chaînes propénoïques latérale, sont moins polaires. Cette propriété peut faciliter le transport de ces molécules à travers la membrane cytoplasmique, elles rentrent en interaction avec les lipides membranaires en affectant le métabolisme secondaire (**Rodríguez-Vaquero *et al.*, 2007**).

Les phénylpropanoïdes développent leur action contre les bactéries en agissant l'un sur l'autre à travers l'interaction avec la membrane cellulaire, cette activité est due à l'hydrophobicité des hydrocarbures cycliques, ce qui leur permet d'interagir avec les membranes cellulaires et s'accumuler dans la bicouche lipidique des bactéries en occupant un espace entre les chaînes des acides gras. Cette interaction cause des changements dans la structure membranaire, ce qui mène à sa fluidité et son expansion (**Calsamiglia *et al.*, 2007**).

I.4.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont synthétisés dans la plante en réponse à une infection microbienne (**Cowan, 1999**). L'activité antibactérienne des flavonoïdes est essentiellement liée à leurs structures chimiques. Ils sont riches en groupement phénoliques capables de se fixer sur certaines protéines et enzymes modifiant ainsi les équilibres enzymatiques (**Amina *et al.*, 2009**). Les flavonoïdes les plus lipophiles peuvent également perturber les membranes bactériennes (**Cowan, 1999**).

La fluidité membranaire peut être réduite par certains flavonoïdes. La galangine de flavonol possède cet effet sur les cellules bactériennes par la perforation et l'agrégation de la membrane de ces dernières qui résulte la réduction de la fluidité en produisant du peroxyde d'hydrogène (**Cushnie et Lamb, 2011**). Le sophoraflavanone semble également avoir la membrane de SARM et de *Streptocoque* comme cible où il agit sur les régions hydrophiles

et hydrophobes ce qui réduit la fluidité des couches externes et internes de la membrane (**Cushnie et Lamb, 2005**).

Le robinetin, myricétine et l'épigallocatechine peuvent inhiber la synthèse d'ADN. L'anneau B des flavonoïdes joue un rôle dans l'intercalation ou la formation d'une liaison d'hydrogène avec l'empilement de base des acides nucléiques, ce qui peut expliquer l'action inhibitrice de la synthèse d'ADN et d'ARN (**Cushnie et Lamb, 2005**).

Les licochalcones peuvent s'interférer avec le métabolisme énergétique d'une manière similaire à l'inhibition respiratoire bactérienne par les antibiotiques. Deux retrochalcones (licochalcones A et B) inhibent le NADH-cytochrome c réductase (**Haraguchi et al., 1998**).

Les catéchines s'intercalent entre les phospholipides membranaires et provoquent une réduction de la fluidité de la membrane, générant une inhibition de certaines fonctions membranaires (**Huber et al., 2003**). Epigallocatechine gallate inhibe l'activité de la pompe d'efflux impliquée dans la résistance des souches *S. aureus* aux tétracyclines ce qui restaure leur sensibilité. Il peut aussi agir en synergie avec les pénicillines et moduler la résistance de *S. aureus* résistants à la méthiciline (SARM) (**Sudano-Roccaro et al., 2004**). Comme il inhibe la pénicillinase conduisant à la restauration de l'activité de la pénicilline (**Taganna et Rivera, 2008**).

La quercitine se lie à la sous unité GyrB de l'ADN gyrase d'*Escherichia coli*, il rentre en compétition avec l'ATP pour le site de fixation ce qui résulte l'inhibition de son activité ATPasique (**Plaper et al., 2003**).

I.4.3 Tannins

Le mode d'action antimicrobien des tannins est lié à leur capacité d'inactiver les adhésines microbiennes, les enzymes, les enveloppes cellulaires et les protéines de transport. (**Cowan, 1999**). Plusieurs recherches ont montré que les tannins ont une efficace activité bactéricide, cette activité est due à l'attachement des molécules de tannins à la membrane de la cellule hôte (**Bruyne et al., 1999**).

Les tannins peuvent se lier aux phospholipides et aux protéines de la membrane bactérienne, perturbant ainsi sa fonction. Ils peuvent aussi établir des liaisons hydrogènes avec le peptidoglycane de la paroi des bactéries Gram positives (**Figueiredo et al., 2008**).

Les tannins empêchent les substrats de traverser la paroi cellulaire, en diminuant sa perméabilité par la formation des complexes avec les protéines de la paroi cellulaire. Ils sont également responsables des changements morphologiques de plusieurs espèces bactériennes (Goel *et al.*, 2005). Malgré la formation des complexes avec des polymères extracellulaires, les proanthocyanidines pénètrent dans la cellule en concentration suffisante pour réagir avec un ou plusieurs composants internes et empêchent sélectivement la synthèse de la paroi cellulaire (Buzzini *et al.*, 2007).

Les tannins s'attachent aux amylases, cellulases et β -glucosidases en produisant un complexe protéine-polyphénol qui se précipite et devient inactif. L'interaction de l'acide tannique avec la protéase de *Pectobactérium chrysanthemi* a montré une diminution significative du taux de croissance de cette dernière ce qui résulte l'inhibition de l'activité protéasique (Zaidi-Yahiaoui *et al.*, 2008).

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

I. Matériel végétal

I.1 Echantillonnage

Les échantillons de *Pulicaria odora* sont récoltés durant le mois de mars 2011, à partir de la région d'Ain-skhoune de la ville de Bejaia à 180m d'altitude (36° 45' 3'' N, 5° 00' 21'' E). Ces échantillons sont transportés dans des sacs en polyéthylène. La plante est identifiée au niveau du laboratoire d'écologie de l'UAMB. La photographie de la plante récoltée est présentée dans la figure 3. La description et la classification de cette plante sont résumées dans le tableau I.



Figure 3: Photographie de *Pulicaria odora*.

Tableau I: Caractéristiques botaniques de *Pulicaria odora* L. et sa classification.

Classification (Deysson, 1979)	Description (Bayer <i>et al.</i> , 1990)
Embranchement : Spermaphytes. Sous embranchement : Angiospermes. Classe : Dicotylédones. Sous classe : Gamopétales. Ordre : Astérales. Famille : Asteraceae. Genre : <i>Pulicaria</i> . Espèce : <i>Pulicaria odora</i> L.	C'est une plante vivace, de 20-90 cm de hauteur, à odeur un peu aromatique et sans stolons. La tige est plus ou moins à poils laineux, simples ou ramifiée, scarieuse. Les feuilles basales à pétiole courts, ovoïdes, pointues et vertes à floraison. Les feuilles de la tige sont alternées, allongées et à demi engainantes. Les feuilles de l'involucre sont linéaires, pointues et plus ou moins glanduleuses. Les fleurs sont linguiformes de couleur jaune doré, dépassant l'involucre de 8 mm. Les fruits peuvent aller jusqu'à 1,8 mm de long à 10-12 soies, entourés à la base d'une petite corolle membraneuse.

I.2 Traitement des échantillons

Les tiges des échantillons de *Pulicaria odora* sont enlevées, les feuilles et les racines sont bien nettoyées par l'eau douce afin d'éliminer toutes matières étrangères suspendues. Après séchage à l'étuve à 40°C, les feuilles et les racines sont coupées en petits morceaux, broyées en fine poudre puis tamisées pour obtenir une poudre de granulométrie inférieure à 200 µm. Les poudres sont mises dans des flacons opaques.

II. Extraction des composés phénoliques

II.1 Protocole d'extraction

Les polyphénols sont extraits par macération de 5g de poudre des feuilles et des racines de *Pulicaria odora* dans 50ml de chaque solvant absolu utilisé: acétone, chloroforme et méthanol. Après deux heures d'agitation, la solution est centrifugée à 1500g pendant 10 minutes, les surnageants sont récupérés et filtrés avec du papier filtre standard. Après évaporation du solvant dans l'étuve à 40°C, une reconstitution est réalisée dans le méthanol absolu à une concentration de 100mg/ml. Les extraits sont conservés dans des flacons fumés à 4°C (Cox *et al.*, 2010).

II.2 Taux d'extraction

Pour chaque partie utilisée (feuilles et racines), le taux d'extraction est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction \%} = [(P_1 - P_0) / E] \times 100$$

P0 : Poids du bécher vide.

P1 : Poids du bécher avec l'extrait, après évaporation.

E : Poids de la poudre.

III. Dosage des composés phénoliques

III.1 Dosage des polyphénols totaux

Principe

La méthode utilisée pour le dosage des polyphénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}), la

coloration produite présente un maximum d'absorption aux environs de 720-750nm, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

Mode opératoire

0,8ml de folin-Ciocalteu à 10% sont ajoutés à 0,4ml d'extrait dilué dans le méthanol absolu. Après 3 minutes, 1,6ml de solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 10% sont ajoutés. Après incubation pendant une heure à l'obscurité et à une température ambiante, des valeurs d'absorbances sont mesurées avec un spectrophotomètre (VIS-7220 G) à 750nm (**Kuda et al., 2005**).

La catéchine est utilisée pour la préparation de la courbe standard (annexe I). Les résultats sont exprimés en équivalent microgramme de catéchine par gramme de poudre sèche (Eq. $\mu\text{g Cat/g de PS}$).

III.2 Dosage des flavonoïdes

Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle libre, en position 5, susceptible de donner, en présence de chlorure d'aluminium, un complexe jaunâtre par chélation des ions Al^{+3} . La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présents dans l'extrait (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

Mode opératoire

La méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits. Elle consiste à mélanger 1,5ml de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) à 2% avec 1,5ml d'extrait dilué dans le méthanol absolu. Après incubation à l'obscurité pendant 15mn à une température ambiante, des mesures d'absorbance sont effectuées avec un spectrophotomètre à 430nm (**Djeridane et al., 2006**).

La quercétine est utilisée comme standard pour la courbe d'étalonnage (annexe I), les teneurs en flavonoïdes sont donc exprimées en équivalent microgramme de quercétine par gramme de poudre sèche (Eq. $\mu\text{g Que/g PS}$).

IV. Activité antibactérienne

IV.1 Souches cibles

Les extraits de *Pulicaria odora* sont étudiés vis-à-vis de quatre souches bactériennes (tableau II). Ces souches sont fournies par le Laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'UAMB.

Tableau II: Les différentes souches bactériennes testées.

Gram	Souche bactérienne	Référence
Gram ⁺	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633
	SARM	ATCC6538
Gram ⁻	<i>Escherichia coli</i>	N.A.R
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853

ATCC : Américain Type Culture Collection.

N.A.R: Nalidixic Acid Resistant.

