



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

**UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCCEN**

# MEMOIRE

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

**MASTER EN CHIMIE**

Spécialité : Chimie des Produits Naturels

Par :

**Melle SAIDI khadidja**

Sur le thème

---

**Analyse phytochimique et effet inhibiteur des extraits  
*d'Acinos alpinus* et *Micromeria debilis* sur des bactéries BLSE  
d'origine hospitalières**

---

Soutenu publiquement le 11 juillet à Tlemccen devant le jury composé de :

Mme AINSEBA Nabila	MCA	Université de Tlemccen	Présidente
Mr BENDAHOU Mourad	Professeur	Université de Tlemccen	Encadrant
Mme MELIANI Nawel	MCB	Université de Tlemccen	Examinatrice

*Année Universitaire : 2020 ~ 2021*

## Dédicace

*C'est avec une joie immense et le cœur ému que je dédie ce mémoire à mes chers parents qui m'ont toujours encouragé dans la poursuite de mes études, ainsi pour leur aide, leur compréhension, leur amour et leurs sacrifices. Ils ont su me donner toutes les chances pour réussir, sans leur soutien et leur amour rien n'aurait été possible.*

*A mes chères sœurs Assia, Fatima Zahra et belle-sœur Soumia pour leurs soutiens et attentions. Elles étaient pour moi, une vraie source d'inspiration et ont été toujours à mes côtés durant les moments difficiles.*

*A mes chers frères Zakaria, Amine et beau-frère Mohamed pour leur appui et leur encouragement. Ils m'ont permis de réaliser que la famille est sacrée.*

*A mes meilleurs amis Nafissa et Khouloud, mes complices et âme sœurs, pour votre patience au cours de ces dernières années, votre réconfort, votre confiance, votre simple présence à mes côtés depuis ces années d'études et pour tous les souvenirs et les moments que nous avons passé ensemble.*

*A mon binôme Souhila, pour votre soutien indéfectible au cours de ces deux dernières années, pour votre présence et pour tout ce que tu m'as apporté*

*A mon très cher neveu Lakhdar et à mes très chères nièces Rokja, Meriem et Amina.*

*A tous ceux qui me sont chers*

## Remerciements

*Avant tout je remercie Allah le tout puissant, de m'avoir guidé tout au long de mon cursus et de m'avoir donné la volonté, la patience et le courage pour réaliser ce travail.*

*Ce mémoire a été réalisé au laboratoire des substances naturelles bioactives (LASNABIO) et au laboratoire de microbiologie appliquée à l'agro-alimentaire au biomédical et à l'environnement (LAMAABE).*

*Mes sincères remerciements s'adressent tout d'abord à mon encadrant, le Professeur BENDAHOU Mourad. Il a su m'apporter un soutien constant, une disponibilité, une écoute, une confiance et des conseils précieux et avisés à la hauteur de ses compétences et de ses réelles qualités humaines, tout au long de ce travail.*

*Merci aux membres du jury, madame AINSEBA Nabila maitre de conférence « A » et madame MELIANI Nawel maitre de conférence « B » A L'université de Tlemcen, de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail et de participer à ce jury.*

*J'exprime mes fortes gratitude à l'équipe 1 « Substances Naturelles Antimicrobiennes » du laboratoire LAMAABE et spécialement aux étudiants doctorants Latti N., Mahdi F., Benziane M.Y. pour leur aide à la réalisation des tests biologiques.*

*Je tiens à remercier toute l'équipe de formation master CPN pour leur professionnalisme lors de ma formation.*

*Également je remercie Mme Berrazeg M. MCA à l'université d'Oran 1 pour les souches BLSE, et Mihoui Khira ingénieure à LASNABIO pour sa gentillesse, sa disponibilité, sa patience et son aide précieuse durant mon stage.*

*Enfin, un grand merci à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.*

## Résumé

Le but assigné à cette étude était l'évaluation de l'effet inhibiteur des extraits d'*Acinos alpinus* et *Micromeria debilis* récoltées dans la région de Béni-snous sur quatre bactéries BLSE d'origine hospitalière. L'analyse des extraits alcoolique, hydroalcoolique et aqueux des parties aériennes des deux plantes a montré que l'espèce *A. alpinus* est plus riche en huile essentielle (0,16%), en flavonoïdes et en tanins que *M. debilis*. Le dosage des polyphénols et des flavonoïdes ont révélé la richesse de l'extrait hydro-alcoolique de *A. alpinus* en extractibles polyphénoliques (46 mg EAG/g MS) et en flavonoïdes (0,12%) que les extraits alcooliques et aqueux de la même plante et ceux de *M. debilis*.

Les tests de l'activité antibactérienne des extraits flavonoidiques et des huiles essentielles des deux plantes sur les quatre bactéries BLSE (*E.coli*, *K.oxytoca*, *K. pneumoniae* 1, *K. pneumoniae* 2) ont montré que seules les souches *E.coli* et *K.oxytoca* sont sensibles à l'huile essentielle d'*A. alpinus* à une CMI de 2%.

**Mots-clés :** *Acinos alpinus*, *Micromeria debilis*, BLSE, huile essentielle, *Lamiaceae*, activité antibactérienne, résistance.

---

## Abstract

The aim of this study was to evaluate the inhibitory effect of extracts of *Acinos alpinus* and *Micromeria debilis* collected in the Beni-snous region on four ESBL bacteria of hospital origin. Analysis of alcoholic, hydroalcoholic and aqueous extracts from the aerial parts of the two plants showed that the species *A. alpinus* is richer on essential oil (0.16%), flavonoids and tannins than *M. debilis*. The determination of polyphenols (46 mg EAG/g MS) and flavonoids (0,12%) revealed the richness of the hydro-alcoholic extract of *A. alpinus* on polyphenolic extracts and flavonoids than the alcoholic and aqueous extracts of the same plant and those of *M. debilis*.

The antibacterial activity of the flavonoid extracts and essential oils of the two plants on the four ESBL bacteria (*E.coli*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* 1, *K. pneumoniae* 2) showed that only *E.coli* and *K. oxytoca* strains are sensitive to the essential oil of *A. alpinus* at a MIC of 2%.

**Key words:** *Acinos alpinus*, *Micromeria debilis*, ESBL, essential oil, *Lamiaceae*, antibacterial activity, resistance.

## الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم التأثير المثبط للمستخلصات لنباتين (*Micromeria debilis* و *Acinos alpinus*) تم جمعهما في منطقة Béni-snousse على بكتيريا ESBL من أصل إستشفائي. أظهر تحليل المستخلصات الكحولية والكحولية المائية والمائية من الأجزاء الهوائية للنباتين أن نوع *A. alpinus* غنى بالزيوت العطرية (0.16%) والفلافونويدات والعفص من *M. debilis*. تحديد البوليفينول والفلافونيدات كشف عن ثراء المستخلص المائي الكحولي لـ *A. alpinus* من مستخلصات البوليفينول (46 مجم EAG / جم MS) و الفلافونويد (0.12%) من المستخلصات الكحولية والمائية لنفس النبات ومن مستخلاصات *M. debilis*.

أظهرت اختبارات النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصات الفلافونويد والزيوت الأساسية للنباتين على بكتيريا *ESBL* الأربعة (*E.coli* ، *K. oxytoca* ، *K. pneumoniae 1* ، *K. pneumoniae 2*) أن فقط سلالات *E.coli* و *K. oxytoca* حساسة للزيت العطري *A. alpinus* عند الحد الأدنى للتركيز 2%.

**الكلمات المفتاحية:** *Micromeria debilis* ، *Acinos alpinus* ، *BLSE* ، زيت أساسي، *Lamiaceae* ، النشاط المضاد للبكتيريا ، المقاومة .

# Sommaire

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1

## Partie 1 : Synthèse bibliographique

<b>Chapitre I :</b> .....	3
1. Les $\beta$ -lactamines.....	3
1.1. Classification des $\beta$ -lactamines.....	3
1.2. Résistance chez les entérobactéries.....	4
2. Les BLSE.....	4
3. Inhibitions $\beta$ -lactamases et résistances aux inhibiteurs.....	4
<b>Chapitre II : Plantes aromatiques-médicinales anti-infectieuses.....</b>	<b>5</b>
1. Les huiles essentielles.....	5
2. Les polyphénols.....	6
3. <i>Acinos alpinus</i> .....	8
4. <i>Micromeria debilis</i> .....	12

## Partie 2 : Etude expérimentale

<b>Chapitre I : Matériels et méthodes.....</b>	<b>15</b>
1. Matériel végétal.....	15
2. Matériel bactérien.....	16
3. Criblage phytochimique.....	16
4. Extraction des flavonoïdes.....	17
5. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.....	18
6. Dosage des polyphénols totaux.....	19
7. Dosage des flavonoïdes.....	19
8. Test antibactérien (anti-BLSE).....	20
9. Analyse statistique.....	23

<b>Chapitre II : résultats et interprétations</b> .....	24
1. Rendements des extractions .....	24
2. Résultats des tests phytochimiques.....	25
3. Rendements en HE.....	26
4. Dosage des polyphénols totaux .....	27
5. Dosage des flavonoïdes totaux .....	28
6. Test antibactérien (anti-BLSE).....	30
<b>Conclusion Générale</b> .....	35
<b>Référence bibliographique</b> .....	36

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Principales classes des $\beta$ -Lactamines.....	3
<b>Figure 2a</b> : Structure des flavonoïdes .....	7
<b>Figure 2b</b> : Structure des classes des flavonoïdes.....	7
<b>Figure 3</b> : <i>Acinos alpinus</i> (L.) Moench.....	9
<b>Figure 4</b> : Répartition géographique d' <i>Acinos alpinus</i> .....	10
<b>Figure 5</b> : <i>Micromeria debilis</i> Pomel.....	13
<b>Figure 6</b> : Distribution géographique de <i>Micromeria débilis</i> .....	13
<b>Figure 7</b> : Carte géographique du lieu de récolte des plantes .....	15
<b>Figure 8</b> : <i>Acinos alpinus</i> (Beni-Snous - Tlemcen, juin 2020).....	16
<b>Figure 9</b> : <i>Micromeria débilis</i> (Beni-Snous - Tlemcen, juin 2020).....	16
<b>Figure 10</b> : Dispositif sous reflux .....	18
<b>Figure 11</b> : Montage Clevenger pour l'extraction des huiles essentielles .....	18
<b>Figure 12</b> : Réalisation d'un test de synergie.....	20
<b>Figure 13</b> : Schéma de préparation des dilutions de l'huile essentielle.....	23
<b>Figure 14</b> : Schéma de la méthode de microplaque .....	23
<b>Figure 15</b> : Rendements (% MS) des extraits bruts d' <i>Acinos alpinus</i> et <i>Micromeria debilis</i> (tiges + feuilles + fleurs) .....	24
<b>Figure 16</b> : Rendement des huiles essentielles (en %) d' <i>A. alpinus</i> et <i>M. debilis</i> .....	26
<b>Figure 17</b> : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	27
<b>Figure 18</b> : Teneurs en polyphénols totaux des extraits d' <i>A.alpinus</i> et <i>M.debilis</i> (Exprimée en mg EAG/g MS) .....	28
<b>Figure 19</b> : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.....	29
<b>Figure 20</b> : Teneur en flavonoides des parties aériennes d' <i>Acinos alpinus</i> et <i>Micromeria debilis</i> exprimé en % .....	29
<b>Figure 21</b> : Antibiogramme des entérobactéries BLSE retenues ( <i>K. pneimoniae</i> 1 ; <i>K. pneumoniae</i> 2 ; <i>K. oxytoca</i> ; <i>E.coli</i> ).....	30
<b>Figure 22</b> : Photos du test de synergie (BLSE) .....	31
<b>Figure 23</b> : Photos des tests de puits de diffusion des extraits flavnoïdiques et HE d' <i>A.alpinus</i> et <i>M.debilis</i> sur <i>E. coli</i> et <i>K. oxytoca</i> (BLSE) .....	32
<b>Figure 24</b> : Photos de la CMI sur plaque de l'HE d' <i>A. alpinus</i> (A) : avant incubation ; (B) : après incubation.....	34



