



Université A/MIRA de Bejaia (UAMB)  
Faculté des sciences de la nature et de la vie (FSNV)  
Département de Biologie Physico-Chimique (BPC)

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

## MAGISTER EN BIOLOGIE

*Option : Biochimie appliquée aux substances végétales bioactives*

### Thème

**CRIBLAGE DES EXTRAITS PHÉNOLIQUES D'ORIGINE VÉGÉTALE  
DOUÉS D'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE :  
RECHERCHE DES INHIBITEURS NATURELS DE  $\beta$ -LACTAMASES**

### Présenté par

M<sup>elle</sup> HAMADACHE Noura

### Devant le jury

Mr M. KECHA	MCA (UAMB)	Président
Mr A. TOUATI	MCA (UAMB)	Promoteur
Mme F. BEDJOU	MCA (UAMB)	Examinatrice
Mr K. AISSAT	MCA (UAMB)	Examineur

Janvier 2011

*« Louanges à ALLAH le tout puissant qui m'a aidé durant toute ma vie »*

## **Remerciements**

Au terme de ce travail il m'est agréable de remercier toute personne ayant contribué de près ou de loin à sa réalisation et notamment celles dont les noms ne figurent pas sur cette page.

Je remercie M<sup>f</sup> A. Touati, directeur de cette thèse, qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et gratitude tant pour m'avoir orienté dans mes études universitaires tout au long de ces années. Merci pour votre compréhension, vos conseils éclairés et pour ces discussions enrichissantes, tant sur le plan humain que scientifique. Vous m'avez beaucoup appris.

J'adresse mes sincères remerciements à M<sup>f</sup> M. Kecha pour ses conseils prodigués au cours des premières phases de ce travail et pour m'avoir fait honneur de présider le jury de cette thèse.

Je remercie très sincèrement M<sup>me</sup> F. Bedjou et M<sup>f</sup> K. Aissat qui ont accepté d'évaluer le présent travail. J'ai été très sensible à l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de juger cette thèse. Je tiens à leur exprimer mes respectueuses gratitude et considérations.

Toutes mes expressions de respect et de gratitude au Professeur H. Louaïleche pour m'avoir autorisé d'effectuer quelques manipulations dans son laboratoire. Je remercie aussi M<sup>f</sup> M. Bachirbey d'avoir pris le temps de me suivre pendant mes manips d'évaporation de solvant.

J'adresse mes sincères remerciements à M<sup>f</sup> M. Sahnoune pour m'avoir aidé dans l'analyse statistique de mes résultats et dans l'identification botanique des plantes de cette étude.

Un grand merci à tous mes enseignants de la graduation et de la post-graduation, et à tous ceux qui m'ont aidé, soutenu, conseillé et encouragé durant tout mon cursus, en témoignage de ma profonde reconnaissance et respectueuse gratitude.

En fin, je tiens à remercier très particulièrement mes amis et mes copines qui ont été toujours à mes côtés dans les moments de joie mais aussi de déception bien que toujours pleins de confiance, de certitude et d'espoir.

## *Dédicaces*

*A la mémoire de mon grand-père qui nous a quitté il y  
a quelques mois. A la mémoire de mon grand frère.  
Leur absence pèse déjà lourde sur nos cœurs.*

*A tous ceux qui m'ont aidé, soutenu et encouragé.  
A ceux qui me sont chers.*

# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction ..... 01

## *Première partie : Synthèse bibliographique*

### **I. Les composés phénoliques**

1. Généralités .....	03
2. Classification des composés phénoliques.....	03
2.1. Les acides phénoliques .....	03
2.2. Les flavonoïdes.....	04
2.3. Les tanins.....	05
2.4. Les stilbènes.....	06
2.5. Les quinones.....	06
2.6. Les coumarines.....	07
3. Rôles physiologiques des composés phénoliques.....	08
4. Propriétés biologiques des composés phénoliques .....	08
4.1. Propriétés antibactériennes des composés phénoliques.....	08
4.2. Propriétés antioxydantes des composés phénoliques.....	08
4.3. Autres propriétés biologiques des composés phénoliques.....	08

### **II. Activité antibactérienne des composés phénoliques**

1. Généralités .....	10
2. Action directe des composés phénoliques sur les bactéries .....	10
2.1. Activité antibactérienne des acides phénoliques.....	10
2.2. Activité antibactérienne des flavonoïdes .....	11
2.3. Activité antibactérienne des quinones .....	11
2.4. Activité antibactérienne des tanins et des coumarines .....	11

2.5. Mécanismes d'action directe des composés phénoliques.....	12
3. Polyphénols inhibiteurs des mécanismes de résistance aux antibiotiques .....	13
3.1. Inhibition des $\beta$ -lactamases.....	13
3.2. Inhibition des pompes d'efflux.....	15

### **III. Plantes médicinales sélectionnées**

1. <i>Artemisia absinthium</i> L.....	16
2. <i>Calendula arvensis</i> L. ....	17
3. <i>Cupressus sempervirens</i> L. ....	18
4. <i>Ephedra altissima</i> Desf.....	19
5. <i>Marrubium vulgare</i> L. ....	20
6. <i>Mirabilis jalapa</i> L. ....	21
7. <i>Nerium oleander</i> L. ....	22
8. <i>Quercus ilex</i> L. ....	23

## ***Deuxième partie : Expérimentation***

### **IV. Matériel et méthodes**

1. Matériel végétal.....	24
2. Préparation des extraits phénoliques .....	26
3. Calcul des rendements de l'extraction.....	28
4. Dosage des polyphénols totaux.....	28
5. Etude de l'activité antibactérienne des extraits phénoliques.....	30
6. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des extraits phénoliques.....	32
7. Tests d'inhibition des $\beta$ -lactamases par les extraits phénoliques.....	32
7.1. Tests iodométriques .....	33
7.2. Mesure de l'activité enzymatique des $\beta$ -lactamases par spectrophotométrie.....	34
8. Analyse statistique.....	35

### **V. Résultats et discussions**

1. Préparation du matériel végétal.....	36
2. Rendements des extractions .....	36
3. Dosage des polyphénols totaux.....	39

4. Activité antibactérienne des extraits des plantes sélectionnées.....	43
4.1. Activité antibactérienne d' <i>Artemisia absinthium</i> .....	46
4.2. Activité antibactérienne de <i>Calendula arvensis</i> .....	47
4.3. Activité antibactérienne <i>Cupressus sempervirens</i> .....	47
4.4. Activité antibactérienne d' <i>Ephedra altissima</i> .....	48
4.5. Activité antibactérienne <i>Marrubium vulgare</i> .....	48
4.6. Activité antibactérienne de <i>Mirabilis jalapa</i> .....	51
4.7. Activité antibactérienne de <i>Nerium oleander</i> .....	51
4.8. Activité antibactérienne de <i>Quercus ilex</i> .....	51
5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	53
6. Action des extraits phénoliques sur les $\beta$ -lactamases d' <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	55
6.1. Résultats des tests iodométriques.....	55
6.2. Mesure de l'activité enzymatique par spectrophotométrie.....	59
7. Inhibition des $\beta$ -lactamases par les extraits des plantes .....	60
7.1. Vitesses d'hydrolyse des $\beta$ -lactamines en présence des extraits de plantes.....	60
7.2. Taux d'inhibition des pénicillinases et des céphalosporinases .....	60
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	<b>63</b>

## Références bibliographiques

### Annexes

### Résumés

## *Liste des abréviations*

**5'-MHC** : 5'-methoxyhydnocarpine

**AHC** : Acides hydroxy-cinnamiques

**ATCC**: American Type Culture Collection

**ATP**: Adénosine triphosphate

**CIP** : Ciprofloxacine

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**DO** : Densité optique

**ECG** : Epicatéchine-gallate

**EDTA**: Ethylene diamine tetra acetic acid

**EGCG** : Epigallocatechine-gallate

**Exp.**: Exemple

**IMP** : Imipinème

**K**: Kanamycine

**LDL**: Low density lipoprotein

**LPS**: Lipopolysaccharide

**NOR** : Norfloxacine

**OFX** : Ofloxacine

**OMS**: Organisation Mondiale de la Santé

**PBP** : Penicillin binding protein

**PLP** : Protéine liant la pénicilline

**TET** : Tétracycline

**UFC** : Unités formant une colonie

**Zn**: Zinc

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Structures de base des acides phénoliques.....	<b>04</b>
<b>Figure 02</b> : Structure de base des flavonoïdes.....	<b>04</b>
<b>Figure 03</b> : Principaux groupes de flavonoïdes.....	<b>05</b>
<b>Figure 04</b> : Structures des tanins condensés (A) et des tanins hydrolysables (B) .....	<b>06</b>
<b>Figure 05</b> : Structure du resvératrol .....	<b>06</b>
<b>Figure 06</b> : Structures de base des <i>para</i> -quinones et des <i>ortho</i> -quinones .....	<b>06</b>
<b>Figure 07</b> : Structure de base des coumarines.....	<b>07</b>
<b>Figure 08</b> : Hydrolyse du noyau $\beta$ -lactame par les $\beta$ -lactamases.....	<b>14</b>
<b>Figure 09</b> : Structure de l'épicatéchine-gallate et de l'épigallocatechine-gallate.....	<b>14</b>
<b>Figure 10</b> : Structure de la baicaline .....	<b>15</b>
<b>Figure 11</b> : Structures du 5'-MHC.....	<b>15</b>
<b>Figure 12</b> : <i>Artemisia absinthium</i> L.....	<b>16</b>
<b>Figure 13</b> : <i>Calendula arvensis</i> L.....	<b>17</b>
<b>Figure 14</b> : <i>Cupressus sempervirens</i> L.....	<b>18</b>
<b>Figure 15</b> : <i>Ephedra altissima</i> Desf.....	<b>19</b>
<b>Figure 16</b> : <i>Marrubium vulgare</i> L.....	<b>20</b>
<b>Figure 17</b> : <i>Mirabilis jalapa</i> L.....	<b>21</b>
<b>Figure 18</b> : <i>Nerium oleander</i> L.....	<b>22</b>
<b>Figure 19</b> : <i>Quercus ilex</i> L.....	<b>23</b>
<b>Figure 20</b> : Carte géographique des sites de récolte des plantes .....	<b>24</b>
<b>Figure 21</b> : Protocole d'extraction des composés phénoliques .....	<b>27</b>
<b>Figure 22</b> : Protocole de dosage des composés phénoliques .....	<b>29</b>
<b>Figure 23</b> : Rendements de l'extraction des composés phénoliques des plantes étudiées.....	<b>36</b>
<b>Figure 24</b> : Teneurs en polyphénols totaux des plantes étudiées .....	<b>40</b>
<b>Figure 25</b> : Activité des extraits sur les souches bactériennes testées (20 $\mu$ l d'extrait).....	<b>44</b>
<b>Figure 26</b> : Activité des extraits sur les souches bactériennes testées (50 $\mu$ l d'extrait).....	<b>44</b>
<b>Figure 27</b> : Photographies de l'activité des extraits sur les souches bactériennes testées (20 $\mu$ l d'extrait).....	<b>49</b>
<b>Figure 28</b> : Photographies de l'activité des extraits sur les souches bactériennes testées (50 $\mu$ l d'extrait).....	<b>50</b>
<b>Figure 29</b> : Résultats des tests iodométriques temoins (substrat Pénicilline G).....	<b>57</b>
<b>Figure 30</b> : Résultats des tests iodométriques temoins (substrat Céfazoline).....	<b>57</b>
<b>Figure 31</b> : Résultats des tests iodométriques après 24h d'incubation (substrat pénicilline G)...	<b>58</b>
<b>Figure 32</b> : Résultats des tests iodométriques après 24h d'incubation (substrat céfazoline).....	<b>58</b>
<b>Figure 33</b> : Variation de l'absorbance en fonction du temps (substrat pénicilline G).....	<b>59</b>
<b>Figure 34</b> : Variation de l'absorbance en fonction du temps (substrat pénicilline G).....	<b>59</b>
<b>Figure 35</b> : Pourcentages d'inhibition des pénicillinases.....	<b>61</b>
<b>Figure 36</b> : Pourcentages d'inhibition des céphalosporinases.....	<b>61</b>



## *Liste des tableaux*

<b>Tableau I</b> : Principales activités biologiques des composés phénoliques.....	<b>09</b>
<b>Tableau II</b> : Quelques groupes de flavonoïdes antibactériens et leurs sources végétales .....	<b>11</b>
<b>Tableau III</b> : Modes d'action antibactérienne des polyphénols.....	<b>12</b>
<b>Tableau IV</b> : Situation géographique des régions de récolte.....	<b>24</b>
<b>Tableau V</b> : Identification botanique des plantes .....	<b>25</b>
<b>Tableau VI</b> : Parties utilisées des plantes .....	<b>26</b>
<b>Tableau VII</b> : Caractéristiques des souches bactériennes étudiées.....	<b>30</b>
<b>Tableau VIII</b> : Antibiotiques utilisés comme contrôles positifs.....	<b>35</b>
<b>Tableau IX</b> : Longueurs d'ondes, coefficients d'extinction molaire et concentrations des antibiotiques utilisés.....	<b>41</b>
<b>Tableau X</b> : Diamètres des zones d'inhibition des extraits phénoliques des plantes étudiées.....	<b>45</b>
<b>Tableau XI</b> : CMI des extraits phénoliques étudiés.....	<b>53</b>
<b>Tableau XII</b> : Résultats des tests iodométriques (Substrat pénicilline G) .....	<b>56</b>
<b>Tableau XIII</b> : Résultats des tests iodométriques (Substrat céfazoline) .....	<b>56</b>
<b>Tableau XIV</b> : Vitesses d'hydrolyse des $\beta$ -lactamines .....	<b>60</b>

# **Introduction**

L'Homme a toujours eu recours à des substances végétales pour se soigner de toute affection. L'invention par des pharmaciens français, en 1834, de la gélule en gélatine, a inauguré l'ère de l'industrie pharmaceutique moderne et a entraîné la disparition progressive de la médecine par les plantes. Néanmoins, en Afrique cette dernière constitue encore le support fondamental pour la pratique de la médecine dans les zones rurales (Piétroni, 1996 ; Keita et al., 2004).

L'introduction des antibiotiques dans l'arsenal thérapeutique des maladies infectieuses a fait que les microorganismes développent des moyens de défense leur conférant une insensibilité aux antibactériens (Bryskier, 1999). La diversité croissante des mécanismes de résistance mis en oeuvre par les souches bactériennes est un sujet de préoccupation, elle pourrait conduire à l'émergence de bactéries ayant accumulé dans leurs génomes les différentes résistances et devenues insensibles à une plus large gamme d'antibiotiques, comme cela s'est vu au Japon où des souches de *Pseudomonas aeruginosa* étaient résistantes à toutes les  $\beta$ -lactamines connues. Les  $\beta$ -lactamines constituent une grande famille d'antibiotiques, la plus importante par le nombre et la diversité des molécules utilisables et par ses indications les plus larges que l'on puisse attribuer à une famille d'antibiotiques (Nordmann, 2003).

L'émergence de ces résistances développées par les bactéries pose à l'heure actuelle de très sérieux problèmes pour la santé publique. L'arsenal thérapeutique mis à notre disposition avec succès depuis le milieu du XX<sup>ème</sup> siècle pour combattre les infections bactériennes s'épuise. Le phénomène de multirésistance aux antibiotiques est de plus en plus fréquent à l'échelle mondiale, en particulier chez les bactéries à Gram positif. Bien qu'une grande partie de ce siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules antibactériennes de synthèse, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs *via* le *screening* de sources végétales est indispensable pour remédier à cette situation clinique inquiétante (Marquez, 2005).

Les infections causées par les souches bactériennes résistantes aux antibiotiques sont responsables d'un taux élevé de morbidité, comparé aux infections causées par les bactéries sensibles, et le coût de traitement annuel des infections causées par des germes résistants est estimé aux Etats-Unis à environ quatre milliards de dollars et est en pleine augmentation. Ainsi, il est indispensable de développer de nouvelles molécules antibactériennes pour surpasser ce problème impliqué dans de nombreuses pathogénèses humaines (Gangoué Piéboji, 2007 ; Hemaiswarya et al., 2008).

Des plantes médicinales et aromatiques pourraient permettre le traitement ou la prévention de maladies chroniques et/ou graves, et résoudre le problème de la résistance bactérienne vis-à-vis des agents antibactériens actuels (Keita et al., 2004). L'usage d'extraits de plantes contenant des constituants bio-actifs est devenu une approche très importante dans la médecine préventive, recommandée d'ailleurs par l'OMS. Les composés phénoliques issus des végétaux génèrent actuellement beaucoup d'intérêt en raison de leur activité antibactérienne prononcée vis-à-vis des souches sensibles et résistantes aux antibiotiques. En plus de leur action directe sur les bactéries, les polyphénols sont capables d'inhiber les systèmes de résistances aux antibiotiques (Hatano et al., 2008 ; Hemaiswarya et al., 2008).

De ce fait, les recherches sur les activités antibactériennes, le mode d'action et la composition chimique des plantes connaissent un regain d'intérêt. C'est dans ce cadre que s'inscrit le présent travail qui aura pour but d'évaluer *in vitro* l'activité antibactérienne des extraits phénoliques de huit plantes médicinales locales (*Artemisia absinthium* ; *Calendula arvensis*; *Cupressus sempervirens*; *Ephedra altissima*; *Mirabilis jalapa*; *Marrubium vulgare*; *Nerium oleander* et *Quercus ilex*) vis-à-vis de quatre souches bactériennes et de tester ensuite l'aptitude de ces mêmes extraits à inhiber les  $\beta$ -lactamases d'une souche d'*Acinetobacter baumannii*.

Pour traiter les différents aspects du sujet, nous avons structuré ce document comme suit : un premier chapitre portera sur la revue de la littérature, concernant les composés phénoliques et leurs propriétés antibactériennes, les  $\beta$ -lactamases et une présentation des plantes médicinales sélectionnées. Le deuxième chapitre présentera le matériel utilisé ainsi que la méthodologie expérimentale suivie. Un troisième chapitre sera consacré à la présentation de l'ensemble des résultats obtenus et aux discussions qui en découlent.

**Première partie:**  
**Synthèse bibliographique**

## **I. Les composés phénoliques**

## **I. Les composés phénoliques**

### **1. Généralités**

Les composés phénoliques forment un groupe important de métabolites secondaires des végétaux avec plus de 8000 structures qui se reconnaissent à la présence d'un ou plusieurs groupes hydroxyles, modifiés ou non, attachés à une structure aromatique. Souvent, ces composés non azotés se présentent liés à des glucosides surtout lorsqu'ils sont en solution dans le suc vacuolaire et sont très différents par leurs configurations et leurs propriétés (Lee *et al.*, 2003 ; Hennebelle *et al.*, 2004).

Les différentes structures phénoliques sont souvent spécifiques de l'espèce, de la famille botanique ou encore des conditions environnementales. Plusieurs études soulignent une plus forte concentration en polyphénols des dicotylédones comparativement aux graminées (Lugasi *et al.*, 2003). Le mode de conservation de l'herbe et son degré de maturité influent fortement sur la concentration de ses différents métabolites (Farruggia *et al.*, 2008). Les principales sources alimentaires des composés phénoliques sont les fruits et légumes (Edeas, 2007).

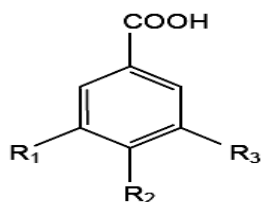
### **2. Classification des composés phénoliques**

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en plusieurs catégories qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base, ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation etc.), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de bases avec d'autres molécules (glucides généralement). On distingue les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, les stilbènes et les quinones (Macheix *et al.*, 2005 ; Bragazza et Freeman, 2007).

#### **2.1. Les acides phénoliques**

Les acides phénoliques sont des substances phytochimiques ayant au moins un groupe carboxyle et un groupe hydroxy-phénolique. On englobe sous la dénomination générale d'acides phénoliques les acides hydroxybenzoïques qui sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure en C6-C1, ils sont très communs aussi bien sous forme libre que combinée à l'état d'ester ou d'hétérosides ; et les acides hydroxycinnamiques qui dérivent de l'acide cinnamique et possèdent une structure en C6-C3 (figure 01) (Bruneton, 1999 ; Cheynier, 2005).

## Acides hydroxybenzoïques



## Acides hydroxycinnamiques

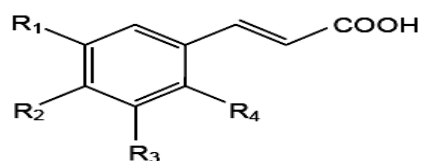


Figure 01 : Structures de base des acides phénoliques (Lopez-Giraldo, 2008)

## 2.2. Les flavonoïdes

Flavonoïdes (de *flavus*, « jaune » en latin) est le terme générique pour désigner des composés basés sur un squelette à quinze carbones, qui à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C6-C3-C6). Le pont en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (Graham, 1998 ; Schijlen *et al.*, 2004). La figure 02 représente la structure de base des flavonoïdes.

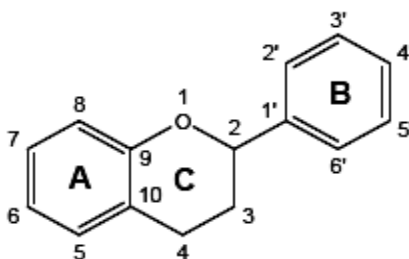


Figure 02 : Structure de base des flavonoïdes (Cuchnie et Lamb, 2005).

Les flavonoïdes forment le groupe le plus vaste et le plus répandu des polyphénols (Kooter *et al.*, 2002). Ils se répartissent en diverses classes qui diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C, alors que les composés individuels au sein d'une même classe diffèrent par la substitution des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes identifiées, les principales sont : les flavonols, les flavones, les isoflavones, les flavanones, les flavanes et les anthocyanines (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Bruneton, 1999), quelques unes sont représentées sur la figure 03.



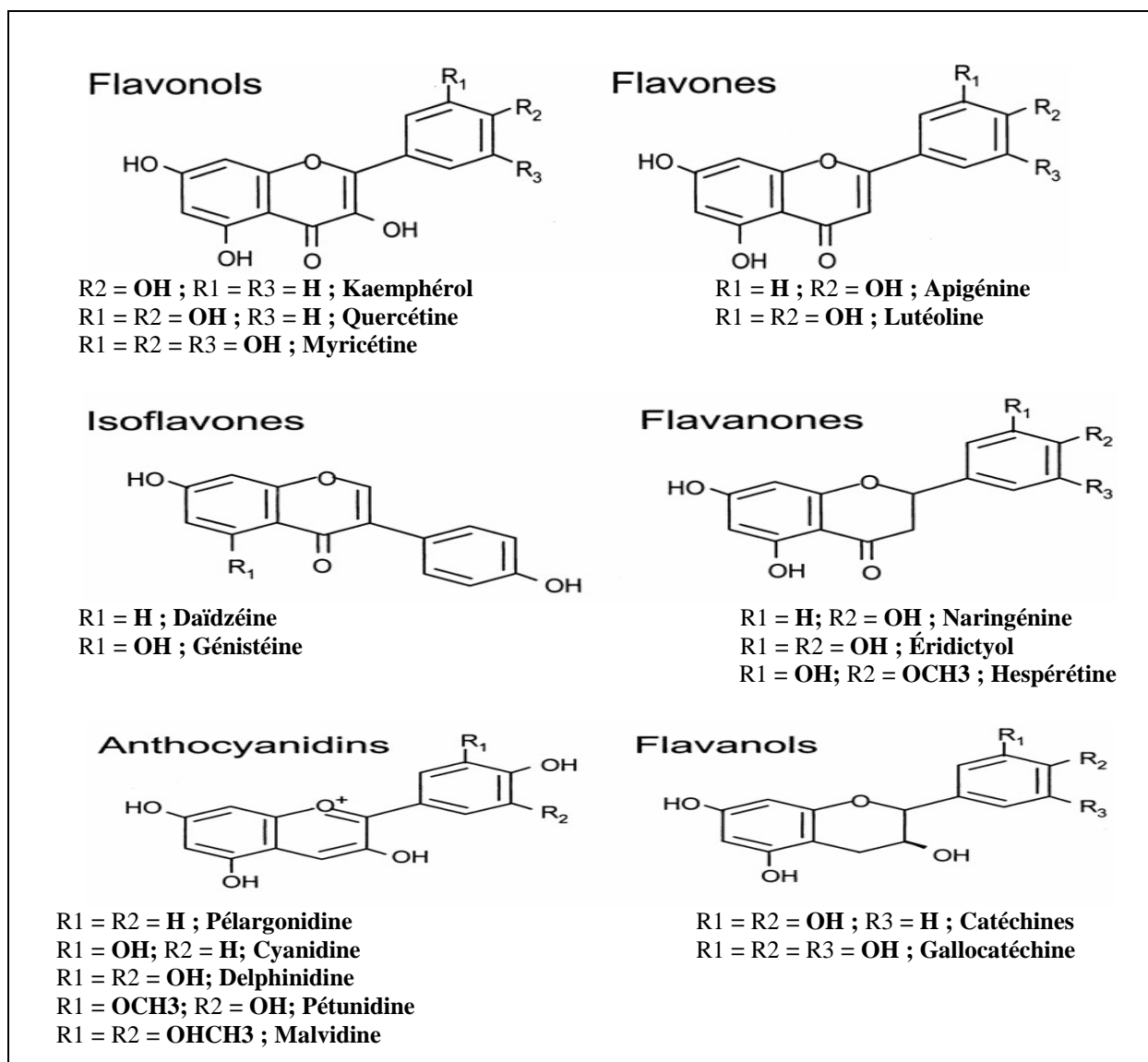


Figure 03 : Principaux groupes de flavonoïdes (Manach et al., 2004)

### 2.3. Les tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques de poids moléculaire allant de 300 à 3000Da caractérisés par leur astringence. Ils peuvent contracter les tissus en liant les protéines et en les précipitant, d'où leur emploi pour «tanner» les peaux. Les tanins sont subdivisés en deux groupes à savoir: les tanins hydrolysables; qui sont des oligo ou des poly-esters de sucres (généralement le glucose) avec des acides phénoliques (acide gallique pour les gallotannins; acide ellagique pour les ellagitanins) et peuvent être dégradés par hydrolyse chimique ou enzymatique et les tanins condensés (ou catéchiques, non hydrolysables), qui sont constitués par des unités de flavane-3-ol liées entre elles par des liaisons carbone-carbone (Vergé et al., 1999 ; Khanbabaee et van Ree, 2001). La figure 04 représente les différentes structures des tanins.

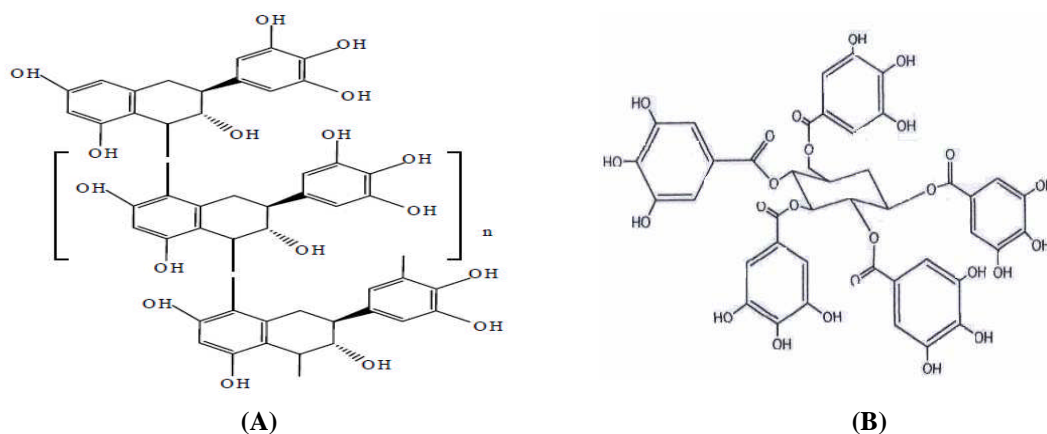


Figure 04: Structures générales des tanins condensés (A) et des tanins hydrolysables (B) (Cowan, 1999 ; Cushnie et Lamb, 2005)

#### 2.4. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques caractérisés par la présence au minimum de deux noyaux aromatiques liés par une double liaison. On connaît l'une des molécules, le resvératrol (figure 05); essentiellement pour ses propriétés antiradicalaires (Vivas et *al.*, 2003).