SARM : *Staphylococcus Aureus* Résistant à la Méthéciline.

IV.2 Evaluation de l'effet antibactérien

IV.2.1 Antibiogrammes

La méthode de **Suay *et al.* (2000)** est utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne de nos extraits, en utilisant quatre dilutions, allant de 100mg/ml à 12,5mg/ml. Elle consiste à déposer 20µl d'extrait sur la surface de la gélose Mueller Hinton préalablement ensemencée, par la méthode d'écouvillonnage, à partir d'une suspension bactérienne de 10⁸ UFC/ml (**Karabay-Yavasoglu *et al.*, 2007**). Les boîtes de Pétri sont mises au réfrigérateur à 4°C pendant trois heures pour une pré-diffusion (**Bansmir *et al.*, 2006**). Après incubation à 37°C/24h, des zones d'inhibition autour du point de dépôt du spot, sont mesurées en millimètre (**Karabay-Yavasoglu *et al.*, 2007**).

Le méthanol absolu est utilisé comme témoin négatif. Des standards polyphénols (acide gallique, catéchine et quercétine) sont également testés vis-à-vis de toutes les souches bactériennes cibles.

IV.2.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration qui permet l'inhibition de la croissance bactérienne, après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C (**Ezoubeiri et al., 2005**). La CMI des extraits est déterminée par la méthode de dilution en milieu solide décrite par **Tunçel et Nergiz (1993)**.

Une série de boîtes de Pétri est coulée par la gélose Mueller Hinton avec des concentrations d'extrait croissantes allant de 0,1 à 2mg/ml. L'ensemencement par spot des différentes souches à tester, est réalisé à partir des suspensions de 10^7 UFC/ml par prélèvement de 1µl, soit 10^4 cellules/spot (**CA-SFM, 2009**). Un témoin négatif sans extrait, et des standards acide gallique, catéchine et quercétine sont également testés. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, une vérification d'une croissance ou non au niveau du spot est effectuée. La CMI correspond à la première concentration pour laquelle il y a absence de croissance bactérienne (**Moroh et al., 2008**).

IV.2.3 Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB)

La CMB est définie comme étant la plus petite concentration aboutissant à une destruction notable des bactéries avec un pourcentage de 0,01% de survivant (**Meyer et al., 1994**).

Des tubes de bouillon nutritifs sont ensemencés par des morceaux de gélose raclés à partir du point de dépôt des spots où aucune croissance bactérienne n'est observée. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, une vérification de présence de trouble ou non est effectuée. La CMB correspond à la première concentration où aucun trouble n'est observé.

V. Etude statistique

Pour pouvoir faire une étude statistique, les tests sont réalisés en trois essais. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Les données sont analysées en utilisant une analyse de variance (ANOVA). Des différences significatives ($p < 0,05$) entre les moyennes sont déterminées par le test LSD (Low Significant Difference). Le logiciel utilisé est STATISTICA 5.5.

Résultats et Discussion

Résultats et discussion

I. Taux d'extraction des composés phénoliques

Le taux d'extraction de composés bioactifs à partir des plantes est influencé principalement par la méthode d'extraction, la température (Cacace et Mazza, 2003) et la variation de la polarité des composés phénoliques dont la solubilité est influencée par la nature du solvant (Falleh *et al.*, 2008). Le temps, les conditions de conservation du matériel végétal et la partie de la plante, sont aussi des paramètres importants pour une meilleure extraction (Nawaz *et al.*, 2006).

Le diamètre des particules influence aussi sur le rendement d'extraction. En effet, la diminution de la taille des particules augmente la surface de contact de ces derniers avec l'extractant (Pinelo *et al.*, 2005).

Dans cette étude, trois solvants de polarité décroissante sont utilisés : méthanol, acétone et chloroforme.

Le taux d'extraction des composés phénoliques obtenu à partir de feuilles et de racines de *Pulicaria odora*, pour les différents solvants utilisés, est représenté dans la figure 4.

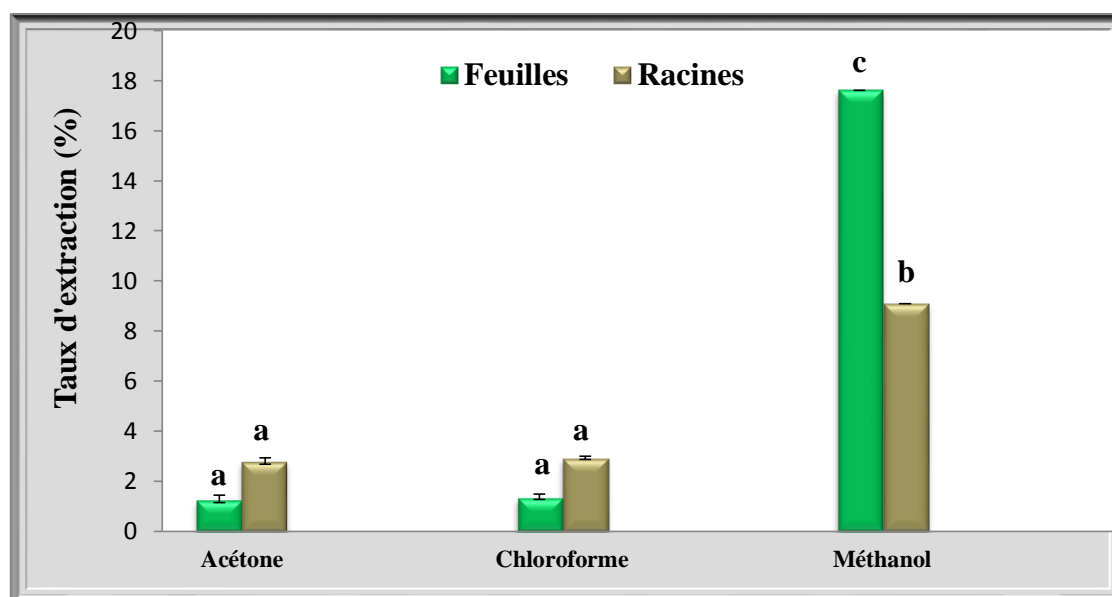


Figure 4: Représentation graphique du taux d'extraction de feuilles et de racines de *Pulicaria odora*, pour les différents solvants utilisés.

Les barres verticales représentent les écarts-types.

Les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p < 0,05$).

La figure montre que le taux d'extraction varie entre 1,28 et 17,62 %. L'étude statistique montre une différence significative entre les feuilles et les racines de *Pulicaria odora* ($p > 0,05$), le taux d'extraction le plus élevé est obtenu par l'extrait méthanolique de feuilles ($17,62 \pm 00\%$), suivi de l'extrait méthanolique racines ($9,08 \pm 00\%$). Des taux d'extraction faibles sont obtenus par les deux autres solvants (Acétone et Chloroforme) pour les deux parties de la plante, avec des valeurs allant de $1,38 \pm 0,61$ à $2,93 \pm 0,05\%$, sans aucune différence significative ($p < 0,05$). Ces résultats sont en accord avec ceux de **Trabelsi et al. (2010)** qui ont trouvé que le méthanol absolu est un solvant efficace pour l'extraction.

Alzoreky et Nakahara (2003), ont montré des taux d'extraction élevés concernant les extraits acétoniques de feuilles de *Chrysanthemum coronarium* (4%) et de *Pulicaria orientalis* (8%) par rapport à ceux qu'on a trouvé pour l'extrait acétonique de feuilles de *Pulicaria odora* ($1,71 \pm 0,53\%$).

Des taux d'extraction inférieurs à celui qu'on a obtenu pour l'extrait méthanolique de feuilles ($17,62 \pm 00\%$), sont enregistrés par **Mothana et Lindequist (2005)**, concernant les extraits méthanoliques de feuilles de *Euryops arabicus* (8,21%) et de *Pulicaria stephanocarpa* (2,98%). Toutefois, des taux d'extraction supérieurs à ceux qu'on a trouvé pour l'extrait chloroformique de feuilles ($1,38 \pm 0,61\%$), sont retrouvés par ces mêmes auteurs chez *Euryops arabicus* à (5,09 et 1,40%) et des valeurs similaires pour *Pulicaria stephanocarpa* (1,40%). Cette divergence de résultats est probablement due à la polarité du solvant méthanolique utilisé (90% de méthanol) par ces auteurs, et à leur méthode d'extraction réalisée par macération au bain-marie.

II. Dosage des composés phénoliques

II.1 Dosage des polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits de feuilles et de racines de *Pulicaria odora* sont représentées dans la figure 5.

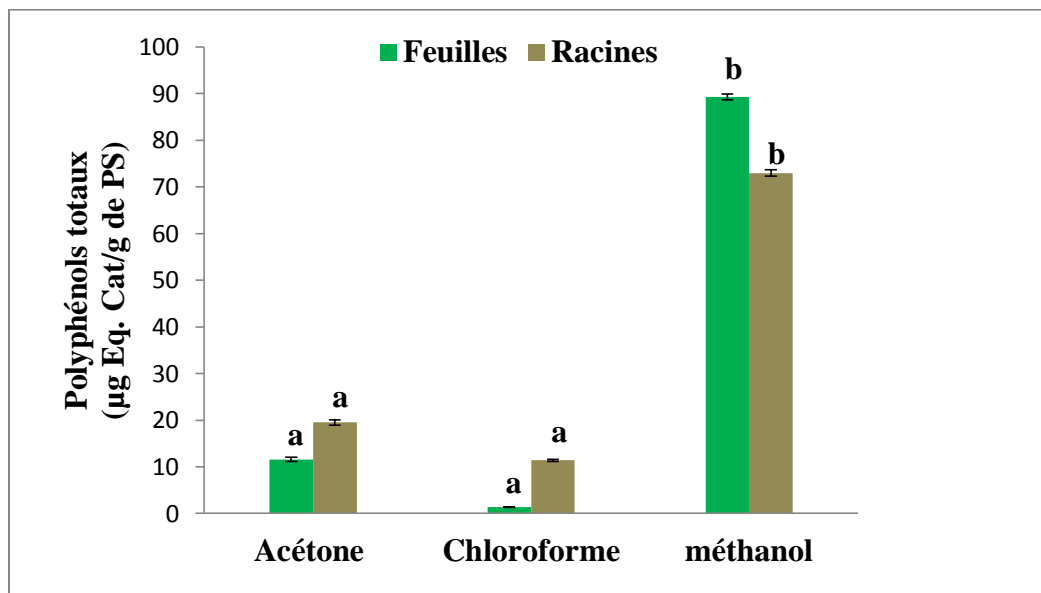


Figure 5: Représentation graphique de la teneur en polyphénols totaux de feuilles et de racines de *Pulicaria odora*, pour les différents solvants utilisés.