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Nomenclature des terpènes.....	<b>5</b>
<b>Tableau 2</b> : Taxonomie et classification d' <i>A.acinos</i> .....	<b>9</b>
<b>Tableau 3</b> : Les flavonoides présents dans <i>A. alpinus</i> .....	<b>11</b>
<b>Tableau 4</b> : Taxonomie et classification de <i>M.debilis</i> .....	<b>12</b>
<b>Tableau 5</b> : Rendements (en % MS) et caractéristiques des extraits des deux plantes <i>Acinos alpinus</i> et <i>Micromeria debilis</i> (tiges + feuilles + fleurs).....	<b>24</b>
<b>Tableau 6</b> : Résultats des tests phytochimiques de la partie aérienne des deux plantes <i>A.alpinus</i> et <i>M. debilis</i> .....	<b>25</b>
<b>Tableau 7</b> : Teneurs en polyphénols totaux de <i>Acinos alpinus</i> et <i>Micromeria debilis</i> (en mg EAG/g Ms.....)	<b>27</b>
<b>Tableau 8</b> : Caractéristiques et résultats des tests de sensibilité des quatre souches BLSE.....	<b>31</b>
<b>Tableau 9</b> : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des différents extraits flavonoïdiques et huiles essentielles d' <i>A.alpinus</i> et <i>M.debilis</i> .....	<b>32</b>
<b>Tableau 10</b> : Résultat de la CMI (en %) des HEs d' <i>A. alpinus</i> et <i>M. debilis</i> .....	<b>34</b>

## Liste des abréviations

*A. alpinus* : *Acinos alpinus*

*M. debilis* : *Micromeria debilis*

**HE** : huile essentielle

**mm**: millimètre

**nm** : nanomètre

**ml**: millilitre

**μL** : microlitre

**g** : gramme

**h** : heures

**%** : Pourcentage.

**°C** : Degré Celsius.

**mg EAG/g MS**: milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche.

**mg EQ/g MS** : milligramme équivalent de quercétine par gramme de matière sèche.

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice.

**DMSO** : Diméthyl sulfoxyde

**DO** : Densité optique

*E. coli* : *Escherichia coli*

*K. oxytoca* : *Klebsiella oxytoca*

*K. pneumoniae* : *Klebsiella pneumoniae*

**BLSE**:  $\beta$ -lactamases à spectre étendu.

**rpm** : rotation par minute

**Ufc** : unité formant colonie

**BHIB** : Bouillon Cœur cervelle

**Rd** : rendement

**UV/VIS** : ultraviolet-visible

**MH**: Mueller Hinton

## Introduction

Les maladies infectieuses d'origine bactériennes constituent un problème de santé publique à cause de leur fréquence, leur gravité et leur coût socioéconomique [1]. En effet, les antibiotiques occupent une place éminente dans le traitement de ces maladies mais l'émergence des bactéries résistantes pose un problème d'inefficacité de ces agents anti-infectieux. Cette résistance acquise est attribuée à l'usage excessif et souvent inappropriée des antibiotiques bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire [2].

L'acquisition des phénomènes de résistance chez les bactéries en particulier chez les entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) a atteint des niveaux dangereusement élevés en Algérie et à travers le monde. Ces enzymes catalysent spécifiquement la liaison amide du cycle  $\beta$ -lactame des  $\beta$ -lactamines rendant l'antibiotique inactif avant qu'il n'atteigne sa cible. Si beaucoup d'inhibiteurs de BLSE ont été développés comme les dérivés de l'acide boronique, acyl phosphanates, acide picolinique, acide clavulanique, acide mercaptocarboxylique....., ces inhibiteurs sont non stables et ont une faible pénétration de la cellule bactérienne [2].

La découverte de nouveaux agents anti-infectieux est devenue plus qu'indispensable vu l'impasse thérapeutique causée par les bactéries multi-résistance. L'exploration des ressources naturelles précisément les plantes aromatiques et médicinales apparaît comme la piste de recherche la plus prometteuse grâce à la biodiversité de leur réserve de substances actives.

Les plantes aromatiques médicinales pourraient être le traitement alternatif des maladies chroniques ou graves, et même résoudre le problème de la résistance bactérienne vis-à-vis des agents antibactériens actuels. Des travaux récents ont montré l'importance des métabolites secondaires d'origine végétale comme les huiles essentielles et leurs dérivées en tant qu'agents antimicrobiens [3]. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'axe de recherche des substances naturelles antibactériennes de la flore de l'ouest Algérien à savoir *Acinos alpinus* et *Micromeria debilis* contre des bactéries BLSE isolées à l'hôpital.

Le choix de ces deux plantes a été justifié par les indications d'usages traditionnels et par le peu de travaux sur ces plantes.

Pour cela, notre travail est structuré comme suit :

- Une première partie est une synthèse bibliographique sur la résistance bactérienne, les métabolites secondaires et les plantes *Acinos alpinus* et *Micromeria debilis* ;
- Une deuxième partie présente le matériel et les méthodes utilisés dans notre travail.
- Et enfin, la troisième partie présente les résultats obtenus et leurs discussions.

## Chapitre I : La résistance bactérienne aux antibiotiques

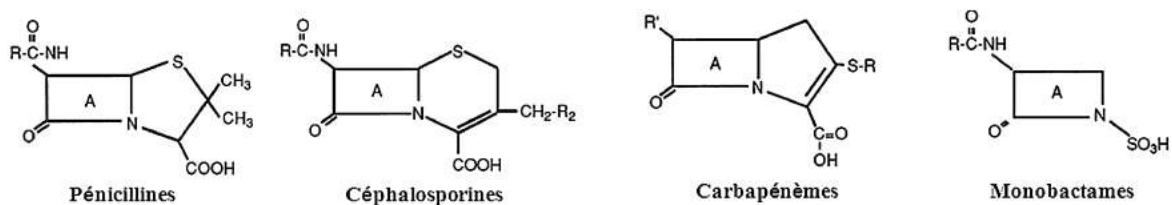
Les antibiotiques, sont des substances chimiques naturelles, de synthèse ou d'hémi-synthèse capables d'arrêter la croissance des bactéries (effet bactériostatique) ou d'entraîner leurs destructions (effet bactéricide). Cependant, l'augmentation des résistances bactériennes est aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Depuis l'utilisation des antibiotiques, la résistance n'a jamais cessé d'augmenter et les bactéries ont toujours réussi à contourner l'action des antibiotiques [4].

### 1. Les $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines constituent une famille d'antibiotiques largement prescrite en clinique, qui inhibent la biosynthèse du peptidoglycane, qui est le composant principal de la paroi bactérienne, par fixation préférentielle à diverses protéines particulièrement les enzymes impliquées dans cette synthèse désignées sous le nom des protéines liant la pénicilline (PLPS) [5]. L'importance de leur utilisation et leur popularité s'expliquent par la diversité de leurs modes d'administration, une activité antibactérienne à large spectre liée à des effets bactéricides, une bonne diffusion tissulaire, une bonne tolérance et une faible interaction. Ce succès, associé à une surutilisation fréquente, a conduit à l'émergence d'une résistance acquise chez les principales espèces bactériennes [4].

#### 1.1. Classification des $\beta$ -Lactamines

Les  $\beta$ -lactamines sont divisées en quatre catégories selon leur structures chimiques et leur activités antibactériennes : pénicillines (pénames), céphalosporines (céphèmes), monobactames et carbapénèmes [4] (**figure 1**).



**Figure 1** : Principales classes des  $\beta$ -Lactamines [4].

## 1.2. Résistance chez les entérobactéries

La plupart des espèces d'entérobactéries ont une résistance naturelle aux  $\beta$ -lactames. Cette résistance est liée à la production d'une enzyme appelée  $\beta$ -lactamase. Ces bactéries peuvent également acquérir une résistance à de nombreux antibiotiques, résultant d'une modification génétique par mutation ou acquisition du matériel génétique étranger [4].

Généralement, on distingue quatre principaux mécanismes de résistance [4] :

- **La diminution de la perméabilité** : Empêchant l'antibiotique d'atteindre sa cible ou limiter sa concentration dans l'espace péri-plasmique.
- **La modification de la cible** : un mécanisme qui permet de modifier la cible par des mutations affectant la porine, conduisant à des niveaux de résistance élevés.
- **Système d'efflux** : Ce système est basé sur l'excrétion de l'ATB de la cellule par transport actif, rendant le site d'action inaccessible.
- **Production de  $\beta$ -lactamases** : C'est le **principal mécanisme de résistance** aux  $\beta$ -lactamines. Enzyme qui inactive ou détruit l'antibiotique [4]. Il s'agit de la production d'une enzyme  $\beta$ -lactamase qui agit sur l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame au niveau de la liaison amide selon la réaction d'hydrolyse après inactivation d'une molécule d'eau [6].

## 2. Les BLSE

Les  $\beta$ -lactamases à large spectre (BLSE) sont des enzymes produits par des bactéries de la famille des Entérobactéries, capables de dégrader l'ATB, y compris les pénicillines, les céphalosporines et les monobactames, à l'exception des carbapénèmes et les céphamycines [6]. La première BLSE a été décrite chez une souche de *Klebsiella pneumoniae* en Allemagne en 1985 [7].

## 3. Inhibitions des $\beta$ -lactamases et résistances aux inhibiteurs

Les inhibiteurs  $\beta$ -lactamases sont des molécules ayant une activité bactérienne intrinsèque, leur association avec les  $\beta$ -lactamines confère une augmentation de l'activité. Cette nouvelle approche a permis de rendre l'activité à quelques  $\beta$ -lactamines inefficaces sur les bactéries productrices de  $\beta$ -lactamases. Actuellement trois inhibiteurs sont utilisés en thérapeutiques :

l'acide clavulanique, le sulbactam et le tazobactam. L'association la plus utilisée est connu sous le nom d'Augmentin : amoxicilline+acide clavulanique [8].

## Chapitre II : Plantes aromatiques-médicinales anti-infectieuses

Les métabolites secondaires des plantes sont des composés qui n'ont pas de rôle fondamental dans le maintien de la vie végétale, mais ils sont importants pour que les plantes interagissent avec leur environnement pour l'adaptation et la défense et ils contribuent également à l'odeur, au goût et à la couleur des plantes [9].

### 1. Les huiles essentielles

#### 1.1. Définition

Selon AFNOR NT 75-006 : « une huile essentielle est un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation sèche» [10].

#### 1.2. Composition chimique

Une huile essentielle est un mélange complexe constitué de nombreux composants appartenant à deux grandes familles chimiques : les composés terpéniques et les dérivés du phénylpropane [11]. Les composés terpéniques sont caractérisés par la présence de l'unité de base isoprène ( $C_5H_8$ ) [12]. Ces composés sont classés selon leur nombre d'unités isoprène et peuvent être cycliques ou acycliques ,plusieurs familles peuvent être distinguées [11] (tableau 1).

Tableau 1: Nomenclature des terpènes [12]

Nombre d'atomes	Unité d'isoprène	Nomenclature
10	2	Monoterpènes (C10)
15	3	Sesquiterpènes (C15)
20	4	Diterpènes (C20)
25	5	Sesterterpènes (C25))
30	6	Triterpènes (C30)
40	8	Tétraterpènes (C40)

Les phénylpropanoïdes, ou les composés phénoliques, sont des métabolites volatiles biosynthétisés à partir des acides aminés aromatiques, telles que la phénylalanine et la tyrosine. Ses composés se caractérisent par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle [13].