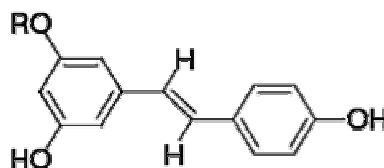
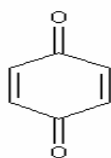


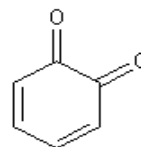
Figure 05 : Structure du resvératrol (Burns et *al.*, 2003)

#### 2.5. Les quinones

Les quinones sont des composés phénoliques oxygénés, caractérisés par un motif 1,4-dicétyclohexa-2,5-diéniq (para-quinone) ou éventuellement, par un motif 1,2-dicétyclohexa-3,5-diéniq (ortho-quinone) (figure 06). Différents groupes de quinones ont été identifiés dont les benzoquinones, les naphthoquinones, les anthraquinones, les anthracyclinones et les naphthodianthrone (Bruneton, 1999).



1,4 benzoquinone (*para*-quinone)



1,2 benzoquinone (*ortho*-quinone)

Figure 06: Structures de base des *para*-quinones et des *ortho*-quinones (Bruneton, 1999).

## 2.6. Les coumarines

Les coumarines (figure 07) sont des substances phénoliques dérivés de la benzo-alpha-pyrone (Cowan, 1999). De différents types, elles se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Plus de milles structures de coumarines ont été décrites, et les plus simples d'entre elles sont distribuées dans tous le règne végétal avec une abondance remarquable au sein des angiospermes (Bruneton, 1999 ; Iserin, 2001).

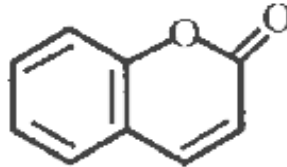


Figure 07: Structure de base des coumarines (Cowan, 1999).

## 3. Rôles physiologiques des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont associés à de nombreux processus physiologiques des végétaux: croissance cellulaire, différenciation, organogenèse, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation. Ce sont les éléments de base des lignines, l'un des constituants majeurs de la paroi des cellules végétales (Nitsh et Nitsh, 1961). Les phénols sont antiseptiques, on suppose que les plantes, en les produisant, cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes phytophages. En effet, les polyphénols sont impliqués dans les interactions plantes-microorganismes: dans les pathogenèses comme dans les symbioses (Bruneton, 1999 ; Iserin, 2000).

Les flavonoïdes agissent dans les systèmes de défense des cellules végétales en réponse à certains stress tels que les radiations ultraviolettes. Ce sont également des agents chélateurs des métaux nocifs aux plantes et des inhibiteurs d'enzymes. De plus ils sont impliqués dans la photosensibilisation, les transferts d'énergie, la morphogenèse, la photosynthèse et la régulation des hormones de croissance des plantes (Di Carlo et al., 1999).

Non seulement les anthocyanes attirent les insectes pollinisateurs, mais elles jouent un rôle protecteur dans l'épiderme, agissant comme un filtre pour réduire les niveaux d'irradiation néfastes qui atteignent les cellules de mésophylle (Burns et al., 2003). Les ubiquinones et les plastoquinones interviennent comme transporteurs d'électrons au niveau de la respiration et la photosynthèse (Tandon et al., 2009). Généralement, les stilbènes participent à la résistance des tissus végétaux aux agressions fongiques (Vivas et al., 2003).

#### **4. Propriétés biologiques des composés phénoliques**

##### **4.1. Propriétés antibactériennes des composés phénoliques**

Les travaux scientifiques réalisés sur les extraits de différentes espèces végétales ont attribué l'effet antibactérien de ces derniers principalement aux composés phénoliques. Une corrélation positive est observée entre la teneur en polyphénols totaux des extraits de plusieurs plantes et leur activité antibactérienne (Ao *et al.*, 2008 ; Bendahou *et al.*, 2008). En effet, ces molécules présentent une activité bactériostatique ou bactéricide *in vitro*, sur une large gamme de microorganismes (Cowan, 1999). Les détails ainsi que les mécanismes de l'activité antibactérienne des composés phénoliques feront l'objet du chapitre II de ce même manuscrit.

##### **4.2. Propriétés antioxydantes des composés phénoliques**

Les composés phénoliques ont un effet scavenger des radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de l'environnement (Lahouel, 2004 ; Duenas, 2006). Les polyphénols réduisent le stress oxydatif des cellules nerveuses, ce qui pourrait constituer une protection contre les modifications nerveuses liées à l'âge telles que celles constatées dans la maladie d'Alzheimer (Cieslik *et al.*, 2006).

Les composés phénoliques inhibent les lipo-oxygénases, la peroxydation lipidique et l'oxydation des LDL, ainsi ils préviennent les maladies cardiovasculaires (Rein *et al.*, 2000 ; Akula *et Odhav*, 2008). Ils seraient également impliqués dans la prévention de nombreux cancers (colon, poumon, peau etc.) (Koprivnjak *et al.*, 2010). Des études faites *in vitro* ont montré que le gallate d'épigallocatechine est 100 fois plus puissant que la vitamine C et 25 fois plus efficace que la vitamine E pour neutraliser les radicaux libres (Hegarty, 2000 ; Maataoui *et al.*, 2006).

##### **4.3. Autres propriétés biologiques des composés phénoliques**

Les composés phénoliques sont munis de plusieurs autres activités biologiques : ils sont antiallergiques, anti-oedémateux et anti-inflammatoires (Landolfi *et al.*, 1984 ; Meng *et al.*, 2009). Plusieurs études ont révélé l'effet antifongique et insecticide des extraits phénoliques isolés de différentes plantes (Belboukhari *et Cheriti*, 2006).

Il est indéniable que les flavonoïdes présentent d'importantes propriétés sur divers systèmes biologiques. Leurs effets pourraient avoir des applications en thérapeutique tels que des effets anti-ulcéreux, anti-inflammatoires, anti-hépatotoxiques. Ils sont aussi des inhibiteurs d'enzymes telles que la xanthine oxydase. Les dérivés de la rutine sont utilisés en thérapeutique pour améliorer la résistance capillaire (Iserin, 2001). Les flavonoïdes sont les constituants habituels des vasculoprotecteurs utilisés en phlébologie (Narayana *et al.*, 2001 ; Ghedira, 2005).

Les tanins permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Les plantes riches en tanins sont utilisées pour rendre les tissus souples, comme dans le cas des veines variqueuses; pour drainer les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée; et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure (Iserin, 2001).

Les coumarines du mélilot et du marronnier d'Inde contribuent à fluidifier le sang alors que les furanocoumarines comme le bergaptène, contenu dans le céleri, soignent les affections cutanées et que la khelline de la khella (*Ammi visnaga*) est un puissant vasodilatateur coronarien (Bruneton, 1999 ; Iserin, 2001). Le tableau I résume les différentes activités biologiques des polyphénols.

**Tableau I : Principales activités biologiques des composés phénoliques**

Classes phénoliques	Activités biologiques	Références
<i>Acides phénoliques</i>	antioxydante, antibactérienne, antivirale, anti-inflammatoire, anticancéreuse.	(Hayase et Kato, 1984 ; Psotova et al., 2003)
<i>Flavonoïdes</i>	antioxydante, anti-inflammatoire, diurétiques, antiallergiques, antibactérienne, hypotenseurs, anticancéreuse, cardiotonique.	(Aruoma et al., 1995 ; Di carlo et al., 1999 ; Narayana et al., 2001)
<i>Coumarines</i>	vasoprotectrice, antiœdémateuse, antibactérienne.	(Mabry et Ulubelen, 1980 ; Cottiglia et al., 2001)
<i>Tanins</i>	antimicrobienne, antiparasitaire, vasodilatateur, antiparasitaire	(Cottiglia et al., 2001 ; Hoste et al., 2006)
<i>Quinones</i>	antibactérienne, antivirale, antifongique, antimalaria, antileishmania	(Tandon et al., 2009)

## **II. Activité antibactérienne des composés phénoliques**

## **II. Activité antibactérienne des composés phénoliques**

### **1. Généralités**

Les cellules végétales résistent aux infections par la synthèse des composés phénoliques, on pense même que la première étape de défense est l'accumulation rapide de ces derniers dans le site de l'infection d'où leur intérêt en infectiologie (Fleuriet et Macheix, 1977 ; Rees et Harborne, 1985). Selon plusieurs études, il est démontré que les huiles essentielles à phénols sont plus efficaces que celles dépourvues de ces composés et que les phénols purs présentent une meilleure activité antibactérienne (Kaloustian et al., 2008 ; Michiels et al., 2009).

L'évolution continue du phénomène de l'antibiorésistance a fait que plusieurs recherches scientifiques s'orientent vers le développement de nouvelles classes de molécules antibactériennes (Thomson et al., 2004). Différentes études ont montré que les extraits des plantes possèdent des sites d'action différents de ceux des antibiotiques ce qui suggère qu'ils auront un effet inhibiteur sur les souches bactériennes résistantes (Kilani et al., 2008).

Les composés phénoliques sont de forts agents antimicrobiens, ils agissent à des concentrations de l'ordre de microgrammes par millilitre. L'action des composés phénoliques sur les souches bactériennes peut être bactériostatique ou bactéricide. Ces composés peuvent agir directement sur les microorganismes en attaquant des cibles privilégiées, comme ils peuvent inhiber leurs systèmes de résistance aux antibiotiques restaurant ainsi l'activité de ces derniers (van Vuuren, 2008 ; Hemaiswarya et al., 2008).

### **2. Action directe des composés phénoliques sur les bactéries**

#### **2.1. Activité antibactérienne des acides phénoliques**

Les acides phénoliques inhibent la croissance de plusieurs souches bactériennes à Gram négatif et à Gram positif (Nascimento et al., 2000). Les acides hydroxycinnamiques (AHC) présents dans les fruits du pommier (*Pyrus malus*) sont inhibiteurs vis-à-vis des bactéries lactiques gastro-intestinales (*Oenococcus oeni* et *Lactobacillus plantarum*), alors que leurs esters ont peu ou pas d'effet. Les AHC libres peuvent être classés par ordre d'actions inhibitrices décroissantes : acide férulique, acide *p*-coumarique et acide caféique, c'est-à-dire dans l'ordre décroissant de leur hydrophobicité (Salih et al., 2000).

## 2.2. Activité antibactérienne des flavonoïdes

La composition chimique de chaque plante détermine son effet thérapeutique, ainsi l'activité antibactérienne de *Tagetes minuta* et celle des genres *Hypericum*, *Capsella* et *Chromolaena* résulte de leurs concentrations élevées en flavonoïdes (Dall'Agnol et al., 2003 ; El-Abyad et al., 1999). Ces plantes ont été utilisées depuis longtemps pour traiter les infections bactériennes (Cushnie et Lamb, 2005). D'autres plantes riches en flavonoïdes ont fait l'objet de plusieurs études, quelques unes sont citées dans le tableau II.

**Tableau II : Quelques groupes de flavonoïdes antibactériens et leurs sources végétales**

Flavonoïdes	Plantes	Références
Isoflavones	<i>Erythrina latissima</i>	Chacha et al., 2005
Flavanones	<i>Physena madagascariensis</i>	Deng et al., 2000
Favonols	<i>Pongamia pinnata</i>	Simin et al., 2002
Isoflavanones	<i>Swartzia polyphylla</i>	Osawa et al., 1992
Isoflavanes	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Li et al., 1998
Flavones	<i>Artemisia giraldii</i>	Zheng et al., 1996

Il est à noter que les di-hydroxylations des carbones 5,7 du cycle A et les carbones 2',4' ou 2',6' du cycle C dans la structure des flavonoïdes semblent être nécessaires pour l'activité antibactérienne de ces derniers (Cushnie et Lamb, 2005). En effet, plus la structure du flavonoïde est hydroxylée, plus son activité antibactérienne est meilleure (Cowan, 1999).

## 2.3. Activité antibactérienne des quinones

Les quinones possèdent une activité antibactérienne prononcée sur différentes souches bactériennes avec des zones d'inhibition de 20mm à une concentration de 50µg/ml. Leur effet peut être bactéricide ou bactériostatique selon la souche bactérienne testée (Riffel et al., 2003).

## 2.4. Activité antibactérienne des tanins et des coumarines

L'étude réalisée par Kilani et al. (2008), a démontré que les tanins et les coumarines extraits de *Cyperus rotundus* présentent un effet bactéricide sur toutes les souches testées y compris celles à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) et d'autres à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* et *Salmonella enteritidis*). Il est connu que la taille des tanins est un élément déterminant de leurs activités biologiques (Bruneton, 1999).



## 2.5. Mécanismes d'action antibactérienne directe des composés phénoliques

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activité antibactérienne des composés phénoliques restent encore non totalement élucidés. Cependant, leur cible majeure est la membrane plasmique des bactéries, la perturbation de cette dernière aura pour conséquence la perte de ses fonctions biologiques qui s'ensuit par la fuite du contenu cellulaire et évidemment la mort de la bactérie (Cushnie et Lamb, 2005).

Les tanins sont connus comme inhibiteurs des microorganismes et d'enzymes. Cette inhibition provient de leur capacité à former des complexes avec les protéines (Broya *et al.*, 2006). Le degré d'inhibition dépend des type des tanins et du microorganisme; les tanins condensés ont un effet répressif plus important sur l'activité de beaucoup d'enzymes et microorganismes par rapport aux tanins hydrolysables et aux phénols à faibles poids moléculaires (Macleod, 1974 ; Smith *et al.*, 2003).

Les quinones forment des complexes irréversibles avec les acides aminés nucléophiles des protéines ce qui engendre l'inactivation de la protéine et la perte de ses fonctions (Cowan, 1999). Le tableau III résume les différents modes d'action des composés phénoliques.

**Tableau III : Modes d'action antibactérienne des polyphénols (Cowan, 1999; Smith *et al.*, 2003).**

<i>Classes</i>	<i>Exemples</i>	<i>Mécanismes d'action</i>
<i>Quinones</i>	Hypericine	Liaison aux adhésines. Inhibition d'enzymes
<i>Flavonoïdes</i>	Chrysine	Formation des complexes avec la paroi
	Quercetine	Inhibition de l'ADN gyrase
	Sophoraflavone G	Inhibition des fonctions membranaires
	Licochalcones A et C	Inhibition du métabolisme énergétique
<i>Phénols simples et Acides phénols</i>	Catéchol Acide cinnamique	Privation de substrat Perméabilisation de la membrane plasmique
<i>Tanins</i>	Gallotanins Ellagitanins	Liaison aux protéines et adhésines Formation des complexes avec la paroi Inhibition d'enzymes bactériennes Privation de substrat Perméabilisation de la membrane plasmique Chélation des métaux
<i>Coumarines</i>	Coumericine	Inhibition de la synthèse de l'ADN Inhibition de la topoisomerase II Inhibition de l'ADN gyrase

### 3. Polyphénols inhibiteurs des mécanismes de résistance aux antibiotiques

L'effet synergique présent entre les antibiotiques et les extraits phénoliques issus des plantes a été observé depuis longue date, mais les mécanismes moléculaires de ces interactions restent encore ambigus. Des études récentes ont démontré que ces extraits naturels sont capables d'inhiber partiellement ou totalement les systèmes de résistance des souches bactériennes aux antibiotiques (Tiwari et al., 2005 ; Wagner et Ulrich-Merzenich, 2009). Les inhibiteurs les plus étudiés sont les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases et les inhibiteurs des pompes d'efflux.

Les extraits de plusieurs plantes chinoises riches en composés phénoliques ont une activité antibactérienne très prononcée sur les souches MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) connues pour leurs multirésistances vis-à-vis de plusieurs familles d'antibiotiques ( $\beta$ -lactamines, aminosides, fluoroquinolones et macrolides). Trois mécanismes d'action de ces substances ont été mis en évidence : inhibition des topoisomérases bactériennes, inhibition des pompes d'efflux et inactivation des  $\beta$ -lactamases (Zuo et al., 2008).

#### 3.1. Inhibition des $\beta$ -lactamases

Dans l'arsenal de la chimiothérapie antibactérienne, les antibiotiques appartenant à la famille des  $\beta$ -lactamines (caractérisées par la présence du noyau  $\beta$ -lactame indispensable à leur activité) sont les plus largement utilisés par le nombre et la diversité des molécules utilisables (Doucet, 2006). On distingue 04 groupes de molécules au sein de cette famille à savoir : les pénèmes, les pénèmes, les céphèmes et les monolactames auxquels il faut ajouter les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases. Toutes les  $\beta$ -lactamines ont le même mécanisme d'action ; elles bloquent la synthèse du peptidoglycane bactérien en se fixant sur les PLPs (Protéine Liant la Pénicilline), enzymes essentielles de cette synthèse (Courvalin et al., 1990 ; Bryskier, 1999). La spécificité de l'interaction s'explique par une analogie de structure entre une partie de la molécule  $\beta$ -lactamine et le motif acyl-D-alanyl-D-alanine du peptidoglycane en formation (Matagne et al., 1998; Handal et Olson, 2000).

La production d'enzymes inactivatrices, appelées  $\beta$ -lactamases, est le principal mécanisme de résistance des bactéries aux  $\beta$ -lactamines (Handal et Olsen, 2000). Le processus enzymatique repose sur un résidu sérine actif chez les enzymes les plus fréquentes ou sur un ion métallique  $Zn^{++}$  chez les métallo-enzymes. Dans les deux cas, l'inactivation des  $\beta$ -lactamines est due à l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame au niveau de la liaison amide (figure 08) (Livermore, 1998 ; Bush, 1999).

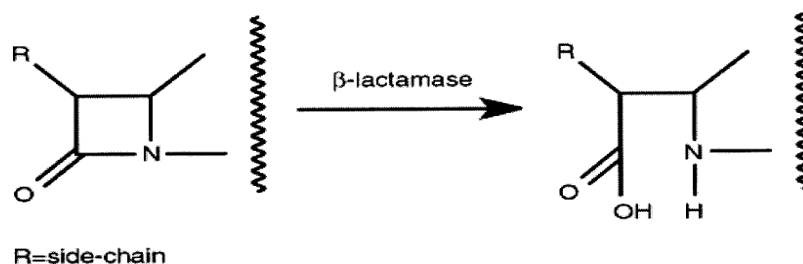


Figure 08 : Hydrolyse du noyau  $\beta$ -lactame par les  $\beta$ -lactamases (Williams, 1999)

Trois inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases sont actuellement utilisés en association avec les  $\beta$ -lactamines pour empêcher leur dégradation par ces enzymes et sont : l'acide clavulanique, le tazobactame et le sulbactame et la recherche des inhibiteurs d'origine végétale est devenue l'objectif de plusieurs études.

De nombreux polyphénols sont capables de se fixer sur les enzymes et de modifier ainsi les équilibres enzymatiques de ces dernières et même d'abolir leurs activités (Cowan, 1999; Yousfi *et al.*, 2006). Les extraits bruts et les produits purifiés des écorces de *Bridelia micrantha* et celle des fruits de *Garcinia lucida* ont une forte activité inhibitrice sur les  $\beta$ -lactamases de différentes classes (A, B, C et D) produites par les entérobactéries. Toutefois l'inhibition de ces enzymes est attribuée à des composés de la classe des phénols (flavonoïdes et anthocyanes) présents dans ces extraits (Gangoué Piéboji, 2007).

L'étude effectuée par Stapleton *et al.* (2004) sur l'épigallocatechine-gallate (EGCG) et l'épicatchine-gallate (ECG) (figure 09), extraits des feuilles de *Camellia sinensis* (le thé) a révélé qu'il existe un effet synergique entre ces composés et les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des souches de *S. aureus*. Des travaux récents, ont démontré que l'EGCG et l'EGC inhibent les  $\beta$ -lactamases de *S. aureus* et restaurent ainsi l'activité des  $\beta$ -lactamines vis-à-vis de ces bactéries (Hemaiswarya, 2008 ; Wagner et Ulrich-Merzenich, 2009).

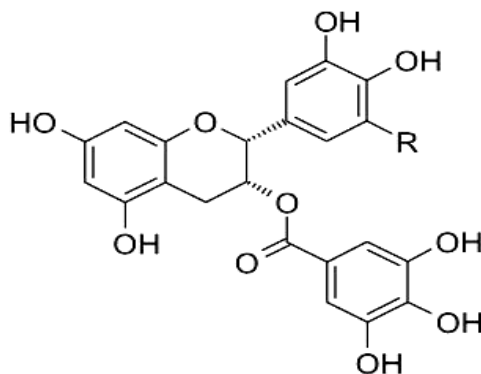


Figure 09 : Structure de l'épicatchine-gallate et de l'épigallocatechine-gallate (Stapleton *et al.*, 2004).  
R=H : Epicatchine-gallate (ECG); R= OH : Epigallocatechine-gallate (EGCG)

### 3.2. Inhibition des pompes d'efflux

Pour lutter efficacement contre l'efflux actif, il faudrait développer des associations d'antibiotiques avec des inhibiteurs atoxiques et présentant des propriétés pharmacocinétiques superposables à celles de l'antibiotique (Cattoir, 2004). Quelques travaux de recherche se sont orientés vers les composés phénoliques des végétaux vue l'efficacité de ces métabolites secondaires sur des bactéries résistantes par efflux actif, ainsi différentes molécules inhibitrices ont été identifiées et caractérisées (Gangoué Piéboji, 2007).

Le 5,6,7-trihydroxyflavone-7-glucuronide, appelé encore la baicaline (Figure 10), présente un effet synergique avec les tétracyclines et les  $\beta$ -lactamines vis-à-vis des souches de *S. aureus*. En fait, la baicaline inhibe le transport actif de la tétracycline en inactivant la pompe TetK; elle inhibe aussi les protéines PBP2a (*Penicillin Binding Protein*) et perturbe la structure du peptidoglycane restaurant ainsi l'activité des  $\beta$ -lactamines (Cushnie et al., 2003).

Le flavonolignane-5'-methoxyhydnocarpine (5'-MHC) (figure 11) ainsi que les isoflavones issus de quelques plantes médicinales sont également inhibiteurs des pompes NorA de *S. aureus* et présentent un effet synergique avec la norfloxacine (Marquez, 2005).

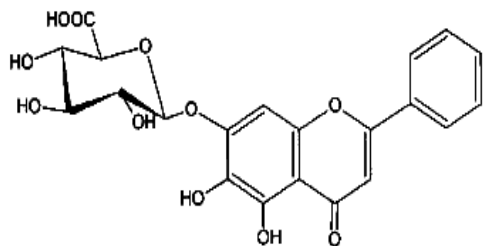


Figure 10 : Structure de la baicaline (Cushnie et al., 2003).

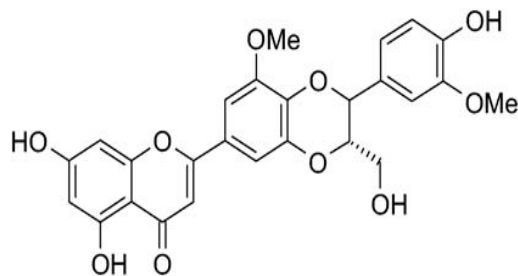


Figure 11 : Structures du 5'-MHC (Marquez, 2005).

### **III. Plantes médicinales sélectionnées**

### III. Plantes médicinales sélectionnées

#### 1. *Artemisia absinthium* L.

- **Noms communs**

- **Anglais** : Wormwood
- **Arabe**: Sedjret meriem
- **Français** : Absinthe, Alvine, armoise amère
- **Kabyle** : Lattey lakhla

- **Description botanique**

L'absinthe est un arbuste vivace de 0.40m à 1m, caractérisé par une tige verte argentée, dressée et cannelée. Ses feuilles sont de couleur grise, verdâtre dessus, blanches dessous, soyeuses, pétiolées, profondément découpées en lanières. Les fleurs sont jaunes, tubuleuses, en capitules petits, globuleux et penchés. Le fruit est un akène ayant une odeur fortement aromatique et une saveur très amère (Delaveau et al., 1985).

- **Taxonomie de l'absinthe (Deysson, 1976)**

<i>Règne</i>	Plantae
<i>Division</i>	Magnoliophyta
<i>Classe</i>	Magnoliopsida
<i>Ordre</i>	Astérales
<i>Famille</i>	Asteraceae
<i>Genre</i>	<i>Artemisia</i>
<i>Espèce</i>	<i>Artemisia absinthium</i> L.



Figure 12: *Artemisia absinthium* L.  
(www.wikipedia.org)

- **Principaux constituants**

Les principaux constituants de l'absinthe sont : huiles essentielles, des terpènes, de l'absinthine, des résines, des tanins, lactones sesquiterpeniques (artabasine, anabsinthine), divers flavonoïdes (flavones, flavanones), des acides phénoliques et des coumarines (Iserin et al., 2001; Valant-Vetschera et al., 2003 ; Wichtl et Anton, 2003).

- **Propriétés pharmacologiques**

L'absinthe est antiseptique, antiparasitaire, anti-inflammatoire, antidépressive, anti-diarrhéique, anti-trypanosomiase, tonique, vermifuge et digestive (Kordali et al., 2006 ; Nibret et Wink, 2010). Elle soulage les maux d'estomac et excelle à soigner les insuffisances du foie (Mességué, 1975). Elle est utilisée traditionnellement pour soigner le diabète et l'hypertension (Tahraoui et al., 2007). L'huile essentielle de l'absinthe est douée d'activités antioxydantes et bactéricides (Lopes-Lutz et al., 2008).

## 2. *Calendula arvensis* L.

### ▪ Noms communs

- **Anglais:** Field marigold
- **Arabe:** Djamir, Razehima
- **Français:** Souci des jardins, Souci, fleur de tous les mois
- **Kabyle:** Maouqel

### ▪ Description botanique

Le Souci des jardins est une plante annuelle herbacée d'origine méditerranéenne, à tige dressée et ramifiée. Les feuilles sont alternées et oblongues. Les fleurs jaunes ou orange vif, simples ou pleines pouvant atteindre 5 à 6mm de diamètre. Le fruit est un akène courbe couvert d'aspérités (Delaveau et al., 1985).

### ▪ Taxonomie du souci des jardins (Deysson, 1976)

<i>Règne</i>	Plantae
<i>Division</i>	Magnoliophyta
<i>Classe</i>	Magnoliopsida
<i>Ordre</i>	Astérales
<i>Famille</i>	Asteraceae
<i>Genre</i>	<i>Calendula</i>
<i>Espèce</i>	<i>Calendula arvensis</i> L.



Figure 13: *Calendula arvensis* L.  
(www.wikipedia.org)

### ▪ Principaux constituants

Le Souci des jardins comporte des terpènes, des mucilages, des résines, des glucosides amers, une huile essentielle, des flavonoides, des acides phénoliques, des carotènes, des saponines, des coumarines, des polysaccharides et des phytostérols (Iserin et al., 2001; Wichtl et Anton, 2003 ; Cetkovic et al., 2004).

### ▪ Propriétés pharmacologiques

Le Souci est employé pour stimuler l'activité hépatique et la sécrétion biliaire, également pour atténuer les spasmes gastriques ou intestinaux. En application externe, le Souci est conseillé pour les plaies rebelles, les ulcères des jambes, les inflammations purulentes et les éruptions cutanées (Iserin et al., 2001 ; Abbasi et al., 2010). *Calendula arvensis* est aussi une plante anti-inflammatoire, antimicrobienne, anti-œdémateuse, antioxydante, antivirale et anti-tumorale (Wichtl et Anton, 2003).

### 3. *Cupressus sempervirens* L.

- **Noms communs**

- **Anglais** : Cypress
- **Arabe** : Sourw
- **Français** : Cyprès vert, Cyprès commun
- **Kabyle** : Azimba

- **Description botanique**

Le cyprès vert est un arbre pouvant atteindre 10 à 12m à feuilles opposées, décussées, triangulaires, étroitement imbriquées sur le rameau. Les fruits sont des cônes formés d'écailles peltées et charnues qui se lignifient progressivement (Quézel et Santa, 1962 ; Bruneton, 1999).

- **Taxonomie du Cyprès vert (Aff et al., 2006)**

<i>Règne</i>	Plantae
<i>Embranchement</i>	Gymnospermes
<i>Classe</i>	Coniféropsidinées
<i>Ordre</i>	Coniférales
<i>Famille</i>	Cupressaceae
<i>Genre</i>	<i>Cupressus</i>
<i>Espèce</i>	<i>Cupressus sempervirens</i> L.

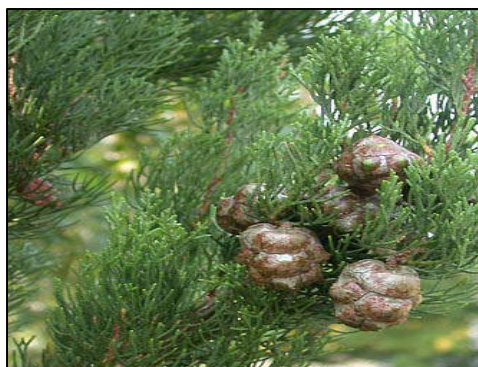


Figure 14: *Cupressus sempervirens* L.  
(www.google.fr)

- **Principaux constituants**

Différents constituants furent isolés de *Cupressus sempervirens* y compris une huile essentielle, des pro-anthocyanidines, des monoterpènes, des diterpènes, des flavonoides, des biflavonoides (exp. Cupressuflavone, Hinokiflavone), des catéchines, des épicatechines, et des glycosides phénoliques (Romani et al., 2002 ; Rawat et al., 2010).