Les barres verticales représentent les écarts-types.

Les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p < 0,05$).

La meilleure teneur en polyphénols totaux est enregistrée par les extraits méthanoliques des feuilles ($90 \pm 0,63 \mu\text{g Eq. Cat/g de PS}$), suivie par les racines ($73 \pm 0,68 \mu\text{g Eq. Cat/g de PS}$) avec aucune différence significative ($p < 0,05$). Les autres extraits (acétone et chloroforme) présentent des faibles teneurs en polyphénols totaux avec aucune différence significatives ($p < 0,05$). La teneur la plus faible est obtenue par l'extrait chloroformique des feuilles ($1,36 \pm 0,077 \mu\text{g Eq. Cat/g PS}$).

Des teneurs en polyphénols totaux assez élevées comparant à celles qu'on a obtenu par l'extrait méthanolique de feuilles, sont observées par **Bousselsela et al. (2012)** pour l'extrait méthanolique de feuilles de *Hertia cheirifolia* ($30,33 \pm 2,82 \mu\text{g Eq. Ag/mg d'extrait}$). Des teneurs aussi élevées sont obtenues par ces mêmes auteurs pour différents autres solvants utilisés pour la même partie de la plante. Cette divergence dans les résultats, peut être due à la maturité de la plante dont la distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le

développement de la plante (Falleh *et al.*, 2008). Plusieurs facteurs peuvent influencer la teneur en polyphénols totaux. Des études ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que les facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur la teneur en polyphénols (Bouزيد *et al.*, 2011).

II.2 Dosage des flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes de feuilles et de racines de *Pulicaria odora* sont représentées dans la figure 6.

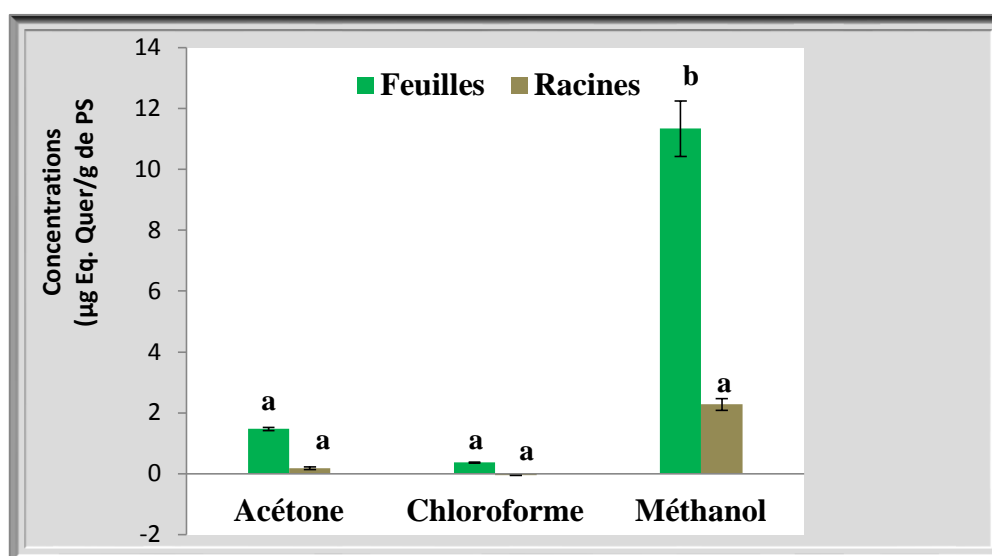


Figure 6: Représentation graphique de la teneur en flavonoïdes de feuilles et de racines de *Pulicaria odora*, pour les différents solvants utilisés.

Les barres verticales représentent les écarts-types.

Les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p < 0,05$).

Une différence significative est enregistrée entre les teneurs en flavonoïdes des feuilles et des racines de *Pulicaria odora* ($p < 0,05$). La figure montre que la teneur la plus élevée est obtenue par l'extrait méthanolique des feuilles ($11,34 \pm 3,15 \mu\text{g Eq. Quer/g de PS}$), suivie de l'extrait acétonique ($1,47 \pm 0,05 \mu\text{g Eq. Quer/g de PS}$). Des faibles teneurs sont obtenues dans les autres extraits acétoniques et méthanoliques des racines ($0,18 \pm 0,04$ et $2,28 \pm 0,19 \mu\text{g Eq. Quer/g de PS}$, respectivement). Des valeurs négatives sont enregistrées par l'extrait chloroformique des racines, cela indique que les flavonoïdes présentent une répartition inégale dans les différentes parties de *Pulicaria odora*, et que les composés de cette dernière sont probablement hydrophiles, d'où leur non solubilité dans les solvants apolaires.

Des teneurs en flavonoïdes supérieures à celles qu'on a obtenu sont observées par **Falleh et al. (2008)** dans l'extrait méthanolique de feuilles de *Cynara cardunculus* (9,08 mg Eq. Cat/g de PS). Les teneurs élevées en flavonoïdes peuvent être liées aux conditions écologiques de la famille des Asteracées (température chaude, exposition solaire élevée, sécheresse et salinité) qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols (**Falleh et al., 2008**).

III. Activité antibactérienne

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'activité antibactérienne des différents extraits de feuilles et de racines de *Pulicaria odora*.

III.1 Antibiogrammes

Dans cette étude, les extraits de feuilles et de racines de *Pulicaria odora* sont testés vis-à-vis de quatre souches bactériennes, deux bactéries Gram positives et deux à Gram négatifs. Les résultats sont exprimés selon trois niveaux d'activité : Résistant : $D < 8$ mm, intermédiaire : $15 \text{ mm} \geq D \geq 8 \text{ mm}$ et sensible : $D > 15 \text{ mm}$ (**Bansemir et al., 2006**) où D : diamètre des zones d'inhibition. L'activité antibactérienne des extraits étudiés de feuilles et de racines de *Pulicaria odora*, est représentée dans la figure 7. Les diamètres des zones d'inhibition sont résumés dans le tableau I, annexe II.

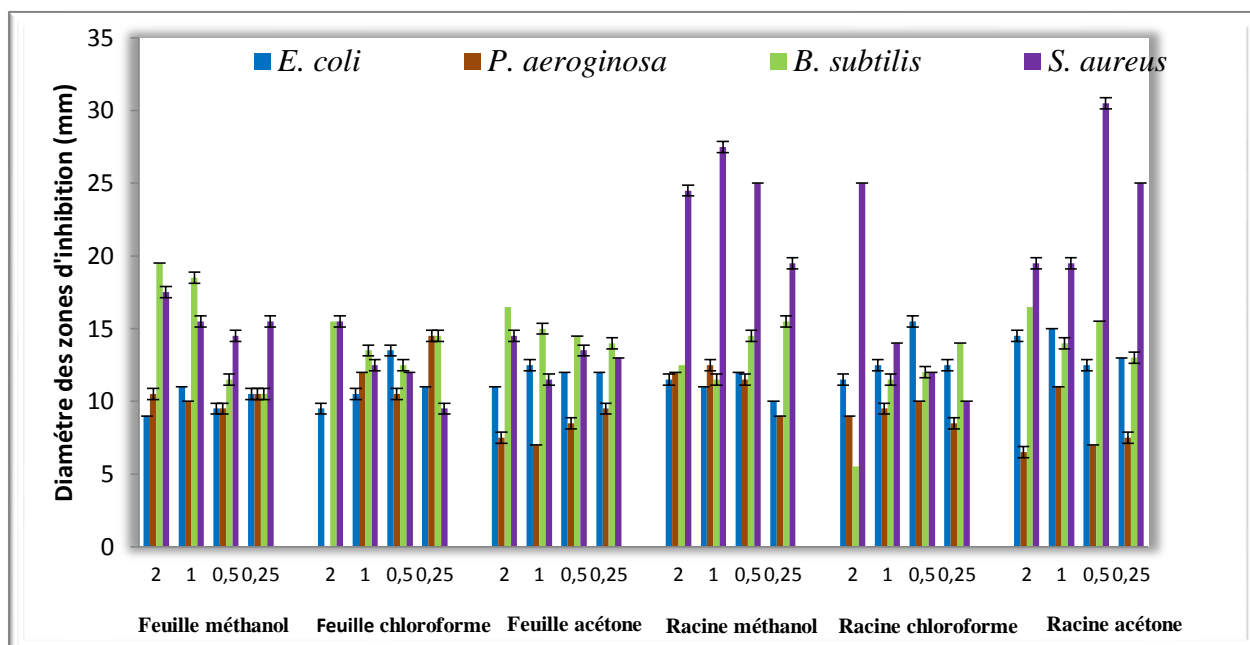


Figure 7: Activité antibactérienne des différents extraits de *Pulicaria odora*.

Les barres verticales représentent les écarts-types.

Les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p < 0,05$).

III.1.1 Activité antibactérienne vis-à-vis de *S. aureus*

Tous les extraits (acétoniques, chloroformiques et méthanoliques) de feuilles et de racines de *Pulicaria odora* montrent une bonne activité vis-à-vis de *S. aureus* avec des zones d'inhibition allant de $11,5 \pm 0,38$ à $30,5 \pm 0,38$ mm (figure 8). L'étude statistique montre une différence significative ($p < 0,05$) entre les feuilles et les racines, où la zone la plus large est obtenue par l'extrait acétonique de racines ($30,5 \pm 0,38$ mm) à une concentration de 0,5 mg/20µl, suivie par l'extrait méthanolique ($27,5 \pm 0,38$ mm) à une concentration de 1 mg/20µl de la même partie de la plante. La plus faible activité est montrée par l'extrait acétonique des feuilles ($11,5 \pm 0,38$ mm) à une concentration de 1 mg/20µl.