### **1.3. Domaines d'utilisation**

Les huiles essentielles sont utilisées dans plusieurs domaines, grâce à leur effet antioxydant, antimicrobienne et antibactérienne, elles sont utilisées dans la médecine pour traiter diverses maladies inflammatoires comme les rhumatismes, la fièvre et le diabète. En industrie elles sont utilisées comme des arômes pour l'amélioration de la saveur, pour la conservation des aliments et pour empêcher l'oxydation [14].

## **2. Les polyphénols**

### **2.1. Définition**

Les polyphénols sont l'un des produits naturels les plus abondants et les plus répandus dans le règne végétal. Il existe actuellement plus de 8 000 structures phénoliques connues, dont plus de 4 000 flavonoïdes ont été identifiés. Les polyphénols ont été classés selon leur origine, leur fonction biologique et leur structure chimique, ils se caractérisent par la présence d'un cycle aromatique à 6 atomes de carbone, qui porte lui-même un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) [15].

### **2.2. Les acides phénoliques**

Les acides phénoliques sont des composés polyphénoliques. Ils se divisent en deux catégories : les dérivés de l'acide benzoïque (acide hydroxycinnamique) et les dérivés de l'acide cinnamique (acide hydroxybenzoïque) [15].

### **2.3. Les flavonoïdes**

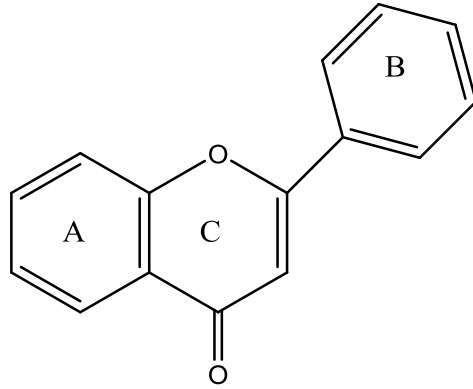
#### **✓ Définition**

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires de la plante qui représentent l'un des groupes les plus divers et les plus vastes de produits naturels végétaux, ces composés jouent également un rôle important dans les plantes elles-mêmes, notamment en tant que pigments et composés de défense [16].



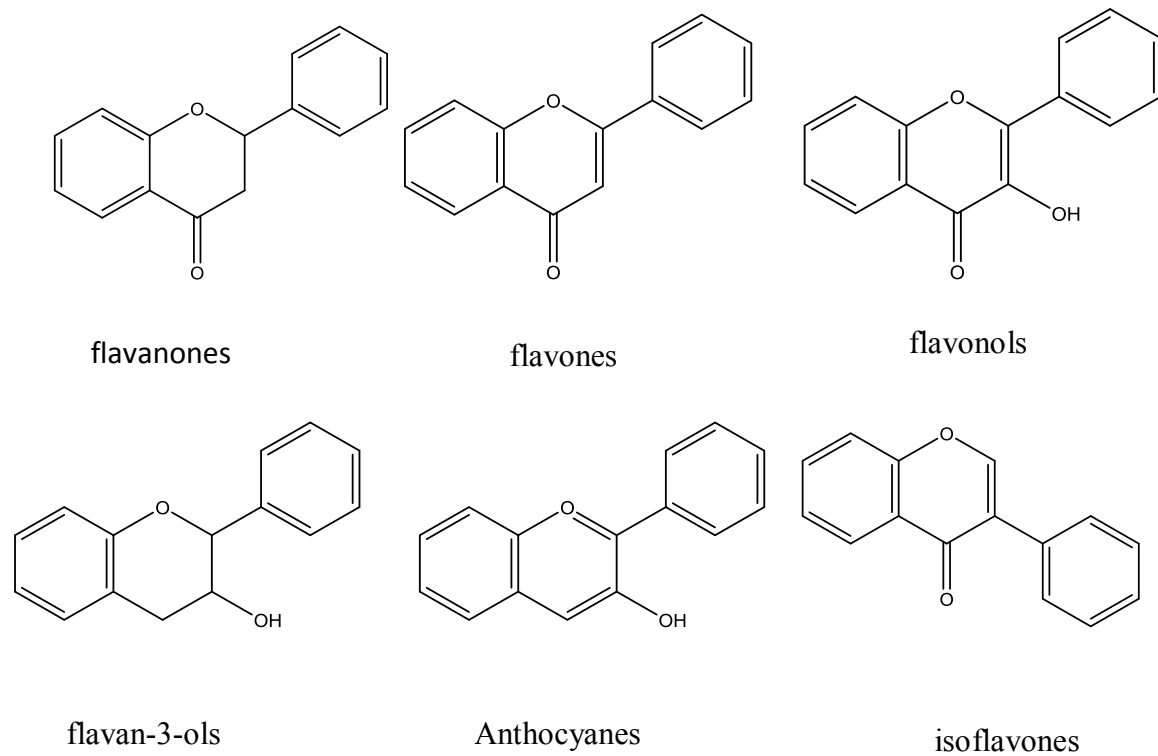
✓ **Structure et classification**

Les flavonoïdes sont une classe de composés naturels caractérisés par une squelette contenant 15 atomes de carbone, base formés par 3 cycles, dont il y a deux cycles C6 (cycle A et B) relié entre eux par une chaîne en C3 souvent fermées en un hétérocycle oxygéné [17] (**figure 2a**).



**Figure 2a** : Structure des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont divisés en six sous-classes : les flavanones, les flavones, les flavonols, flavan-3-ols, les anthocyanes et les isoflavones [17] (**figure 2b**).



**Figure 2b** : Structure des classes des flavonoïdes

### ✓ Propriétés biologiques des polyphénols

Les effets bénéfiques des **polyphénols** intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire. De nombreuses études ont montré que les polyphénols ont un effet positif sur la santé et la prévention des pathologies liées au vieillissement et aux dommages oxydatifs (cancer, maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives). De plus, leur activité antioxydante assure une meilleure conservation des aliments en empêchant la peroxydation des lipides [18]. Les flavonoïdes possèdent un large éventail d'activités biologiques, telles que, anti-inflammatoire, antibactérien, anticancéreux, antiviral et antioxydante qui est liée à la capacité de neutraliser les radicaux libres [17].

## 3. *Acinos alpinus*

### 3.1. Généralité

*Acinos* est un genre de la famille des *Lamiacées*, originaire d'Europe, de la Méditerranée, d'Asie centrale, d'Afrique du Nord et des Amériques [19]. Ce genre se trouve couramment dans les endroits froids et les montagnes [20]. Le nom *Acinos* vient du grec *Akinos*, qui signifie petite plante aromatique. Selon l'Organisation internationale pour l'information sur les plantes (IOPI), le genre *Acinos* Miller comprend 11 espèces [21]. En Algérie, seuls deux taxons sont représentés par *A. alpinus* Moench subsp. *Meridionalis* (Nyman) P.W. Balle et *A. rotundifolius* Pers [22].

*Acinos alpinus* (L) Moench est connu sous le nom de thym de roche avec de nombreux synonymes *Satureja alpina* (L.) Scheele, *Acinos baumgartenii* (Simonk.) Klokov, *Acinos alpinus* susp, *baumgartenii*(Simonk.) Pawl.l, *Melissa baumgartenii* (Simonk.), *Clinopodium alpinum* (L.) mérinos, *Calamintha alpina* (L.) Lam. *Calamintha alpina* (L.) Lam. subsp.*alpina* [20].

### 3.2. Taxonomie et classification

Selon Quézel et Santa [23], *A.alpinus* est classée comme suit (tableau 2) :

**Tableau 2** : Taxonomie et classification d'*A.acinos*

Règne	<i>Plantea</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>lamiaceae</i>
Genre	<i>Acinos</i>
Espèce	<i>Acinos alpinum</i>

### 3.3. Description botanique

**Nom scientifique** : *Acinos alpinus* (L.) Moench

**Nom vernaculaire** : Zatar sakhri

Plante vivace à tiges flexueuses, allongées. Feuilles lancéolées ± crénelées hispides. Calice de 6-8 mm Corolle purpurine, grande, 12-16 mm, avec un long tube composé de pétales soudés. La fleur a quatre étamines fertiles. Le fruit est divisé en quatre lobes ovales (**figure 3**) [23].



**Figure 3** : *Acinos alpinus* (L.) Moench [24].

### 3.4. Répartition géographique

*Acinos alpinus* est distribué jusqu'à 1500 m d'altitude en Europe centrale et orientale et en Afrique du Nord (Algérie, Maroc), où elle se trouve souvent dans un large éventail d'habitats comme les pelouses de montagne, les forêts de chênes et de cèdres (**figure 4**) [24].



germacrène A (32,3%), épi-bicyclosesquiphellandrène (15,8%),  $\beta$ -élémente (12,5%) et  $\beta$ -caryophyllène (12,2%) [28].

La première étude sur la composition chimique de l'extrait a été réalisée par **Golubović et al.**, L'échantillon provenant de Gornje selo (Bosnie) a montré que l'extrait méthanolique contient le thymol (31,5%), bornéol (14,6%) et spathulénole (14,6%) comme composés majoritaire avec une présence significative en germacrène D (9,6%), en oxyde de caryophyllène (9,1%) et en acide hexadécanoïque (8,4%) [29].

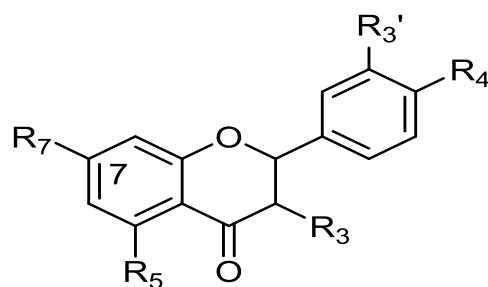
Les mêmes chercheurs en **2020** ont fait une étude comparative sur l'extrait éthanolique d'*Acinos alpinus* récolté dans la même région. L'analyse chromatographique GC/SM a indiqué la présence de thymol (11,01%), n-docsane (10,08%) et l'acide hexadécanoïque (9,15%) comme composés majoritaires [19].

Les résultats de ses deux derniers travaux ont montré que l'extrait méthanolique et l'extrait éthanolique ont une activité antioxydante et antimicrobienne significatives vis-à-vis les souches de références ATCC [19, 29].

Une étude réalisée par **Pviru et al.**, sur la partie aérienne d'*Acinos alpinus* d'origine Roumaine a montré que la teneur totale en flavonoïdes exprimée en équivalent de rutine est de 24,6 mg (RE ; mg/g MS) et la teneur totale en phénol exprimée en équivalent d'acide gallique est de 16,5 mg (GAE ; mg/g MS). Les analyses HPTLC ont indiqué la présence des flavonoïdes [20] (**tableau 3**)

**Tableau 3:** Les flavonoides présents dans *A. alpinus*

Composés	R <sub>3</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>
Apigénine	H	OH	OH	H	OH
Quercétine	OH	OH	OH	OH	OH
Kaempférol	OH	OH	OH	H	OH



L'extrait éthanolique et l'extrait standardisé au propylène glycol ont montré une activité antioxydante modérée et une activité antimicrobienne faible ou inexistante sur les souches microbiennes de références ATCC [20].

Une seule étude sur les acides gras a été réalisée par **Jovanovic et al., (2008)**. Ils ont trouvé que l'acide linoléique était le principal composant d'*A. alpinus* (35,2%) suivi par l'acide palmitique (23,0%) [30].