- **Propriétés pharmacologiques**

Les phyto-préparations des fruits et des feuilles de *C. sempervirens* sont antiseptiques, antivirales et anti-inflammatoires. Le cyprès est rapporté comme antispasmodique et diurétique. Il promouvoit la circulation sanguine. Les extraits méthanoliques de cette plante ont un effet hépato-protecteur et sont scavengers des radicaux libres. Son huile essentielle possède une forte activité insecticide, antimicrobienne et antifongique (Tapondjou et al., 2005 ; Rawat et al., 2010).



#### 4. *Ephedra altissima* Desf.

- **Noms communs**

- **Anglais** : Ephedra
- **Arabe**: Balbal
- **Français** : Ephédra, Arbre aux jointures
- **Kabyle** : Thilleguith

- **Description botanique**

L'éphédra est un arbuste de 0.40 à 1m. Ses rameaux verts, opposés ou fasciculés, sont constitués par des articles rigides, striés de 2 à 4cm de long. Les feuilles formées de deux petites écailles opposées, situées à la naissance des rameaux. Les fleurs sont des écailles florales arrondies jaune verdâtre agglomérées en chatons pédonculés (Delaveau et al., 1985).

- **Taxonomie de l'éphédra (Deysson, 1976)**

<i>Règne</i>	Plantae
<i>Embranchement</i>	Gymnospermes
<i>Classe</i>	Chlamydospermes
<i>Ordre</i>	Gnétales
<i>Famille</i>	Ephédraceae
<i>Genre</i>	<i>Ephedra</i>
<i>Espèce</i>	<i>Ephedra altissima</i> Desf.

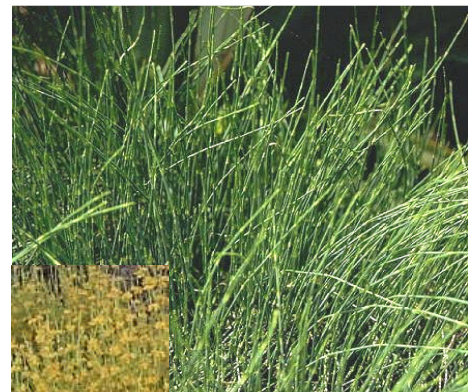


Figure15: *Ephedra altissima* Desf.  
(www.wikipedia.org)

- **Principaux constituants**

L'éphédra est constituée d'alcaloïdes principalement d'éphédrine et de pseudoéphédrine, de vitamine C, de tanins, de saponines, de divers flavonoïdes, une huile essentielle et des sels minéraux (Iserin et al., 2001 ; Ganzera et al., 2005).

- **Propriétés pharmacologiques**

L'éphédra favorise la transpiration, dilate les bronchites, améliore la circulation et soulage les rhumatismes. Elle est aussi antispasmodique. Elle est utilisée pour soigner : coups du froid, fièvres, asthme, insuffisances rénales et rhume des foins (Schaneberg et al., 2003). Elle favorise la perte de poids, diminue l'obésité (Tellez et al., 2004 ; Kim et al., 2008) et soigne les maladies cardiovasculaires (Frishman et al., 2004).

### 5. *Marrubium vulgare* L.

- **Noms communs**

- **Anglais** : Horehound, hoarhound
- **Arabe** : Merriw
- **Français**: Marrube blanc, Bonhomme, Herbe aux crocs
- **Kabyle** : Marrouyeth

- **Description botanique**

Le marrube blanc est une plante vivace qui peut mesurer de 0.30 à 0.80m. Elle est caractérisée par une tige dressée, velue et peu rameuse. Les feuilles sont blanchâtres, arrondies, pétiolées, gaufrées dessus et cotonneuses dessous. Les fleurs blanches en verticilles globuleux avec des calices velues ayant une odeur forte et peu agréable (Delaveau et al., 1985).

- **Taxonomie du Marrube blanc (Deysson, 1976)**

<i>Règne</i>	Plantae
<i>Embranchement</i>	Angiospermes
<i>Classe</i>	Magnoliopsida
<i>Ordre</i>	Lamiales
<i>Famille</i>	Lamiaceae
<i>Genre</i>	<i>Marrubium</i>
<i>Espèce</i>	<i>Marrubium vulgare</i> L.



Figure16: *Marrubium vulgare* L.  
(www.google.fr)

- **Principaux constituants**

Le marrube blanc renferme des flavonoides (lutéoline, apigénine), des terpénoides (marrubiine), des tanins, des phénylpropanoïdes, un principe amer, une huile essentielle, des saponosides et des glucosides (Delaveau et al., 1985 ; Sahpaz et al., 2002 ; Stulzer et al., 2006).

- **Propriétés pharmacologiques**

Le marrube blanc est emménagogue, tonique, expectorant, fébrifuge, neurosédatif, et anti-inflammatoire (Delaveau et al., 1985). Les extraits des parties aériennes de cette plante sont traditionnellement utilisés contre la toux, les insuffisances hépatiques et les affections pulmonaires (Sahpaz et al., 2002 ; Molina-Salinas et al., 2006 ).

## 6. *Mirabilis jalapa* L.

### ▪ Noms communs

- **Anglais**: Four o'clock, Marvel of Peru
- **Arabe** : Nouar laächia
- **Français** : Merveille du Pérou, 18heures

### ▪ Description botanique

La merveille du Pérou est une plante vivace herbacée tubéreuse originaire d'Amérique du Sud, et forme en une saison des massifs de 60cm à 1m de haut et de large. Le feuillage est vert, glabre, assez épais sur des tiges vertes ou rougeâtres. Les feuilles sont opposées, ovales et pointues, à base cordiforme parfois presque triangulaires. Les fleurs sont tubulaires, nocturnes, et parfumées de couleurs variées : blanches, rouges, jaunes, roses, mais également quelquefois panachées de plusieurs couleurs à la fois (Bayer et al., 2005).

### ▪ Taxonomie de la merveille du Pérou (Deysson, 1976)

<i>Règne</i>	Plantae
<i>Division</i>	Magnoliophyta
<i>Classe</i>	Magnoliopsida
<i>Ordre</i>	Caryophyllales
<i>Famille</i>	Nyctaginaceae
<i>Genre</i>	<i>Mirabilis</i>
<i>Espèce</i>	<i>Mirabilis jalapa</i> L.



Figure 17: *Mirabilis jalapa* L.  
(www.gardenbreizh.org)

### ▪ Principaux constituants

Différents constituants de *Mirabilis jalapa* furent isolés à partir de ces parties aériennes et de ses racines y compris quelques roténoïdes, des composés phénoliques, des catéchines, des terpènes, des stéroïdes et des glucosides (Aoki et al., 2008).

### ▪ Propriétés pharmacologiques

La merveille du Pérou est largement utilisée comme laxative chez les peuples du Mexique, et pour le traitement des diarrhées et des douleurs musculaires dans d'autres régions du monde. D'autre part *mirabilis jalapa* est douée d'activités antivirales, antibactériennes, antifongiques et inhibitrices de la synthèse protéique (Oskay et Sari, 2007 ; Aoki et al., 2008 ; Walker et al., 2008).

## 7. *Nerium oleander* L.

### ▪ Noms communs

- **Anglais:** Rose-bay, oleander
- **Arabe:** Deffla
- **Français:** Laurier rose, Nérion, Oléandre
- **Kabyle :** Illili

### ▪ Description botanique

Le laurier rose est une plante ornementale d'origine méditerranéenne. Cet arbrisseau érigé, buissonnant de 2 à 4m de haut possède des feuilles linéaires lancéolées à elliptiques, de 6 à 15cm de long. Les fleurs sont en grappes de couleur rose rouge ayant 3 à 5cm de large. Le fruit en sac, jusqu'à 15cm de long (Bayer et al., 2005 ; Orecchio et Amorello, 2010).

### ▪ Taxonomie du laurier rose (Deysson, 1976)

<i>Règne</i>	Plantae
<i>Division</i>	Magnoliophyta
<i>Classe</i>	Magnoliopsida
<i>Ordre</i>	Gentianales
<i>Famille</i>	Apocynaceae
<i>Genre</i>	<i>Nerium</i>
<i>Espèce</i>	<i>Nerium oleander</i> L.



Figure 18: *Nerium oleander* L.  
(www.google.fr)

### ▪ Principaux constituants

Le laurier rose est composé essentiellement d'huile essentielle, de glycosides (oléandrine, oleandroside, gentiobioside, diginoside), de terpènes et de composés phénoliques (flavonoïdes) (Dang Khanh et al., 2005).

### ▪ Propriétés pharmacologiques

Les propriétés du laurier rose sont connues et utilisées à visées thérapeutiques et suicidaires depuis l'antiquité. Il est toxique dans toutes ses parties vu la présence d'hétérosides cardiotoniques, d'où son utilisation en cas d'insuffisances cardiaques (Bourgeois et al., 2005; Ibrahim et al., 2007; Barbosa et al., 2008). Le laurier rose est utilisé comme remède pour les fièvres, les indigestions, la malaria et la lèpre (DangKhanh et al., 2005). Ses extraits alcooliques sont utilisés pour le traitement de cancer. Le fruit est un remède pour les maladies de la peau. Les extraits du laurier rose possèdent une activité anti-inflammatoire prononcée et calment les douleurs du rhumatisme et de l'eczéma (Erdemoglu et al., 2003).

## 8. *Quercus ilex* L.

### ▪ Noms communs

- **Anglais:** Evergreen oak
- **Arabe:** Bellout
- **Français:** Chêne vert, Chêne toujours vert
- **Kabyle :** Akerrouche

### ▪ Description botanique

Le chêne vert est un arbre originaire du bassin méditerranéen à feuillage persistant pouvant atteindre jusqu'à 25m de haut. L'écorce est de couleur grise. Les feuilles sont ovoïdes à lancéolées, pointues, jusqu'à 7cm de long, dures, dentées, de couleur vert foncé et brillantes sur la face supérieure et à poils gris-vert sur la face inférieure. Les fleurs sont très petites en chatons. Les fruits sont des glands étroits et pointus dans des cupules courtes et écailleuses (Bayer et al., 2005).

### ▪ Taxonomie du chêne vert (Deysson, 1976)

<i>Règne</i>	Plantae
<i>S/Embranchement</i>	Angiospermes
<i>Classe</i>	Magnoliopsida
<i>Ordre</i>	Amentales
<i>Famille</i>	Fagaceae
<i>Genre</i>	<i>Quercus</i>
<i>Espèce</i>	<i>Quercus ilex</i> L.

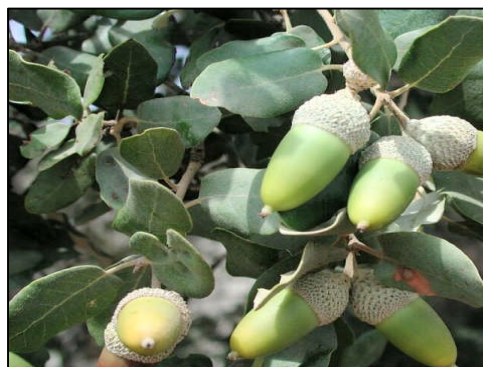


Figure 19: *Quercus ilex* L.  
(www.gardenbreizh.org)

### ▪ Principaux constituants

Les investigations phytochimiques effectuées sur le chêne vert ont démontré que les extraits des feuilles et de l'écorces de cet arbre sont très riches en composés phénoliques, tanins et flavonoïdes glycosidiques (Beltrán-Heredia et al., 2009 ; Brossa et al., 2009 ; Karioti et al., 2010).

### ▪ Propriétés pharmacologiques

Le chêne est doué de propriétés antiseptiques, fébrifuges et toniques. Il est utilisé contre l'angine et les diarrhées (Delaveau et al., 1985). L'écorce de chêne est traditionnellement utilisée par voie externe pour guérir les maladies inflammatoires de la peau, par voie interne en cas de diarrhée aiguës et sur les muqueuses en cas d'inflammations modérées (Bruneton, 1999).

## **Deuxième partie : Expérimentation**

## **IV. Matériel & méthodes**



## 1. Matériel végétal

### ▪ Récolte des plantes

Au cours de ce travail, huit plantes médicinales locales ont été récoltées pour évaluer l'activité antibactérienne de leurs extraits phénoliques. Les plantes médicinales de cette étude ont été sélectionnées sur la base de leur utilisation en médecine traditionnelle et de leur richesse en composés phénoliques. La récolte du matériel végétal a été réalisée durant la période allant du mois de novembre 2009 au mois de janvier 2010, et cela dans deux villages de la wilaya de Bejaia (Algérie) à savoir le village de Benidjellil pour *Mirabilis jalapa* et *Quercus ilex* et celui de Boudjellil pour les six autres plantes (figure 20). Les situations géographiques de ces deux sites de récolte figurent sur le tableau IV.



Figure 20: Carte géographique des sites de récolte des plantes (Encarta, 2009)

Tableau IV : Situation géographique des régions de récolte (Encarta, 2009, www.google.fr)

Région	Altitude (m)	Latitude	Longitude
Benidjellil	590	36° 34' N	4° 47' E
Boudjellil	300	36° 20' N	4° 20' E



### ▪ Identification botanique des plantes sélectionnées

L'identification botanique des plantes récoltées a été réalisée avec l'aide du Dr M. SAHNOUNE, Maître de conférence au département de Biologie des Organismes et de la Population (BOP), et en se référant aux ouvrages de Quézel et santa, (1962) et (1963). Les résultats de cette identification sont donnés sur le tableau V.

**Tableau V: Identification botanique des plantes**

<i>N°</i>	<i>Famille botanique</i>	<i>Plante</i>	<i>Nom commun</i>
01	Asteraceae	<i>Artemisia absinthium</i>	Absinthe
02	Asteraceae	<i>Calendula arvensis</i>	Souci des jardins
03	Cupressaceae	<i>Cupressus sempervirens</i>	Cyprès vert
04	Ephedraceae	<i>Ephedra altissima</i>	Ephédra
05	Lamiaceae	<i>Marrubium vulgare</i>	Marrube blanc
06	Nyctaginaceae	<i>Mirabilis jalapa</i>	Merveille du Pérou
07	Apocynaceae	<i>Nerium oleander</i>	Laurier rose
08	Fagaceae	<i>Quercus ilex</i>	Chêne vert

### ▪ Préparation et conservation du matériel végétal

Le matériel végétal est débarrassé des débris, lavé à l'eau est séché à l'air libre, à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant une dizaine de jours. Toutes ces opérations permettent de pallier la dégradation des composés phénoliques présents.

Bien séchées, les parties étudiées des plantes, représentées sur le Tableau VI, sont réduites en poudre assez fine à l'aide d'un broyeur électrique. Cette dernière est tamisée pour obtenir des particules de tailles plus ou moins homogènes. La poudre ainsi obtenue est conservée dans des bocaux hermétiquement fermés à l'abri de la lumière et de l'humidité en vue d'une utilisation ultérieure.

Tableau VI : Parties utilisées des plantes

N°	Plantes	Parties utilisées
01	<i>Artemisia absinthium</i>	Feuilles
02	<i>Calendula arvensis</i>	Parties aériennes (Feuilles, tiges et fleurs)
03	<i>Cupressus sempervirens</i>	Feuilles
04	<i>Ephedra altissima</i>	Tiges et feuilles
05	<i>Marrubium vulgare</i>	Tiges et feuilles
06	<i>Mirabilis jalapa</i>	Parties aériennes (Feuilles, tiges et fleurs)
07	<i>Nerium oleander</i>	Feuilles
08	<i>Quercus ilex</i>	Feuilles

## 2. Préparation des extraits phénoliques

Nous avons utilisé pour cette étude, une méthode d'extraction solide-liquide. Le protocole d'extraction des composés phénoliques est celui décrit par **Falleh et al. (2008)**, avec quelques modifications (figure 21), et consiste en la macération de 10g de poudre végétale sèche dans 100ml de méthanol pur pendant 30 minutes sous agitation à température ambiante et à l'obscurité (la fiole de macération a été enveloppée par du papier Aluminium).

Les extraits ont été conservés pendant 24h à 4°C, ensuite ils ont été filtrés (papier Whatman N°5) et concentrés par évaporation sous pression réduite à 40°C à l'aide d'un rotavapeur (BÜCHI Rotavapor R-200). Enfin, les résidus secs obtenus ont été récupérés dans du Diméthylsulfoxyde (DMSO) à raison de 100mg/ml. Les extraits ainsi préparés en été conservés à 4°C.

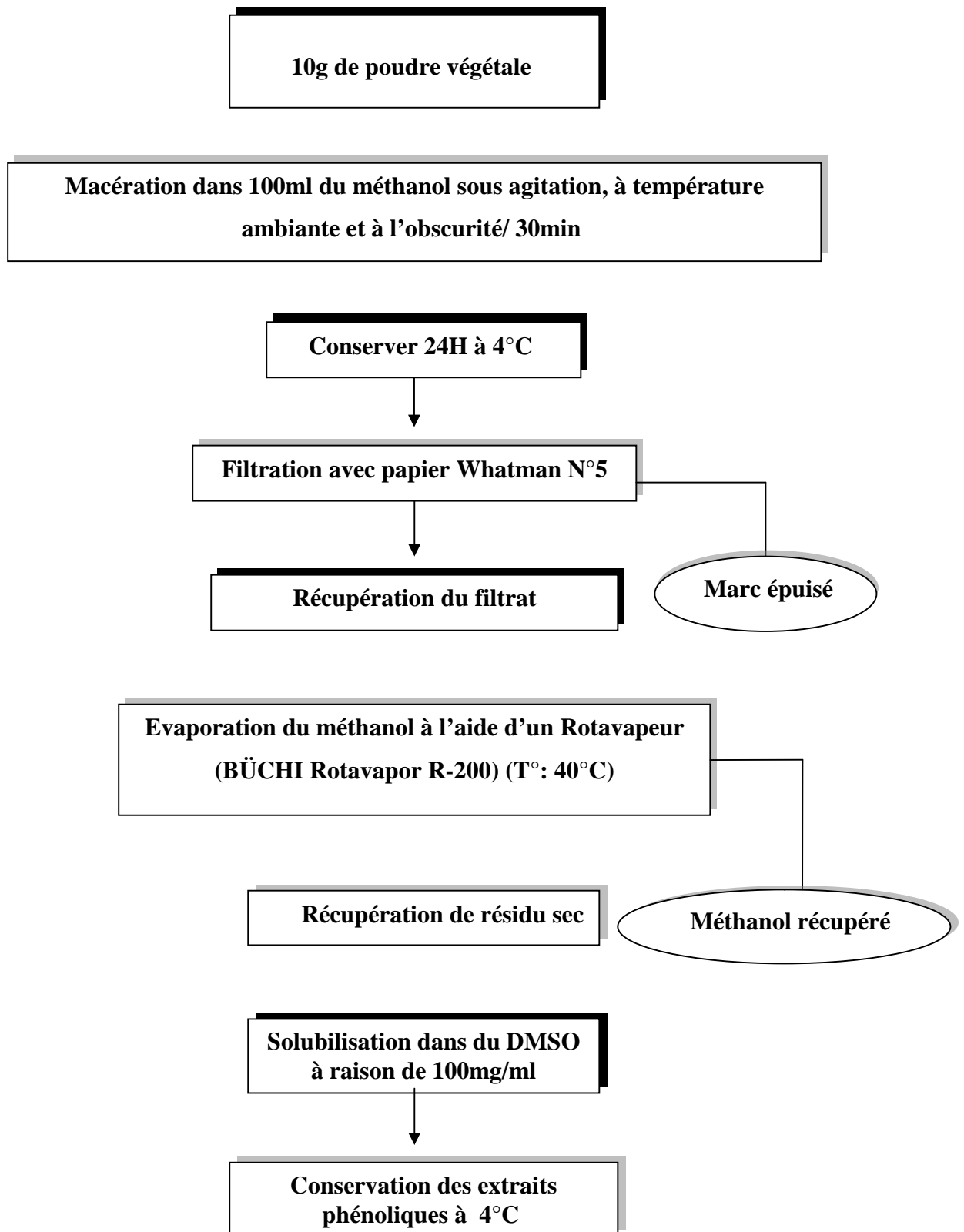


Figure 21 : Protocole d'extraction des composés phénoliques (Falleh et al., 2008)

### 3. Calcul des rendements de l'extraction

Le rendement d'extraction est défini comme étant le rapport entre le poids de l'extrait sec obtenu après évaporation du solvant et le poids de la poudre végétale traitée. Le rendement d'extraction exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante (Bssaibis et al., 2009) :

$$R\% = [(P_1 - P_0)/P] \cdot 100$$

Où : **R** : rendement de l'extraction en %.

**P<sub>1</sub>** : poids du ballon avec extrait en gramme après évaporation du méthanol.

**P<sub>0</sub>** : poids du ballon vide en gramme.

**P** : poids de l'échantillon initial (poudre végétale) en gramme.

### 4. Dosage des polyphénols totaux

Dans la présente étude, la teneur en polyphénols totaux des extraits des huit plantes étudiées a été déterminée par spectrophotométrie en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

#### ▪ Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'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 bleu d'oxyde de tungstène et de molybdène. La coloration bleuâtre obtenue est proportionnelle à la quantité des phénols présents (Ribéreau-Gayon, 1968).

#### ▪ Mode opératoire

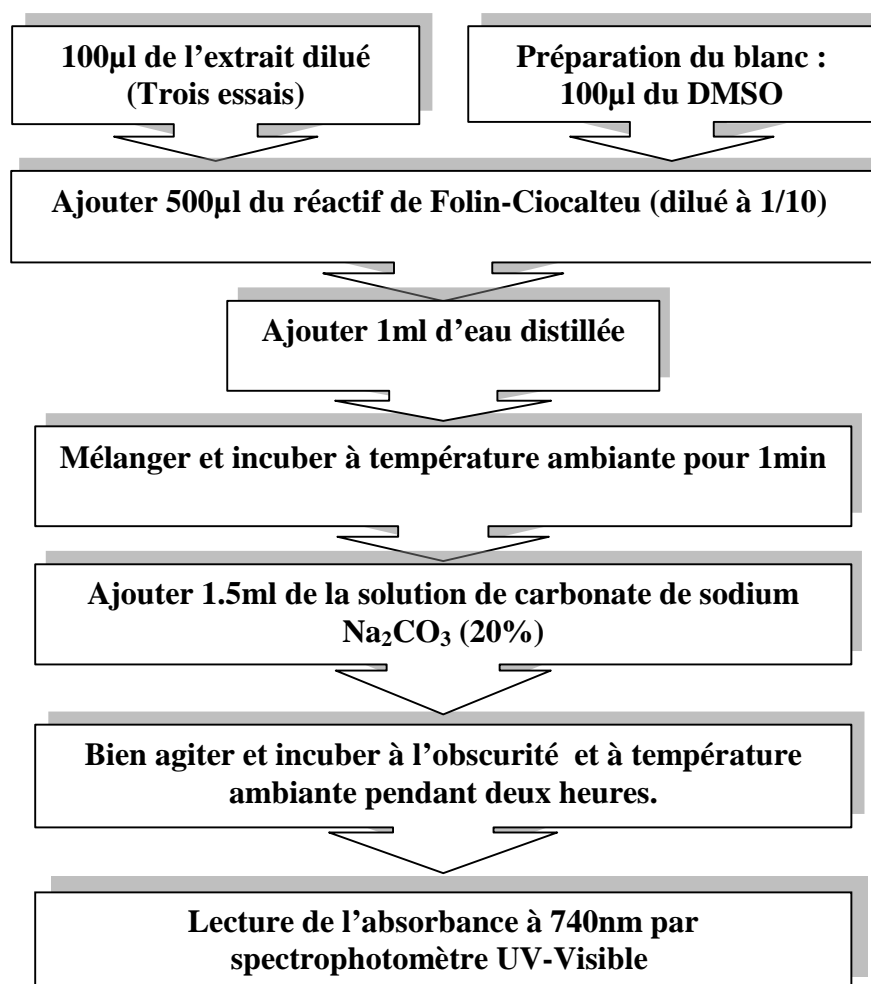
Le protocole de dosage des composés phénoliques totaux utilisé dans notre travail est celui décrit par Hayouni et al. (2007) avec quelques modifications.

Les extraits des plantes ont été dilués pour avoir une absorbance comprise entre 0.8 et 1. Ensuite, 500µl du réactif de Folin-Ciocalteu (dilué à 1/10) et 1ml d'eau distillée ont été ajoutés à 100µl de l'extrait végétal dilué. Les solutions sont bien mélangées et incubées à température ambiante. Après 1min, 1.5ml d'une solution de carbonate de Sodium ( $Na_2CO_3$ ) à 20 % ont été ajoutés. Les mélanges ont été bien agités et incubés à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant deux heures. Enfin, la lecture de l'absorbance des échantillons a été réalisée

à 740nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. Le blanc a été préparé en remplaçant les extraits des plantes par 100µl du DMSO.

Les mêmes solutions ont été préparées en utilisant un standard, l'acide gallique (avec six points de concentrations allant de 0mg/L à 1mg/L) au lieu de l'extrait végétal, pour la réalisation de la courbe d'étalonnage.

Toutes les expériences ont été répétées trois fois et les résultats ont été déterminés par l'équation de régression de la courbe d'étalonnage, et ont été exprimés sous forme de moyennes en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g d'extrait). Le protocole de dosage des composés phénoliques est représenté sur la figure 22.



**Figure 22 : Protocole de dosage des composés phénoliques (Hayouni et al., 2007)**

## 5. Etude de l'activité antibactérienne des extraits phénoliques

### ▪ Souches bactériennes testées

Les extraits méthanoliques des huit plantes étudiées ont été testés vis-à-vis de 04 souches bactériennes de références appartenant à l'ATCC (*American Type Culture Collection*) (Tableau VII).

**Tableau VII : Caractéristiques des souches bactériennes étudiées**

Code	Souche bactérienne	Gram
ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>	-
ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i>	+
ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
ATCC 43300	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	+

MRSA : Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

### ▪ Stérilisation des extraits phénoliques

Les extraits phénoliques sont stérilisés par microfiltration sous vide à l'aide d'un dispositif de microfiltration de marque NAHITA, en utilisant des membranes de microfiltration stériles ayant des pores de 0,22µm de diamètre. Les extraits phénoliques stériles ont été conservés dans des flacons stériles et hermétiquement fermés à 4°C.

### ▪ Préparation des inocula

Les souches bactériennes ont été ré-isolées sur gélose nutritive. Quelques colonies ont été prélevées d'une culture de 18 à 24 heures et ont été diluées dans 5ml d'eau physiologique stérile. Les suspensions bactériennes ont été ajustées par spectrophotométrie pour obtenir un inoculum de  $10^8$ UFC/ml, ensuite une dilution de  $10^{-1}$  a été réalisée (Nayemulla et al., 2006).

### ▪ Réalisation des tests d'activité antibactérienne

Les activités antibactériennes des différents extraits phénoliques ont été déterminées par la technique de diffusion sur gélose Mueller-Hinton. Le mode opératoire utilisé est celui décrit par Dickson *et al.* (2006) avec quelques modifications. Les milieux (gélose Mueller-Hinton) ont étéensemencés par écouvillonnage par des inocula bactériens standardisés ( $10^7$ UFC/ml). Des disques stériles de papier filtre ayant un diamètre de 6mm ont été déposés aseptiquement sur la géloseensemencée et ont été immédiatement imprégnés par une quantité d'extrait phénolique ayant une concentration de 100mg/ml. Deux séries de tests antibactériens ont été réalisées : l'une à 20µl d'extrait végétal et l'autre à 50µl (soit 2mg ou 5mg d'extrait sec par disque).

Le contrôle négatif est représenté par des disques contenant les mêmes quantités (20 ou 50µl) de DMSO. Des disques d'antibiotiques auxquelles les souches sont sensibles ont été utilisés comme contrôles positifs, ces derniers ont été déterminés après réalisation des antibiogrammes standard pour les quatre souches testées (Tableau VIII).

**Tableau VIII : Antibiotiques utilisés comme contrôles positifs**

Code	Souche bactérienne	Antibiotique	Abréviation	Charge du disque
ATCC 25922	<i>E. coli</i>	Imipinème	IMP	10µg
ATCC 25923	<i>S. aureus</i>	Kanamycine	K	30µg
ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i>	Norfloxacine	NOR	10µg
		Ciprofloxacine	CIP	5µg
ATCC 43300	<i>S. aureus</i> MRSA	Tétracycline	TET	30µg
		Ofloxacine	OFX	5µg

MRSA : Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

Les boîtes de Pétriensemencées ont été incubées à 37°C pendant 24h. L'activité antibactérienne des extraits phénoliques a été évaluée par mesure des diamètres des zones d'inhibition formées autour des disques en prenant en compte le diamètre du disque. Toutes les manipulations ont été effectuées sous conditions stériles et refaites deux fois. Les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes.