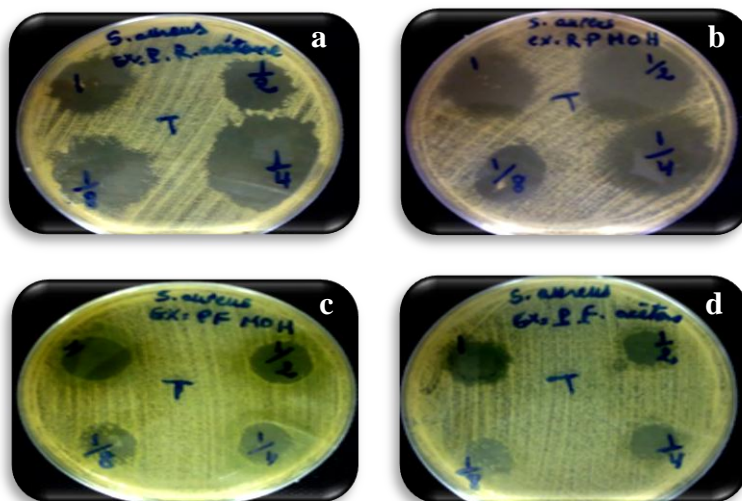


Figure 8: Photographies de quelques zones d'inhibition de *S. aureus* obtenues par les différents extraits de *Pulicaria odora*. (a) : Racines acétone, (b) : Racines méthanol, (c) : Feuilles méthanol et (d) : Feuilles acétone.

Malgré une faible teneur en polyphénols totaux de l'extrait chloroformique des racines, on remarque qu'il présente une bonne activité antibactérienne vis-à-vis de cette souche (25 ± 00 mm) à une concentration de 2 mg/20 μ l. Cela peut être expliqué par le caractère autant qualitatif que quantitatif des composés présents dans l'extrait.

Nickavar et Mojab (2003), ont trouvé que l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Pulicaria dysenterica* montre une activité intermédiaire vis-à-vis de *S. aureus* (13 mm) et l'extrait chloroformique de la même partie montre une faible activité (8 mm), alors que nos résultats montrent que les extraits méthanoliques et chloroformiques ont une bonne activité vis-à-vis de cette souche (17,5 et 15,5 mm, respectivement) à une concentration de 2 mg/20 μ l.

Des résultats similaires à ceux qu'on a trouvé pour l'extrait méthanolique de feuilles ($17,5 \pm 0,38$ mm) sont observés par **Mothana et Lindequist (2005)** concernant l'extrait méthanolique de la partie aérienne (feuilles et fleurs) de *Pulicaria stephanocarpa* (19 mm). **El-Kamali et Al-Tayeb Mahjoub (2009)** ont observé aussi des résultats similaires (19 mm) chez l'extrait acétate d'éthyle de la partie aérienne de *Pulicaria undulata*.

Les travaux menés par **Falleh et al. (2008)** montrent que l'extrait méthanolique de feuilles de *Cynara cardunculus* a une bonne activité vis-à-vis de *S. aureus* ($25,7 \pm 0,6$ mm) par rapport à nos résultats observer chez le même extrait de feuilles de *Pulicaria odora* ($17,5 \pm 0,38$ mm) à une concentration de 2 mg/20 μ l, cela peut être dû à la méthode de disque utilisée.

III.1.2 Activité antibactérienne vis-à-vis de *B. subtilis*

Une différence significative ($p < 0,05$) est enregistrée entre les différents extraits de feuilles et de racines de *Pulicaria odora* vis-à-vis de *B. subtilis*, tous les extraits de feuilles montrent une meilleure activité avec des zones d'inhibitions de 16,5, 15,5 et 19,5 mm, respectivement pour les extraits acétoniques, chloroformiques et méthanoliques, à une concentration de 2 mg/20 μ l (figure 9). La diminution de la concentration de ces extraits s'est accompagnée par une diminution de la zone d'inhibition, ce qui correspond à un effet dose dépendant. L'activité la plus faible vis-à-vis de *B. subtilis* est observée dans l'extrait chloroformique des racines ($11,5 \pm 0,38$ mm), à une concentration de 1 mg/20 μ l. Contrairement aux feuilles, l'augmentation de la concentration de l'extrait chloroformique et méthanolique de racines s'accompagne d'une diminution des diamètres des zones d'inhibitions où cette souche montre une résistance vis-à-vis de l'extrait chloroformique des racines ($5,5 \pm 0,38$ mm) à une concentration de 2 mg/20 μ l. Cela peut être expliqué par la diminution de l'activité de l'extrait qui pourrait être due à une diminution de la solubilité des substances actives. Cependant, avec des concentrations plus élevées en extrait, la solubilité de ces derniers peut devenir un facteur limitant (Lindberg *et al.*, 2004). Il est probable que la diminution de l'activité soit due à une modification des propriétés de la substance responsable de l'activité en présence d'autres composés de l'extrait (Pereira *et al.*, 2007), aboutissant à une combinaison de deux composants actifs (majeur ou mineur) agissant en synergie (Brijjesh *et al.*, 2006), ou bien des composants mineurs d'extrait qui sont également actifs à de faibles concentrations (Lindberg *et al.*, 2004).

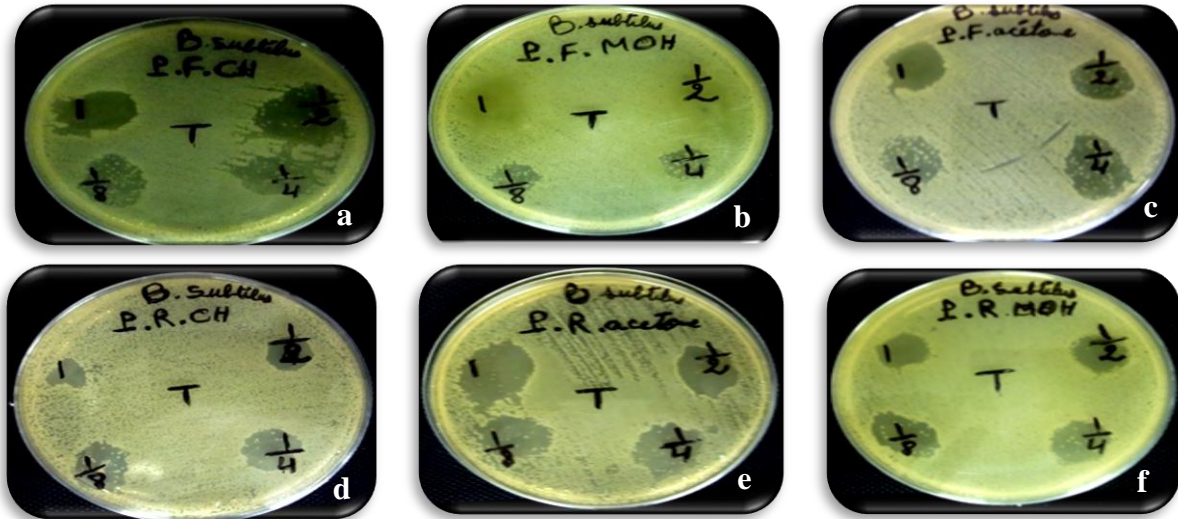


Figure 9: Photographies de quelques zones d'inhibition de *B. subtilis* obtenues par les différents extraits de *Pulicaria odora*. (a) : Feuilles chloroforme, (b) : Feuilles méthanol, (c) : Feuilles acétone, (d) : Racines chloroforme, (e) : Racines acétone, (f) : Racines méthanol.

El-Kamali et Al-Tayeb Mahjoub (2009), ont trouvé une bonne activité vis-à-vis de *B. subtilis* avec les extraits éthanoliques et éther de pétrole (23 et 30 mm, respectivement) de l'écorce de la tige de *Pulicaria undulata*. Ces résultats sont supérieurs à ceux qu'on a obtenu par l'extrait méthanolique des feuilles ($19,5 \pm 0,38$). Des résultats similaires sont obtenus par les mêmes auteurs avec les extraits méthanoliques et éthyle acétate (17 mm) de la partie aérienne de la même plante, alors que l'extrait qu'ils ont obtenu par l'eau ne montre aucune activité vis-à-vis de cette souche. Donc le choix du protocole et du solvant d'extraction ainsi que la partie de la plante étudiée est très important.

III.1.3 Activité antibactérienne vis-à-vis d'*E. coli*

L'étude statistique montre une différence significative ($p < 0,05$) entre les feuilles et les racines de *Pulicaria odora*, la meilleure activité est exercée par l'extrait chloroformique des racines ($15,5 \pm 0,38$ mm) à une concentration de 0,5 mg/20 μ l, suivie de l'extrait acétonique (15 mm) à une concentration de 1 mg/20 μ l de la même partie de la plante, avec aucune différence significative ($p < 0,05$). Les extraits des feuilles présentent une activité antibactérienne intermédiaire vis-à-vis de cette souche, les diamètres des zones d'inhibition sont compris entre 09 et 13,5 mm (figure 10).

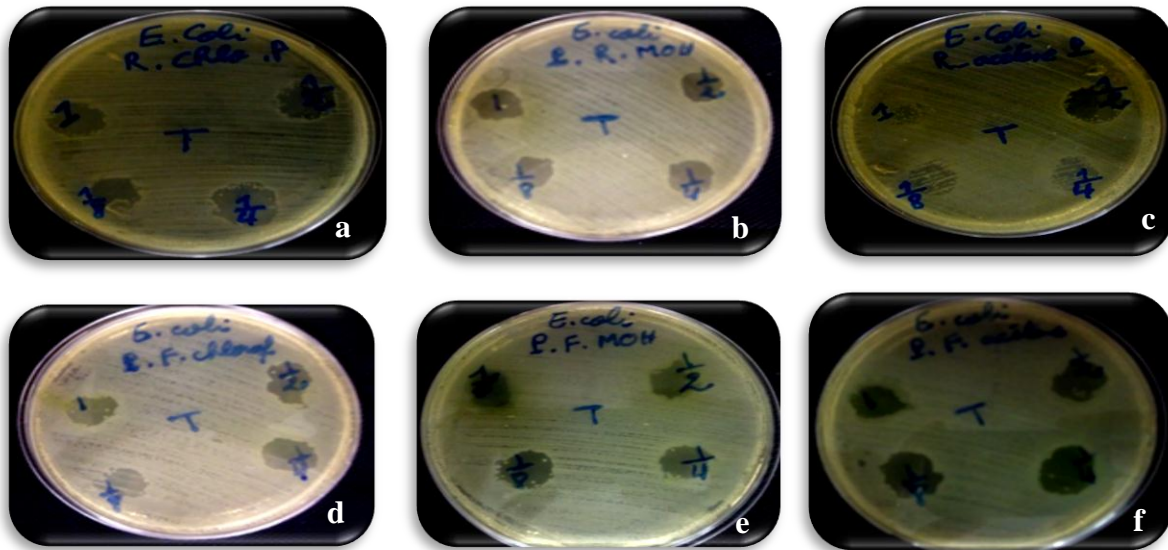


Figure 10: Photographies de quelques zones d’inhibition d’*E. coli* obtenues par les différents extraits de *Pulicaria odora*. (a) : Racines chloroforme, (b) : Racines méthanol, (c) : Racines acétone, (d) : Feuilles chloroforme, (e) : Feuilles méthanol et (f) : Feuilles acétone.