#### 4. *Micromeria debilis*

##### 4.1. Généralités

L'espèce *Micromeria debilis* Pomel, également connue sous le nom de *Satureja briguetii* Maire est une plante endémique d'Algérie et du Maroc. Dans la flore algérienne, le genre *Satureja* comprend quatre sous-genres : *Calamintha*, *Acinos*, *Clinopodium* et *Micromeria*. En effet le genre *Micromeria* de la famille des lamiacées contient environ soixante-dix espèces avec trente-deux sous-espèces et treize variétés avec une aire de répartition s'étendant de la région himalayenne à l'archipel micronésien et de la mer méditerranéenne à l'Afrique du Sud et Madagascar [31].

##### 4.2. Taxonomie et classification

Selon **Quézel et Santa [23]**, *Micromeria debilis* appartient (**tableau 4**):

**Tableau 4** : Taxonomie et classification de *M.debilis*

Règne	<i>Plantea</i>
Division	<i>Tracheophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>lamiaceae</i>
Genre	Micromeria Benth
Espèce	<i>Micromeria debilis Pomel</i>

##### 4.3. Description botanique

**Nom scientifique** : *Micromeria debilis Pomel*

**Nom vernaculaire** : Tazrira Hmer

Plante endémique avec des tiges très étroites et beaucoup de fleurs couvertes pourpres au sommet. Les feuilles florales sont ovales et lancéolées 2-3 fois plus longues que larges.

Le calice se caractérise par des dents triangulaires très courtes, hérissées d'une poilue pressée dentelées à celle du reste de la plante (**figure 5**) [32].



**Figure 5** : *Micromeria debilis* Pomel [33]

#### 4.4. Répartition géographique :

En Algérie on trouve *Micromeria debilis* dans les zones côtières (**figure 6**).



**Figure 6** : Distribution géographique de *Micromeria debilis* [25]

#### 4.5. Usage traditionnel

Les espèces de genre *Micromeria* sont généralement consommées sous forme de tisane à des fins médicinales contre le rhume. Elles ont de nombreuses activités pharmacologiques, y compris l'anesthésie, antiseptique, antirhume et effets stimulants sur le système nerveux. Aussi, elles sont également utilisées contre les maux de tête, douleurs abdominales, blessures, troubles cardiaques, infections des yeux et de la peau et les troubles cardiaques [32].

#### 4.6. Travaux antérieures

En 2016, **Ghrib et al.**, ont réalisé la première étude sur la composition chimique et l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de la partie aérienne d'un échantillon de *M. debilis* récolté dans deux endroits ; Moghrar et Aïn Safra de la wilaya de Nâama (Algérie). Les analyses par CPG/SM et RMN-<sup>13</sup>C ont révélés que l'HE contient quarante-deux composés dont le  $\beta$ -pinène (19,3%) est le composé majoritaire suivi du gèranial (8,7%), linalol (6,5%), germacrène D (11,4%), (E) - $\beta$ -caryophyllène (8,0 %), oxide de caryophyllène (8,0 %) et le néral (5,4%). L'activité de l'HE vis-à-vis de 10 bactéries de références ATCC et une levure a montré une activité antimicrobienne modérée avec des valeurs de CMI 2  $\mu$ /ml et 6  $\mu$ /ml respectivement [32].

**Yakoubi et al.**, ont testé l'effet inhibiteur de l'HE de *M. debilis* de la région de Nâama (Moghrar) sur la croissance d'*Alternaria* spp., par la méthode de contact direct et ils ont confirmés l'efficacité de l'HE à des faibles concentrations contre les isolats d'*Alternaria* [34].

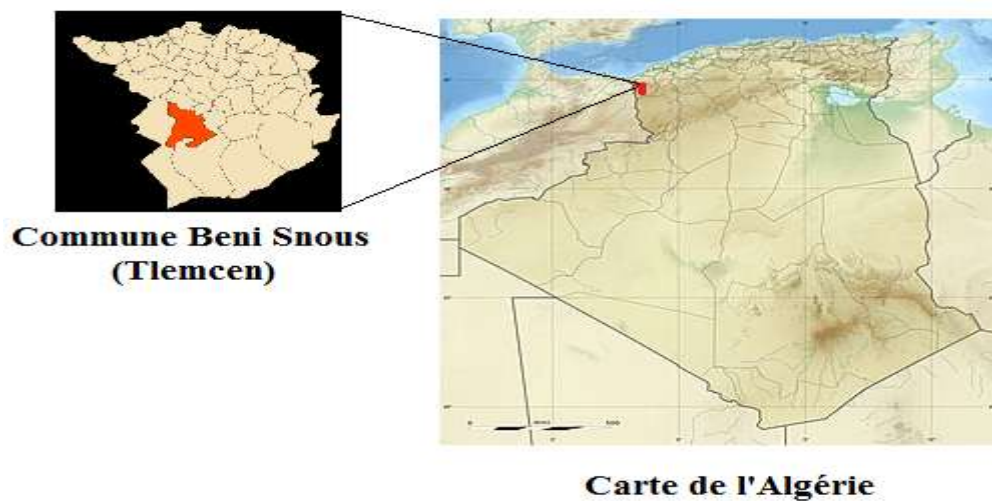


## Chapitre I : Matériels et méthodes

L'étude assignée à ce travail est d'évaluer l'effet antibactérien des extraits de *Acinos alpinus* et *Micromeria debilis* sur les bactéries BLSE d'origine hospitalière.

### 1. Matériel végétal

Les plantes *A. alpinus* et *M. debilis* ont été récoltées dans la région de Beni Snous, wilaya de Tlemcen durant le mois de juin 2020 en période de floraison (**figure 7**).



**Figure 7 :** Carte géographique du lieu de récolte des plantes [35]

La ville de Beni Snous se trouve au sud-ouest algérien, et entre Latitude 34.643, Longitude -1.56145, 34° 38' 35" Nord, 1° 33' 41" Ouest, altitude 835 m d'un climat méditerranéen avec été chaud (**Office national de météorologie, 2019**).

Le matériel végétal a été conditionné après séchage dans du papier kraft. L'identification botanique a été faite au laboratoire botanique du département foresterie-université de Tlemcen où un spécimen est déposé (**figure 8 ; 9**).



**Figure 8 :** *Acinos alpinus*

**Figure 9 :** *Micromeria debilis*

(Beni-Snous - Tlemcen, juin 2020)

## 2. Matériel bactérien

Les quatre souches bactériennes utilisées dans ce travail (à phénotype BLSE), proviennent des malades hospitalisés au CHUs d'Oran (3 souches) et de Tlemcen (1 souche) prélevées durant le mois de mai 2021. L'identification des souches a été réalisé par la méthode automatisée VITEK 2 (Biomerieux).

## 3. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique a pour but d'examiner la nature des principales familles chimiques présentes dans les plantes. Les tests chimiques sont réalisés par des réactions de solubilité, coloration et précipitation en utilisant des réactifs [36, 37, 38, 39,40].

### 3.1. Extraction par macération à froid

Le matériel végétal des deux plantes (tiges+feuilles+fleurs) a été soumis à des extractions par des solvants de polarités déférentes (eau, éthanol, éthanol/eau 7/3)

- **Extrait éthanolique** : 10g de matériel végétal broyé est soumis à une extraction par macération sous agitation dans 100 ml d'éthanol pendant 5 heure à l'obscurité. Après filtration par papier filtre le résidu a subi une nouvelle macération pendant 5 h. Le filtrat est évaporé à sec en utilisant un évaporateur rotatif.
- **Extrait hydro-éthanolique** : 10g de matériel végétal est mis en contact avec 100 ml d'éthanol 70%, l'ensemble est laissé macéré à froid pendant 5 heures sous agitation et à l'obscurité. Après filtration, le résidu est récupéré et macéré une deuxième fois. Le macéras est ensuite évaporé à sec en utilisant un évaporateur rotatif.
- **Extrait aqueux** : 10 g de matériel végétal sont mélangés avec 150 ml d'eau distillé, le mélange est placé dans l'incubateur agitateur à 37°C pendant 48 heures avec

renouvellement de solvant après 24 heures. Les filtrats sont rassemblés et évaporés à sec en utilisant un évaporateur puis conservé à 4°C.

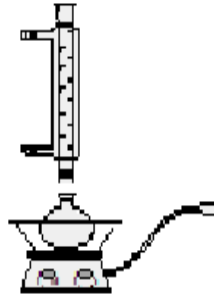
### 3.2. Tests phytochimiques

- ✓ **Les flavonoïdes** : la réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml d'extrait avec 0.5g de tournures de magnésium et quelques gouttes de HCl concentré, après quelques minutes l'apparition de la couleur rose indique la présence des flavonoïdes [36].
- ✓ **Les tanins** : la présence des tanins est mise en évidence par une coloration verdâtre ou bleu foncé après l'ajout de 2-3 gouttes de solution de  $\text{FeCl}_3$  (10 %) à 1ml de chaque extrait avec 2 ml d'eau distillé [37].
- ✓ **Saponosides** : 2ml d'extrait sont ajouté à 2 ml d'eau distillée dans un tube à essai. Après agitation, le mélange est abandonné pendant 20 minutes et la teneur en saponosides est estimée selon l'échelle suivante [38].  
Pas de mousse = Test négatif.                      Mousse moins de 1cm = test faiblement positif  
Mousse de 1-2 cm = test positif.                      Mousse plus de 2cm = test très positif
- ✓ **Les anthraquinones** : 10 ml de chaque extrait a été mélangé avec 5ml de solution d'ammoniaque 10%, après agitation l'apparition d'une couleur violette indique la présence des anthraquinones [36].
- ✓ **Les quinones libres** : leur détection consiste à traiter 10 ml de l'extrait, on le verse dans un tube à essai et on ajoute quelques gouttes de NaOH 1%. L'apparition d'une couleur jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres [39].
- ✓ **Les terpénoïdes** : 5 ml de l'extrait a été introduit dans un tube avec 2 ml de chloroforme et 3ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré. L'apparition de 2 phases et une couleur marron en interphase indique la présence des terpénoïdes [40].

### 4. Extraction des flavonoïdes

20g de matériel végétal broyé sont mélangés avec 200 ml d'éthanol (70%) dans un ballon monocol surmonté d'un réfrigérant (**figure 10**). L'ensemble est porté à reflux pendant 2 heures. Le mélange est filtré et évaporé à sec avec un évaporateur rotatif (Büchi). L'extrait sec est récupéré avec l'eau chaude (50°C) pour une séparation successive par l'acétate d'éthyle (30ml) et le n-butanol (30ml). L'opération est répétée trois fois pour chaque

solvant. Les fractions obtenues ont été évaporées à sec en utilisant un évaporateur rotatif et conservé à 4°C pour les différents tests.



**Figure 10** : Dispositif sous reflux

## 5. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

L'extraction des huiles essentielles (HEs) a été réalisée par hydrodistillation type Clevenger (**figure 11**) selon la technique recommandée par la pharmacopée européenne (**European-Pharmacopoeia, 2005**). Le principe consiste à faire immerger le matériel végétal (200 g) dans l'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition pendant 3 heures. Le mélange vapeur d'eau et huile produits dans le ballon passe dans le condensateur. Ainsi, l'HE est récupéré après décantation et conservée dans des flacons en verre ambrés à 4°C.



**Figure 11** : Montage Clevenger pour l'extraction des huiles essentielles

## 6. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits a été effectué selon la méthode décrite par Singleton et *al.*, (1965) en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu [41].

### 6.1. Principe

Le Réactif de Folin-Ciocalteu est un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), lors d'une réaction d'oxydation en milieu alcalin de ce réactif avec le groupement oxydable du phénol, il se forme un mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et du molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). La coloration bleue est suivie dans le visible a une longueur d'onde de 765 nm [42].