## 6. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des extraits phénoliques

L'aspect qualitatif du pouvoir antimicrobien est souvent complété par une approche quantitative qui est la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). La CMI est la plus faible concentration de la substance pouvant inhiber toute culture bactérienne visible à l'œil nu après 18 à 24h heures de culture à 37°C.

Pour déterminer les CMI des extraits des huit plantes étudiées, la méthode de dilution sur gélose a été utilisée. Les extraits des plantes ont été dilués dans du DMSO pour obtenir une série de onze dilutions pour avoir des concentrations comprises entre 0.048 et 50mg/ml. Ensuite, 50µl de chaque extrait dilué ont été mis dans des puits (6mm de diamètre) réalisés sur boîtes de Pétri contenant une gélose Mueller-Hinton préalablement ensemencée par des suspensions de 10<sup>7</sup>UFC/ml des quatre souches bactériennes citées précédemment. Enfin, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h. Tous les tests ont été refaits deux fois. Les CMI ont été déduites après mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des puits et les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes.

## 7. Tests d'inhibition des β-lactamases par les extraits phénoliques

Dans cette partie du travail, nous allons tester la capacité des extraits phénoliques, obtenus précédemment à partir des huit plantes, à inhiber les β-lactamases produites par une souche bactérienne pathogène: *Acinetobacter baumannii*.

### ▪ Caractéristiques de la souche d'*Acinetobacter baumannii*

Les β-lactamases ayant servi pour la présente étude ont été extraites d'une souche bactérienne d'*Acinetobacter baumannii*. Cette dernière fut isolée à partir d'un prélèvement urinaire effectué à l'hôpital de Tizi-Ouzou en 2007.

*Acinetobacter baumannii* est une espèce bactérienne à Gram négatif fréquemment impliquée dans les infections nosocomiales. Il s'agit d'un pathogène opportuniste qui peut être responsable d'infections sévères malgré sa faible virulence, en particulier chez les patients immunodéprimés. Depuis une trentaine d'années, la résistance d'*A. baumannii* aux antibiotiques n'a cessé d'augmenter et des épidémies intra hospitalières dues à des souches multirésistantes sont régulièrement rapportées (Mansour et al., 2008).



### ▪ Préparation des cellules bactériennes

Avant l'extraction des  $\beta$ -lactamases, quelques colonies sont prélevées d'une culture de 24h à 37°C de la souche d'*A. baumannii* et sont ensemencées dans 100ml de bouillon nutritif dans des flacons de 500ml. Ensuite, une solution d'oxacilline (2,45mM) est ajoutée. La culture est incubée pendant une nuit à 37°C sous agitation (Reading et Cole, 1977 ; Simpson et al., 1980). Après incubation, la culture bactérienne est centrifugée à 4500g pendant 30min et les cellules ont été lavées deux fois avec du tampon phosphate (25mM, PH 7). Ensuite les  $\beta$ -lactamases ont été extraites.

Une étude de caractérisation biochimique des  $\beta$ -lactamases de cette même souche d'*Acinetobacter baumannii* a été déjà effectuée. Cette étude a révélé que cet extrait enzymatique contient au moins une pénicillinase et une céphalosporinase (Yousfi, 2010). A la lumière de ces résultats et pour déterminer l'effet des extraits phénoliques des plantes étudiées sur ces deux  $\beta$ -lactamases, la pénicilline G et la céfazoline ont été utilisées comme substrats dans les tests iodométriques réalisés avec les extraits de plantes, ensuite les vitesses d'hydrolyse de ces deux antibiotiques ont été déterminées en absence et en présence des extraits phénoliques.

### 7.1. Tests iodométriques

Pour détecter, s'il y a lieu, l'effet inhibiteur des extraits phénoliques sur les  $\beta$ -lactamases isolées précédemment de la souche d'*Acinetobacter baumannii*, des tests de détection de l'activité de ces enzymes sur gel d'iode ont été réalisés.

Le gel d'iode a été préparé en mélangeant 1,5g d'agar et 0,5g d'amidon avec 100ml de tampon phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; 50mM, pH 7) (Novick, 1962). Le mélange ainsi préparé est porté à ébullition trois fois à intervalle de 10 minutes. Après refroidissement, le mélange est additionné de:

- 1.5ml de la solution d'iode-iodure de potassium (2g/53g dans 100ml) ;
- 1ml de la céfazoline (2,26mM) ou de la pénicilline G (2,81mM). A noter que ces deux antibiotiques utilisés comme substrat de  $\beta$ -lactamases ont été sous forme de poudre sodique pour solutions injectables.
- 50 $\mu$ l des différents extraits phénoliques (100mg/ml) issus des huit plantes médicinales étudiées.

Les mélanges ainsi préparés ont été versés immédiatement dans des boîtes de Pétri. Des puits de 6mm de diamètre ont été réalisés dans les gels et 30µl de l'extrait enzymatique y sont mis. Deux témoins négatifs ont été utilisés: le DMSO et le tampon phosphate.

## **7.2. Mesure de l'activité enzymatique des β-lactamases par spectrophotométrie**

Pour mettre en évidence l'effet des extraits phénoliques sur les β-lactamases, l'activité enzymatique de ces dernières sur la pénicilline G et la céfazoline a été suivie en absence et en présence des extraits phénoliques, et cela en utilisant une méthode spectrophotométrique. L'évolution de la densité optique (DO) des mélanges réactionnels a été suivie en fonction du temps et à différentes longueurs d'ondes. La diminution de l'absorbance indique que l'antibiotique a été dégradé par l'enzyme adéquate.

### **▪ Activité enzymatique des β-lactamases en absence des extraits phénoliques**

50µl de l'extrait enzymatique sont ajoutés à une solution de la pénicilline G (200µM) ou de la céfazoline (100µM) préparées dans du tampon phosphate (25mM, pH 7), pour avoir un volume total de 15ml pour la pénicilline G et de 12ml pour la céfazoline (Fujii *et al.*, 1986). La concentration de l'extrait enzymatique dans le mélange réactionnel final est de 3,066µg/ml.

### **▪ Activité enzymatique des β-lactamases en présence des extraits phénoliques**

L'activité enzymatique des β-lactamases a été mesurée en présence de 50µl de l'un des extraits méthanoliques des trois plantes: *Artemisia absinthium*, *Calendula arvensis* et *Mirabilis jalapa*. La concentration des trois extraits phénoliques était de 100mg/ml. Le choix de ces plantes repose sur le fait que leurs extraits ont révélé une activité inhibitrice vis-à-vis des pénicillinases et des céphalosporinases au même temps (selon les résultats des tests iodométriques effectués précédemment).

La méthode utilisée est celle décrite par Yang *et al.* (2010) avec quelques modifications. L'extrait enzymatique à une concentration de 3.066µg/ml a été incubé avec l'extrait végétal pendant 10min à 30°C. Pour initier la réaction, des solutions de la pénicilline G (200µM) ou de la céfazoline (100µM) sont ajoutées. Le contrôle a été réalisé avec le DMSO au lieu des extraits de plantes.

L'activité enzymatique des  $\beta$ -lactamases a été suivie en absence et en présence des extraits phénoliques des trois plantes pour les premières 10 minutes et les absorbances ont été notées. Les vitesses d'hydrolyse des deux antibiotiques ont été calculées par la loi de *Beer-Lambert* et ont été exprimées en  $\mu\text{mol/L/min}$  (la méthode de calcul est détaillée en annexe 02). Les différentes longueurs d'ondes, les coefficients d'extinctions molaires ainsi que les concentrations des antibiotiques utilisés figurent sur le tableau IX.

**Tableau IX : Longueurs d'ondes, coefficients d'extinction molaire et concentrations des antibiotiques utilisés (Minami et al., 1980 ; Laraki et al., 1999).**

Antibiotiques	Longueur d'onde (nm)	Coefficient d'extinction molaire $\Delta\varepsilon$ ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )	Concentration ( $\mu\text{M}$ )
Pénicilline G	235	-775	200
Céfazoline	263	+771	100

## 8. Analyse statistique

Toutes les données de la présente étude sont représentées sous forme de moyennes de deux ou trois essais. Nous avons comparé les résultats obtenus lors de ce travail en utilisant des tests de comparaison des moyennes (Statistica 5.5). Les différences ont été considérées comme significatives au seuil d'une probabilité calculée  $P < 0,05$ .

## **V. Résultats et discussion**

## 1. Préparation du matériel végétal

D'une première vue, on peut constater que deux de huit plantes sélectionnées pour la présente étude (*Artemisia absinthium* et *Calendula arvensis*) appartiennent à la famille des Astéracées. En effet, cette famille est connue par son utilisation large en ethnopharmacologie vu sa richesse en métabolites secondaires doués d'activité antibactérienne (Canales et al., 2005).

## 2. Rendements de l'extraction

Les rendements des extractions ont été calculés par rapport à la poudre végétale sèche utilisée et sont illustrés sur la figure 23. On constate d'après ces résultats que les rendements d'extraction varient selon l'espèce végétale considérée.

Le meilleur taux d'extraction est enregistré pour *Cupressus sempervirens* (32.84%) alors que les rendements les plus faibles sont obtenus pour *Marrubium vulgare* (5.72%) et *Artemisia absinthium* (7.57%).

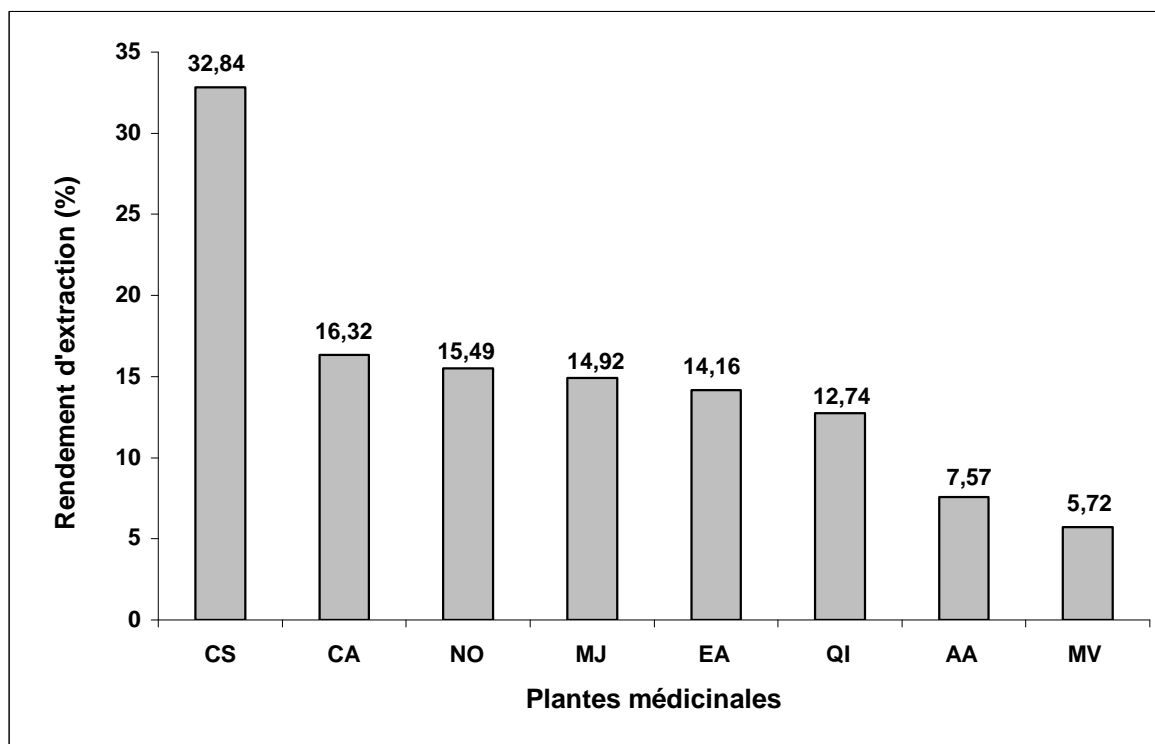


Figure 23 : Rendements de l'extraction des composés phénoliques des plantes étudiées

AA : *Artemisia absinthium*; CA : *Calendula arvensis*; CS : *Cupressus sempervirens*; EA : *Ephedra altissima*; MJ : *Mirabilis jalapa*; MV : *Marrubium vulgare*; NO : *Nerium oleander*; QI : *Quercus ilex*.

**Calzada et al. (2010)** ont travaillé sur les extraits méthanoliques d'*Artemisia absinthium* et ont eu un rendement d'extraction de 10.8%. Ce taux est légèrement supérieur à celui enregistré dans notre étude pour la même plante (7.57%), cela peut être expliqué par la durée de macération qui était d'une semaine pour les auteurs et de 24h seulement dans le présent travail.

Dans leur étude réalisée sur les extraits méthanoliques des fleurs de *Calendula arvensis*, **Cetkovic et al. (2004)** ont obtenu un taux d'extraction de 1.35% ce qui est largement inférieur à notre résultat (16.32%) obtenu pour les parties aériennes de la même plante. A noter que les auteurs ont effectué une macération sous agitation pendant 24h à 25°C avec du méthanol 70%.

Pour les feuilles de *Cupressus sempervirens*, nous avons obtenu un rendement d'extraction de 32.84%. Ce taux est supérieur à celui rapporté par **Ibrahim et al. (2009)** qui est de 6.09% et cela en utilisant le chloroforme comme solvant et à celui rapporté par **Rawat et al. (2010)** qui est de 11.25% pour l'extrait éthanolique des fruits de *C. sempervirens*.

**Kim et al. (2008)** ont effectué une extraction aqueuse à 105°C/70min d'*Ephedra sinica* et ont obtenu un taux d'extraction de 17.4%. Ce taux est légèrement supérieur comparé à celui obtenu pour les extraits méthanoliques d'*Ephedra altissima* dans la présente étude (14.16%).

Nous avons obtenu un taux d'extraction de 5.72% pour les parties aériennes de *Marrubium vulgare*. Ce rendement est proche de celui rapporté pour l'extrait aqueux du méthanol (4.57%) rapporté par **Sahpaz et al. (2002)**. Mais il est beaucoup plus inférieur à celui obtenu par **Matkowski et Piotrowska, (2006)** pour l'extrait méthanolique des parties aérienne de la même plante et qui est de 16.8%. Les auteurs ont effectué une macération des parties aérienne de *M. vulgare* dans du chloroforme pour éliminer la chlorophylle et les matières grasses avant de réaliser la macération dans du méthanol.

Plusieurs études ont souligné que les matières grasses et les phospholipides empêchent la pénétration du solvant dans la matière solide et l'extraction complète des substances végétales, ce qui se reflète négativement sur le taux d'extraction (**Matkowski et Piotrowska, 2006**).

Nous avons eu un rendement d'extraction de 14.92% pour les parties aériennes de *Mirabilis jalapa*. Un taux d'extraction similaire à notre résultat et qui est de 14.25% a été obtenu pour les extraits éthanoliques des feuilles de *M. jalapa* (Walker et al., 2008). Cependant, un taux d'extraction plus faible et qui est de l'ordre de 5.4% a été obtenu pour les extraits méthanoliques des fleurs (Aoki et al., 2008) et des rhizomes (Mohamed et al., 2010) de la même plante. Ceci peut être expliqué par la richesse des parties aériennes (feuilles, tiges et fleurs) en composés polaires par rapport aux rhizomes et aux fleurs de cette plante.

Selon les résultats rapportés par une étude effectuée sur les extraits éthanoliques et aqueux des feuilles de *Nerium oleander*, les rendements d'extraction étaient de 7.5% et 10% respectivement. A noter que la technique de macération à température ambiante a été utilisée (Erdemoglu et al., 2003). Ces résultats sont inférieurs à ceux de notre étude (15.49%) utilisant la macération des feuilles de la même plante dans du méthanol pur.

Pour les feuilles de *Quercus ilex*, un taux d'extraction de 12.74% a été obtenu dans la présente étude, ce taux est proche de celui obtenu pour les extraits aqueux des feuilles de *Quercus resinosa* et qui est 15.98% (Rocha-Guzmán et al., 2009), mais il est largement inférieur à celui obtenu pour les extraits aqueux des fruits de *Quercus infectoria* qui est de 37.8% (Voravuthikunchai et al., 2004).

Dans la présente étude, nous avons opté pour l'extraction des composés phénoliques par macération dans du méthanol pur. Celui-ci possède l'avantage d'être plus facilement éliminé sous vide et donne en plus un meilleur rendement d'extraction (Ribéreau-Gayon, 1968). Ceci est confirmé par une étude récente effectuée sur différents extraits organiques (méthanoliques, éthanoliques et acétoniques) de *Dittrichia viscosa* (Asteraceae) et qui a révélé que le méthanol était le meilleur solvant en terme de rendement d'extraction (Bssaibis et al., 2009).

La technique d'extraction ainsi que le solvant utilisé affectent significativement les rendements d'extraction des métabolites secondaires à partir des plantes. En comparant les techniques d'extraction par macération et par soxhlet et en utilisant différents solvants (eau, acétone, chloroforme ainsi que des mixtures de ces mêmes solvants), Hayouni et al. (2007) ont démontré que la macération donne des rendements plus importants que l'extraction par soxhlet. Les auteurs ont conclu que le rendement d'extraction est meilleur quand celle-ci s'effectue en une seule étape.

Toutefois, le rendement d'extraction dépend de plusieurs autres facteurs y compris la durée d'extraction, la matière végétale brute, la quantité du solvant d'extraction, la température et le pH. La variation de ces facteurs donne naissance à une altération différentielle de la distribution des composés entre les deux phases solide et liquide (Andrensek *et al.*, 2004 ; Hayouni *et al.*, 2007).

### 3. Dosage des polyphénols totaux

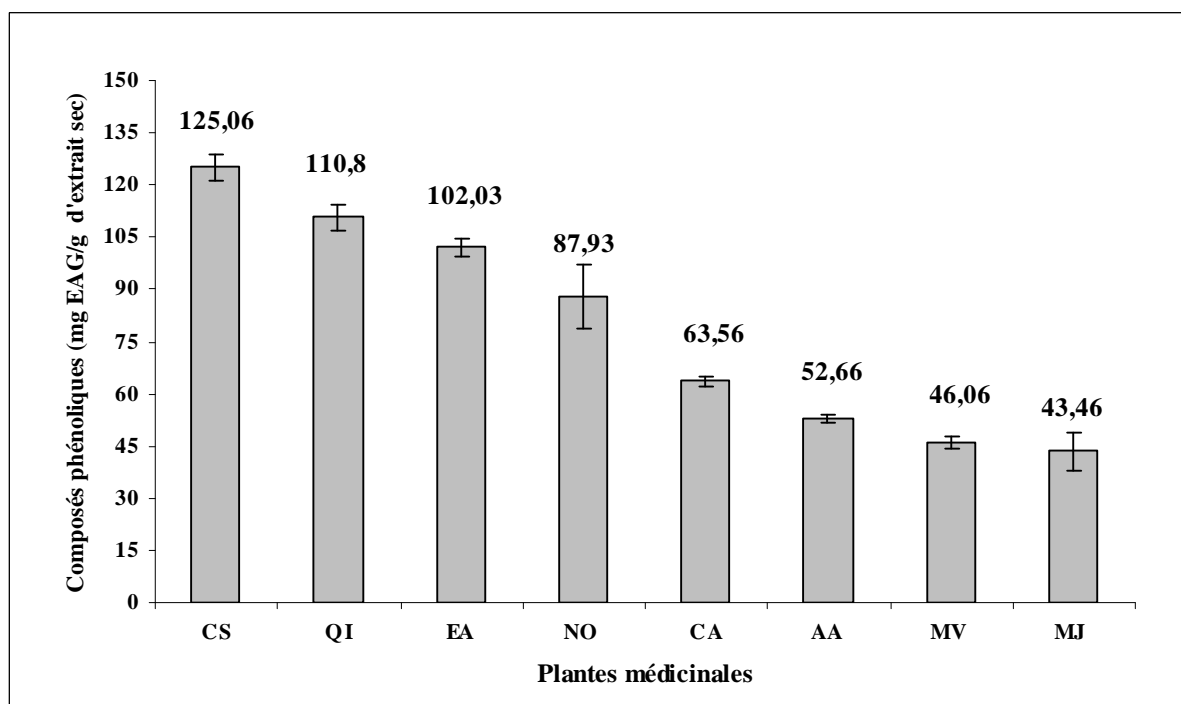
Les teneurs en polyphénols totaux des extraits méthanoliques des plantes ont été déterminées par la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Les résultats ont été déduits de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage (Annexe 01) réalisée à base d'acide gallique et sont exprimés en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g d'extrait). Les résultats sont représentés sur la figure 24.

En général, tout les extraits de cette étude ont présenté des teneurs élevées en composés phénoliques (>20mg EAG/g d'extrait). Cependant ces dernières varient d'une plante à une autre et sont comprises entre 43.46 et 125.06mg EAG /g d'extrait.

La teneur la plus importante est obtenue pour *Cupressus sempervirens* (125.06mg EAG/g d'extrait) suivi de celle de *Quercus ilex* (110.8mg EAG/g d'extrait) et d'*Ephedra altissima* (102.03mg EAG/g d'extrait) alors que les teneurs les plus faibles sont celles de *Marrubium vulgare* (46.06mg EAG/g d'extrait) et de *Mirabilis jalapa* (43.46mg EAG/g d'extrait).

Des variations interspécifiques des teneurs en polyphénols totaux sont notées entre *A. absinthium* et *C. arvensis* appartenant à la même famille (Asteraceae) : *A. absinthium* présente une teneur plus faible (52.66mg EAG/g d'extrait) comparée à celle de *C. arvensis* (63.56mg EAG/g d'extrait).





**Figure 24 : Teneurs en polyphénols totaux des extraits des plantes étudiées**

**AA** : *Artemisia absinthium* ; **CA** : *Calendula arvensis*; **CS** : *Cupressus sempervirens*; **EA** : *Ephedra altissima*; **MJ** : *Mirabilis jalapa*; **MV** : *Marrubium vulgare*; **NO**: *Nerium oleander*; **QI** : *Quercus ilex*.

La teneur en polyphénols totaux obtenue dans la présente étude pour l'extract d'*Artemisia absinthium* est de 52.66mg EAG/g d'extract. Cette teneur est largement inférieure à celle citée par Mahmoudi et al. (2009) et qui est de 194,9mg EAG/g d'extract et elle est supérieure à celle obtenue par Canadanovic-Brunet et al. (2005) qui est de 25.6mg EAG/g d'extract sec.

La teneur de notre extract obtenu à partir des parties aériennes (tiges, feuilles et fleurs) de *Calendula arvensis* (63.56mg EAG/g d'extract) est beaucoup plus importante que celle obtenue dans l'étude de Cetkovic et al. (2004) pour l'extract méthanolique des fleurs de la même plante et qui est de 14.49mg EAG/g d'extract.

Les composés phénoliques sont beaucoup plus abondants dans les feuilles par rapport aux autres parties de certaines espèces de plantes (Ismail et al., 2010). Dans une autre étude effectuée sur 51 espèces végétales, Tawaha et al. (2007) ont eu un taux de phénol totaux de 12.3mg EAG/g d'extract pour l'extract méthanolique de *C. arvensis* ce qui est beaucoup plus inférieur à notre résultat.

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique des feuilles de *Cupressus sempervirens* est de l'ordre de 125.06mg EAG/g d'extrait ce qui est supérieur à celle de l'extrait aqueux de l'éthanol issu des fruits de *Juniperus oxycedrus* (Cupressaceae) contenant 12.66mg EAG/g d'extrait (Djeridane et al., 2006).

L'extrait méthanolique d'*Ephedra altissima* s'est avéré riche en composés phénoliques (102.03mg EAG/g d'extrait). Cette teneur est largement supérieure comparée à la teneur en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique d'*Ephedra sinica* (27.7mg EAG/g d'extrait). Les auteurs ont effectué une macération de la plante dans un mélange méthanol-eau (8 : 2 v/v) pendant 24H sous agitation à 35°C (Song et al., 2010).

Dans la présente étude, le taux de polyphénols totaux de *Marrubium vulgare* est de 46.06mg EAG/g d'extrait, ce qui est largement inférieur à celui cité dans une étude effectuée sur la même espèce botanique macérée dans du chloroforme ensuite dans du méthanol à 60°C, et qui est de 140mg EAG/g d'extrait (Matkowski et Piotrowska, 2006).

Pour les parties aériennes de *Mirabilis jalapa*, un taux de polyphénols totaux équivalent à 43.36mg EAG/g d'extrait a été obtenu, ce résultat est largement faible comparé à celui de Mohamed et al. (2010) qui est de 232.2mg EAG/g d'extrait obtenu pour l'extrait des rhizomes de *M. jalapa*, mais il est supérieur au résultat obtenu par Mekbib, (2007) où la teneur en polyphénols totaux de l'extrait des racines de la même plante était de 28.24mg EAG/g d'extrait. La présence des composés phénoliques dans les racines a pour but de protéger ces dernières des bactéries et des champignons présents dans le sol et d'initier les interactions symbiotiques plantes-microorganismes (Hyder et al., 2002).

Dans notre étude, la teneur de l'extrait méthanolique des feuilles de *Nerium oleander* est de 87.93mg EAG/g d'extrait. Cette teneur est largement plus faible que celle obtenue par Huang et al. (2007) et qui est de 307mg EAG/g d'extrait.

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique des feuilles de *Quercus ilex* est de 110.8mg EAG/g d'extrait. Cette teneur est légèrement supérieure à celle enregistrée par Glyphis et Puttick, (1989) qui est de 90mg EAG/g d'extrait et à celle de l'extrait aqueux des feuilles de *Quercus resinosa* (80mg EAG/g d'extrait) (Rocha-Guzmán et al., 2009). Cependant elle reste inférieure à la teneur en phénols totaux de l'extrait éthanolique des feuilles de *Quercus robur* (346mg EAG/g d'extrait) (Almeida et al., 2008) et à celle de l'extrait méthanolique des fruits de *Quercus robur* et de *Quercus cerris* (223 et 229mg EAG/g d'extrait respectivement)

(Rakic et al., 2007). L'utilisation ethnopharmacologique large de *Quercus ilex* est due à sa haute teneur en composés phénoliques et surtout en tanins hydrolysables (Rakic et al., 2007 ; Karioti et al., 2010).

Il est connu que les composés phénoliques se répartissent dans les différents solvants en fonction de leur polarité (Calliste et al., 2001). Sachant que le méthanol est considéré comme solvant de polarité élevée, on peut déduire que les extraits méthanoliques sont riches en composés polaires. Cet effet explique les teneurs assez élevées en polyphénols totaux enregistrées pour nos extraits.

En général, la teneur en phénols totaux ainsi que la nature des composés présents dans l'extrait végétal sont fortement influencées par le type de solvant d'extraction et la durée de l'extraction. Comme elles varient aussi selon la méthode d'extraction utilisée et la matière brute (poudre végétale).

L'extraction des polyphénols est directement liée à la compatibilité du composé avec le système de solvants utilisé et répond au principe « *like dissolves like* ». Un temps d'extraction trop long réduit les teneurs de l'extrait en polyphénols. Des températures élevées, mais ne dépassant pas 65°C, augmentent la perméabilité des membranes plasmiques des cellules végétales ce qui augmente les coefficients de diffusion et favorise ainsi la libération des polyphénols. Cependant les hautes températures ne sont pas convenables pour tout les types de composés phénoliques (Hayouni et al., 2007; Thoo et al., 2010). Le taux des polyphénols totaux des extraits est aussi influencé par le génotype de la plante (Lombardo et al., 2010 ).

La teneur de l'extrait en composés phénoliques est aussi influencée par le prétraitement de l'échantillon (dégraissage, dimension des particules après broyage, etc.) et le ratio solvant/poudre végétale. La réduction des dimensions des particules augmente la surface disponible pour le transfert des masses et accroît ainsi les rendements d'extraction (Spigno et al., 2007).

Les phospholipides interfèrent avec l'extraction des composés phénoliques hydrophiles et la teneur des phénols dans les extraits décline en augmentant la concentration en phospholipides (Koprivnjak et al., 2010).

L'évaluation du contenu en polyphénols totaux dans divers organes et tissus d'une plante peut-être un indicateur très pertinent des changements d'états dus aux différentes conditions environnementales ou une réponse à des conditions de traitement particulier. La méthode d'évaluation du contenu en polyphénols totaux utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu donne des résultats fiables et reproductibles. Elle reste néanmoins une méthode analytique destructive (prise d'échantillon, réalisation d'un extrait, etc.) qui bien qu'optimisée demande la mise en oeuvre de nombreuses manipulations (Boizot et Charpentier, 2006).