Des zones d’inhibition similaires à celles qu’on a trouvées pour l’extrait méthanolique de feuilles (11 ± 00 mm) à une concentration de $1 \text{ mg}/20\mu\text{l}$, sont observées par **Karabegović et al. (2011)** pour l’extrait méthanolique de la partie aérienne d’*Artemisia vulgaris* avec une zone d’inhibition égale à $12,7 \pm 0,3$ mm. Par contre l’extrait méthanolique d’*Artemisia campestris* a donné une zone d’inhibition supérieure ($20 \pm 0,4$ mm). Cette divergence peut être due à la différence entre les espèces des plantes étudiées, malgré qu’elles appartiennent à la même famille (Asteraceae).

III.1.4 Activité antibactérienne vis-à-vis de *P. aeruginosa*

Une faible activité antibactérienne est obtenue par les extraits de feuilles et de racines de *Pulicaria odora* vis-à-vis de *P. aeruginosa*. L’étude statistique ne montre aucune différence significative entre les feuilles et les racines ($p < 0,05$).

Le diamètre des zones d’inhibition varie entre 00 et $14,5 \pm 0,38$ mm à des différentes concentrations (figure 11). La meilleure activité vis-à-vis de cette souche bactérienne est obtenue par l’extrait chloroformique des feuilles ($14,5 \pm 0,38$ mm) à une concentration de $0,25 \text{ mg}/20\mu\text{l}$, suivie de l’extrait méthanolique des racines ($12,5 \pm 0,38$ mm) à une concentration de $1 \text{ mg}/20\mu\text{l}$ avec aucune différence significative ($p < 0,05$). La plus faible activité est obtenue par l’extrait acétonique des feuilles et chloroformique des racines ($8,5 \pm 0,38$ mm) à des concentrations de 0,5 et $0,25 \text{ mg}/20 \mu\text{l}$, respectivement. Aucune zone

d'inhibition n'est obtenue par l'extrait chloroformique de feuilles à une concentration de 2 mg/20 µl.

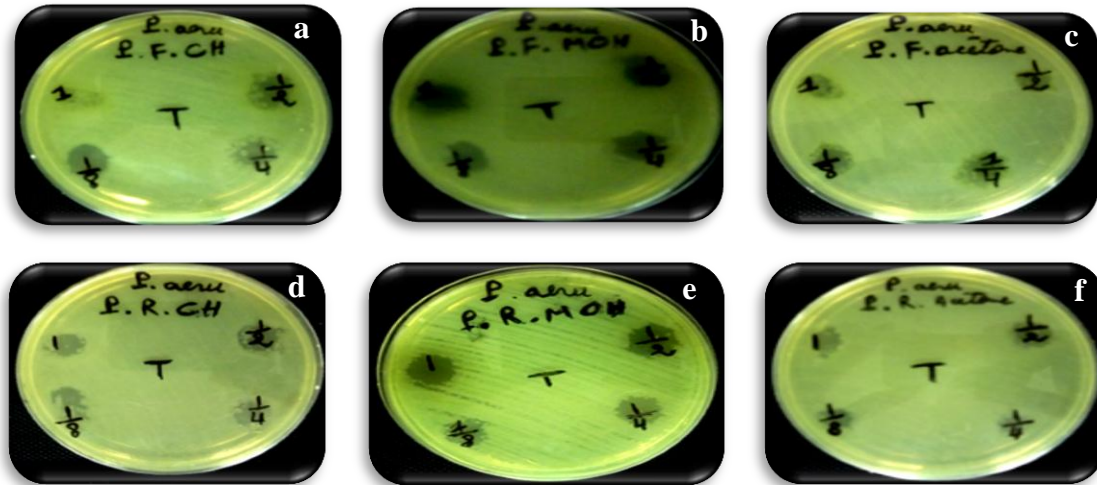


Figure 11: Photographies de quelques zones d'inhibition de *P. aeruginosa* obtenues par les différents extraits de *Pulicaria odora*. (a) : Feuilles chloroforme, (b) : Feuilles méthanol, (c) : Feuilles acétone, (d) : Racines chloroforme, (e) : Racines méthanol et (f) : Racines acétone.

Falleh et al. (2008) ont obtenu une zone plus large (13,7) avec l'extrait méthanolique des feuilles de *Cynara cardunculus* comparant à celle obtenue par notre extrait méthanolique des feuilles ($10,5 \pm 0,38$ mm) à une concentration de 2 et 0,25 mg/20µl.

Contrairement à nos résultats obtenus par l'extrait chloroformique des feuilles ($14 \pm 0,38$ mm), **El-Kamali et Al-Tayeb Mahjoub (2009)** ont trouvé que *P. aeruginosa* montre une sensibilité (20 mm) vis-à-vis de l'extrait d'acétate d'éthyle de la partie aérienne de *Pulicaria undulata*.

La différence entre nos résultats obtenus et ceux des autres peut être due à la méthode utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne. **Bousselsela et al. (2012)** ont constaté que la méthode des puits est meilleure que celle des disques.

D'après nos résultats, on remarque que les différents extraits de feuilles et de racines de *Pulicaria odora* montrent des activités antibactériennes intermédiaires vis-à-vis les Gram négatifs (*E. coli* et *P. aeruginosa*), la plus large zone est obtenue par *E. coli* (15,5 mm), et *P. aeruginosa* (14,5 mm), alors que les bactéries Gram positives (*B. subtilis* et *S. aureus*) montrent une bonne sensibilité vis-à-vis de ces mêmes extraits, avec de larges zones

d'inhibition (19,5 et 30,5 mm, respectivement). La sensibilité des Gram positives par rapport aux Gram négatives pourrait être due à la composition de leur paroi (Bouزيد *et al.*, 2011). En effet, la résistance des bactéries Gram négatives est liée aux lipopolysaccharides (LPS) (Alzoreky et Nakahara., 2003), qui empêche la perméabilité de la plupart des agents bioactifs (Bouزيد *et al.*, 2011), alors que les bactéries Gram positives sont moins protégées contre les agents antibactériens, où le peptidoglycane n'empêche que la diffusion des molécules supérieures à 50 000 Da (Basli *et al.*, 2012).

Le tableau III montre l'activité antibactérienne de certains standards polyphénols étudiés, acide gallique, catéchine et quercétine, à différentes concentrations.

Tableau III: Activité antibactérienne de quelques standards polyphénols.

Standard polyphénol	Dilution (mg/20µl)	Diamètre des zones d'inhibition (mm)			
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
Acide gallique	1	20,00±00,00 ^f	18,67±00,57 ^d	20,67±00,57 ^d	27,33±00,57 ^h
	0,5	18,33±00,57 ^e	21,33±00,57 ^j	19,33±00,57 ^c	24,33±00,57 ^j
	0,25	18,33±00,57 ^e	19,33±00,57 ^e	18,33±00,57 ^b	15,33±00,57 ^a
Catéchine	1	17,00±00,00 ^d	17,33±00,57 ^c	20,33±00,57 ^d	20,33±00,57 ^e
	0,5	09,33±00,57 ^b	15,33±00,57 ^a	19,33±00,57 ^c	18,33±00,57 ^c
	0,25	06,33±00,57 ^a	16,67±00,57 ^b	18,33±00,57 ^b	18,00±00,00 ^c
Quercétine	1	17,33±00,57 ^d	18,33±00,57 ^d	17,33±00,57 ^a	17,33±00,57 ^c
	0,5	15,33±00,57 ^c	20,00±00,00 ^f	20,33±00,57 ^d	22,33±00,57 ^f
	0,25	18,00±00,00 ^e	23,33±00,57 ^h	25,00±00,00 ^e	19,33±00,57 ^d

* A noter que le témoin négatif (méthanol absolu) n'a montré aucune activité.

Chaque valeur représente la moyenne ± écart-type (n=3).

Les valeurs portant les mêmes lettres sur la même colonne ne présentent aucune différence significative (p<0,05).

D'après le tableau III, tous les standards polyphénols étudiés montrent une activité antibactérienne vis-à-vis de toutes les souches bactériennes testées. La meilleure zone d'inhibition est développée par l'acide gallique (27,33 ± 00,57 mm) à 1 mg/20µl vis-à-vis de *S. aureus*, suivie de la quercétine (25,00 ± 00,00 mm) à 0,25 mg/20µl à l'égard de *B. subtilis*. La catéchine montre une faible activité comparant aux autres standards polyphénols (20,33 ± 00,57 mm) vis-à-vis de *S. aureus* et de *B. subtilis* à 1 mg/20 µl.

L'extrait méthanolique des feuilles à 2 mg/20 µl exerce une activité inhibitrice similaire à celle de l'acide gallique et la catéchine à 0,5 mg/20µl vis-à-vis de *B. subtilis*, sans aucune différence significative (p<0,05). Par contre à des concentrations de 1 et 0,5 mg/20µl,

les extraits de feuilles et de racines montrent une faible activité vis-à-vis de cette souche par rapport à celle de l'acide gallique, la catéchine et la quercétine à 0,5 et 0,25 mg/20µl.

Une différence significative ($p < 0,05$) est enregistrée entre les extraits de feuilles et de racines de *Pulicaria odora* et les standards polyphénols étudiés, ces derniers exhibent une bonne activité vis-à-vis de *P. aeruginosa*, à l'exception de l'extrait chloroformique des feuilles à 0,25 mg/20µl, où il a montré une activité inhibitrice similaire à celle de la catéchine à 1 mg/20µl, avec une différence significative ($p < 0,05$). Cette différence entre les extraits et les standards polyphénols, peut être due à la pureté des standards testés.

L'extrait acétonique de racines à 0,5 mg/20µl montre une différence significative ($p < 0,05$) avec tous les standards polyphénols testés vis-à-vis de *S. aureus*, il a exhibé une meilleure activité ($30,5 \pm 0,38$). Cette différence peut être due à la concentration élevée de nos extraits. Aucune différence significative ($p < 0,05$) n'est observée entre l'extrait méthanolique des racines à 1 mg/20µl et l'acide gallique à la même concentration, et les extraits méthanolique, chloroformique et acétonique (2 et 0,5, 2 et 0,25 mg/20µl, respectivement) de racines et l'acide gallique à 0,5 mg/20µl. Aucune différence significative n'est observée entre l'extrait méthanolique des feuilles à 2 mg/20µl avec la catéchine à 0,25 mg/20µl et la quercétine à 1 mg/20µl, vis-à-vis de la même souche bactérienne.