### 6.2. Mode opératoire

Un volume 200  $\mu$ l de chaque solution a été mélangé avec 1ml du réactif de Folin- Ciocalteu fraîchement préparé (10 fois dilué) et 0,8ml de carbonate de sodium à 7,5% ( $Na_2CO_3$ ) a été ajouté. Après agitation et incubation à température ambiante pendant 2 heures la lecture des absorbances a été effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS (OPTIZEN) à 765 nm. L'opération est répétée trois fois. En même temps, une courbe d'étalonnage est réalisée avec l'acide gallique à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme du poids sec de la plante en appliquant la formule suivante :

$$C = (c \times V) / m$$

**C**: La teneur en phénols totaux (mg d'ac. gallique / g de matière sèche).

**c**: La concentration de l'acide gallique établie à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

**V**: Volume de l'extrait (ml)

**m**: Le poids de l'extrait brut (g).

## 7. Dosage des flavonoïdes

### 7.1. Principe

Les flavonoïdes ont un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5 qui peut donner un complexe coloré (jaunâtres) avec le chlorure d'aluminium [43].

## 7.2. Mode opératoire

Une quantité de 1 ml de chaque extrait a été mélangée avec 1 ml de solution éthanolique de chlorure d'aluminium à 2%, après une incubation à l'obscurité pendant 30 min, les absorbances ont été mesurées en utilisant un spectrophotomètre UV/VIS à 430 nm. L'expérience a été réalisée trois fois. Une courbe d'étalonnage réalisée par la quercétine à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats sont exprimés en %.

## 8. Test antibactérien (anti-BLSE)

### 8.1. Purification des souches

Les souches conservées ont été purifiées par repiquage successif sur gélose nutritive et sont ensemencées sur de la gélose nutritive inclinée puis conservées à 4°C.

### 8.2. Détection des souches BLSE (Test de synergie)

La méthode est de chercher une image (bouchon de champagne) de synergie entre un antibiotique inhibiteur de  $\beta$ -lactamases et un antibiotique de céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération (CTX, CAZ) [44]. Par la technique de l'antibiogramme, la recherche de BLSE se fait en disposant 2 disques : amoxicilline + acide clavulanique (AMC) et une céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération (CTX) à une distance de 20 à 30 mm sur gélose Mueller Hinton. L'incubation se fait à 37°C pendant 18h (figure 12).

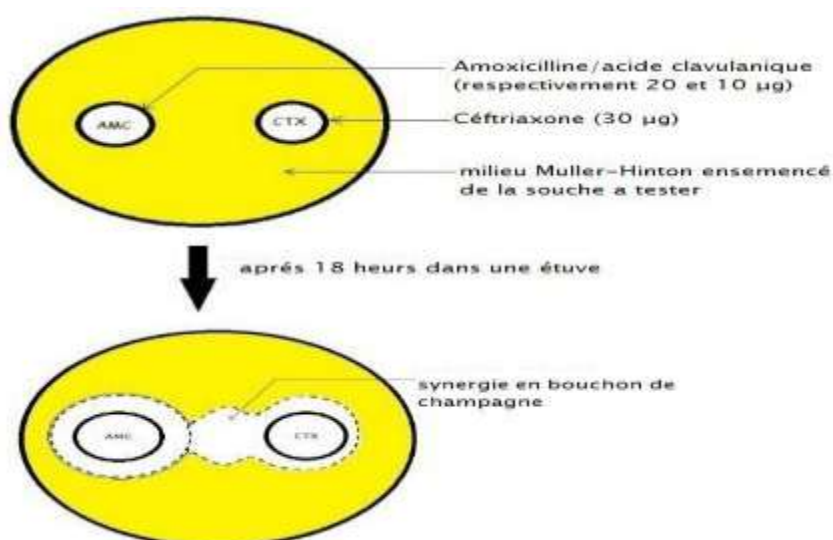


Figure 12: Réalisation d'un test de synergie [45]

### 8.3. Préparation des suspensions bactériennes

Chaque souche purifiée précédemment est ensemencée au préalable sur des boîtes de Pétrie préalablement coulées par la gélose Mac Conkey, puis incubé à 37 °C pendant 24 h. Ensuite, 4 colonies bactériennes bien isolées sont mises en suspension dans l'eau physiologique à 0,9 % NaCl. Cette suspension est ajustée au standard Mc Farland 0,5 à l'aide d'un spectrophotomètre, correspondant à une densité optique DO entre 0,08 à 0,1 lue à 625 nm, ce qui correspond à une suspension contenant environ  $10^8$  UFC/ ml [56].

### 8.4. Antibiogramme

➤ La méthode utilisée est la technique de diffusion des antibiotiques en milieu solide (méthode des Disques), selon le **CA-SFM** [56]. L'antibiogramme a été réalisé sur des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre remplies par la gélose Muller–Hinton. Les boîtes sont ensemencées par écouvillonnage à partir des suspensions bactériennes de  $10^8$  ufc/mL. Puis les disques d'antibiotiques sont déposés sur la surface de la gélose et les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24h. Après 24 heures d'incubation, on mesure les diamètres d'inhibition en se référant aux valeurs critiques publiées par le **CA-SFM** [56].

Les antibiotiques utilisés (**oxoid**) sont : Amoxicilline (25µg), l'amoxicilline/acide clavulanique (30µg), ticarcilline (75µg), acide ticarcilline/acide clavulanique (85µg), pipéracilline (75µg), pipéracilline/tazobactam(85µg), céphalotine (30µg), céfotaxime (30µg), la ceftazidime (30µg), céfépime (30µg), l'imipénème (10µg), l'aztréonam (30µg), la céfoxitine (30µg), la gentamicine (15µg), l'amikacine (30µg) l'acide nalidixique (30µg), la ciprofloxacine (5µg), Triméthoprim/sulfaméthoxazole (75µg) , Doxycycline (30µg) , Colistine (10µg), Fosfomycine (30µg).

### 8.5. Préparation des solutions des extraits

Les différents extraits ont été dilués avec le diméthyle sulfoxyde (DMSO stérile à 5%), puis ils ont subi une centrifugation de 3000 rpm pendant 20 minutes, ensuite filtrés en utilisant des membranes de microfiltration stériles ayant de 0,22µm de diamètre.

### 8.6. Test de diffusion en milieu solide (technique des puits)

Le principe de cette technique consiste à faire couler la gélose Muller-Hinton dans des boîtes de Pétri. Après séchage, les boîtes sont ensemencées par écouvillonnage en utilisant une suspension bactérienne de  $10^8$  cellules/mL qui provient d'une culture jeune de bactéries. La gélose est perforée après séchage à l'aide de la partie supérieure d'une pipette pasteur, les différents extraits sont incorporés dans chaque puits (20  $\mu$ l pour les extraits et 10  $\mu$ l pour l'huile essentielle sans DMSO), après incubation dans une étuve à 37°C pendant 24 h, la lecture des résultats s'effectue par mesure de diamètres des zones d'inhibitions [46,47]. La technique est répétée trois fois.

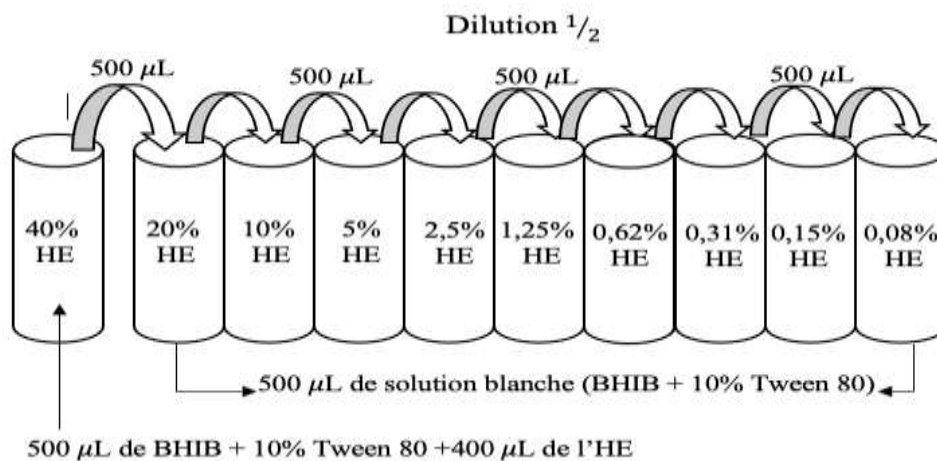
L'interprétation du résultat se fait par la mesure du  $\varnothing$  de la zone d'inhibition à l'aide d'une règle graduée en mm selon la fourchette proposée par **Ponce et al.**, [48] comme suit :

$6 \text{ mm} \leq \varnothing \leq 8 \text{ mm}$ : non sensible	$9 \text{ mm} \leq \varnothing \leq 14 \text{ mm}$ : sensible
$15 \text{ mm} \leq \varnothing \leq 19 \text{ mm}$ : très sensible	$\varnothing \geq 20 \text{ mm}$ : extrêmement sensible

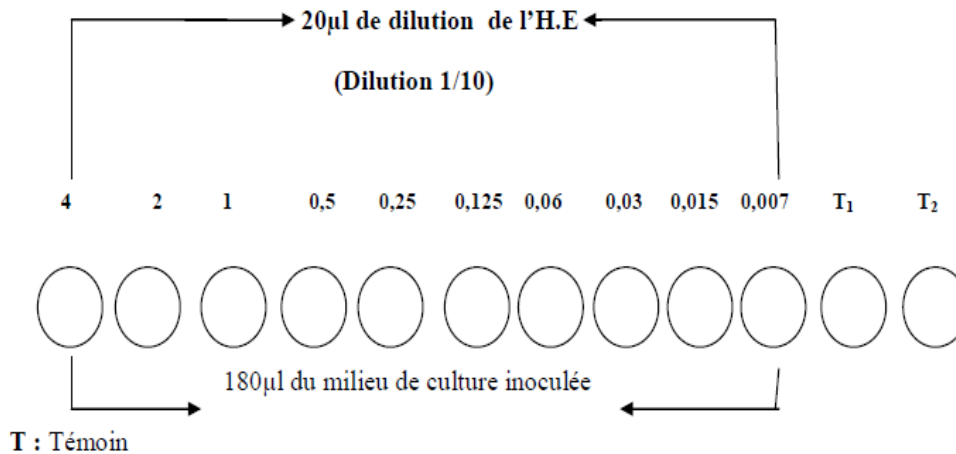
### 8.7. Détermination de la CMI par la méthode de microplaque

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées par microdilution en bouillon en utilisant la méthode modifiée des microplaques par **Wiegand et al.**, [49]. Une microplaque à 96 puits a été utilisée pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI). Une série de dilution à 1/2 de l'extrait retenu (HE de *A.alpinus*) a été préparée dans le bouillon BHIB en ajoutant le Tween 80 à 10 % (v/v). Une deuxième solution dite blanche a été préparée avec le bouillon BHIB et le Tween 80 avec une concentration de 10 % afin de compléter les dilutions successives de la première solution qui contient l'huile essentielle et pour que la concentration de Tween 80 est maintenue à 10 % dans les différentes concentrations préparées (**figure 13**). La microplaque a été préparée en remplissant 180  $\mu$ l de la suspension bactérienne (dilué à 1/100 pour avoir la concentration de  $10^6$  UFC/ml ensuite) avec 20  $\mu$ l d'HE de chaque concentration. La concentration finale dans les puits variait de 4,000 à 0,007 (mg/mL) et la concentration finale du Tween 80 est à 1% dans chaque puits. On laisse deux rangées verticales représentent les témoins (200  $\mu$ l de bouillon BHIB comme premier témoin négatif et 200  $\mu$ l de la suspension microbienne standardisée à  $10^5$  UFC/ml comme témoin positif) (**figure 14**).Après incubation des plaques à 37 °C pendant 18- 24 h, la CMI est déterminée comme la plus faible concentration pour laquelle la croissance microbienne n'est pas observée à l'œil nu [56].