#### **4. Activité antibactérienne des extraits des plantes sélectionnées**

La technique de diffusion sur gélose Mueller-Hinton a été utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques issus des huit plantes médicinales et cela avec 20 et 50µl d'extrait végétal (100mg/ml) vis-à-vis de quatre souches bactériennes de référence. Les résultats sont représentés sur les figures 25 et 26 et le tableau X. Les photographies des boîtes de Pétri sont représentées sur les figures 27 et 28.

D'après les résultats obtenus dans la présente étude, on note que les huit extraits phénoliques possèdent une activité antibactérienne sur une ou plusieurs souches testées (diamètres des zones d'inhibition supérieurs à 10mm), cependant l'efficacité de ces extraits diffère significativement selon les souches bactériennes considérées ( $P < 0.05$ ).

Des différences significatives de l'effet antibactérien des extraits ont été notées entre quelques espèces botaniques, par exemple entre *Artemisia absinthium* et *Quercus ilex* ( $P=0.02$ ); *Cupressus sempervirens* et *Marrubium vulgare* ( $P=0.01$ ); etc. Le DMSO utilisé comme témoin n'a montré aucun effet antibactérien sur les quatre souches bactériennes testées.

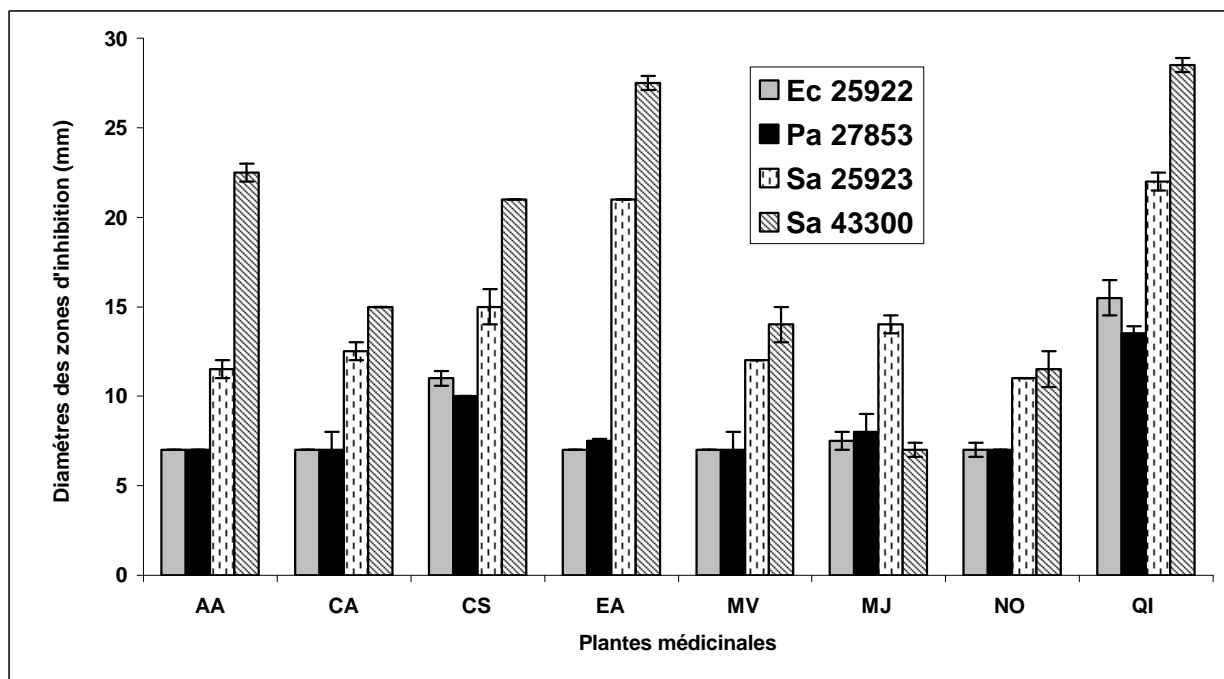


Figure 25 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits phénoliques avec 20µl d'extrait

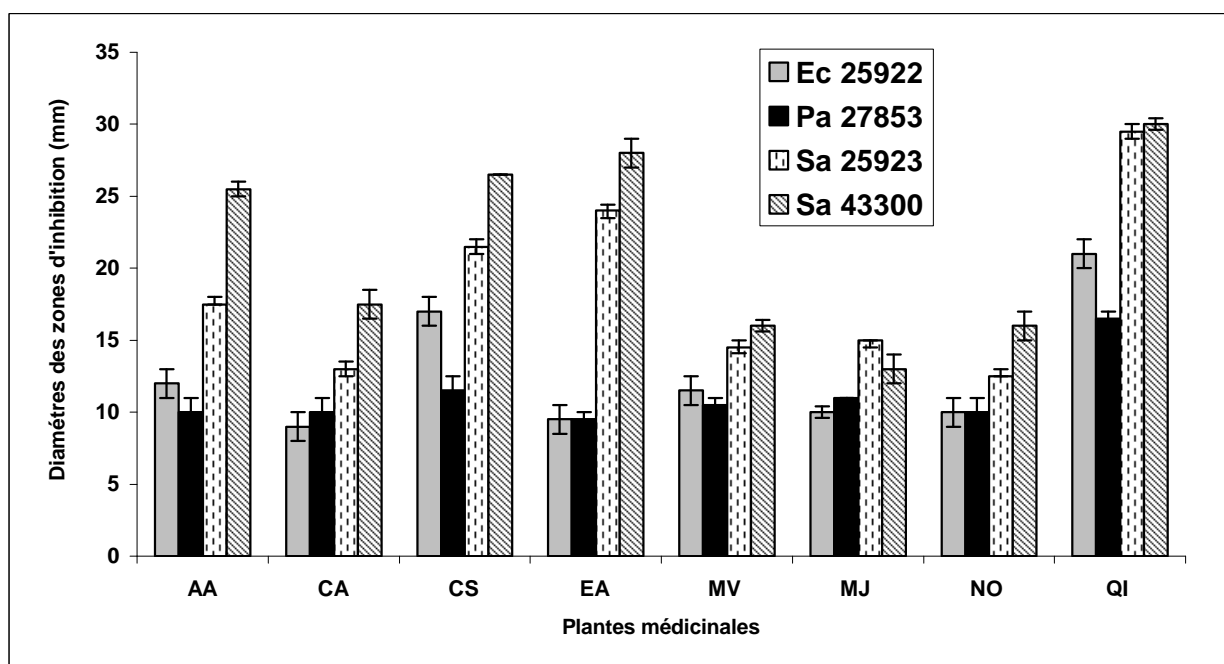


Figure 26 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits phénoliques avec 50µl d'extrait

**Légende :** AA : *Artemisia absinthium*; CA : *Calendula arvensis*; CS : *Cupressus sempervirens*; EA : *Ephedra altissima*; MJ : *Mirabilis jalapa*; MV : *Marrubium vulgare*; NO : *Nerium oleander*; QI : *Quercus ilex*. Ec 25922 : *E. coli* ATCC 25922, Sa 25923 : *S. aureus* ATCC 25923, Pa 27853 : *P. aeruginosa* ATCC 27853, Sa 43300 : *S. aureus* ATCC 43300.

Tableau X: Diamètres des zones d'inhibition des extraits phénoliques des plantes étudiées.

Plantes	Souches bactériennes	Diamètres des zones d'inhibition (mm)		
		Avec 20µl	Avec 50µl	C+
<i>Artemisia absinthium</i>	<i>E. coli</i> 25922	7±00	12±01	25.5±0.5
	<i>S. aureus</i> 25923	11.5±0.5	17.5±0.5	29±00
	<i>P. aeruginosa</i> 27853	7±00	10±01	31±00
	<i>S. aureus</i> 43300	22.5±0.5	25.5±0.5	34.5±0.5
<i>Calendula arvensis</i>	<i>E. coli</i> 25922	07±00	09±01	25.5±0.5
	<i>S. aureus</i> 25923	12.5±0.5	13±0.5	29±00
	<i>P. aeruginosa</i> 27853	07±01	10±01	31±00
	<i>S. aureus</i> 43300	15±00	17.5±01	34.5±0.5
<i>Cupressus sempervirens</i>	<i>E. coli</i> 25922	11±0.4	17±01	25.5±0.5
	<i>S. aureus</i> 25923	15±01	21.5±0.5	29±00
	<i>P. aeruginosa</i> 27853	10±00	11.5±01	31±00
	<i>S. aureus</i> 43300	21±00	26.5±00	34.5±0.5
<i>Ephedra altissima</i>	<i>E. coli</i> 25922	07±00	9.5±01	25.5±0.5
	<i>S. aureus</i> 25923	21±00	24±0.4	29±00
	<i>P. aeruginosa</i> 27853	7.5±0.1	9.5±0.5	31±00
	<i>S. aureus</i> 43300	27.5±0.4	28±01	34.5±0.5
<i>Marrubium vulgare</i>	<i>E. coli</i> 25922	07±00	11.5±01	25.5±0.5
	<i>S. aureus</i> 25923	12±00	14.5±0.5	29±00
	<i>P. aeruginosa</i> 27853	07±01	10.5±0.5	31±00
	<i>S. aureus</i> 43300	14±01	16±0.4	34.5±0.5
<i>Mirabilis jalapa</i>	<i>E. coli</i> 25922	7.5±0.5	10±0.4	25.5±0.5
	<i>S. aureus</i> 25923	14±00	15±00	29±00
	<i>P. aeruginosa</i> 27853	08±01	11±00	31±00
	<i>S. aureus</i> 43300	07±0.4	13±01	34.5±0.5
<i>Nerium oleander</i>	<i>E. coli</i> 25922	07±0.4	10±01	25.5±0.5
	<i>S. aureus</i> 25923	11±00	12.5±0.5	29±00
	<i>P. aeruginosa</i> 27853	07±00	10±01	31.5±00
	<i>S. aureus</i> 43300	11.5±01	16±01	34.5±0.5
<i>Quercus ilex</i>	<i>E. coli</i> 25922	15.5 ±01	21±01	25.5±0.5
	<i>S. aureus</i> 25923	22±0.5	29.5±0.5	29±00
	<i>P. aeruginosa</i> 27853	13.5±0.4	16.5±0.5	31±00
	<i>S. aureus</i> 43300	28.5 ±0.4	30±0.4	34.5±0.5

- C+ : Contrôles positifs (Antibiotiques). Imipénème pour *E.coli* 25922 ; Kanamycine pour *S. aureus* 25923 ; Ciprofloxacine/Norfloxacine pour *P. aeruginosa* 27853 ; Tétracycline /Ofloxacine pour *S. aureus* 43300.
- Aucune zone d'inhibition n'a été obtenue pour le contrôle négatif (DMSO).

On peut constater des résultats obtenus que les diamètres des zones d'inhibition augmentent avec l'augmentation de la quantité des extraits phénoliques testés. Des zones d'inhibition allant de 7 à 28mm de diamètre ont été obtenues avec 20µl d'extrait alors qu'elles étaient comprises entre 9 et 30mm avec 50µl d'extrait. Des différences significatives entre les zones d'inhibition obtenues avec les deux volumes ont été notées pour toutes les plantes testées ( $P < 0.05$ ). Comme exemple, une zone d'inhibition de 11.5mm a été obtenue avec l'extrait de l'absinthe vis-à-vis de *S. aureus* 25923 à 20µl alors qu'elle était de 17.5mm avec 50µl du même extrait.

Les zones d'inhibition les plus importantes ont été obtenues avec l'extrait des feuilles de *Quercus ilex* vis-à-vis de la souche de *S. aureus* ATCC 43300 (soit 28.5mm avec 20µl d'extrait et 30mm avec 50µl d'extrait). Il est rapporté que *S. aureus* compte parmi les souches bactériennes les plus sensibles aux extraits de plantes (Shahidi Bonjar et al., 2004 ; Melendez et Capriles, 2006).

D'après nos résultats, on constate que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles aux extraits des plantes comparés à celle à Gram négatif. Des zones d'inhibition ne dépassant pas 14mm et 16mm ont été obtenues pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *E. coli* ATCC 25922 respectivement. La même observation fut rapportée par plusieurs études (Hernandez et al., 2003 ; Konning et al., 2004 ; Parekh et Chanda, 2007). Cet effet a été attribué à la présence d'une membrane externe, chez les bactéries à Gram négatif, constituée de phospholipides, de lipopolysaccharide (LPS) et de protéines. Cette membrane externe est ainsi le premier obstacle aux molécules hydrophiles chargées devant pénétrer la bactérie pour la détruire. De la même manière, la densité des sucres et des chaînes latérales du LPS organise un filtre efficace pour les autres molécules (Mann et al., 2000 ; Pagés et Garnotel, 2003).

#### **4.1. Activité antibactérienne d'*Artemisia absinthium***

Avec 20µl d'extrait l'effet de l'extrait de l'absinthe n'a pas d'effet sur *E. coli* et *P. aeruginosa*, alors que son activité est moyenne pour *S. aureus* 25923 et prononcée sur *S. aureus* 43300 (zones d'inhibition de 11.5 et 22.5mm respectivement). Avec 50µl, il a présenté un effet antibactérien appréciable sur toutes les souches testées (zones d'inhibition allant de 12 à 25.5mm). Ces résultats sont bien meilleurs comparés à ceux cités dans quelques études. Les travaux de Canales et al. (2005) ont démontré que l'extrait méthanolique des parties aériennes d'*Artemisia absinthium* (200mg/ml) ne possède aucune activité vis-à-vis des souches de *S. aureus* et d'*E. coli* (ATCC 25922).

Selon **Shan et al. (2007)**, les extraits méthanoliques d'*Artemisia capillaris* et d'*Artemisia caruifolia* (100mg/ml) n'avaient aucun effet sur la souche d'*E. coli* alors que seul l'extrait d'*A. caruifolia* avait une faible activité sur la souche de *S. aureus* avec une zone d'inhibition ne dépassant pas 7mm. A noter que les auteurs ont utilisé 60µl d'extrait par puit.

#### **4.2. Activité antibactérienne de *Calendula arvensis***

L'extrait méthanolique des parties aériennes de *Calendula arvensis* a exhibé une bonne activité sur la souche de *S. aureus* ATCC 43300 (zones d'inhibition de 15mm et de 17.5mm avec 20 et 50µl d'extrait respectivement) et une activité moins importante sur *S. aureus* ATCC 25923 alors qu'il était presque inactif sur les deux souches à Gram négatif (zones d'inhibition  $\leq 10$ mm). Ces résultats concordent avec ceux obtenus par **Shahidi Bonjar et al. (2004)** pour l'extrait méthanolique des fleurs de *Calendula officinalis*. Les auteurs ont rapporté que ce dernier était inactif vis-à-vis de *P. aeruginosa* (PTCC1074) et *E. coli* (PTCC 1330) et il a présenté une zone d'inhibition de 9mm pour *S. aureus* (PTCC 1112), et cela en utilisant 100µl d'extrait (20mg/ml) par puit et des inocula de  $1,5 \cdot 10^6$  cellules/ml. En revanche, **Melendez et Capriles, (2006)** ont rapporté que l'extrait méthanolique de *C. officinalis* n'avait aucun effet sur les souches de *S. aureus* et *E. coli*.

#### **4.3. Activité antibactérienne de *Cupressus sempervirens***

L'extrait méthanolique des feuilles de *Cupressus sempervirens* (Cyprés) possède un bon effet inhibiteur sur les quatre souches testées que ce soit avec 20 ou 50µl d'extrait. Les diamètres des zones d'inhibition sont compris entre 10 et 26.5mm. Ces résultats sont légèrement inférieurs à ceux obtenus par **Hayouni et al. (2007)** avec les extraits aqueux des fruits de *Juniperus phoenicea* (Cupressaceae) vis-à-vis de *P. aeruginosa* ATCC 9027, *S. aureus* ATCC 25923 et *E. coli* ATCC 25922. L'étude de **Ibrahim et al. (2009)** a révélé que l'huile essentielle de *C. sempervirens* n'avait aucun effet sur la souche d'*E. coli* testée et que des zones d'inhibition ayant 11mm de diamètre ont été obtenues vis-à-vis de *S. aureus*. La même observation fut rapportée par **Oussalah et al. (2006)** en testant l'huile essentielle de *C. sempervirens* sur des souches de *Pseudomonas putida*. On constate que l'extrait méthanolique des feuilles de cet arbre est plus efficace sur *P. aeruginosa* comparé à son huile essentielle. L'étude de **Chéraïf et al. (2007)** a démontré que les diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles issues des feuilles de *C. arizonica* étaient de 27mm pour *E. coli* ATCC 25922, de 15mm pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 et de 18mm pour *S. aureus* ATCC 25923 et cela en



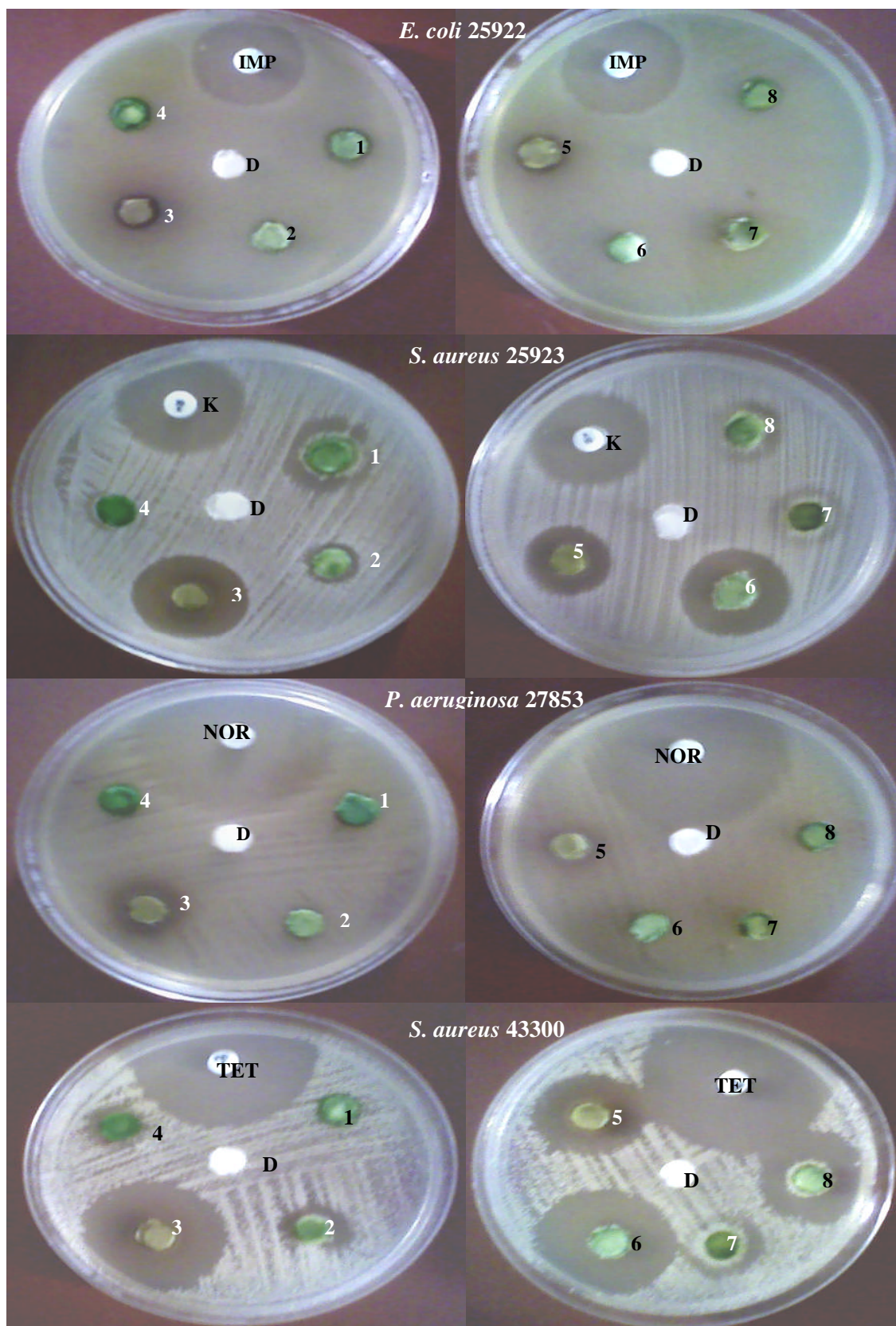
utilisant 20µl d'huile essentielle par disque. Ces résultats sont meilleurs que ceux obtenus pour les extraits méthanoliques de *C. sempervirens* rapportés dans la présente étude.

#### **4.4. Activité antibactérienne d'*Ephedra altissima***

Nos résultats ont révélé que l'extrait méthanolique d'*Ephedra altissima* possède une faible activité antibactérienne vis-à-vis des souches à Gram négatif que se soit avec 20 ou 50µl d'extrait (zones d'inhibition comprises entre 7 et 9.5mm). En revanche, un effet antibactérien prononcé a été observé sur les deux souches de *S. aureus* et cela avec les deux volumes d'extrait (zones d'inhibition allant de 21 à 28mm). Ces résultats sont proches de ceux rapportés par **Shahidi Bonjar, (2004)** où l'extrait méthanolique d'*Ephedra intermedia* a présenté un effet inhibiteur sur les souches de *P. aeruginosa* et *S. aureus* avec des zones d'inhibition de 10mm et 16mm respectivement, mais il n'avait pas d'activité sur *E. coli*.

#### **4.5. Activité antibactérienne de *Marrubium vulgare***

Notre travail a montré que l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* a présenté une bonne activité sur les deux souches de *S. aureus* (zones d'inhibition comprises entre 12 et 16mm). Les diamètres des zones d'inhibitions de nos extraits sont moins importants sur les bactéries à Gram négatif (07 et 11.5mm pour *E. coli* ATCC 25922 ; 07 et 10.5mm pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 avec 20 et 50µl respectivement). En général, les résultats de certaines études effectuées sur l'activité antibactérienne des extraits de *M. vulgare* consultés dans la bibliographie sont faibles comparés à ceux de la présente étude. Par exemple, une étude effectuée en Turquie par **Sarac et Ugur, (2007)** a révélé que l'extrait éthanolique de *M. vulgare* (20µl d'extrait par disque) n'a aucune activité sur toutes les souches bactériennes testées y compris celles à Gram positif (exp. *S. aureus* ATCC 25923) et celles à Gram négatif (exp. *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853) (inocula de 10<sup>8</sup>UFC/ml). Les travaux de **Masoodi et al. (2008)** ont démontré que l'extrait méthanolique de *M. vulgare* (100mg/ml) n'avait aucune activité sur les souches d'*E. coli* MTCC 443 et de *P. aeruginosa* MTCC 424, et a exhibé une faible activité sur la souche de *S. aureus* MTCC 740. **Al-Bakri et Afifi, (2007)** ont démontré que l'extrait méthanolique des feuilles et des fleurs de *M. vulgare* n'avait aucune activité sur *S. aureus* (ATCC 6538P) et celle *E. coli* (ATCC 8739).



**Figure 27 : Photographies de l'activité des extraits sur les souches bactériennes testées (20µl d'extrait)**

**1 : *Mirabilis jalapa* ; 2 : *Marrubium vulgare* ; 3 : *Quercus ilex* ; 4 : *Nerium oleander* ; 5 : *Cupressus sempervirens* ; 6 : *Ephedra altissima* ; 7 : *Calendula arvensis* ; 8 : *Artemisia absinthium* ; D : DMSO ; IMP : Imipénème ; K : Kanamycine ; NOR : Norfloxacine ; TET : Tétracycline.**



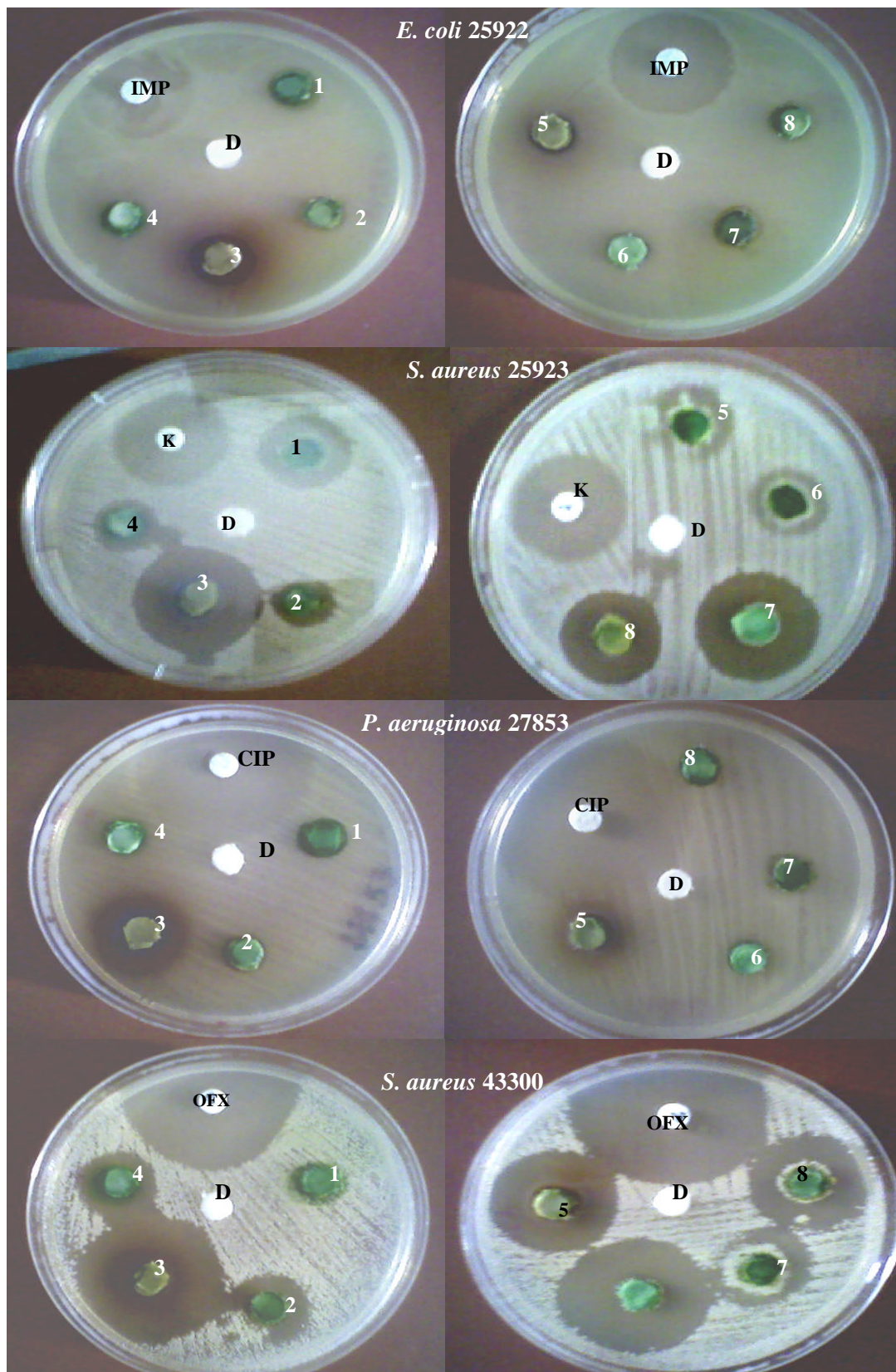


Figure 28 : Photographies de l'activité des extraits sur les souches bactériennes testées (50µl d'extrait)

1 : *Mirabilis jalapa* ; 2 : *Marrubium vulgare* ; 3 : *Quercus ilex* ; 4 : *Nerium oleander* ; 5 : *Cupressus sempervirens* ; 6 : *Ephedra altissima* ; 7 : *Calendula arvensis* ; 8 : *Artemisia absinthium* ; D : DMSO ; IMP : Imipénème ; K : Kanamycine ; CIP : Ciprofloxacine ; OFX : Ofloxacine.

#### **4.6. Activité antibactérienne de *Mirabilis jalapa***

L'extrait méthanolique des parties aériennes (tiges, feuilles et fleurs) de *Mirabilis jalapa* (Merveille du Pérou) a présenté une activité médiocre sur toutes les souches bactériennes testées que ce soit avec 20 ou 50µl d'extrait (zones d'inhibition comprises entre 7 et 13mm) à l'exception de la souche de *S. aureus* ATCC 25923 (zones d'inhibition de 14mm avec 20µl et de 15mm avec 50µl d'extrait). L'étude de **Mohamed et al. (2010)** a révélé que l'extrait méthanolique des rhizomes de *Mirabilis jalapa* (100mg/ml) n'avait pas d'activité sur *S. aureus* et *E. coli* par contre il a présenté un bon effet antibactérien sur *P. aeruginosa* (zone d'inhibition de 15mm) et cela en utilisant des volumes de 50µl par disque. Ces résultats sont différents de ceux de la présente étude où l'extrait méthanolique de la même plante a présenté une bonne activité sur les deux souches de *S. aureus* et une activité plus faible sur *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *E. coli* ATCC 25922 avec des zones d'inhibition de 11mm et 10mm respectivement.