Vis-à-vis de la souche *E. coli*, l'extrait chloroformique des racines à 0,5 mg/20µl montre une activité similaire à celle de la quercétine à 0,5 mg/20µl, avec aucune différence significative ($p < 0,05$). A des autres concentrations, l'acide gallique et la quercétine présentent une activité supérieure à celle obtenue par nos extraits. La catéchine à 0,5 mg/20µl présente des zones d'inhibition de diamètre similaire avec l'extrait méthanolique à 2 et 0,5 mg/20 µl et l'extrait chloroformique à 2 mg/20µl des feuilles, sans aucune différence significative ($p < 0,05$). Ce dernier standard à 0,25 mg/20µl, il révèle une différence significative ($p < 0,05$) avec les extraits de feuilles et de racines de *Pulicaria odora*, où il ne présente aucune activité vis-à-vis de cette souche.

Contrairement à nos résultats, **Rauha et al. (2000)** n'ont pas observé d'effets inhibiteurs de l'acide gallique et de la catéchine à l'égard d'*E. Coli*, *S. aureus* et *B. subtilis*. Cela pourrait être dû à leur faible concentration testée (0,5 mg/500 µl). La quercétine a inhibé la croissance de toutes les espèces étudiées par ces auteurs (*S. aureus*, *S. epidermis*, *M. luteus*, *B. Subtilis*, *E. Coli* et *P. aeruginosa*). Ce résultat est similaire à celui obtenu dans notre étude.

III.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI/CMB)

D'après le tableau IV, les meilleures activités antibactériennes des extraits de feuilles et de racines de *Pulicaria odora* sont exercées par l'extrait méthanolique des feuilles vis-à-vis de *P. aeruginosa* et *S. aureus* avec des CMI/CMB de 1/1,4 mg/ml, suivie de l'extrait acétonique des feuilles à l'égard de *P. aeruginosa* et l'extrait méthanolique de racines à l'égard de *S. aureus* avec des CMI/CMB de 1/1,6 mg/ml. L'extrait acétonique et méthanolique de racines montrent un effet inhibiteur bactéricide à 1,8 mg/ml.

L'extrait chloroformique de feuilles et de racines ne montre aucun effet inhibiteur vis-à-vis de toutes les souches bactériennes testées à l'exception de *B. subtilis* où l'extrait chloroformique des racines montre une activité inhibitrice à 1 mg/ml. Pour la souche *E. coli*, il ya absence d'effet inhibiteur pour les extraits des feuilles et des racines ceci jusqu'à une concentration de 2 mg/ml. Cela est en accord avec le travail mené par Meyer et Afolayen (1995), ils ont trouvé que les extraits méthanoliques et dichlorométhaniques ne montrent aucune activité antibactérienne contre la souche *E. coli*.

Süzgeç-Selçuk et Birteksöz (2011), ont testé différents extraits de flavonoïdes de la partie aérienne de *Helichrysum chasmolycicum*, ils n'ont trouvé aucune activité inhibitrice vis-à-vis d'*E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*, et seul l'extrait acétate d'éthyle qui montre une activité inhibitrice (CMI = 625 µg/ml) vis-à-vis de *P. aeruginosa* qui est inférieure à nos valeurs obtenues par les différents extraits de feuilles de *Pulicaria odora*.

Tableau IV: Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des différents extraits de feuilles et de racines de *Pulicaria odora* étudiée sur les souches bactériennes testées.

Partie de la plante	Solvant	CMI/CMB (mg/ml)			
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
Feuille	Acétone	>2/>2	1/1,6	1/>2	1,6/>2
	Chloroforme	>2/>2	>2/>2	2/>2	>2/>2
	Méthanol	>2/>2	1/1,4	1,6/>2	1/1,4
Racine	Acétone	>2/>2	1/1,8	1/>2	1/>2
	Chloroforme	>2/>2	>2/>2	1/>2	2/>2
	Méthanol	>2/>2	1,6/1,8	1/>2	1/1,6

D'après le tableau V, on remarque que la catéchine a le même effet inhibiteur sur *E. coli*, *B. subtilis* et *S. aureus* avec une CMI de 0,7 mg/ml et des CMB de 0,8, 0,9 et 0,7 mg/ml respectivement, aucune activité inhibitrice n'est observée par la catéchine vis-à-vis de *P. aeruginosa*. L'acide gallique a une activité inhibitrice vis-à-vis de toutes les souches bactériennes testées, où les CMI sont comprises entre 0,1 et 0,5 et les CMB varient de 0,1 à 0,8. La quercétine n'a aucune activité inhibitrice à l'égard de toutes les souches bactérienne testées et cela jusqu'à 2 mg/ml.

Tableau V: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des standards polyphénols utilisés sur les souches bactériennes testées.

Standard polyphénols	CMI/CMB (mg/ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
Acide gallique	0,5/0,7	0,1/0,1	0,4/0,8	0,1/0,2
Catéchine	0,7/0,8	>2/>2	0,7/0,9	0,7/0,7
Quercétine	>2/>2	>2/>2	>2/>2	>2/>2

D'après les tableaux IV et V, on remarque que les deux standards polyphénols, acide gallique et catéchine, montrent une meilleure activité inhibitrice vis-à-vis de toutes les souches bactériennes testées comparant à nos extraits de feuilles et de racines de *Pulicaria odora*, à l'exception de *P. aeruginosa* où les extraits acétoniques et méthanoliques de feuilles et de racines montrent un meilleur effet inhibiteur vis-à-vis de cette souche par rapport à la catéchine.

Conclusion

Conclusion

Plusieurs études ont été réalisées sur les plantes appartenant à la famille des Astéracées, elles ont montré la richesse de ces dernières en composés bioactifs. Par contre, il existe peu de données et d'études évaluant le potentiel antibactérien de la plante *Pulicaria odora* (Astéracées), ainsi nous nous sommes intéressés dans la présente étude, à l'évaluation de l'activité antibactérienne de cette espèce végétale, de la wilaya de Bejaia, vis-à-vis de quatre souches bactériennes, à savoir deux à Gram positif et deux à Gram négatif.

Les résultats montrent que le méthanol est le meilleur solvant d'extraction avec un taux d'extraction de 17,62% pour les feuilles et de 9,08% pour les racines, alors que les autres solvants ont enregistré des faibles taux d'extraction compris entre 1,28 et 2,92%.

Les résultats des teneurs en polyphénols totaux montrent que l'extrait méthanolique de feuilles est le plus riche (90 µg Eq. Cat/g de PS), suivi de l'extrait méthanolique de racines (73 µg Eq. Cat/g de PS), par contre l'extrait chloroformique de feuilles enregistre la teneur la plus faible en polyphénols totaux (1,36 µg Eq. Cat/g de PS).

Concernant les teneurs en flavonoïdes, des valeurs négatives sont enregistrées dans l'extrait chloroformique de racines. Comme tous les résultats précédents, l'extrait méthanolique de feuille a donné la meilleure teneur en flavonoïdes (11,34 µg Eq. Quer/g de PS) et des faibles teneurs sont enregistrées dans les autres extraits.

L'évaluation de l'effet antibactérien montre que la plupart des souches bactériennes testées sont sensibles aux différents extraits de feuilles et de racines de *Pulicaria odora*. Une grande sensibilité est observée chez les bactéries à Gram positif avec des zones d'inhibition comprises entre $11,5 \pm 0,38$ et $30,5 \pm 0,38$ mm. La souche *S. aureus* s'est révélé la plus sensible avec une zone d'inhibition de 30,5 mm obtenue par l'extrait acétonique de racines.

En ce qui concerne les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) de nos extraits, les résultats ont révélé que *P. aeruginosa* et *S. aureus* sont les deux

espèces les plus sensibles pour l'extrait méthanolique de feuilles avec des valeurs de CMI/CMB égales à 1/1,4 mg/ml.

Notre étude montre que *Pulicaria odora* peut être utilisée comme une bonne source naturelle d'agent antibactérien. Dans cette étude nous avons utilisé des extraits bruts, ce qui nous ne renseigne pas sur les composés actifs responsables de l'activité antibactérienne. Il serait donc nécessaire :

- D'extraire les composés phénoliques par fractionnement ;
- D'élargir la gamme des microorganismes cibles ;
- D'orienter la recherche vers d'autres parties de la plante (tiges, fleurs...etc).
- De procéder à une séparation de ces composés, par CCM, HPLC ou d'autres méthodes, afin de les tester séparément et identifier ceux parmi eux actifs ;
- De réaliser des tests complémentaires telles que les activités antifongique, antioxydant, anti-inflammatoire...etc.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Alcaraz LE, Blanco SE, Puig ON, Tomas F and Ferretti FH. (2000). Antibacterial activity of flavonoids against *méthicillin-resistant Staphylococcus aureus* stains. *Journal of theoretical Biology*. **205**, 231-240.

Algabr MN, Ameddah S, Menad A, Mekkiou R, Chalchat JC, Benayache S and Benayache F. (2012). Essential oil composition of *Pulicaria jaubertii* from Yemen. Short communication. **2** (4), 688-690.

Alzoreky NS and Nakahara K. (2003). Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*. **80**, 223-230.

Amina ST, Merghem R et Dehimat L. (2009). Etude phytochimique et evaluation de l'activité antibacterienne d'une labiee: *Thymus hirtus*. *Sciences & Technologie*. **29**, 25-29.

B

Bansemir A, Blum M, Schröder S and Lindequist U. (2006). Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*. **252**, 79-84.

Barrico L, Azul Ammorais MC, Coutinho AP, Freitas H and Castro P. (2012). Biodiversity in urban ecosystems: Plants and macromycetes as indicators for conservation planning in the city of Coimbra (Portugal). *Landscape and Urban Planning*. **106**, 88-102.

Basli A, Chibane M, Madani K et Oukil N. (2012). Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*. **10**, 2-9.

Bayer E, Buttler KP, Finkenzeller X et Grau J. (1990). Guide de la flore méditerranéenne. Ed : Delachaux et niestlé. Paris, p. 287.

Bousselsela H, Benhouda A, Yahia M, Benbia S, Ghecham A and Zidani A. (2012). In vitro evaluation of antioxidant and antibacterial activities of extracts of *Hertia cheirifolia*'s leaves. *Natural Science*. **4**, 825-831.

Bouزيد W, Yahia M, Abdeddaim M, Aberkane MC et Ayachi A. (2011). Evaluation de l'activité antioxydant et antimicrobienne des extraits de l'*Aubepine Monogyne*. *Lebanese Science Journal*. **12**, 59-69.