**Figure 13 :** Schéma de préparation des dilutions de l'huile essentielle



**Figure 14 :** Schéma de la méthode de microplaque

## 9. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  l'erreur standard.

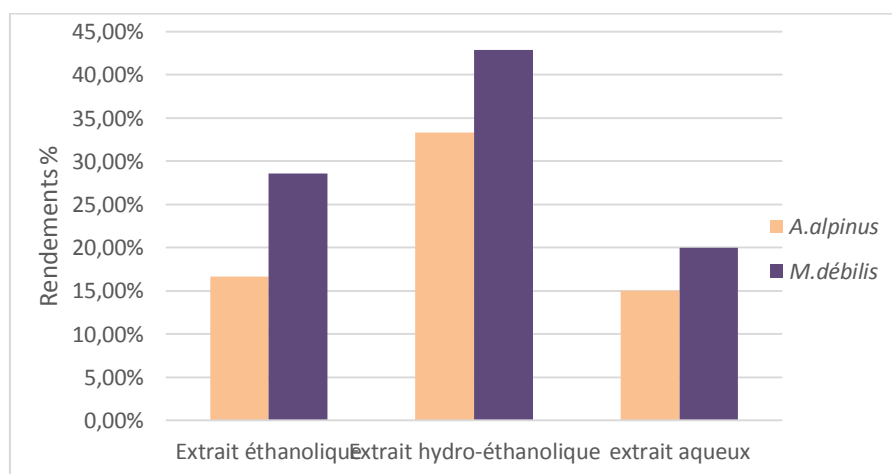
## Chapitre II : Résultats et discussion

### 1. Rendements des extractions

Les résultats des extractions de la partie aérienne (tiges+feuilles+fleurs) des deux plantes *Acinos alpinus* et *Micromeria debilis* sont renseignés dans le **tableau 5** et les rendements sont illustrés par la **figure 15**.

**Tableau 5** : Rendements (en % MS) et caractéristiques des extraits des deux plantes *Acinos alpinus* et *Micromeria debilis* (tiges + feuilles + fleurs)

Échantillons	Extrait éthanolique		Extrait hydroalcoolique		Extrait aqueux	
	<i>Acinos</i>	<i>Micromeria</i>	<i>Acinos</i>	<i>Micromeria</i>	<i>Acinos</i>	<i>Micromeria</i>
Aspect	pâteux	pâteux	poudre	pâteux	pâteux	poudre
Couleur	vert	vert	vert foncé	vert	marron	marron
Rendement (%)	16,66	28,57	33,33	42,85	15	20



**Figure 15:** Rendements (% MS) des extraits bruts d'*Acinos alpinus* et *Micromeria debilis* (tiges + feuilles + fleurs)

On constate que le rendement le plus élevé a été observé pour l'extrait hydro-éthanolique dans les deux plantes *A. alpinus* et *M. debilis* (33,33% ; 42,85%), suivie par l'extrait éthanolique (16,66% ; 28,57%), et enfin l'extrait aqueux qui possède le rendement le plus faible (15% ; 20%) respectivement.

Le rendement de l'extrait éthanolique (16,66%) d'*A.alpinus* est important par rapport au rendement de la même espèce (11,40%) étudiée par **Golubovic et al.**, [19] en Bosnie.

## 2. Résultats des tests phytochimiques

Les résultats des tests phytochimiques sont présentés dans le **tableau 6**.

**Tableau 6** : Résultats des tests phytochimiques de la partie aérienne des deux plantes *A. alpinus* et *M. debilis*

Famille recherché	Extrait éthanolique		Extrait hydro-alcoolique		Extrait aqueux	
	<i>Acinos</i>	<i>Micromeria</i>	<i>Acinos</i>	<i>Micromeria</i>	<i>Acinos</i>	<i>Micromeria</i>
<b>Flavonoïdes</b>	+++	+	++	+	+	-
<b>Tanins</b>	+++ Bleu	+ Bleu clair	+++ Bleu	-	+++ vert	+++ vert
<b>Saponosides</b>	-	-	-	-	+	+
<b>Quinones</b>	-	-	-	+	-	-
<b>Anthraquinones</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Terpénoides</b>	++	+	+	+	-	-

- : Test négatif.    ++: Test positif.    +++: test fortement positif

D'après le tableau ci-dessus, on remarque que les trois extraits d'*Acinos* sont riches en flavonoïdes et tanins, alors que les quinones et les anthraquinones sont absentes. En revanche les terpénoïdes sont présents dans l'extrait hydro-éthanolique et éthanolique, mais les saponosides sont uniquement présent dans l'extrait aqueux.

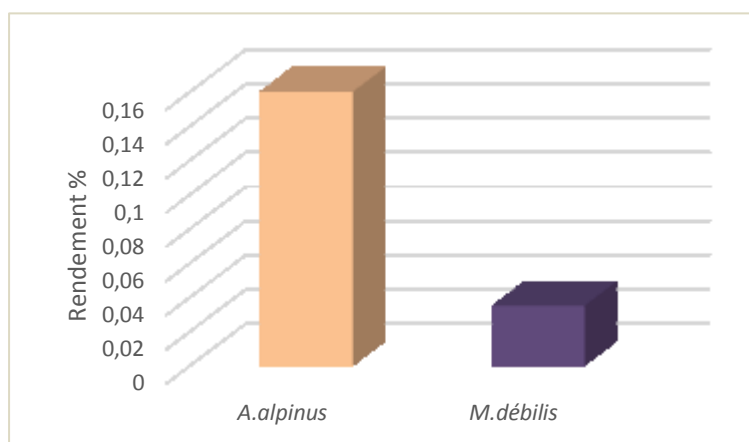
Le criblage phytochimique de *Micromeria debilis* a révélé la présence des terpénoïdes dans l'extrait hydro-éthanolique, les tanins et les flavonoïdes sont faiblement présents dans l'extrait

éthanolique et fortement marqué dans l'extrait aqueux, mais les saponosides ont été mis en évidence uniquement dans l'extrait aqueux.

On peut conclure que, *A. alpinus* est une plante riche en flavonoïdes, terpénoïdes et tanins, alors que *M. debilis* est moins riche en terpénoïdes, flavonoïdes et tanins.

### 3. Rendements en HE

Les rendements en HEs obtenues par hydrodistillation sont illustrés par la **figure 16**.



**Figure 16** : Rendement des huiles essentielles (en %) d'*A. alpinus* et *M. debilis*

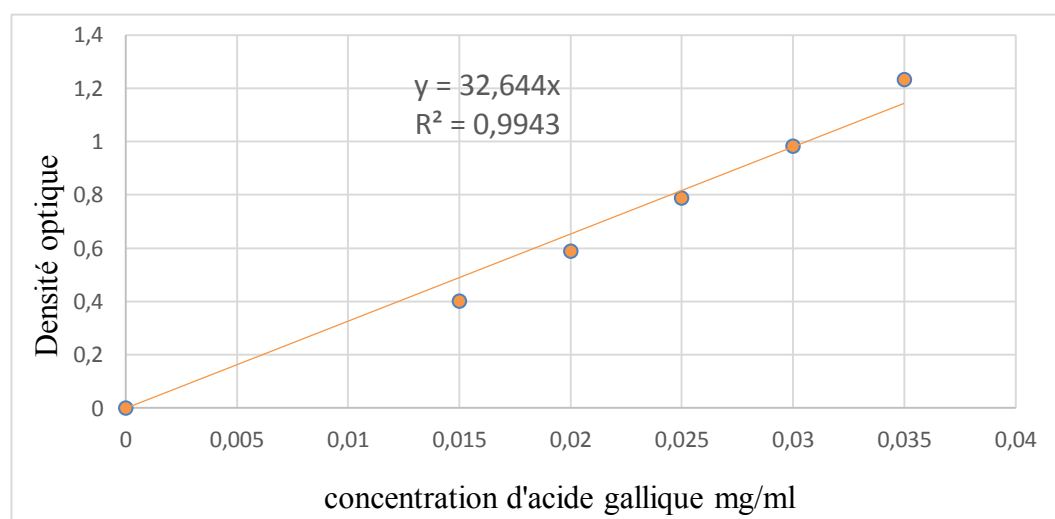
Le rendement en huile essentielle de *Micromeria debilis* (couleur jaune à odeur moins persistante) est de l'ordre de 0,035%. Ce rendement est comparable avec celui obtenu par **Gherib et al.**, [32] (0,045%), mais nettement inférieur à celui obtenu par **Yakoubi et al.**, [34] (0,07% et 0,12%) sur des échantillons récoltés à Naâma (Algérie).

Par contre, le rendement en HE d'*Acinos alpinus* (couleur jaune à odeur persistante) est remarquable soit 0,16%. En comparant ce rendement avec ceux des échantillons de la même espèce récoltée en Espagne (0,05%), Grèce (0,3%) et la Turquie (0,01-0,08%), notre rendement est moyen.

Les variations des rendements observés sont liés à l'origine géographique, aux paramètres d'extraction (températures, solvants, méthodes), aux conditions de stockage de la récolte.....) [50].

#### 4. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage de la teneur en polyphénols totaux des extraits a été réalisé par la méthode spectrophotométrique de Folin– Ciocalteu en utilisant comme standard l'acide gallique. Les teneurs en polyphénols de chaque extrait sont exprimées en mg-équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g Ms) (**figure 17**).

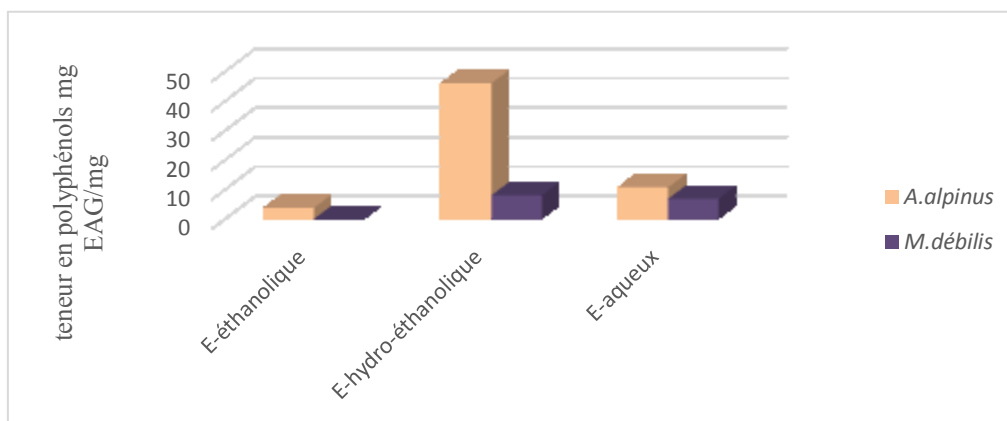


**Figure 17** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

Les résultats des analyses quantitatives des extraits par spectrophotomètre UV- visible sont représentés dans le **tableau 7** et illustrés par la **figure 18**.