#### **4.7. Activité antibactérienne de *Nerium oleander***

Dans cette étude, une très faible activité antibactérienne a été présentée par l'extrait méthanolique des feuilles de *Nerium oleander* vis-à-vis des souches de *P. aeruginosa* ATCC 27853 et d'*E. coli* ATCC 25922, les diamètres des zones d'inhibition observés ne dépassent pas 10mm. Les deux souches de *S. aureus* étaient moins résistantes à l'extrait de cette plante avec des diamètres des zones d'inhibition compris entre 11 et 16mm. Ces résultats sont faibles comparés à ceux rapportés par **Hussein et Gorski, (2004)** où l'extrait méthanolique des feuilles de la même plante a présenté une forte activité inhibitrice sur des souches de *S. aureus* et *E. coli* avec des diamètres des zones d'inhibition de 20mm et 22mm respectivement. Les auteurs ont utilisé des volumes de 0.1ml d'extrait par disque.

#### **4.8. Activité antibactérienne de *Quercus ilex***

Dans la présente étude, l'extrait méthanolique des feuilles de *Quercus ilex* s'est avéré le plus efficace présentant un effet inhibiteur très prononcé que ce soit vis-à-vis des souches à Gram positif ou à Gram négatif (zones d'inhibition allant de 13 à 28.5mm avec 20µl d'extrait et de 16.5 à 30mm avec 50µl d'extrait). Cet effet est dû à la richesse de cet extrait en composés phénoliques (**Berahou et al., 2007**). Nos résultats concordent avec ceux rapportés par **Moghadam et al. (2010)** dans leur étude effectuée sur l'activité antibactérienne des extraits de plusieurs plantes médicinales. Les auteurs ont révélé que l'extrait éthanolique de *Quercus Brantii* (150mg/ml) avait une importante activité inhibitrice sur *S. aureus* (zones d'inhibition

allant de 19 à 31mm). Ces valeurs sont approximativement similaires à nos résultats (zones d'inhibition comprises entre 22 et 30mm pour les deux souches de *S. aureus*).

Des résultats plus faibles comparés aux nôtres ont été obtenus pour l'extrait méthanolique des écorces de *Q. ilex* concentré puis ré-extraits par différents solvants (éthyle acétate, butanol et eau). Ces derniers possèdent un effet inhibiteur sur les souches bactériennes testées y compris *S. aureus*, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *E. coli* avec des zones d'inhibition comprises entre 7 et 18mm (Berahou et al., 2007).

Selon une étude réalisée en 2004, les extraits aqueux des fruits de *Quercus infectoria* n'avaient aucun effet inhibiteur sur la souche d'*E. coli* ATCC 25922, alors que leur extrait éthanolique a présenté des zones d'inhibition de 8 à 10mm vis-à-vis de la même souche (2.5mg d'extraits par disque) (Voravuthikunchai et al., 2004). Ces résultats sont faibles comparés à ceux obtenus dans le présent travail où l'extrait des feuilles de *Q. ilex* a présenté un effet antibactérien significatif sur *E. coli* ATCC 25922 avec des diamètres de 15.5mm avec 20µl d'extrait (2mg d'extrait/disque) et de 21mm avec 50µl d'extrait (5mg d'extrait/disque).

Les résultats de notre étude ont montré que l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles de *Quercus ilex* est plus importante que celle de l'extrait des feuilles de *Cupressus sempervirens* et cela malgré que ce dernier contient plus de composés phénoliques. Selon Rakic et al. (2007) l'activité des extraits de plantes ne dépend pas seulement de la teneur en polyphénols totaux mais aussi de types des composés phénoliques présents dans l'extrait. De leur part, Alzoreky et Nakahara (2003) ont rapporté que les extraits des plantes obtenus par du méthanol tamponné contiennent de 1.3 à 34 fois de matière solide par rapport aux autres extraits mais ils n'avaient pas d'activité sur les souches bactériennes testées y compris celles de *S. aureus* et d'*E. coli*. D'après Ksouri et al. (2009), l'activité antibactérienne des polyphénols dépend de la nature des polyphénols, de leurs structures ainsi que de leurs interactions synergétiques. Cet effet est observé aussi pour l'activité antioxydante des extraits de certaines plantes et il est expliqué par le fait que le réactif de Folin-Ciocalteu n'est pas spécifique des polyphénols mais nombreux sont les composés qui interfèrent avec ce réactif, engendrant ainsi de hautes concentrations apparentes en composés phénoliques. Ceci peut expliquer la corrélation équivoque entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité biologique des extraits de quelques espèces de plantes (Tawaha et al., 2007).

Cette activité est aussi influencée par divers facteurs, à savoir : le pH du milieu et sa composition chimique (Rios et Reco, 2007), la nature des souches bactériennes testées, le taux d'inoculum bactérien ainsi que le composé phénolique lui même (Gangoué Piéboji, 2007 ; Obeid et al., 2007). Les résultats d'une étude effectuée sur les extraits de différentes plantes a montré qu'une température allant de 4 à 100°C n'affecte pas l'activité antibactérienne de ces extraits vis-à-vis de toutes les souches testées alors qu'un pH acide (compris entre 2 et 6) diminue l'effet de ces derniers (Salama et Marraiki, 2010).

### 5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La CMI permet de définir la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes aux substances antimicrobiennes (Kablan et al., 2008). Dans la présente étude, seules les CMI des extraits ayant présenté une bonne activité antibactérienne vis-à-vis d'une souche bactérienne donnée furent déterminées. Les résultats obtenus sont représentés sur le tableau XI. On peut noter que la CMI la plus faible a été enregistrée pour *Quercus ilex* vis-à-vis de la souche de *S. aureus* (ATCC 43300) et qui est de 0.41mg/ml. On constate que ces CMI diffèrent d'un extrait à l'autre et d'une souche bactérienne à une autre.

**Tableau XI: CMI des extraits phénoliques étudiés (mg/ml)**

Code	Souche	AA	CA	CS	EA	MV	MJ	NO	QI
25922	<i>E. coli</i>	>50	>50	7.03±0.4	>50	>50	>50	>50	0.87±0.18
25923	<i>S. aureus</i>	18±0.25	25±00	0.8±0.2	0.84±0.2	4.68±0.56	12.5±00	12.5±00	1.66±0.4
27853	<i>P.aeruginosa</i>	>50	>50	3.51±0.7	>50	>50	>50	>50	3.32±0.3
43300	<i>S. aureus</i>	25±00	25±00	6.64±0.5	1.95±0.2	9.37±0.12	>50	25±00	0.41±0.1

**Légende:** AA : *Artemisia absinthium* ; CA : *Calendula arvensis*; CS : *Cupressus sempervirens*; EA : *Ephedra altissima*; MJ : *Mirabilis jalapa*; MV : *Marrubium vulgare*; NO : *Nerium oleander*; QI : *Quercus ilex*.

Les CMI de nos extraits vis-à-vis des souches de *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 et de *P. aeruginosa* ATCC 27853 sont supérieures à celles rapportées pour les extraits de différentes plantes (y compris *Rosmarinus officinalis* et *Salvia officinalis*) testées par Weckesser et al. (2007) vis-à-vis des mêmes souches bactériennes. Les CMI obtenues par les auteurs sont comprises entre 1 et 100µg/ml alors que les nôtres varient de 0.8 à 25mg/ml. En revanche, nos résultats sont meilleurs que ceux obtenus par Nazaruk et Jakoniuk, (2005) où les CMI des extraits méthanoliques des feuilles de *Cirsium rivulare* (Asteraceae) étaient de 25mg/ml pour *E. coli* ATCC 25922 et de 12.5mg/ml pour *P. aeruginosa*.

Selon l'étude d'Alzoreky et Nakahara (2003), les CMI de l'extrait méthanolique d'*Artemisia absinthium* étaient de 2,64mg/ml vis-à-vis de *S. aureus* (KR-103) et supérieures à 2.64mg/ml pour *E. coli* (B-1030) (inocula de 10<sup>6</sup>UFC/ml). Dans la présente étude, la CMI de l'absinthe vis-à-vis d'*E. coli* n'a pas été déterminée mais c'est claire qu'elle sera supérieure à celle de *S. aureus* qui est de 18mg/ml, donc nos résultats sont beaucoup plus supérieurs à ceux des travaux cités précédemment.

Les CMI de l'extrait de *Marrubium vulgare* vis-à-vis des deux souches de *S. aureus* obtenues dans la présente étude sont largement supérieures à celle des extraits méthanoliques de *Thymus vulgaris* appartenant à la même famille (Lamiacées) vis-à-vis des mêmes souches et qui est de 15,6.10<sup>-3</sup> mg/ml (Al-Bayati, 2008).

Selon Kilani et al. (2008), des CMI de l'ordre de 5mg/ml ont été obtenues avec l'extrait méthanolique des racines de *Cupressus rotundus* vis-à-vis de la souche de *S. aureus* ATCC 25923 alors que des CMI>5mg/ml ont été enregistrées pour la souche d'*E. coli* ATCC 25922. Les résultats de la présente étude sont inférieurs à ceux des auteurs pour la souche de *S. aureus* ATCC 25923 (CMI de 0.8mg/ml) et sont en accords avec ces derniers pour la souche d'*E. coli* ATCC 25922 (CMI de 6.64mg/ml). Des CMI meilleures ont été obtenues par l'étude de Chéraif et al. (2007) avec l'huile essentielle des feuilles de *Cupressus arizonica* et qui étaient de 0.38µg/ml pour *E. coli* ATCC 25922 ; de 23.6µg/ml pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 et de 0.98µg/ml pour *S. aureus* ATCC 25923.

Dans la présente étude des CMI de l'ordre de 12.5 et 25mg/ml ont été obtenues avec l'extrait méthanolique des feuilles de *Nerium oleander* et cela vis-à-vis des deux souches de *S. aureus* ATCC 25923 et ATCC 43300 respectivement. Ces CMI sont supérieures à la CMI de ce même extrait obtenue par **Huang et al. (2007)** vis-à-vis d'une souche de *S. aureus* et qui est de l'ordre de 6.25mg/ml.

Des CMI comprises entre 0.128 et 0.512mg/ml ont été obtenues par **Berahou et al. (2007)** pour l'extrait méthanolique des écorces de *Quercus ilex* vis-à-vis de toutes les souches testées y compris *S. aureus*, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *E. coli*. Ces résultats sont inférieurs aux résultats de la présente étude où les CMI de l'extrait méthanolique des feuilles de *Q. ilex* sont comprises entre 0.41 et 3.32mg/ml. Une étude effectuée sur l'extrait des fruits de *Quercus infectoria* a rapporté que les CMI de l'extrait aqueux et éthanolique vis-à-vis de la souche d'*E. coli* ATCC 25922 étaient de 0.02 et 0.78mg/ml respectivement (**Voravuthikunchai et al., 2004**). Dans notre étude, la CMI de l'extrait méthanolique des feuilles de *Q. ilex* vis-à-vis de la souche d'*E. coli* ATCC 25922 était de 0.87mg/ml. Cette dernière est similaire à celle de l'extrait aqueux obtenue par les auteurs mais elle est trop supérieure à celle de l'extrait éthanolique.

Selon l'étude de **Kokoska et al. (2002)**, les CMI des extraits éthanoliques des plantes testées vis-à-vis de la souche *E. coli* ATCC 25922 et celle de *P. aeruginosa* ATCC 27853 varient entre 15 et 65mg/ml. Ces valeurs sont largement supérieures aux CMI de nos extraits vis-à-vis des mêmes souches bactériennes.

**Ahmadi et al. (2010)** ont rapporté que la CMI de l'extrait méthanolique de *Hymenocrater longiflorus* vis-à-vis de *P. aeruginosa* ATCC 27853 était supérieure à 0.48mg/ml, cette dernière est supérieure à la CMI de l'extrait de *Cupressus sempervirens* (3.51mg/ml) et celle de *Quercus ilex* (3.32mg/ml) vis-à-vis de la même souche bactérienne.

## **6. Action des extraits phénoliques sur les $\beta$ -lactamases d'*Acinetobacter baumannii***

### **6.1. Résultats des tests iodométriques**

Les résultats des tests iodométrique offrent des données qualificatives sur le phénomène de l'inhibition d'enzymes. La réduction du complexe iode-amidon par l'acide pénicilloïque issu de l'hydrolyse de la pénicilline G ou par l'acide cephalosporoïque issu de l'hydrolyse de la céfazoline par les  $\beta$ -lactamases entraine une décoloration du gel d'iode de couleur violette. Donc, l'apparition des zones transparentes autour des puits contenant l'extrait enzymatique indique que l'antibiotique (pénicilline G ou céfazoline) a été hydrolysé par les enzymes



( $\beta$ -lactamases) présentes dans cet extrait. En revanche, l'absence de ces zones transparentes est un signe de l'inhibition de ces  $\beta$ -lactamases par les extraits des plantes présents dans le gel d'iode. Les témoins ont été préparés avec du DMSO et du tampon phosphate au lieu de l'extrait végétal. Les résultats des tests iodométriques sont résumés dans les tableaux XII et XIII. Aucune zone transparente n'est observée après 10min alors qu'une clarté commence à apparaître autour de quelques puits contenant de l'extrait enzymatique après huit heures d'incubation. Aucune zone transparente n'est observée, sur toutes les boîtes, autour des puits contenant du DMSO ou du tampon phosphate au lieu de l'extrait enzymatique car ces derniers ne possèdent aucun effet hydrolytique sur la pénicilline G et la céfazoline.

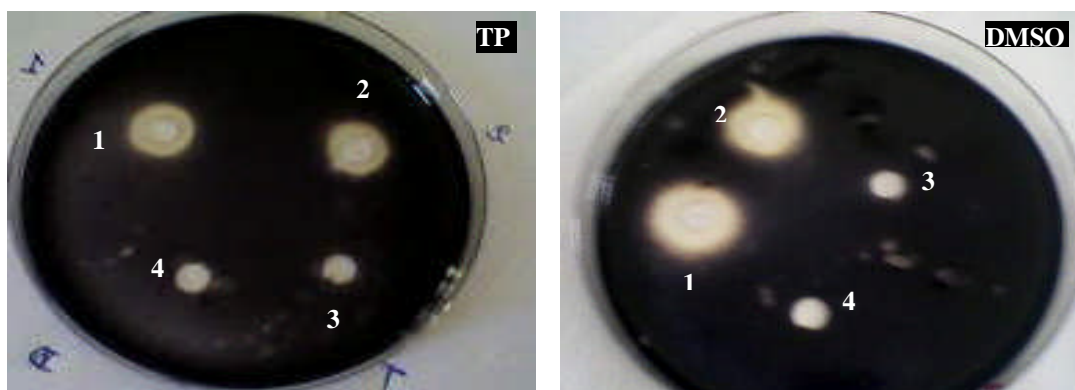
**Tableau XII : Résultats des tests iodométriques (substrat pénicilline G)**

Plantes	Diamètres des zones transparentes (mm)	
	Après 8h	Après 24h
<i>Artemisia absinthium</i>	00	00
<i>Calendula arvensis</i>	00	00
<i>Cupressus sempervirens</i>	00	13
<i>Ephedra altissima</i>	07	08
<i>Marrubium vulgare</i>	00	08
<i>Mirabilis jalapa</i>	00	00
<i>Nerium oleander</i>	07	08
<i>Quercus ilex</i>	09	12
Témoin	10	26
DMSO	12	27

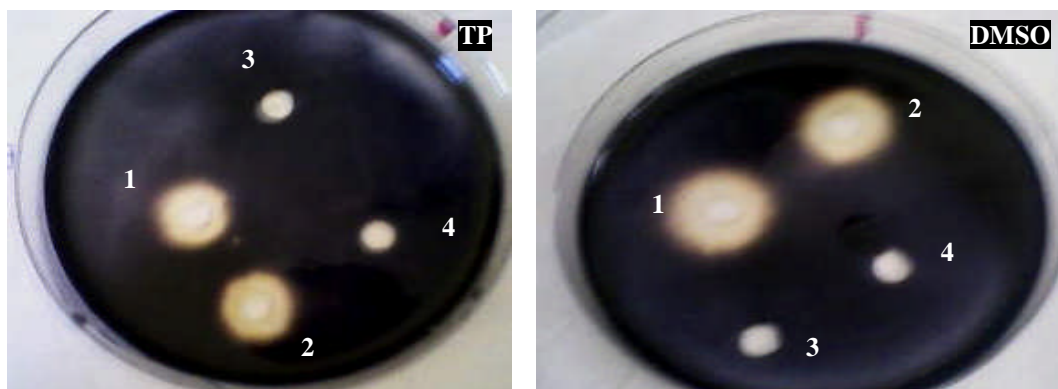
**Tableau XIII : Résultats des tests iodométriques (substrat céfazoline)**

Plantes	Diamètres des zones transparentes (mm)	
	Après 8h	Après 24h
<i>Artemisia absinthium</i>	00	00
<i>Calendula arvensis</i>	00	00
<i>Cupressus sempervirens</i>	00	12
<i>Ephedra altissima</i>	00	00
<i>Marrubium vulgare</i>	00	08
<i>Mirabilis jalapa</i>	00	00
<i>Nerium oleander</i>	00	08
<i>Quercus ilex</i>	00	13
Témoin	9	15
DMSO	8	15

Le DMSO et le tampon phosphate ne possèdent aucune activité anti-enzymatique y compris sur les pénicillinases et les céphalosporinases, par conséquent d'importantes zones transparentes en terme de diamètres ont été observées avec les tests iodométriques réalisés avec des gels d'iode contenant du DMSO ou du tampon phosphate au lieu des extraits des plantes (figures 29 et 30).



**Figure 29 : Résultats des tests iodométriques témoins (substrat Pénicilline G)**  
1 et 2 : extrait enzymatique ; 3 : tampon phosphate ; 4 : DMSO ; TP : Tampon phosphate



**Figure 30 : Résultats des tests iodométriques témoins (substrat Céfazoline)**  
1 et 2 : extrait enzymatique ; 3 : tampon phosphate ; 4 : DMSO ; TP : Tampon phosphate

L'absence de zones transparentes autour des puits contenant de l'extrait enzymatique réalisés sur gels d'iode renfermant la pénicilline G ou la céfazoline en plus des extraits des trois plantes : *Artemisia absinthium*, *Calendula arvensis* et *Mirabilis jalapa* indiquent que ces deux antibiotiques ne sont pas dégradés par les  $\beta$ -lactamases présentes dans l'extrait enzymatique utilisé. Donc, on déduit que les extraits de ces trois plantes ont inhibé les céphalosporinases et les pénicillinases de la souche d'*Acinetobacter baumannii*. La même observation est notée pour le gel d'iode contenant l'extrait d'*Ephedra altissima* et la céfazoline, où ce dernier inhibe uniquement les céphalosporinases de cette même souche. Les photographies des gels d'iode sont représentées sur les figures 31 et 32.

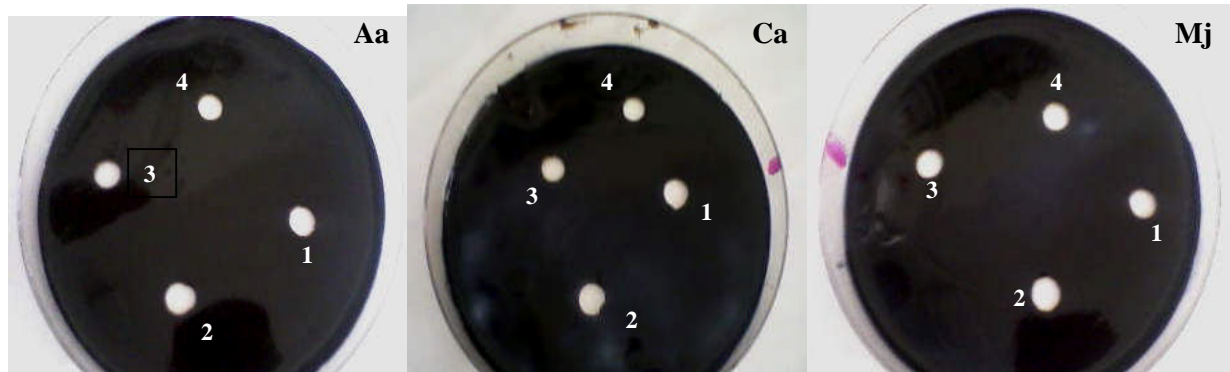


Figure 31 : Résultats des tests iodométriques après 24h d'incubation (substrat pénicilline G)

Aa : *Artemisia absinthium* ; Ca : *Calendula arvensis* ; Mj : *Mirabilis jalapa*  
 1 et 2 : extrait enzymatique ; 3 : tampon phosphate ; 4 : DMSO.

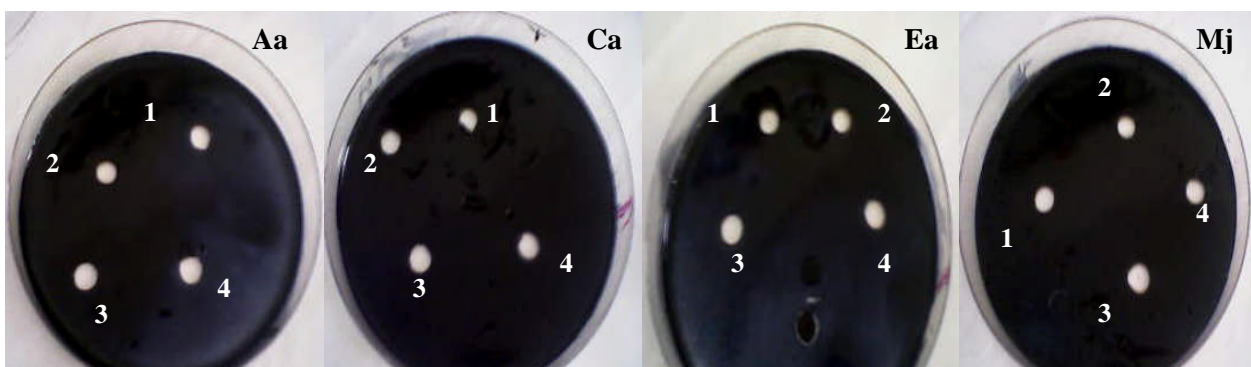


Figure 32 : Résultats des tests iodométriques après 24h d'incubation (substrat céfazoline)

Aa: *Artemisia absinthium* ; Ca: *Calendula arvensis* ; Ea: *Ephedra altissima* ; Mj : *Mirabilis jalapa* ;  
 1 et 2 : extrait enzymatique ; 3 : tampon phosphate ; 4 : DMSO.

Une apparition de zones claires autour des puits contenant les extraits des plantes riches en composés phénoliques a été notée. En réalité, ça ne veut pas dire forcément que ces extraits ne possèdent pas d'activité anti- $\beta$ -lactamases. Ceci pourrait être expliqué par la forte concentration de polyphénols. Des études ont montré que l'activité biologique des polyphénols augmente avec l'augmentation de la concentration de ces derniers jusqu'à arrivée à un certain seuil ou cette dernière se voit décliner. En effet, le rapport pondéral polyphénols/protéines a un effet sur l'affinité des composés phénoliques pour les protéines. Lorsque tous les sites de liaison des protéines aux polyphénols sont occupés, le reste des polyphénols non liés forment de petits agrégats qui s'agglomèrent peu à peu. A un poids moléculaire très élevé (supérieur à 5000Da), le complexe perd sa capacité à précipiter les protéines. En solution physiologique, il devient insoluble et précipite sous forme de complexe inactif (Kumar et vaithyanathan, 1990).

## 6.2. Mesure de l'activité enzymatique par spectrophotométrie

Pour mesurer l'activité enzymatique des  $\beta$ -lactamases présentes dans l'extrait enzymatique, nous avons suivi la diminution de l'absorbance du mélange extrait enzymatique/ $\beta$ -lactamines en fonction du temps à différentes longueurs d'onde: à 235nm pour la pénicilline G et à 263nm pour la céfazoline. Les résultats sont représentés sous forme de courbes sur les figures 33 et 34. La vitesse d'hydrolyse de la pénicilline G était de  $8.033 \pm 0.92 \mu\text{mol/L/min}$  alors que celle de la céfazoline était de  $5.5 \pm 0.62 \mu\text{mol/L/min}$ . On peut constater que la pénicilline est plus hydrolysée par l'extrait enzymatique d'*A. baumannii* comparée à la céfazoline.

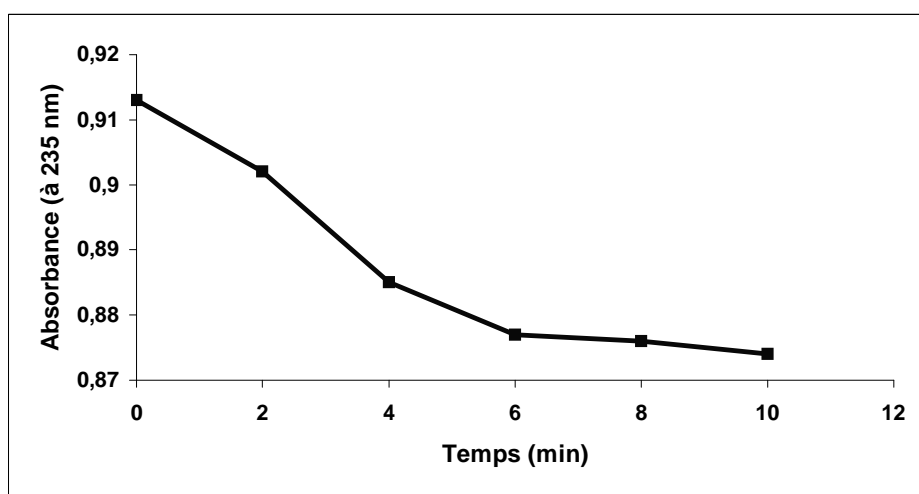


Figure 33 : Variation de l'absorbance en fonction du temps (substrat pénicilline G)

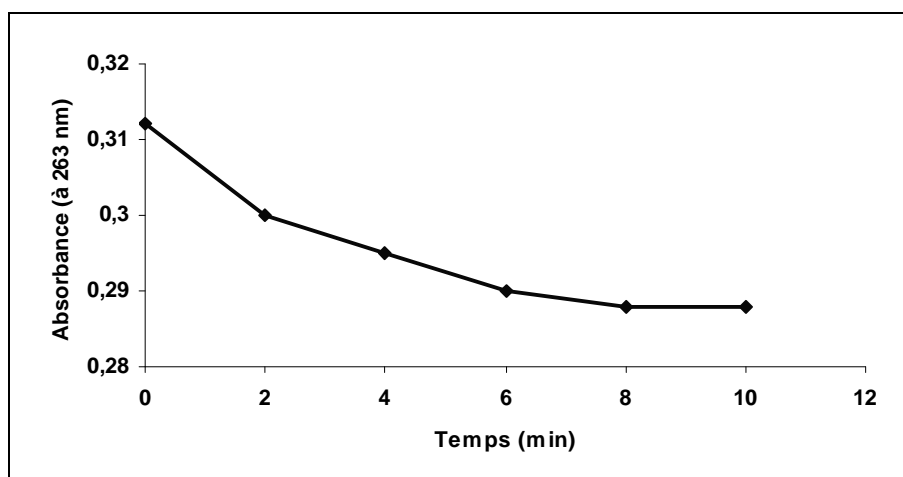


Figure 34 : Variation de l'absorbance en fonction du temps (substrat céfazoline)

## 7. Inhibition des $\beta$ -lactamases par les extraits des plantes

### 7.1. Vitesses d'hydrolyse des $\beta$ -lactamines en présence des extraits des plantes

Les vitesses des réactions enzymatiques en présence des extraits phénoliques des trois plantes *Artemisia absinthium* (Absinthe), *Calendula arvensis* (Souci des jardins) et *Mirabilis jalapa* (Merveille du Pérou) ont été calculées. Les résultats sont résumés dans le tableau XIV. On note que les vitesses d'hydrolyse des  $\beta$ -lactamines testées se voient décliner en présence de l'un des extraits phénoliques des trois plantes. L'extrait phénolique de *Mirabilis jalapa* affaiblit le plus la vitesse d'hydrolyse de la pénicilline G alors que l'extrait de *Calendula arvensis* amoindrit plus celle de la céfazoline.