Brijesh S, Daswani PG, Tetali P, Rojatkar SR, Antia NH et Birdi TJ. (2006). Studies on *Pongamia pinnata* (L.) Pierre leaves: understanding the mechanism (s) of action in infectious diarrhea. *Journal of Zhejians University Science*. **7**, 665-674.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. Ed : TEC et TOC. Lavoisier, 1120p.

Bruyne TD, Pieters L, Deelstra H and Vlietinck A. (1999). Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*. **27**, 445-459.

Buzzini P, Turchetti B, Ieri F, Gorreti M, Branda E, Mulinacci N and Romani A. (2007). Catechins and proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles with antimicrobial activity. *Top Heterocycl Chem*. **10**, 239-263.

C

Cacace JE and Mazza G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compound from milled berries. *Journal of Food Engineering*. **59**, 379-389.

Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L and Ferret A. (2007). Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science*. **90**, 2580-2595.

Chebaibi A, Rhazi Filali F, Amine A et Zerhouni M. (2011). Effet bactéricide (in vitro) des extraits aqueux des feuilles du grenadier marocain (*Punica granatum* L.) sur des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*. **9**, 158-164.

Chira K, Suh JH, Saucier C, Teissédre PL. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytonutrition fondamentale*. **6**, 75-82.

Choudhury S, Sree A, Mukherjee SC, Pattnaik P and Bapuji M. (2005). *In Vitro* Antibacterial activity of extracts of selected marine algae and mangroves against fish pathogens. *Asian Fisheries Science*, **18**, 285-294.

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Communiqué . (2009).

Cowan MM. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. **12** (4), 564-582.

Cox S, Abu-Ghannam N and Gupta S. (2010). An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *International Food Research Journal*. **17**, 205-220.

Cushnie TPT and Lamb AJ. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **26**, 343-356.

Cushnie TPT and Lamb AJ. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **38**, 99-107.

D

Deysson G. (1979). Organisation et classification des plantes vasculaires. Ed : SEDES. Paris, 540p.

Djeridane A, Yous M, Nadjemi B, Boutassouna D, stocker P and Vidal N. (2006). Antioxydant activity of some medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry. **97**, 654-660.

E

El-Kamali HH and Al-Tayeb Mahjoub S. (2009). Antibacterial Activity of *Francoeuria crispa*, *Pulicaria undulata*, *Ziziphus spina-christi* and *Cucurbita pepo* Against Seven Standard Pathogenic Bacteria. Ethnobotanical Leaflets. **13**, 722-33.

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

F

Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M and Abdelly C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. C. R. Biologies. **331**, 372-379.

Figueiredo AR, Campos F, Freitas V, Hogg T and Couto JA. (2008). Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. International Journal of Food Microbiology. **25**, 105-112.

G

Goel G, Puniya AK, Aguilar CN and Singh K. (2005). Interaction of gut microflora with tannins in feeds. Naturwissenschaften. **92**, 497-503.

H

Hanbali FE, Akssira M, Ezoubeiri A, Gadhi CEA, Mellouki F, Benherraaf A, Amparo M. Blazquez AM and Boira H. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Pulicaria odora* L. Journal of Ethnopharmacology. **99**, 399-401.

Haraguchi H, Tanimoto K, Tamura Y, Mizutani K and Kinoshita T. (1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. Phytochemistry. **48**, 125-129.

Huber B, Eberl L, Feucht W and Polster J. (2003). Influence of Polyphenols on Bacterial Biofilm Formation and Quorum-sensing. Z. Naturforsch. **58**, 879-884.

K

Karabay-Yavasoglu NU, Sukatar A, Ozdemir G and Horzum Z. (2007). Antimicrobial Activity of Volatile components and Various Extracts of the Red Alga *Janiarubens*. *Phytotherapy research*. **21**, 153-156.

Karabegović I, Nikolova M, Veličković D, Stojićević S, Veljković V and Lazić M. (2011). Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanolic Extracts of the *Artemisia* sp. Recovered by Different Extraction Techniques. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. **19** (3), 504-511.

Karou D, Dicko MH, Simpore J, and Traore AS. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*. **4** (8), 823-828.

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

L

Lindberg LE, Willför SM and Holmbom BR. (2004). Antibacterial effects of knotwood extractives on paper mill bacteria. *J ind Microbiol Biotechnol*. **31**, 137-147.

M

Meyer A, Deiana J et Leclerc H. (1994). *Cours de microbiologie générale*. Ed : Doin. Paris, 365p.

Meyer JJM and Afolayan AJ. (1995). Antibacterial activity of *Helichrysum aureonitens*. *Journal of Ethnopharmacology*. **47**, 109-111.

Moroh GLA, Bahi C, Dje K, Loukou YG, Guede-Guina F. (2008). Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) sur la croissance in-vitro des souches d'*Escherichia coli*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. **77**, 44-61.

Mothana RAA and Lindequist U. (2005). Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. *Journal of Ethnopharmacology*. **96**, 177-181.

Mtolera MSP and Semesi AK. (1996). Antimicrobial Activity of Extracts from Six Green Algae from Tanzania. *Current in Trends Marine Botanical Research in East African Region*. 211-217.

N

Nawaz H, Shi J, Mittal GS and Kakuda Y. (2006). Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration . Separation and Purification Technologie. **48**, 176-181.

Nickavar B and Mojab F. (2003). Antibacterial activity of *Pulicaria dysenterica* extracts. Fitoterapia. **74**, 390–393.

P

Pereira AP, Ferreira ICFR, Marcelino F, Valentao P, Andrade PB, Seabra R, Estevinho L, Bento A, Pereira JA. (2007). Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L.Cv. Cobrançosa) leaves. Molecules. **12**, 1153-1162.

Pinelo M, Del Fabbro P, Manzocco L, Nunez MJ and Nicoli MC. (2005). Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. Food Chemistry. **92**, 109-117.

Plaper A, Golob M, Hafner I, Oblak M, Solmajer T, and Jerala R. (2003). Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. Biochemical and Biophysical Research Communications. **306**, 530-536.

R

Rauha JP, Remesa S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H and Vuorela P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. International Journal of Food Microbiology. **56**, 3-12.

Ribéreau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Ed:Dunod.Paris, P: 173-201.

Rodríguez-Vaquero MJ, Alberto MR and Manca de Nadra MC. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. Food Control. **18**, 93-101.

S

Schiota S, Shimizu S, Mizushima T, Ito H, Hatano T, Yoshida T and Tsuchiya T. (2004). Mechanisms of action of Corilagin and Tellimagradin I that remarkably potentiate the activity of B-lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiology Immunology. **48**, 67-73.

Song JH, Yang TC, Chang KW, Han SK, Yi HK and Jeon JG. (2007). In vitro effects of fraction separated from *polygomonum cuspidatum* root on the viability, in suspension and biofilm, and biofilm formation of mutants *Streptococci*. Journal of Ethnopharmacology. **112**, 419-425.

Spigno G, Tramelli L and De Faveri DM. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*. **81**, 200-208.

Suay I, Arenal F, Asensio FG, Basilio A, Cabello MA, Diez MT, Garcia JB, Gonzalez delval A, Gorrochategui J, Hernandez P, Pelaez F and Vicente MF. (2000). Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie van Leeuwenhoek*. **78**, 129-139.

Sudano Roccaro A, Rita Blanco A, Giuliano F, Rusciano D and Enea V. (2004). Epigallocatechin-Gallate Enhances the Activity of Tetracycline in Staphylococci by Inhibiting Its Efflux from Bacterial Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **48** (6), 1968-1973.

Süzgeç-Selçuk S and Birteksöz AS. (2011). Flavonoids of *Helichrysum chasmolycicum* and its antioxidant and antimicrobial activities. *South African Journal of Botany*. **77**, 170-174.

T

Taganna JC and Rivera WL. (2008). Epigallocatechin gallate from *Camellia sinensis* L. (Kuntze) is a potential quorum sensing inhibitor in *Chromobacterium violaceum*. *Science Diliman*. **20** (1), 24-30.

Trabelsi N, Megdiche w, Ksouri R, Falleh H, Oueslati S, Bourgou S, Hajlaoui H and Abdelly C. (2010). Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *Food Science and Technology*. **43**, 632-639.

Tunçel G and Nergiz C. (1993). Antimicrobial effect of some olive phenols in a laboratory medium. *Letters in Applied Microbiology*. **17**, 300-302.

W

Williams CA, Harborne JF, GreenhamRJ, Grayer RJ, Kite GC and Eagles J. (2003). Variations in lipophilic and vacuolar flavonoids among European *Pulicaria* species. *Phytochemistry*. **64**, 275-283.

Wollenweber E and Rustaiyant A. (1991). Exudate Flavonoids in three Persian Asteraceae Species. *Biochemical Systematics and ecology*. **19**, 673-675.

Z

Zaidi-Yahiaoui R, Zaidi F and Ait Bessai A. (2008). Influence of gallic and tannic acids on enzymatic activity and growth of *Pectobacterium chrysanthemi* (*Dickeya chrysanthemi* bv. *chrysanthemi*). *African Journal of Biotechnology*. **7** (4), 482-486.

Annexes

Annexe I: Courbes d'étalonnages

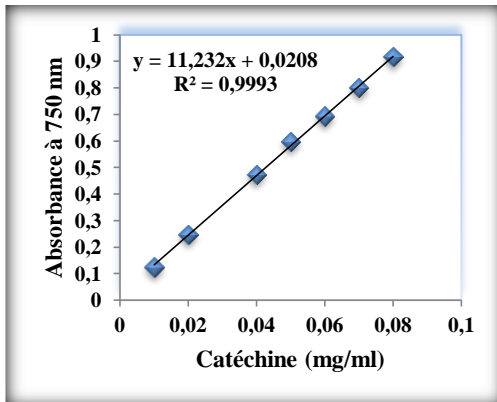


Figure 1: Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux.

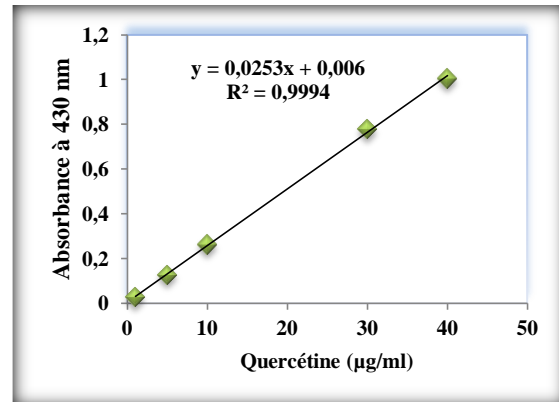


Figure 2: Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.