**Tableau 7** : Teneurs en polyphénols totaux de *Acinos alpinus* et *Micromeria debilis* (en mg EAG/g Ms)

Echantillons	Extrait éthanolique		Extrait hydroalcoolique		Extrait aqueux	
	<i>Acinos</i>	<i>Micromeria</i>	<i>Acinos</i>	<i>Micromeria</i>	<i>Acinos</i>	<i>Micromeria</i>
Teneurs mg EAG/g	3,7	1,35	46,1	8,01	10,66	6,81



**Figure 18:** Teneurs en polyphénols totaux des extraits d'*A.alpinus* et *M.debilis* (Exprimée en mg EAG/g MS)

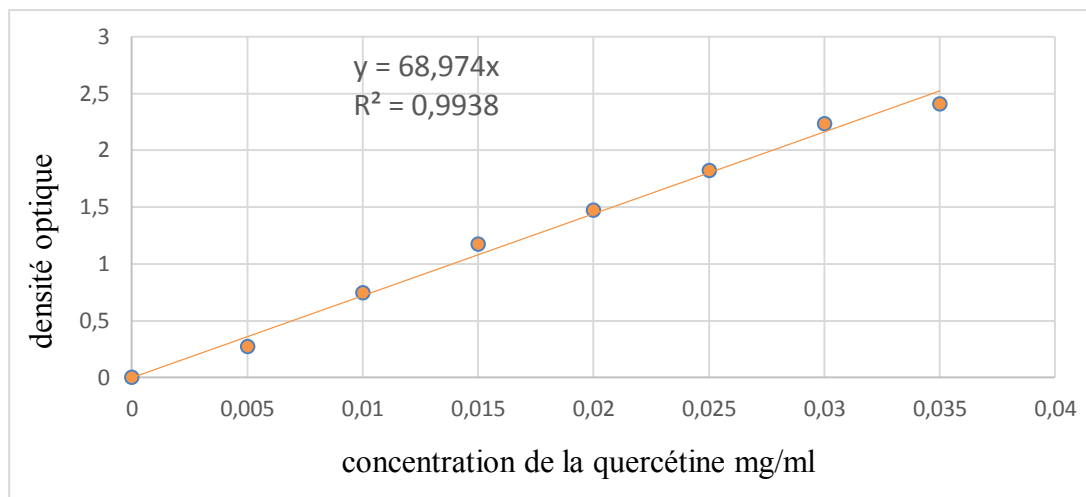
Nous constatons, que l'extrait hydroalcoolique des deux plantes est plus riche en extractibles phénoliques que les deux autres extraits (46 mg EAG/g ; 8,01 mg EAG/g) respectivement. Par contre les teneurs en polyphénols des extraits aqueux et éthanolique étaient faibles pour *Acinos alpinus* (10,66 mg EAG/g ; 3,7 mg EAG/g) et pour *M. debilis* (6,81 mg EAG/g ; 1,35 mg EAG/g) respectivement.

Les teneurs en polyphénols de l'extrait éthanolique d'*Acinos alpinus* enregistrés par **Pivru et al., [20]** (16,5 mg GAE /g Roumanie) et **Golubovic et al., [19]** (140,12 mg EAG/mg Bosnie) sont nettement supérieures à nos rendements.

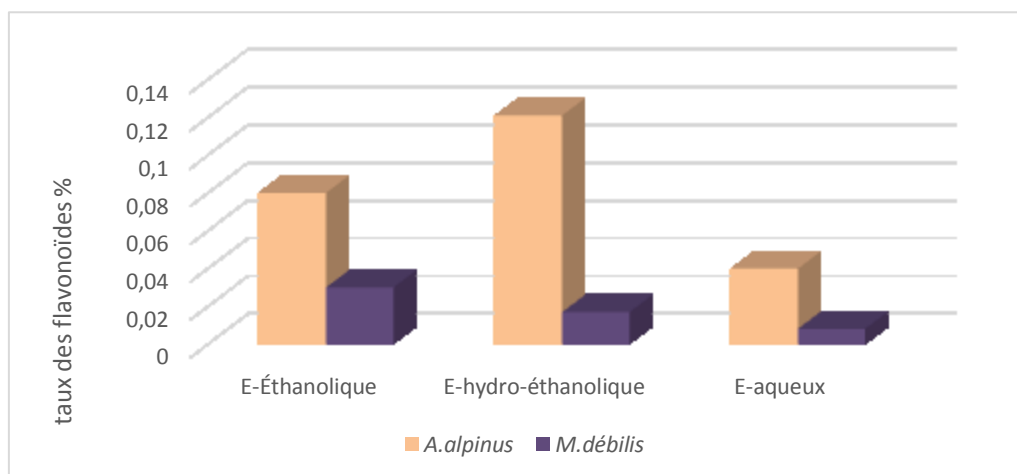
La variation de teneur en polyphénols dans les différents solvants s'explique par la différence en solubilité de ces composés dans les solvants d'extraction [51]. **Gironi et al., [52]** confirment dans leur étude que la quantité des polyphénols augmente dans le mélange eau-éthanol plutôt que dans l'eau libre.

## 5. Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été déterminé par la méthode au trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) en utilisant la quercétine comme un étalon (**figure 19**). Les taux des teneurs en flavonoïdes des extraits (**figure 20**) ont été obtenus à partir de la courbe d'étalonnage exprimée en %.



**Figure 19 :** Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux



**Figure 20 :** Teneur en flavonoïdes des parties aériennes d'*Acinos alpinus* et *Micromeria debilis* exprimé en %

On remarque que l'extrait hydro-alcoolique d'*A. alpinus* est plus riche en extractibles flavonoidiques (0,12%), suivie par l'extrait éthanolique 0,08%, puis l'extrait aqueux 0,04%. Nos résultats ne concordent pas avec ceux **Golubovic et al.**, [19] qui ont obtenus un rendement de 0,8% sur un extrait d'origine Bosniaque.

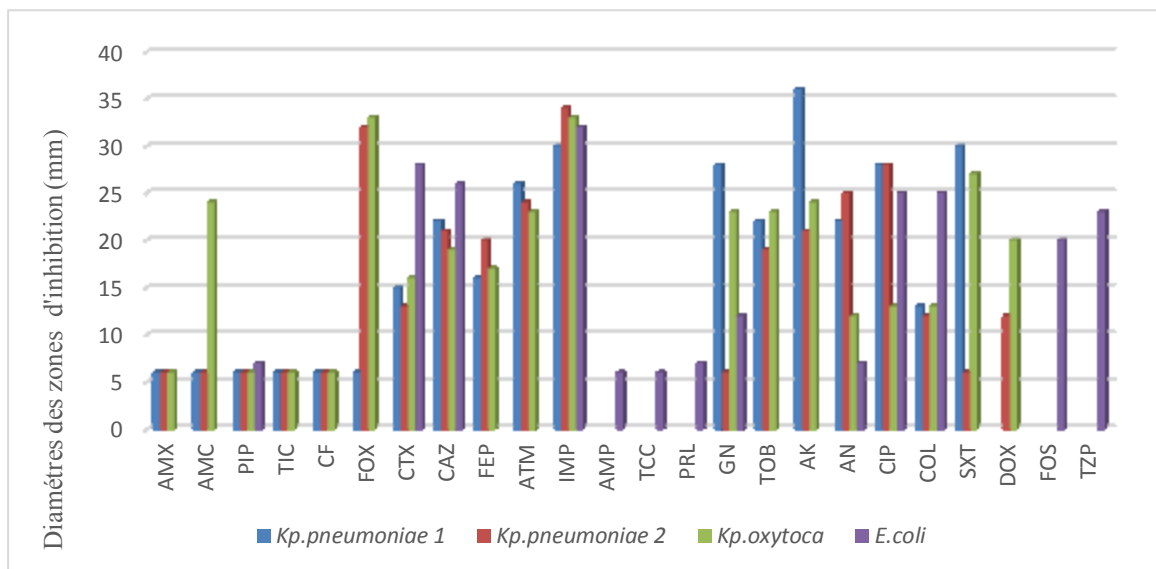
Par contre, *M. debilis* est moins riche en flavonoïdes avec des taux très faibles dans les trois extraits. Nos résultats concorde avec ceux obtenus par **Vladimir-knezevic et al.**, [53] qui ont trouvé des pourcentages très faibles (0,01–0,09%) dans les trois espèces de *Micromeria* étudiées (*M. croatica* , *M. juliana* et *M. thymifolia* ).

## 6. Test antibactérien (anti-BLSE)

Les quatre souches BLSE utilisées pour le test antibactérien ont fait l'objet d'une confirmation vis-à-vis des antibiotiques (antibiogramme) et de production de  $\beta$ -lactamases.

### 6.1. Antibiogramme

Le but de l'antibiogramme est de déterminer le degré de sensibilité des souches aux antibiotiques et de prédire le profil phénotypique des souches. Les résultats sont représentés par la **figure 21**.



**Figure 21** : Antibiogramme des entérobactéries BLSE retenues (*K. pneumoneae* 1 ; *K. pneumoneae* 2 ; *K. oxycopa* ; *E.coli*)

**PIP**: pipéracilline ; **TIC**: ticarcilline ; **AMX**: amoxicilline ; **CTX**: céfotaxine ; **AMC**: amoxicilline+acide clavulanique; **CAZ**: ceftazidine ; **FEP**: Pefloxacine ; **ATM**: aztréonam ; **IMP**: imipénème ; **GN**: Gentamicine ; **TOB**: Tobramycine ; **AK**: Amikacine ; **AN**: Acide nalidixique ; **CIP**: Ciprofloxacine ; **COL**: Colistine; **SXT**: Triméthoprime/sulfaméthoxazole; **DOX**: Doxycycline , **CF**: Céfaloine ; **AMP**: Ampicilline ; **TCC**: Ticarcilline + acide clavulanique ; **PRL**: Pipéracilline ; **FOS**: Fosfomycine ; **TZP**:Pipéracilline + Tazobactam.

D'après la **figures 21**, on constate que les taux de résistances les plus élevées sont observés avec l'amoxicilline, pipéraciline, titracilline, céfaloine, céfotaxine et colistine. L'association d'acide clavulanique avec l'amoxicilline diminue la résistance de 100% jusqu'à un taux de 67%. Les résultats obtenus montrent que l'imipénème, aztréonam, pefloxacine, tobramycine et l'amikacine pouvant être utilisée comme un traitement alternatif pour ces souches résistantes.



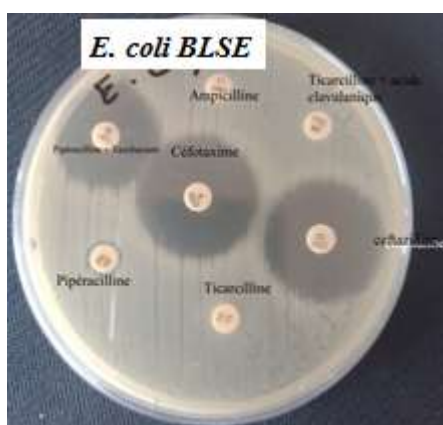
Plusieurs travaux ont rapporté l'efficacité de l'imipénème sur les souches d'entérobactéries productrices de BLSE [54]. **Goossens et al.**, [55] dans leur étude ont trouvé une sensibilité de 100% qui est en accord avec nos résultats.

## 6.2. Détection des souches BLSE

La méthode de détection des BLSE est de chercher une image (bouchon de champagne) de synergie entre un antibiotique inhibiteur de  $\beta$ -lactamases et un antibiotique de céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération (CTX, CAZ) [44]. Les résultats sont présentés dans le **tableau 8** et illustrés par la **figure 22**.

**Tableau 8** : Caractéristiques et résultats des tests de sensibilité des quatre souches BLSE

	<i>K. pneumoniae</i> 1	<i>K. pneumoniae</i> 2	<i>K. oxycota</i>	<i>E. coli</i>
<b>Prélèvement</b>	urine	Urine	urine	urine
<b>Sexe</b>	femme	Femme	femme	femme
<b>Phénotype</b>	BLSE	BLSE	BLSE	BLSE
<b>ATBiogramme</b> Ø Cefotaxime Ø Ceftazidime	22-25 mm	22-25 mm	22-25 mm	22-25 mm
<b>Test de synergie</b>	Positif	Positif	Positif	Positif



**Figure 22** : Photos du test de synergie (BLSE)

Au regard des résultats ci-dessus et selon les recommandations de la **CA-SFM** [56], on confirme que les quatre souches ont exprimé un phénotype de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE).