**Tableau XIV: Vitesses d'hydrolyse des  $\beta$ -lactamines**

Substrat	Vitesses d'hydrolyse ( $\mu\text{mol/L/min}$ )			
	Témoin	+ <i>A. absinthium</i>	+ <i>C. arvensis</i>	+ <i>M. jalapa</i>
Pénicilline G	8.033±0.92	1±00	1.03±0.22	0.5±0.05
Céfazoline	5.5±0.62	3.75±0.75	3±00	3.25±0.25

### 7.2. Taux d'inhibition des pénicillinases et des céphalosporinases

Les pourcentages d'inhibition des  $\beta$ -lactamases ont été calculés par rapport à la cuve témoin ne contenant pas d'extraits de plantes et sont représentés sur les figures 35 et 36. On note que l'activité de la pénicillinase est presque totalement inhibée par les extraits phénoliques des trois plantes, soit avec des pourcentages de 93.81% pour *Mirabilis jalapa*, 87.62% pour *Artemisia absinthium*, 87.25% pour *Calendula arvensis*. Ces taux d'inhibition sont plus importants que ceux obtenus pour la céphalosporinase et qui sont de 40.90% pour *M. jalapa*, 31.81% pour *A. absinthium*, 45.45% pour *C. arvensis*. On peut déduire de ces résultats que l'extrait de *M. jalapa* est le meilleur inhibiteur des pénicillinases de la souche d'*A. baumannii* et que l'extrait de *C. arvensis* possède la plus forte activité inhibitrice sur les céphalosporinases de la même souche bactérienne.

Le DMSO utilisé comme témoin a montré une activité inhibitrice négligeable avec des taux d'inhibition de l'ordre de 0.4% pour les pénicillinases et de 0.7% pour les céphalosporinases. L'effet inhibiteur des composés phénoliques n'est pas influencé par le DMSO car avec de faibles concentrations, ce dernier ne possède pas d'activité inhibitrice sur les  $\beta$ -lactamases (Horsfall et al., 2007). Sachant que les concentrations du DMSO dans le mélange réactionnel final est de 0.4% pour la céfazoline et 0.3% pour la pénicilline G.

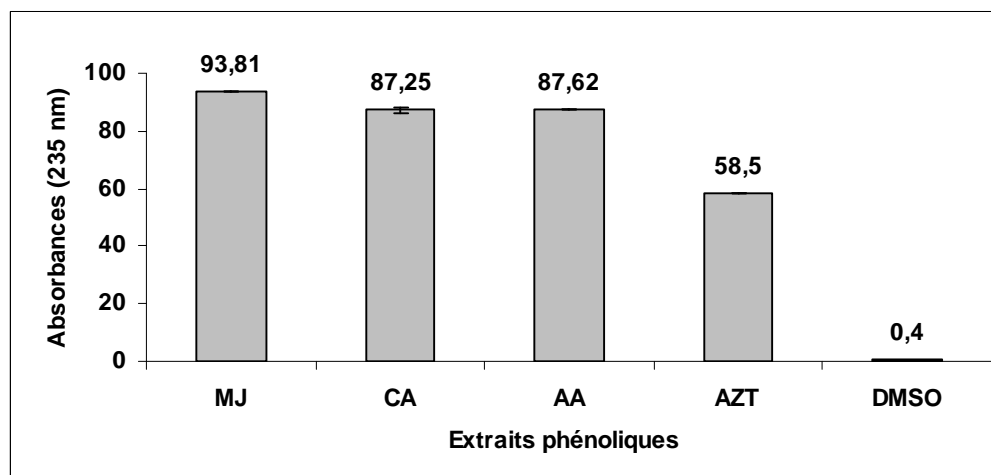


Figure 35 : Pourcentages d'inhibition des pénicillinases

MJ : *Mirabilis jalapa* ; CA : *Calendula arvensis* ; AA : *Artemisia absinthium* ; AZT: Aztereonam

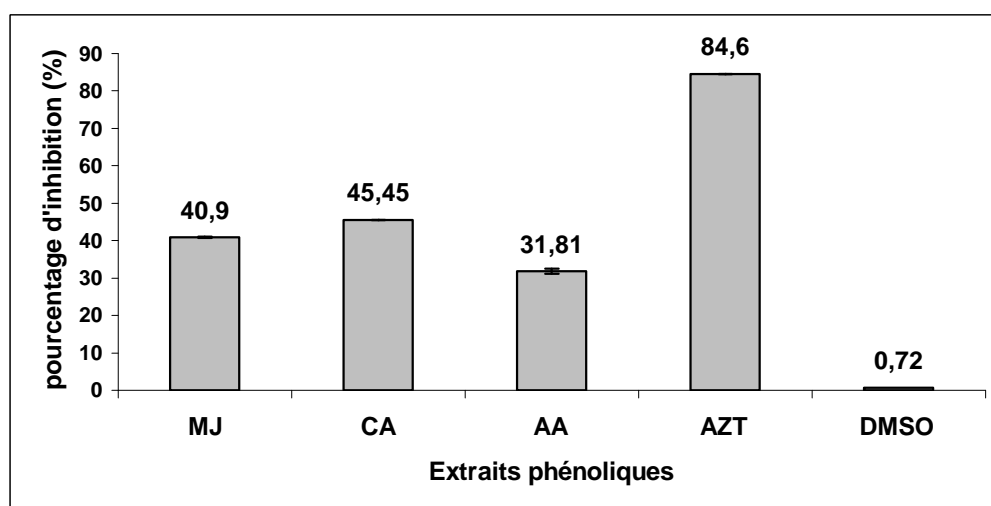


Figure 36 : Pourcentages d'inhibition des céphalosporinases

MJ : *Mirabilis jalapa* ; CA : *Calendula arvensis* ; AA : *Artemisia absinthium*, AZT : Aztereonam

La présente étude a mis en évidence l'effet inhibiteur de trois extraits méthanoliques de plantes sur les  $\beta$ -lactamases de la souche d'*A. baumannii*. L'étude effectuée par Yousfi, (2010) sur le même extrait enzymatique a révélé que les enzymes de cette souche bactérienne sont inhibées par la cloxacilline, l'aztréonam et le tazobactam à différentes concentrations.

Selon l'étude de Yousfi, (2010); l'hydrolyse de la pénicilline G (200 $\mu$ M) se voit décliner en présence de différentes concentrations de cloxacilline et d'aztréonam. Les pourcentages d'inhibition de cette enzyme sont compris entre 34.3 et 68.6% en présence de la cloxacilline et entre 24.5 et 58.5% en présence de l'aztréonam. On constate que les extraits méthanoliques des trois plantes testées (*Mirabilis jalapa*, *Calendula arvensis*, *Artemisia absinthium*) possèdent un effet inhibiteur plus prononcé vis-à-vis des pénicillinases d'*A. baumannii*.

Yousfi, (2010) a rapporté que la vitesse d'hydrolyse de la céfazoline (100 et 200 $\mu$ M) diminue en présence de la cloxacilline et de l'aztréonam. Les pourcentages d'inhibition de la céphalosporinase sont compris entre 93.4 et 100% en présence de la cloxacilline et entre 84.6 et 98.9% en présence de l'aztréonam. En comparant ces résultats aux nôtres, on peut conclure que les inhibiteurs classiques sont plus efficaces sur les céphalosporinases d'*A. baumannii* que les extraits méthanoliques des trois plantes (*Mirabilis jalapa*, *Calendula arvensis*, *Artemisia absinthium*) en terme de pourcentages d'inhibition.

Plusieurs études ont mis en évidence la présence d'un effet synergique entre les extraits phénoliques d'origine végétale et les  $\beta$ -lactamines et cela vis-à-vis des souches bactériennes productrices de  $\beta$ -lactamases. Zhao *et al.* (2002) ont démontré que l'acide gallique inhibe les pénicillinases de la souche de *S. aureus* MRSA, ce composé a présenté un effet synergique avec plusieurs  $\beta$ -lactamines vis-à-vis de cette souche productrice de  $\beta$ -lactamases. Sato *et al.* (2004) ont démontré que les flavones et leurs dérivés augmentent la sensibilité des souches de *S. aureus* productrice de  $\beta$ -lactamases aux  $\beta$ -lactamines sensibles aux pénicillinases de cette même souche.

L'inhibition de l'activité enzymatique résulte de deux phénomènes, simultanés ou non. Les composés phénoliques liés aux molécules substrats rendent ces dernières moins accessibles aux enzymes en les insolubilisant ou en masquant les sites de reconnaissance enzyme-substrat. Les tanins liés aux enzymes inhibent leur activité directement par précipitation de la protéine enzymatique et en se fixant sur les sites actifs (de reconnaissance de substrat), indirectement par encombrement stérique et par la formation d'un complexe (enzyme-substrat-inhibiteur) inactif (Leinmüller *et al.*, 1991).

La compréhension des mécanismes d'action des inhibiteurs identifiés encore très limitée constitue un enjeu de société important, d'où la nécessité d'accentuer les recherches scientifiques sur cet axe qui a donné des premiers résultats prometteurs, peut être que l'inhibiteur miracle de ces mécanismes de résistance bactérienne viendra des plantes (Gangoué Piéboji, 2007).

## **Conclusion & perspectives**



De nos jours, un grand nombre de composés d'origine végétale sont utilisés en médecine moderne et une majorité de ceux-ci le sont selon leur usage traditionnel. Des 25 composés pharmaceutiques les plus vendus à travers le monde, 12 proviennent de produits naturels, mais jusqu'ici, environ 10% seulement des 250 000 espèces de plantes inventoriées ont fait l'objet de recherches de molécules bioactives.

L'objectif de cette étude était d'évaluer en premier lieu l'activité antibactérienne des extraits phénoliques de quelques plantes médicinales locales, ensuite de mettre en évidence, s'il y a lieu, l'effet inhibiteur de ces extraits sur des  $\beta$ -lactamases isolées d'une souche bactérienne d'*Acinetobacter baumannii*.

Durant ce travail, huit plantes médicinales appartenant à différentes familles botaniques (*Artemisia absinthium*, *Calendula arvensis*, *Cupressus sempervirens*, *Ephedra altissima*, *Marrubium vulgare*, *Mirabilis jalapa*, *Nerium oleander* et *Quercus ilex*) ont été sélectionnées pour évaluer *in vitro* l'activité antibactérienne de leurs extraits phénoliques vis-à-vis de 04 souches de référence (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300).

Tous les extraits étudiés se sont révélés riches en polyphénols et ont présenté une bonne activité antibactérienne sur une ou plusieurs souches testées, cependant leur efficacité diffère d'une plante à une autre. Les diamètres des zones d'inhibition augmentent avec l'augmentation de la quantité de l'extrait testé.

Les souches bactériennes à Gram positif sont plus sensibles aux extraits des plantes comparativement à celles à Gram négatif. Les zones d'inhibition les plus larges ont été obtenues avec l'extrait des feuilles de *Q. ilex*. La CMI la plus faible (0,41mg/ml) a été enregistrée pour ce même extrait vis-à-vis de la souche *S. aureus* ATCC 43300.

Les tests d'inhibition des  $\beta$ -lactamases, réalisés sur gel d'iode, effectués pour l'extrait enzymatique d'*Acinetobacter baumannii* ont montré que les extraits des trois plantes: *Artemisia absinthium* (Absinthe), *Calendula arvensis* (Souci des jardins) et *Mirabilis jalapa* (Merveille du Pérou) inhibent les pénicillinases et les céphalosporinases de la souche d'*A. baumannii* et que l'extrait d'*Ephedra altissima* (Ephédra) inhibe les céphalosporinases uniquement de cette souche.

Les vitesses d'hydrolyse de la pénicilline G et de la céfazoline, déterminées par spectrophotométrie, diminuent en présence de l'un des extraits phénoliques des trois plantes *Artemisia absinthium*, *Calendula arvensis* et *Mirabilis jalapa*. Les pénicillinases d'*A. baumannii* ont été presque totalement inhibées par les extraits des trois plantes avec des pourcentages d'inhibition de 93.81% par *M. jalapa*, 87.62% par *A. absinthium*, 87.25% par *C. arvensis* alors que les céphalosporinases sont inhibées avec des taux de 40.90% par *M. jalapa*, 31.81% par *A. absinthium* et 45.45% par *C. arvensis*.

Nos résultats sont très prometteurs en ce qui concerne la lutte contre le phénomène de l'antibiorésistance qui devient aujourd'hui un problème de santé publique. Cette étude aura donc permis d'un point de vue fondamental de mieux connaître l'importance des extraits phénoliques des plantes étudiées, mais elle reste néanmoins préliminaire, des recherches plus approfondies s'avèrent nécessaires pour éclaircir certains points et découvrir d'autres pistes de recherche. Nos perspectives de recherche à venir sont:

- Détermination des paramètres de la cinétique enzymatique et d'inhibition.
- Etude de l'effet inhibiteur de ces extraits sur différentes  $\beta$ -lactamases isolées à partir d'autres souches bactériennes pathogènes.
- Recherche d'autres activités des extraits de ces huit plantes.

## **Références bibliographiques**

***Références bibliographiques***

**Abbasi A.M., Khan M.A., Ahmad M., Zafar M., Jahan S. & Sultana S. (2010).** Ethno pharmacological application of medicinal plants to cure skin diseases and in folk cosmetics among the tribal communities of North-West Frontier Province. *Pakistan J. Ethnopharmacol.* **128**: 322-5.

**Afif H., Mokahli S., Bourra H., Aichane A. & Bouayad Z. (2006).** Sensibilisation cutanée au cyprès à Casablanca. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique.* **46**: 633-9.

**Ahmadi F., Sadeghi S., Modarresi M., Abiri R. & Mikaeli A. (2010).** Chemical composition, in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* Benth. of Iran. *Food Chem. Toxicol.* Article in press.

**Akula U.S. & Odhav B. (2008).** In vitro, 5-Lipoxygenase inhibition of polyphenolic antioxidants from undomesticated plants of South Africa. *J. Med. Plants Res.* **2**(9): 207-12.

**Al-Bakri A.G. & Afifi F.U. (2007).** Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *Journal of Microbiological Methods.* **68**:19-25.

**Al-Bayati F.A. (2008).** Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *J. Ethnopharmacol.* **116**: 403-6.

**Almeida I.F., Fernandes E., Lima J.L.F.C., Costa P.C. & Bahia M.F. (2008).** Protective effect of *Castanea sativa* and *Quercus robur* leaf extracts against oxygen and nitrogen reactive species. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* **91**: 87-95.

**Alzoreky N.S. & Nakahara K. (2003).** Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Int. J. Food Microbiol.* **80**: 223-30

**Andrensek S., Simonovska B., Vovk I., Fyhrquist P., Vuorela H. & Vuorela P. (2004).** Antimicrobial and antioxidative enrichment of oak (*Quercus robur*) bark by rotation planar extraction using ExtraChrom®. *Int. J. Food Microbiol.* **92**:181-7.

**Ao C., Li A., Elzaawely A.E., Xuan T.D. & Tawata S. (2008).** Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of (*Ficus microcarpa* L. Fil.) extract. *Food Control.* **19**:940-48.

**Aoki K. Cortes A.R., Ramirez M.D, Gomez-Hernandez M. & Lopez-Munoz F.J.(2008).** Pharmacological study of antispasmodic activity of *Mirabilis jalapa* Linn. flowers. *J. Ethnopharmacol.* **116**:96-101.

**Arcuri H.A., Canduri F., Pereira J.H., da Silveira N.J.F., Camera Jr. J.C., de Oliveira J.S., Basso L.A., Palma M.S., Santos D.S. & de Azevedo Jr.W.F. (2004).** Molecular models for shikimate pathway enzymes of *Xylella fastidiosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320** : 979-91.

**Aruoma O.I., Spencer J.P.E., Butler J. & Halliwell B. (1995).** Commentary reaction of plant derived and synthetic antioxidants with tricholoromethylperoxyl radicals. *Free Rad. Res.* **22**:187-90.

- Barbosa R.R., Fontenele-Neto J.D. & Soto-Blanco B. (2008).** Toxicity in goats caused by oleander (*Nerium oleander*). *Research in Veterinary Science*. **85**: 279–281.
- Bayer E., Buttler K.P., Finkenzeller X. & Grau J. (2005).** Guide de la flore méditerranéenne. Caractéristiques, habitat, distribution et particularités de 536 espèces. (Ed.) *Delachaux et Niestlé*. 287p.
- Belboukhari N. & Cheriti A. (2006).** Phytochemical investigation of the bioactive extract from (*Launaea arborescens*). *Pak. J. Biol. Sci.* **9**:2930–32.
- Beltrán-Heredia J., Sánchez-Martín J. & Frutos-Blanco G. (2009).** *Schinopsis balansae* tannin-based flocculant in removing sodium dodecyl benzene sulfonate. *Separation and Purification Technology*. **67**: 295–303.
- Bendahou M., Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., Desjobert J.M., Bernardini A.F. & Costa J. (2008).** Antimicrobial activity and chemical composition of (*Origanum glandulosum* Desf.) essential oil and extract obtained by microwave extraction: comparison with hydrodistillation. *Food Chem.* **106**:132–39.
- Berahou A., Auhmani A., Fdil N., Benharref A., Jana M. & Gadhi C.A. (2007).** Anti-bacterial activity of *Quercus ilex* bark's extracts. *J. Ethnopharmacol.* **112**: 426-9.
- Boizot N. & Charpentier J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le cahier des techniques de l'INRA*. pp:79-82.
- Bourgeois B., Incagnoli P., Hanna J. & Tirard V. (2005).** Traitement par anticorps antidigitalique d'une intoxication volontaire par laurier rose. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. **24**: 640–2
- Bragazza L. & Freeman C. (2007).** High nitrogen availability reduces polyphenol content in Sphagnum peat. *Science of the Total Environment*. **377**: 439–443.
- Brossa R., Casals I., Pinto-Marijuan M. & Fleck I. (2009).** Leaf flavonoid content in *Quercus ilex* L. resprouts and its seasonal variation. *Trees*. **23**:401-8.
- Broya F.J., Bouzada M.L.M., fabri R.L., Matos M., Moreura O.R., Scio E. & Combra E.S. (2006).** Antileishmania and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J. Ethnopharmacol.* **111**:397-402.
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. (Ed.) *Lavoisier, Tec et Doc*. 3<sup>ème</sup> édition. Paris.1120 p.
- Bryskier A. (1999).** Antibiotiques et agents antibactériens: classification et relation structure activité. In: Bryskier A. Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. (Ed.) *Ellipses*. Paris. pp: 54-57.
- Bssaibis F., Gmira N. & Meziane M. (2009).** Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter *Rev. Microbiol. Ind. San. Environn.* **3**(1): 44-55.

- Burns J., Landrault N., Mullen W., Lean M.E.J., Crozier A. & Teissedre P.L. (2003).** Variations du profil et du contenu des anthocyanes dans les vins issus de cépages de *Cabernet sauvignon* et de cépages hybrides. *Bulletin O.I.V.* **76**: 262-80.
- Bush K. (1999).**  $\beta$ -lactamases of increasing clinical importance. *Curr.Pharm.Des.* **5**:839-45.
- Calliste C.A., Trouillas P., Allais D.P., Simon A. & Duroux J.L. (2001).** Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *J. Agric. Food Chem.* **49**:3321-27.
- Calzada F., Arista R. & Pérez H. (2010).** Effect of plants used in Mexico to treat gastrointestinal disorders on charcoal–gum acacia-induced hyperperistalsis in rats. *J. Ethnopharmacol.* **128**: 49–51.
- Canadanovic Brunet J.M., Djilas S.M., Cetkovic G.S. & Tumbas V.T. (2005).** Free-radical scavenging activity of wormwood (*Artemisia absinthium* L) extracts. *J. Sci. Food Agric.* **85**: 265-72.
- Canales M., Hernandez T., Caballero J., Romo de Vivar A., Avilaa G., Duran A. & Lira A. (2005).** Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlan, Puebla, Mexico. *J. Ethnopharmacol.* **97**: 429-39.
- Cattoir V. (2004).** Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria. *Pathol. Biol.* **52**:607-16.
- Cetkovic G.S., Djilas S.M., Canadanovic-Brunet J.M. & Tumbas V.T. (2004).**Antioxidant properties of marigold extracts. *Food Research International.* **37**: 643-50.
- Chacha M., Bojase-Moleta G. & Majinda R.R.(2005).**Antimicrobial and radical scavenging flavonoids from the stem wood of (*Erythrina latissima*). *Phytochemistry.* **66**: 99-104.
- Chah K.F., Eze C.A., Emuelosi C.E. & Esimone C.O. (2006).** Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **104**: 164-7.
- Chéraif I., Ben Jannet H., Hammami M., Khouja M.L. & Mighri Z. (2007).** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cupressus arizonica* Greene *Biochem. Syst. Ecol.* **35**:813-20.
- Cheyrier V. (2005).** Dietary polyphenols and health: Proceedings of the 1<sup>st</sup> international conference on polyphenols and health. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**(1):223-9.
- Cieslik E., Greda A. & Adamus W. (2006).** Contents of polyphenols in fruit and vegetables. *Food Chem.* **94**:135-142.
- Cottiglia F., Loy G., Garau D., Floris C., Casu M., Pompei R. & Bonsignore L. (2001).** Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of (*Daphne gnidium* L.). *Phytomedicine.* **8** (4): 302–05.
- Cowan M.M. (1999).**Plant products as antimicrobial agents.*Clin.Microbiol.Rev.***12**(4):564-82.

- Cushnie T.P. & Lamb A.G. (2005).** Antimicrobial activity of flavonoïdes. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **26**: 343-56.
- Cushnie T.P., Vivienne E.S. & Lamb A.G. (2003).** Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol. Res.* **158**: 281-9.
- Dall'Agnol R., Ferraz A. & Bernardi A.P. (2003).**Antimicrobial activity of *Hypericum* species. *Phytomedicine.* **10**:511-16.
- Dang Khan T., Huu Hong N., Dang Xuan T. & Min Chung I. (2005).** Paddy weed control by medicinal and leguminous plants from Southeast Asia. *Crop Protection.***24**:421-31.
- Delaveau P., Lorrain M., Mortier F., Rivolier C., Rivolier J. & Schweitzer A.R. (1985).** Secrets et vertus des plantes médicinales. (Ed.) *Selection Reader's Digest.* 454 p.
- Deng Y., Lee J.P. & Tianasoa-Ramamonjy M. (2000).** New antimicrobial flavanones from (*Physena madagascariensi*). *J. Nat. Prod.* **63**:1082–9.
- Deysson G. (1976).** Organisation et classification des plantes vasculaires. Tome I. (Ed.) *CDU et SEDES réunis.* Paris. 529p.
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A. & Capasso F. (1999).** Flavonoïdes: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* **65**(4): 337-53.
- Dickson R.A., Houghton P.J., Hyhinds P.J. & Gibbon S. (2006).** Antimicrobial, resistance-modifying effects, antioxidant and free radical scavenging activities of *Mezoneuron benthamianum* Bail., *Securinega virosa* Roxb. and *Microglossa pyrifolia* Lam. *Phytotherapy Research.* **20**: 41-45.
- Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P. & Vidal N. (2006).** Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolics compounds. *Food Chem.* **97**: 654-60.
- Doucet N. (2006).** Mutagenèse semi-aléatoire et analyse dynamique de la  $\beta$ -lactamase TEM-1 de *Escherichia coli*. Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* en Biochimie. Université de Montréal. Canada. 293p.
- Duenas M., Hernandez T. & Estrella I. (2006).** Assessment of *in vitro* antioxidant capacity of the seed coat and the cotyledon of legumes in relation to their phenolic contents.*Food Chem.* **98**: 95–103.
- Edeas M. (2007).** Les polyphénols et les polyphénols du thé. *Phytothérapie.* **5**: 264–70.
- El-Abyad M.S., Morsi N.M., Zaki D.A. & Shaaban M.T. (1990).** Preliminary screening of some Egyptian weeds for antimicrobial activity. *Microbios.* **62**:47–57.
- Encarta. (2009).** Microsoft ® Encarta ® 2009. © 1993-2008. Microsoft Corporation.
- Erdemoglu N., Esra K. & Erdem Y. (2003).** Antiinflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in turkish folk medicine. *J. Ethnopharmacol.* **89**: 123-9.

- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. & Abdelly C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies.* **331**: 372-9.
- Farruggia A., Martin A.B., Baumont R., Prache S., Doreau M., Hoste H. & Durand D. (2008).** Quels intérêts de la diversité floristique des prairies permanentes pour les ruminants et les produits animaux ?. *INRA. Prod. Anim.* **21**(2):181-200.
- Fleuriet A. & Macheix J.J. (1997).** Effet des blessures sur les composés phénoliques des fruits de tomates « cerises » (*Lycopersion esculentum*). *Phys. Veg.* **15**:239-50.
- Frishman W.H., Sinatra S.T. & Moizuddin M. (2004).** The use of herbs for treating cardiovascular disease. *Seminars in Integrative Medicine.* **2** :23-35.
- Fujii T., Sato K., Miyata K., Inoue M & Mitsuhast S. (1986).** Biochemical Properties of 3-Lactamase Produced by *Legionella gormanii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**(5):925-6.
- Gangoué Piéboji J. (2007).** Caractérisation des  $\beta$ -lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. Thèse de Doctorat en Biochimie. Centre d'Ingénierie des Protéines (CIP). Université de Liège. Belgique. 127 p.
- Ganzera M., Lanser C. & Stuppner H. (2005).** Simultaneous determination of *Ephedra sinica* and *Citrus aurantium* var. *amara* alkaloids by ion-pair chromatography. *Talanta.* **66**:889-94.
- Ghedira K. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie.* **4**: 162-9.
- Glyphis J.P. & Puttick G.M. (1989).** Phenolics, nutrition and insect herbivory in some garrigue and maquis plants. *Oecologia.* **78**:259-63.
- Graham T.L. (1998).** Flavonoids and flavonal glycoside metabolism in Arabidopsis. *Plant physiol. biochem.* **36**: 135-44
- Handal T. & Olsen I. (2000).** Antimicrobial resistance with focus on oral  $\beta$ -lactamases. *Eur. J. Oral Sci.* **108**:163-74.
- Hatano T., Tsugawa M., Kusuda M., Taniguchi S., Yoshida T., Shiota S. & Tsuchiya T. (2008).** Enhancement of antibacterial effects of epigallocatechin gallate, using ascorbic acid. *Phytochemistry.* **69**:3111-6.
- Hayase F. & Kato M. (1984).** Antioxidant compounds of sweet potatoes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **30**:37-46.
- Hayouni E.A., Abedrabba M., Bouix M. & Hamdi M. (2007).** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian (*Quercus coccifera* L.) and (*Juniperus phoenicea* L.) fruit extracts. *Food Chem.* **105**:1126-34.
- Hegarty V.M. (2000).** Tea drinking and bone mineral density in older women. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**(41):3-7.



- Hemaiswarya S., Kruthiventib A.K. & Doble M. (2008).** Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. **15**:639-52.
- Hennebelle T., Sahpaz S. & Bailleul F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Pharmacologie*. **1**: 3-6.
- Hernández T., Canales M., Avila J.G., Duran A., Caballero J., Romo de Vivar A. & Lira R. (2003).** Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *J. Ethnopharmacol.* **88**: 181-8.
- Horsfall L.E., Garau G., Lienard B.M.R., Dideberg O., Schofield C.J., Frere G.M. & Galleni M. (2007).** Competitive Inhibitors of the CphA Metallo- $\beta$ -Lactamase from *Aeromonas hydrophila*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**(6):2136-42.
- Hoste H., Jackson F., Athanasiadou S., Thamsborg S.M. & Hoskin S.O. (2006).** The effects of tannins rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* **22**: 253-26.
- Huang W.Y., Cai Y.Z., Hyde K.D., Corke H. & Sun M. (2007).** Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**:1253-63.
- Hussein M.A. & Gorski M.S. (2004).** Antimicrobial activity of *Nerium oleander* Linn. *Asian J. plant Sci.* **3**(2): 177-180.
- Hyder P.W., Fredrickson E.L., Estell R.E., Tellez M. & Gibbens R.P. (2002).** Distribution and concentration of total phenolics, condensed tannins and Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) in creosotebush (*Larrea tridentata*). *Biochem. Syst. Ecol.* **30**:905-12.
- Ibrahim A.K., Khalifa S., Khafagi I., Youssef D., Khan I. & Mesbah M. (2007).** Stimulation of oleandrin production by combined *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and fungal elicitation in *Nerium oleander* cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology.* **41**:331-6.
- Ibrahim N.A., El-Seedi H.R. & Mohammed M.M.D. (2009).** Constituents and biological activity of the chloroformic extracts and essential oil of *Cupressus sempervirens*. *Chemistry of Natural Compounds.* **45**(3): 309-13.
- Iserin P. (2001).** Larousse: Encyclopédie des plantes médicinales. (Ed.) Larousse. Paris.
- Ismail H.I., Chan K.W., Mariod A.A. & Ismail M. (2010).** Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*cucumis melo*) methanolic extracts. *Food Chem.* **119**: 643-647.
- Kablan B.J., Adiko M. & Abrogoua D.P. (2008).** Evaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de *Kalanchoe crenata* et de *Manotes longiflora* utilisées dans les ophtalmies en Cote d'Ivoire. *Phytothérapie.* **6**: 282-8.
- Kaloustian J., Chevalier J., Mikail C., Martino M., Abou L. & Vergnes M.F. (2008).** Etude de six huiles essentielles: composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie.* **6**:160-4.
- Karioti A., Bilia A.R. & Skaltsa H. (2010).** *Quercus ilex* L.: A rich source of polyacylated flavonoid glucosides. *Food Chem.* **123**: 131-142.