Annexe II

Tableau I: Diamètres des zones d'inhibition des extraits de *Pulicaria odora* vis-à-vis les souches testées.

Extrait	Dilution (mg/20µl)	Diamètre des zones d'inhibition (mm)			
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Feuille acétone	2	16,50±00,38 ^k	14,50±00,38 ^{lg}	11,00±00,00 ^{de}	07,50±00,38 ^c
	1	15,00±00,00 ^{ij}	11,50±00,38 ^{bc}	12,50±00,38 ^{gh}	07,00±00,00 ^{bc}
	0,5	14,50±00,38 ^{hi}	13,50±00,38 ^{ef}	12,00±00,00 ^{fg}	08,50±00,38 ^d
	0,25	14,00±00,00 ^g	13,00±00,00 ^{de}	12,00±00,00 ^{fg}	09,50±00,38 ^{ef}
Feuille chloroforme	2	15,50±00,38 ^j	15,50±00,38 ^h	09,50±00,38 ^{ab}	00,00±00,00 ^a
	1	13,50±00,38 ^{fg}	12,50±00,38 ^{cd}	10,50±00,38 ^{cd}	12,00±00,00 ^{jk}
	0,5	12,50±00,38 ^{de}	12,00±00,00 ^c	13,50±00,38 ⁱ	10,50±00,38 ^{gh}
	0,25	14,50±00,38 ^{hi}	09,50±00,38 ^a	11,00±00,00 ^{de}	14,50±00,38 ⁱ
Feuille méthanol	2	19,50±00,38 ^m	17,50±00,38 ⁱ	09,00±00,00 ^a	10,50±00,38 ^{gh}
	1	18,50±00,38 ^l	15,50±00,38 ^h	11,00±00,00 ^{de}	10,00±00,00 ^{fg}
	0,5	11,50±00,38 ^c	14,50±00,38 ^{fg}	09,50±00,38 ^{ab}	09,50±00,38 ^{ef}
	0,25	10,50±00,38 ^b	15,50±00,38 ^h	10,50±00,38 ^{cd}	10,50±00,38 ^{gh}
Racine acétone	2	16,50±00,38 ^k	19,50±00,38 ^j	14,50±00,38 ^j	06,50±00,38 ^b
	1	14,00±00,00 ^{gh}	19,50±00,38 ^j	15,00±00,00 ^{jk}	11,00±00,00 ^{hi}
	0,5	15,50±00,38 ^j	30,50±00,38 ^m	12,50±00,38 ^{gh}	07,00±00,00 ^{bc}
	0,25	13,00±00,00 ^{ef}	25,00±00,00 ^k	13,00±00,38 ^h	07,50±00,38 ^c
Racine chloroforme	2	05,50±00,38 ^a	25,00±00,00 ^k	11,50±00,38 ^{ef}	09,00±00,00 ^{de}
	1	11,50±00,38 ^c	14,00±00,00 ^f	12,50±00,38 ^{gh}	09,50±00,38 ^{ef}
	0,5	12,00±00,00 ^{cd}	12,00±00,00 ^c	15,50±00,38 ^k	10,00±00,00 ^{fg}
	0,25	14,00±00,00 ^{gh}	10,00±00,00 ^a	12,50±00,38 ^{gh}	08,50±00,38 ^d
Racine méthanol	2	12,50±00,38 ^{de}	24,50±00,38 ^k	11,50±00,38 ^{te}	12,00±00,00 ^{jk}
	1	11,50±00,38 ^c	27,50±00,38 ^l	11,00±00,00 ^{de}	12,50±00,38 ^k
	0,5	14,50±00,38 ^{hi}	25,00±00,00 ^k	12,00±00,00 ^{fg}	11,50±00,38 ^{ij}
	0,25	15,50±00,38 ^j	19,50±00,38 ^j	10,00±00,00 ^{bc}	09,00±00,00 ^d

Annexe III: Matériel et produits utilisés

1. Appareillages

Autoclave.
Bain-marie MEMMERT.
Balance de précision.
Broyeur (Kika Labortechnik).
Centrifugeuse SIGMA.
Etuve MEMMERT.
Four Pasteur.
pH mètre.
Spectrophotomètre UV-visible SHIMADZU 1240.
Tamiseur RETCH.
Vortex.

2. Produits chimiques

Acétone: (C₃H₆O), 99,78%, MM=58,08 g/mol (BIOCHEM).
Acide gallique.
Acide tannique.
Carbonate de sodium (Na₂CO₃).
Catéchine.
Chloroforme: (CHCl₃), 99-99,6%, MM=119,38 g/mol, d=1.47-1.49 (PROLABO).
Chlorure d'aluminium (AlCl₃).
Chlorure de sodium (NaCl).
Ethanol: (C₂H₆O), 99%, MM=46.07 g/mol, d=0.81 (PROLABO).
Eau physiologique (9g NaCl dans un litre d'eau distillée).
Folin-Ciocalteu.
Méthanol: CH₃OH, 99%, MM=32.04 g/mol, d= 0.79 (PROLABO)
Quercétine.

**Annexe IV: Composition (pour un litre) des milieux de culture utilisés
(Guiraud, 1998)**

Bouillon nutritif

Peptone 10g
Extrait de viande 5g
Chlorure de sodium 5g
pH 7,2

Gélose Chapman

Extrait de viande 1 g
Peptone 10 g
Chlorure de sodium 5 g
Mannitol 10 g
Rouge de phénol 25 mg
Agar 15 g
pH 7,4

Gélose Hecktoène

Protéose peptone 12 g
Extrait de levure 3 g
Chlorure de sodium 5 g
Thiosulfate de sodium 5 g
Sels biliaires 9 g
Citrate de fer ammoniacal 1,5
Salicine 2 g
Lactose 12 g
Saccharose 12 g
Fuchine acide 0,1 g
Bleu de bromothymol 65 mg
Agar 13 mg
pH 7,6

Gélose Mueller Hinton

Etrait de viande 2 g
Hydrolysate acide de caséine 17,5 g
Amidon 1,5 g
Agar 10 g
pH 7,4

Gélose PCA

Peptone 5 g
Extrait de levure 2,5 g
Glucose 1 g
Agar 15 g
pH 7

Glossaire

Glossaire

Antihistaminique : Un médicament qui sert à réduire ou à éliminer les effets de l'histamine, libéré au cours des réactions allergiques, par action sur les récepteurs de l'histamine.

Antilukémique : Médicaments anticancéreux qui sont utilisés pour traiter un ou plusieurs types de leucémies.

Anti-inflammatoire : Substances chimiques ayant le pouvoir de réduire les réactions inflammatoires de l'organisme.

Antispasmodique : Médicament ou une herbe qui supprime les spasmes musculaires.

Corolle : Nom désignant l'ensemble formé par les pétales d'une fleur. Généralement colorée, la corolle a pour fonction d'attirer les insectes pollinisateurs. Elle peut être persistante ou caduque.

Engainantes : Se dit de feuille, pétiole ou stipule formant à leur base une gaine autour de la tige ou du rameau.

Gamopétales : Fleure ou corolle dont les pétales soudées au moins à leur base.

Involucre : Ensemble de bractées florales insérées en verticille à la base d'un pédoncule floral ou d'une inflorescence et formant ainsi une sorte de collerette.

Fleurs linguiforme : En forme de langue.

Pétiole : Partie rétrécie reliant le limbe d'une feuille à la tige.

Scarieuses : Un organe (feuille, bractée) membraneux (mince), plus ou moins translucide, coriace, généralement de couleur paille ou blanchâtre, comme une écaille.

Stolon : Tige rampante à la surface du sol qui peut s'enraciner et former des feuilles et des tiges au niveau de ces nœuds.

Vivace : Un végétal dont le développement peut s'étendre sur plusieurs années. Ce sont des plantes ligneuses ou herbacées, des plantes à bulbes, à rhizomes, à tige et racine tuberculeuse, des plantes monocarpiques ou polycarpiques.

Résumé

L'objectif du présent travail est de mettre en évidence l'activité antibactérienne des extraits des feuilles et des racines d'une plante appartenant à la famille des Asteraceae *Pulicaria odora*. Trois solvants de polarités différentes (méthanol, acétone et chloroforme) sont utilisés pour l'extraction des composés phénoliques. Le méthanol est le meilleur solvant d'extraction des composés phénoliques. L'extrait méthanolique des feuilles enregistre les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux (90 µg Eq. Cat/g de PS) et en flavonoïdes (11,34 µg Eq. Quer/g de PS). L'activité antibactérienne des extraits montre que les souches bactériennes testées sont sensibles aux extraits de *Pulicaria odora*. Les bactéries Gram positives (*B. subtilis* et *S. aureus*) sont plus sensibles que les bactéries Gram négatives (*E. coli* et *P. aeruginosa*). La souche *S. aureus* s'est révélée la plus sensible, avec le plus large diamètre d'inhibition (30,5 mm) obtenue par l'extrait racine acétone. Tandis que la souche *P. aeruginosa* s'est montrée plus résistante, avec absence de zones d'inhibition pour l'extrait chloroforme feuilles. L'extrait méthanolique des feuilles est plus actif à l'égard de *S. aureus* et *P. aeruginosa* avec des CMI/CMB égales à 1/1,4 mg/ml.

Mots-clés: Activité antibactérienne, *Pulicaria odora*, composés phénoliques.

Abstract

The aim of this work is to highlight the antibacterial activity of extracts of leaves and roots from a plant belonging to the family Asteraceae, *Pulicaria odora*. Three different polarity solvents (methanol, acetone and chloroforme) are used for the extraction of phenolic compounds. The methanolic extract of leaves records the highest content of total polyphenols (90 µg Eq. Cat/g de PS) and flavonoids (11,34 µg Eq. Quer/g de PS). Antibacterial activity of the different extracts shows that most of the bacterial strains tested are sensitive to extracts of *Pulicaria odora*. Gram positive bacteria (*B. subtilis* and *S. aureus*) are more sensitive than Gram negative bacteria (*E. coli* and *P. aeruginosa*). The strain *S. aureus* was the most sensitive, with the larger diameter of inhibition (30,5mm), for the acetonic extract of roots. The strain *P. aeruginosa* is the most resistant (00 mm) for the chloroformic extract of leaves. The leaves extracts are the most actives against *S. aureus* and *P. aeruginosa*, with MCI/MBC equal to 1/1,4 mg/ml.

Key words: Antibacterial activity, *Pulicaria odora*, phenolic compounds.