- Keita Y., Koné O., Ly A.K. & Häkkinen V. (2004).** Etude chimique et de l'activité antibactérienne des distillats de quelques variétés de mangue de Guinée. *C.R. Chimie*.7:1095-100.
- Khanbabaee K. & van Ree T. (2001).** Tannins: Classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* 18: 641-9.
- Kilani S., Ben Sghaier M., Limem I., Bouhleb I., Boubaker J., Bhourri W., Skandrani I., Neffatti A., Ben Ammar R., Dijoux-Franca M.G., Ghedira K. & Chekir-Ghedira L. (2008).** *In vitro*, evaluation of antibacterial, antioxidant, cytotoxic and apoptotic activities of the tubers infusion and extracts of *Cyperus rotundus*. *Bioresource Technology*. 99:9004-8.
- Kim H.G., Park J.M., Kim J.A. & Ko B.P. (2008).** Effect of herbal *Ephedra sinica* and *Evodia rutaecarpa* on body composition and resting metabolic rate: a randomized, double-blind clinical trial in Korean premenopausal women. *J.Acupunct. Meridian Stud.* 1(2):128-38.
- Kokoska L., Polesny Z., Rada V., Nepovim A. & Vane T. (2002).** Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 82:51-3.
- Konning G.H., Agyare C. & Ennison B. (2004).** Antimicrobial activity of some medicinal plants from Ghana. *Fitoterapia.* 75:65-7.
- Kooter I.M., Steiner R.A., Dijkstra B.W., Noort P.I., Egmond M.R. & Huber M.E. (2002).** Characterisation of the mononuclear Cu-containing *Aspergillus japonicus* quercetin 2,3-dioxygenase reveals dramatic changes upon anaerobic binding of substrate. *Eur. J. Biochem.* 269:2971-9.
- Koprivnjak O., Majetić V., Malenica Staver M., Lovrić A. & Blagović B. (2010).** Effect of phospholipids on extraction of hydrophilic phenols from virgin olive oils. *Food Chem.* 119: 698–702.
- Kordali S., Aslan I., Calmaşur O. & Cakir A. (2006).** Toxicity of essential oils isolated from three *Artemisia* species and some of their major components to granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Industrial Crops and Products.* 23:162-70.
- Ksouri R., Falleh H., Megdiche W., Trabelsi N., Mhamdi B., Chaieb K., Bakrouf A., Magné C. & Abdelly C. (2009).** Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food Chem. Toxicol.* 47: 2083-91.
- Kumar R. & Vaithyanathan S. (1990).** Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 30: 21–38.
- Lahouel M., Boulkour S., Segueni N. & Fillastre J.P. (2004).** Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Pathol. Biol.* 52 :314–22.
- Landolfi R., Mower R.L. & Steiner M. (1984).** Modification of platelet function and arachidonic acid by bioflavonoid, structure-activity relations. *Biochem.Pharmacol.*33:1525-35.
- Lee C.Y., Jeong S.W. & Kim D. (2003).** Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.* 81: 321-6.

- Leinmüller E., Steingass H. & Henke K.H. (1991).** Tannins in ruminant feedstuffs. Ed. Metzinger. *Anim. Res. Dev.* **33**: 9-56.
- Li W., Asada Y. & Yoshikawa T. (1998).** Antimicrobial flavonoids from (*Glycyrrhiza glabra*) hairy root cultures. *Planta Med.* **64**: 746-7.
- Livermore D.M. (1998).**  $\beta$ -Lactamase mediated resistance and opportunities for its control. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**: 25-41.
- Lombardo S, Pandino G., Mauromicale G., Knödler M., Carle R. & Schieber A. (2010).** Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori]. *Food Chem.* **119**:1175-81.
- Lopes-Lutz D., Alviano D.S., Alviano C.S. & Kolodziejczyk P.P. (2008).** Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. *Phytochemistry.* **69**:1732-8.
- Lopez-Giraldo L.J. (2008).** Lipophilisation enzymatique des composés phénoliques et évaluation de leurs propriétés antioxydantes. Thèse de Doctorat en Biochimie, chimie et technologie des aliments. École Doctorale: Sciences des Procédés-Sciences des Aliments. Montpellier. 216p.
- Lugasi A., Hóváré J., Sági K.V. & Biró L. (2003).** The role of antioxidant photonutrients in the prevention of diseases. *Acta biologica Szegediensis.* **47**:119-25.
- Maataoui B. S., Hmyene1 A. & Hilali S. (2006).** Activités antiradicalaires des extraits de jus de fruits du figuier de Barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal.* **7**(1): 3-8.
- Mabry T.J. & Ulubelen A. (1980).** Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids , coumarins and lignans. *J. Agric. Food. Chem.* **28**:188-96.
- Macheix J., Fleuriet A. & Jay-Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux. (Ed.) *Presses polytechniques et universitaire romandes.* pp:1-32.
- Macleod M. M. (1974).** Plant tannins: their role in forage quality. *Nur. Abstr. Rev.* **44**: 808-12.
- Mahmoudi M., Ebrahimzadeh M.A., Ansaroudi F., Nabavi, S.F. & Nabavi S. M. (2009).** Antidepressant and antioxidant activities of *Artemisia absinthium* L. at flowering stage. *Afr. J. Biotechnol.* **8** (24) : 7170-5.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remezy C. & Jimenez L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**:727-47.
- Mann C.M., Cox S.D. & Markham J.L. (2000).** The outer membrane of *pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749; contribution to its tolerance to the essential oil of *melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Lett. Appl. Microbiol.* **30**: 294-5.
- Mansour W., Bouallegue O., Dahmen S. & Boujaafar N. (2008).** Caractérisation des mécanismes enzymatiques de résistance aux  $\beta$ -lactamines chez des souches de *Acinetobacter baumannii* isolées à l'hôpital universitaire Sahloul, Sousse en Tunisie (2005). *Pathol. Biol.* **56** :116-20.

- Marquez B. (2005).** Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitor. *Biochimie*. **8**:1137-47.
- Masoodi M.H., Ahmed B., Zargar I.M., Khan S.A., Khan S. & Singh P. (2008).** Anti-bacterial activity of whole plant extract of *Marrubium vulgare*. *Afr.J. Biotechnol.* **7**(2):86-7.
- Matagne A.J., Lamotte-Brasseur J. & Frere J.M. (1998).** Catalytic Properties of class A  $\beta$ -lactamases: efficiency and diversity. *Biochem. J.* **330**: 581-98.
- Matkowski A. & Piotrowska M. (2006).** Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia.* **77**: 346-53.
- Mekbib S.B. (2007).** In vitro antimicrobial assay of some medicinal plants from Ethiopia against plant and food-borne pathogens. University of Pretoria etd. Chapter five. pp:97-128.
- Melendez P.A. & Capriles V.A. (2006).** Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. *Phytomedicine.* **13**: 272-6.
- Meng L., Yves L., Isabelle B., Emile M. & Bin G. (2009).** Polyphenols extraction from eight (*Perilla frutescens*) cultivars. *C.R. Chimie.* **12**:602-11.
- Mességué M. (2001).** Mon herbier de santé. (Ed.) *Robert Laffont*. Paris. 333 p.
- Michiels J., Missotten J. A.M., Fremaut D., De Smet S. & Dierick N.A. (2009).** In vitro, characterisation of the antimicrobial activity of selected essential oil components and binary combinations against the pig gut flora. *Animal Feed Science and Technology.* **151**:111-27.
- Minami S. Inoue M. & Mitsuhashi S. (1980).** Purification and Properties of a Cephalosporinase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **18**(6): 853-7.
- Moghadam M.S., Maleki S., Darabpour E., Motamedi H. & Nejad S.M.S. (2010).** Antibacterial activity of eight Iranian plant extracts against methicillin and cefixime resistant Staphylococcus aureus strains. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* 262-5.
- Mohamed H., Raoudha J., Imen L., Ons M., Mohamed D. & Moncef N. (2010).** GC/MS and LC/MS analysis, antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts from *Mirabilis jalapa* tubers. *Process Biochemistry* (2008), doi:10.1016/j.procbio.2010.05. 027.
- Molina-Salinas G.M., Ramos-Guerra M.C., Vargas-Villarreal J., Mata-Cardenas B.D., Becerril-Montes P. & Said-Fernández S. (2006).** Bactericidal activity of organic extracts from *Flourensia cernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of Medical Research.* **37**: 45-9.
- Narayana K.R., Reddy M.S., Chaluvadi M.R. & Krishna D.R. (2001).** Bioflavonoids, classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Phamacol.* **33**:2-16.
- Nascimento G.G.F., Locatelli J., Freitas P. & Silva L.G. (2000).** Antimicrobial activity of plant extract and photochemical on antibiotic resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol.* **31**:247-56.

- Nayeemulla S., Sudarshana M.S., Umesha S. & Hariprasad P. (2006).** Antimicrobial activity of *Rauwolfia tetraphylla* and *Physalis minima* leaf and callus extracts. *Afr. J. Biotechnol.* **5** (10) :946-950.
- Nazaruk J. & Jakoniuk P. (2005).** Flavonoid composition and antimicrobial activity of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All. Flowers. *J. Ethnopharmacol.* **102**: 208–12.
- Nibret E. & Wink M. (2010).** Volatile components of four Ethiopian *Artemisia* species extracts and their in vitro anti-trypanosomal and cytotoxicactivities. *Phytomedicine.* **17**:369-74.
- Nitsch J.P. & Nitsch C. (1961).** Synergistes naturels des auxines et des gibbérellines. *Bull. Soc. Fr.* **26**: 2237-40.
- Nordmann P. (2003).** Mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines de *Pseudomonas aeruginosa*. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation.* **22**: 527-30.
- Novick R.P. (1962).** Micro-Iodometric Assay for Penicillinase. *Biochem. J.* **88**: 236-240.
- Obeid H.K., Bedgood J., Prenzler P.D. & Robards K. (2007).** Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscidal activities. *Food Chem. Toxicol.* **45**:1238-48.
- Orecchio S. & Amorello D. (2010).** Platinum and rhodium associated with the leaves of *Nerium oleander* L.; analytical method using voltammetry; assessment of air quality in the Palermo (Italy) area. *Journal of Hazardous Materials.* **174**: 720-7.
- Osawa K., Yasuda H., Maruyama T., Morita H., Takeya K. & Itokawa H. (1992).** Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Chem. Pharm. Bull.* **40**:2970–4.
- Oskay M. & Sari D. (2007).** Antimicrobial screening of some Turkish medicinal plants. *Pharmaceutical Biology.* **45**:176–81.
- Oussalah M., Caillet S., Saucier L. & Lacroix M. (2006).** Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science.* **73**: 236-44.
- Pagés J.M. & Garnotel E. (2003).** Perméabilité membranaire et résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif. *Revue Française des Laboratoires.* **352**:352-63.
- Parekh J. & Chanda S.V. (2007).** In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. *Turk. J. Biol.* **31**:53-8.
- Piétroni P. (1996).** Manuel pratique. Médecines des douces. (Ed.) *Hachette*. Paris. 224 p.
- Psotova J., Lasovsky J. & Vicar J. (2003).** Metal chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomed. Papers.* **147**(2): 147-53.

- Quezel P. & Santa S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I. *Editions du centre national de la recherche scientifique*. Paris. pp : 34, 40, 264.
- Quezel P. & Santa S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. *Editions du centre national de la recherche scientifique*. Paris. pp : 744, 801, 967.
- Rakic S., Petrovic S., Kukic J., Jadranin M., Tesevic V., Povrenovic V. & Siler-Marinkovic S. (2007).** Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. *Food Chem.* **104**: 830-4.
- Rawat P., Khan M.F., Kumar M., Tamarkar A.K., Srivastava A.K., Arya K.R. & Maurya R.(2010).** Constituents from fruits of *Cupressus sempervirens*. *Fitoterapia.* **8**:162-6.
- Reading C. & M. Cole. (1977).** Clavulanic acid: a betalactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**: 852-857.
- Rees S.B. & Harborne J.B. (1985).** The role of sesquiterpenes lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. *Photochemistry.* **24**: 2225-31.
- Rein D., Teresa G.P., Debra A.P., Wun T., Schmitz H.H., Gosselin R. & Carl L.K.(2000).** Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. *J. Nutr.* **130**: 2120-6.
- Ribéreau-Gayon P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. (ED) *Dunod*. Paris. 254p
- Riffel A. (2003).** Radiolyse Gamma des flavonoïdes, étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depside. Thèse de Doctorat en Biophysique. Université de Limoges. 197p.
- Rios J.L. & Recio M.C. (2005).** Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* **100**: 80-4.
- Rocha-Guzmán N.E., Gallegos-Infante J.A., González-Laredo R.F., Reynoso-Camacho R., Ramos-Gómez M., Garcia-Gasca T., Rodríguez-Muñoz M.E., Guzmán-Maldonado S.H., Medina-Torres L. & Lujan-García B.A. (2009).** Antioxidant activity and genotoxic effect on HeLa cells of phenolic compounds from infusions of *Quercus resinosa* leaves. *Food Chem.* **115**:132-5.
- Romani A., Galardi C., Pinelli P., Mulinacci N. & Heimle D. (2002).** HPLC quantification of flavonoids and biflavonoids in *Cupressaceae* leaves. *Chromatographia.* **56**: 469-74.
- Sahpaz S., Garbacki N., Tits M. & Bailleul F.(2002).** Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. *J. Ethnopharmacol.* **79**:389-92.
- Salama H.M.H. & Marraiki N. (2010).** Antimicrobial activity and phytochemical analyses of *Polygonum aviculare* L. (Polygonaceae), naturally growing in Egypt. *Saudi Journal of Biological Sciences.* **17**:57-63.
- Salih A., Le Quéré J. & Drilleau J. (2000).** Effect of hydrocinnamic acids on the growth of lactic bacteria. *Sciences des Aliments.* **20**(6):537-60.

**Sarac N. & Ugur A. (2007).** Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey. *Eur Asia J. Bio. Sci.* **4**: 28-37.

**Sato Y., Shibata H., Arai T., Yamamoto A., Okimura Y., Arakaki N. & Higuti T. (2004).** Variation in synergistic activity by flavone and its related compounds on the increased susceptibility of various strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **24**: 28–35.

**Schaneberg B.T., Crockett S., Bedir E. & Khan I.A. (2003).** The role of chemical fingerprinting: application to *Ephedra*. *Phytochemistry.* **62**: 911–8.

**Schijlen E.G.W.M., Ric de Vos C.H., Van Tunen A.J. & Bovy A.G. (2004)** Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry.* **65**: 2631–48.

**Shahidi Bonjar G.H. (2004).** Antibacterial screening of plants used in Iranian folkloric medicine. *Fitoterapia.* **75**: 231–235

**Shahidi Bonjar G.H., Aghighi S. & Karimi Nik A. (2004).** Antibacterial and antifungal survey in plants used in indigenous herbal medicine of south east regions of Iran. *J. Bio. Sci.* **4**(3): 405-12.

**Shan B., Cai Y.Z., Brooks J.D. & Corke H. (2007).** The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int. J. Food Microbiol.* **117**: 112-9.

**Simin K., Ali Z., Khaliq-Uz-Zaman S.M. & Ahmad V.U. (2002).** Structure and biological activity of a new retinoid from *Pongamia pinnata*. *Nat. Prod. Lett.* **16**:351–7.

**Simpson L.N., Harper P.B. & O'Callghan C.H. (1980).** Principal  $\beta$ -Lactamases responsible for resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **17**(6): 929-36.

**Smith A.H., Inlay J.A. & Mockie R.I. (2003).** Increasing the oxidative stress response allows *Escherichia coli* to overcome inhibitory effect of condensed tannins. *American Society of Microbiology.* **69**:3406-11.

**Song F.L., Gan R.Y., Zhang Y., Xiao Q., Kuang L. & Li H.B. (2010).**Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected chinese medicinal plants. *Int. J. Mol. Sci.* **11**: 2362-72.

**Spigno G., Tramelli L. & De Faveri D.M. (2007).** Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering.* **81**: 200-8.

**Stapleton P.D., Shah S., Anderson J.C., Hara Y., Hamilton-Miller J.M.T. & Taylor P.W. (2004).**Modulation of  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **23**: 462-67.

**Stulzer H. K., Tagliari M.P., Zampirolo J.A., Cechinel-Filho V. & Schlemper V. (2006).** Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*. *J. Ethnopharmacol.* **108**: 379-84.

**Tahraoui A., El-Hilaly J., Israili Z.H. & Lyoussi B. (2007).** Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). *J. Ethnopharmacol.* **110**: 105–17.

**Tandon V.K., Hardesh K., Maurya A., Nripendra N., Mishra B. & Praveen K.S.(2009).** Design, synthesis and biological evaluation of novel nitrogen and sulphur containing hetero-1, 4-naphthoquinones as potent antifungal and antibacterial agents. *European J. Med. Chem.* **44**:3130–37.

**Tapondjou A.L., Adler C., Fontem D.A., Bouda H. & Reichmuth C. (2005).** Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. *Journal of Stored Products Research.* **41**: 91–102.

**Tawaha K., Alali F.Q., Gharaibeh M., Mohammad M. & El-Elimat T. (2007).**Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species.*Food Chem.***104**:1372-8.

**Tellez M. R., Khan I.A., Schaneberg B.T., Crockett S.L., Rimando A.M. & Kobaisy M. (2004).** Steam distillation-solid-phase micro-extraction for the detection of *Ephedra sinica* in herbal preparations. *J. Chromatogr. A.* **1025**: 51-56.

**Thomson C.J., Power P., Ruebsamen-Waigmann H. & Labischinski H. (2004).** Antibacterial research and development in the 21<sup>st</sup> Century: an industry perspective of the challenges. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 445-50.

**Thoo Y.Y., Hoa S.K., Liang J.B., Hob C.W. & Tan C.P. (2009).** Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food Chem. Article In Press.*

**Tiwari R.P., Bharti S.K., Kaur H.D., Dikshit R.P. & Hoondal G.S. (2005).**Synergistic antimicrobial activity of tea and antibiotics. *Indian J. Med. Res.* **122**:80-84.

**Valant-Vetschera K.M., Fischer R. & Wollenweber E. (2003).** Exudates flavonoids in species of *Artemisia* (Asteraceae-Anthemideae): new results and chemosystematic interpretation. *Biochem. Syst. Ecol.* **31**: 487–98.

**van Vuuren S.F. (2008).** Antimicrobial activity of South African medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.***119**: 462-72.

**Vergé S., Soulet S., Lacan F., Mas T., Arnaudinaud V., Nay B., Castagnino C., Delaunay J.C., Cheze C., Monti J.P., Deffieux G., Merillon J.M., Nuhrich A. & Vercauteren J. (1990).** Les polyphénols du vin: de la chimie pour la vie. *Bull. Soc. Pharm.* **138**: 75-90.

**Vivas N., De Gaulejac N.V. & Nonier M.F. (2003).**Sur l'estimation et la quantification des composés phénoliques des vins. Estimation and quantification of wine phenolic compounds. *Bulletin de l'O.I.V.* **02**: 865-66.

**Voravuthikunchai S., Lortheeranuwat A., Jeeju W., Sririrak T., Phongpaichit S. & Supawita T. (2004).** Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Ethnopharmacol.* **94**: 49-54.



**Wagner H. & Ulrich-Merzenich G. (2009).** Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. **16**: 97–110.

**Walker C.I.B., Trevisan G., Rossato M.F., Franciscato C., Pereira M.E., Ferreira J. & Manfron M.P. (2008).** Antinociceptive activity of *Mirabilis jalapa* in mice. *J. Ethnopharmacol.* **120**: 169–75.

**Weckesser S., Engel K., Simon-Haarhaus B., Wittmer A., Pelz K. & Schempp C.M. (2007).** Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine*. **14**: 508–16.

**Wichtl M. & Anton R. (2003).** Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. (Ed.) *TEC & DOC*. 2<sup>ème</sup> édition. *Lavoisier*. 689p.

**Williams J.D. (1999).**  $\beta$ -lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Int. J. Antimicrob. Agents* **12** Suppl. **1**:S3–S7.

**Yang Z., Niu Y., Le Y., Ma X. & Qiao C. (2010).**  $\beta$ -lactamase inhibitory component from the roots of *Fissistigma cavaleriei*. *Phytomedicine*. **17** :139-41.

**Yousfi K. (2010).** Essai de caractérisation biochimique d'un mécanisme de résistance par  $\beta$ -lactamases d'une souche hospitalière d'*Acinetobacter baumannii*. Thèse de Magister en Biologie. Université A/MIRA. Bejaia. 63p.

**Yousfi M., Djeridane A., Nadjemi B., Maamri S., Djireb F. & Stocker B. (2006).** Phenolic extracts from various Algerian plants as strong inhibitors of porcine liver carboxylesterase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **21**(6): 719-26.

**Zhao W.H. Hu Z.Q., Hara Y. & Shimamura T. (2002).** Inhibition of penicillinase by epigallocatechin gallate resulting in restoration of antibacterial activity of penicillin against penicillinase-producing *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2266-8.

**Zheng W.F., Tan R.X., Yang L. & Liu Z.L. (1996).** Two flavones from *Artemisia giraldii* and their antimicrobial activity. *Planta Med.* **62**:160-62.

**Zuo G.Y., Wang G.C., Zhao Y.B., Xu G.L., Hao X.Y., Han J. & Zhao Q. (2008).** Screening of Chinese medicinal plants for inhibition against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Ethnopharmacol.* **120**: 287–90.

**Autres références:**

<http://www.gardenbreizh.org> (24/02/2010)

<http://www.google.fr> (25/02/2010)

<http://www.wikipedia.org> (15/01/2010)

# **Annexes**

### Annexe 01: Courbe d'étalonnage d'acide gallique

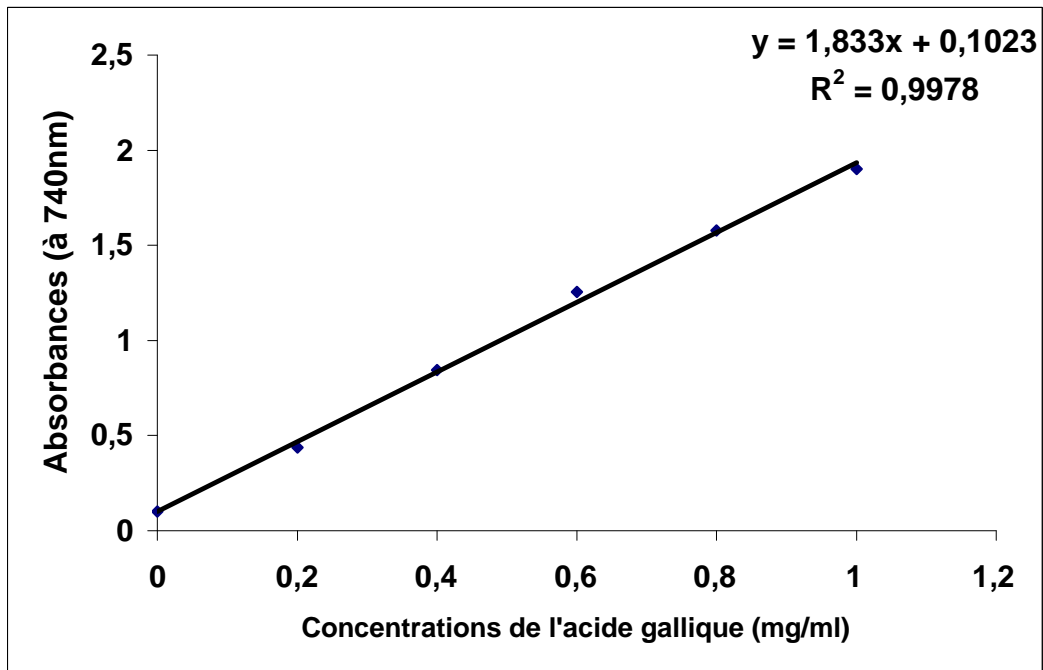


Figure 01 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique utilisée pour quantifier les Polyphénols totaux des différents extraits de plantes.

### Annexe 02 : Calcul des vitesses d'hydrolyse des antibiotiques par les $\beta$ -lactamases

Selon la loi de Beer-Lambert :  $\Delta A = \epsilon \Delta C l$  ; Donc:  $\Delta C = \Delta A / \epsilon l$

(A : Absorbance; C : concentration;  $\epsilon$  : coefficient d'extinction molaire; l : trajet optique)

On sait que :  $V = \Delta C / \Delta t$  (V : vitesse d'hydrolyse; t : temps)

Sachant que :

$\Delta t = t_2 - t_0$  dans le cas où  $\Delta \epsilon < 0$

$\Delta t = t_0 - t_2$  dans le cas où  $\Delta \epsilon > 0$

## Résumé

Durant cette étude, nous avons évalué l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques de 08 plantes médicinales locales vis-à-vis de 04 souches bactériennes de référence. Tous les extraits étaient riches en composés phénoliques. L'extrait des feuilles de *Quercus ilex* s'est avéré le plus efficace sur les quatre souches testées. La souche de *S. aureus* est la plus sensible alors que *P. aeruginosa* est la plus résistante aux extraits des plantes. Les tests iodométriques ont montré que les extraits d'*A. absinthium*, *C. arvensis* et *M. jalapa* inhibent les céphalosporinases et les pénicillinases de la souche d'*Acinetobacter baumannii* et que l'extrait d'*E. altissima* inhibe uniquement les céphalosporinases de cette même souche. La pénicillinase d'*A. baumannii* est inhibée avec des taux de 93.81% par *M. jalapa*, 87.62% par *A. absinthium*, 87.25% par *C. arvensis* alors que la céphalosporinase est inhibée avec des taux de 40.90% par *M. jalapa*, 31.81% par *A. absinthium* et 45.45% par *C. arvensis*.

**Mots clés** : Plantes médicinales, extraits méthanoliques, composés phénoliques, activité antibactérienne, inhibition de  $\beta$ -lactamases.

## Summary

In this study, we have evaluated the antibacterial activity of methanolic extracts from 08 local medicinal plants against 04 bacterial reference strains. All extracts were rich on phenolic compounds. *Q. ilex* leaf's extract was the most active one showing activity against all strains under study. *S. aureus* was the most susceptible strain to plant extracts whereas *P. aeruginosa* was the most resistant one. Iodometric essays have demonstrated that extracts from *A. absinthium*, *C. arvensis* and *M. jalapa* inhibited penicillinases and cephalosporinases of *Acinetobacter baumannii* however *E. altissima* extract inhibit cephalosporinases only. Penicillinases of *A. baumannii* were inhibited at 93.81% by *M. jalapa*, at 87.62% by *A. absinthium* and at 87.25% by *C. arvensis*. Céphalosporinases were inhibited at 40.90% by *M. jalapa*, at 31.81% by *A. absinthium* and at 45.45% by *C. arvensis*.

**Keywords**: Medicinal plants, methanolic extracts, phenolic compounds, antibacterial activity,  $\beta$ -lactamases inhibition.

## ملخص

أثناء هذه الدراسة قمنا باختبار فعالية المستخلصات الميثانولية لـ 08 أعشاب طبية على أربعة بكتيريا تنتمي إلى فصائل مختلفة. كل هذه المستخلصات كانت غنية بالفينولات. مستخلص أوراق *Q. ilex* كانت أكثر فعالية. *S. aureus* هي أكثر حساسية لمستخلصات النباتات بينما *P. aeruginosa* كانت أكثر مقاومة. الاختبار الأيودوميترى بين أن مستخلصات *A. absinthium* و *C. arvensis* و *M. jalapa* تهدم  $\beta$ -لاكتيمزات *Acinetobacter baumannii* (pénicillinases و céphalosporinases) أما مستخلص *E. altissima* فيهدم céphalosporinases منه البكتريا فقط. نشاط pénicillinases تثبط بالنسب التالية : 93.81% بـ *M. jalapa* / 87.62% بـ *A. absinthium* / 87.25% بـ *C. arvensis* . نشاط céphalosporinases تثبط بالنسب التالية : 40.90% بـ *M. jalapa* / 31.81% بـ *A. absinthium* / 45.45% بـ *C. arvensis* .

**الكلمات المفتاح**: أعشاب طبية; المستخلصات الميثانولية; الفينولات; نشاط ضد البكتريا; تثبيط  $\beta$ -لاكتيمزات .