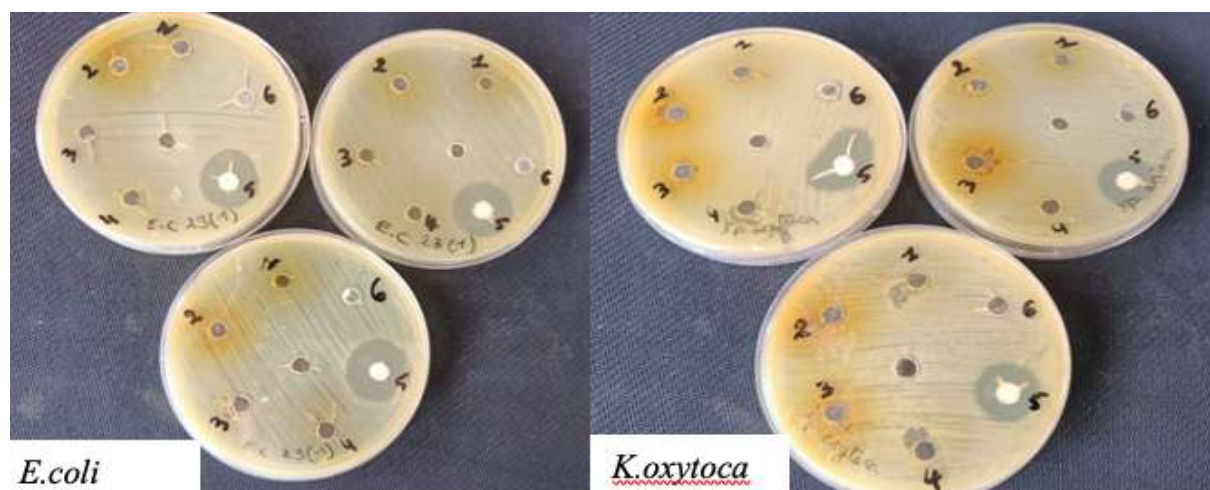
### 6.3. Test des puits de diffusion

Le test de pouvoir antibactérien par la méthode des puits de diffusion sur gélose a été estimé par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des puits contenant l'extrait vis-à-vis des souches bactériennes utilisées. Les résultats de l'activité des extraits (flavonoïdes et HES) sont représentés par le **tableau 9** et illustrés par la **figure 23**.

**Tableau 9** : Diamètres des zones d'inhibitions (en mm) des différents extraits flavonoïdiques et huiles essentielles d'*A.alpinus* et *M.debilis*

Plante	Extrait	Souches BLSE			
		<i>K.oxytoca</i>	<i>E.coli</i>	<i>K.pneumoniae 1</i>	<i>K.pneumoniae 2</i>
<i>M.debilis</i>	F. AcOET	6mm	6mm	6mm	6mm
	F. n-BuOH	6mm	6mm	6mm	6mm
	HE	6mm	6mm	6mm	6mm
<i>A.alpinus</i>	F. AcOET	6mm	6mm	6mm	6mm
	F.n-BuOH	6mm	6mm	6mm	6mm
	HE	19,6 ±1,78 mm	21,3±0,5 mm	6mm	6mm

F. AcOET : fraction acétate d'éthyle ; F. n-BuOH : fraction n-butanol ; HE : huile essentielle



1 : F. AcOET d'*A.alpinus* ; 2 : F. n-BuOH d'*A.alpinus* ; 3 : F. AcOET de *M.debilis* ;  
4 : F. n-BuOH de *M.debilis* ; 5 : huile essentielle *A.alpinus* ; 6 : huile essentielle *M.debilis*

**Figure 23**: Photos des tests de puits de diffusion des extraits flavonoïdiques et HE d'*A.alpinus* et *M.debilis* sur *E. coli* et *K. oxytoca* (BLSE)

D'après les résultats ci-dessus, nous remarquons que l'huile essentielle d'*Acinos alpinus* présente un effet inhibiteur important avec des zones d'inhibitions de 21,3 mm pour *E. coli* et de 19,6 mm pour *K. oxytoca*. De point de vue sensibilité des souches à l'HE et au regard de l'échelle proposé par **Ponce et al.**, [48], la souche *Escherichia coli* est extrêmement sensible tandis que la souche *klebsiella oxytoca* est très sensible. En revanche les quatre souches étaient résistantes vis-à-vis des extraits flavonoïdiques.

Cette activité de l'HE d'*A. alpinus* peut être liée à la composition chimique de l'huile. D'après la littérature, l'HE d'*A. alpinus* d'origine Espagnol est riche en germacrène D et trans- $\beta$ -caryophyllène [26], celle de Turquie est riche en germacrène D et thymol [27] et celle d'origine Grecque contient le germacrène A, épi-bicyclosesquiphellandrène,  $\beta$ -élémente et  $\beta$ -caryophyllène comme composés majoritaires [28].

L'HE de *M. debilis* n'a montrée aucune activité vis-à-vis des quatre souches testées. Ce résultat est confirmé par l'étude réalisé par **Ghrib et al.**, [32] qui a montré que l'HE de *M. débilis* récoltée de la région de Naâma possède une faible activité antimicrobienne vis-à-vis des souches de références ATCC.

**Golubovic et al.**, [57] ont trouvé une activité modéré de l'extrait éthanolique d'*Acinos alpinus* d'origine Bosniaque contre des souches de références ATCC tandis que dans l'étude réalisé par **Pivru et al.**, [20] l'activité sur l'extrait éthanolique ( 70%) de la plante d'origine Roumaine ne présente aucune activité.

L'activité antibactérienne dépend de plusieurs facteurs tels que le type de microorganismes, le type d'extrait, sa composition et sa concentration. En général les micro-organismes à Gram- sont plus résistants que les micro-organismes à Gram +, et cela s'explique par la barrière de perméabilité de la membrane externe, qui limite l'accès des agents antimicrobiens [58]. De plus les souches sur lesquelles nous avons testés les extraits sont des souches BLSE donc très résistantes aux antibiotiques. C'est pourquoi les extraits n'ont pas montrés d'activités sur les souches, par contre l'HE d'*Acinos alpinus* s'est montré très active sur *Escherichia coli* et *K. oxytoca*. Ceci suppose que l'HE d'*A. alpinus* agit bien sur le système enzymatique des deux souches sensibles.

#### 6.4. Détermination de la CMI par la méthode de microplaque

Les concentrations minimales inhibitrices ont été déterminées par microdilution en bouillon en utilisant la méthode modifiée des microplaques des deux HEs. Les résultats sont présentés dans le **tableau 10** et illustrés par la **figure 24**.

**Tableau 10:** Résultat de la CMI (en %) des HEs d'*A. alpinus* et *M. debilis*

Souches BLSE	<i>Acinos alpinus</i>	<i>M. debilis</i>
<i>E.coli</i>	2	nd
<i>K.oxytoca</i>	2	nd
<i>K. pneumoniae</i> 1	nd	nd
<i>K. pneumoniae</i> 2	nd	nd

**nd** : non déterminée



1 : *K.oxytoca* ; 2 : *E.coli* 23(1) ; 3 : *K.pneumoniae* 1 ; 4 : *K.pneumoniae* 2

**Figure 24** : Photos de la CMI sur plaque de l'HE d'*A. alpinus*  
(A) : avant incubation ; (B) : après incubation

D'après les résultats du **tableau 10**, on remarque que l'HE d'*A. alpinus* est active sur les souches BLSE *E. coli* et *K. oxycota* ave une CMI de 2%. Par contre la CMI de l'HE de *M. debilis* n'a pas pu être déterminée même à des CMI > 4%. Aussi, on remarque que les souches de *K. pneumoniae* 1 et 2 sont résistantes. Ces résultats confirment le test de diffusion en milieu solide.

## Conclusion générale

L'utilisation des antibiotiques reste le moyen de choix pour traiter et prévenir les infections bactériennes, mais l'émergence des bactéries résistantes BLSE pose un problème d'inefficacité de ces molécules anti-infectieuses.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet des extraits d'*Acinos alpinus* et *Micromeria debilis* sur des bactéries BLSE d'origine hospitalier.

Le criblage phytochimique des parties aériennes des deux plantes en utilisant des solvants de différentes polarités a permis (i) de révéler la présence de différentes familles chimiques en particulier les terpènes, les flavonoides et les tanins chez *A. alpinus*, (ii) de montrer que l'extrait hydro-éthanolique est plus riche en extractibles que les extraits alcoolique et aqueux et (iii) de révéler que l'extrait hydro-alcoolique d'*A. alpinus* est aussi plus riche en extractibles polyphénoliques (46 mg EAG/g MS) et en flavonoides (0,12%) que les autres extraits.

L'extraction d'huile essentielle d'*A. alpinus* et *M. debilis* par hydrodistillation à donner des rendements d'environ 0,16 % et 0,035 % respectivement.

Les résultats du test antibactérien ont montré une activité significative de l'huile essentielle d'*A. alpinus* sur les souches cliniques (*E.coli* et *K.oxytoca* BLSE) avec des zones d'inhibitions de 22,1mm et 19,6mm respectivement et une CMI=2%.

En perspective, il serait intéressant de réaliser des études approfondies sur les deux plantes en particulier :

- Analyse des HE par CPG/SM et les extraits favonoidiques par HPLC/SM
- Tester d'autres activités biologiques (pouvoir antioxydant, anti-moisissures.....) dans le but de déterminer de nouveaux agents naturels antimicrobiens.

## Références bibliographiques

- [1] Fki, H.; Yaïch, S.; Jdidi, J.; Karray, A.; Kassis, M.; Damak, J. Epidémiologie des infections nosocomiales dans les hôpitaux universitaires de Sfax: résultats de la première enquête nationale de prévalence de l'infection nosocomiale. *2*, 10.
- [2] Trystram, D.; Varon, E.; Péan, Y.; Grundmann, H.; Gutmann, L.; Jarlier, V.; Aubry-Damon, H. Réseau européen de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (EARSS), **2002**, 24.
- [3] Kechar, K.; Latreche, A.; Mahroug, S. Production et caractérisation de l'huile essentielle de *Ballota hirsuta* Benth. En provenance du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Les technologies de laboratoire*, **2015**, 9, 6.
- [4] Cavallo, J.-D.; Fabre, R.; Jehl, F.; Rapp, C.; Garrabé, E. Bêta-lactamines. *EMC - Maladies Infectieuses*, **2004**, 1 (3), 129–202.
- [5] Philippon, A. Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE). *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, **2013**, 28 (5–6), 287–296.
- [6] Lamotte-Brasseur, J.; Fre, J.-M. Catalytic Properties of Class A  $\beta$ -Lactamases: Efficiency and Diversity. **1998**, 18.
- [7] Cattoir, V. Les nouvelles Beta-lactamases à Spectre Étendu (BLSE). 7.
- [8] Hammami, A. Les inhibiteurs de bêta-lactamases; Place dans le traitement des infections ORL de l'enfant. **1991**, 4.
- [9] Akula, R.; Ravishankar, G. A. Influence of Abiotic Stress Signals on Secondary Metabolites in Plants. *Plant Signaling & Behavior* .**2011**, 6 (11), 1720–1731.
- [10] AFNOR, Association Française de Normalisation, Huiles Essentielles - Tome 2, Monographies Relatives Aux Huiles Essentielles. 6e Édition, Ed. AFNOR, Paris La Défense, **2000**, 663.
- [11] Couic-Marinier, F.; Lobstein, A. Composition chimique des huiles essentielles. *Actualités Pharmaceutiques*, **2013**, 52 (525), 22–25.
- [12] Marriott, P. J.; Shellie, R.; Cornwell, C. Gas Chromatographic Technologies for the Analysis of Essential Oils. *Journal of Chromatography A* , **2001**, 936 (1–2), 1–22.
- [13] Petersen, M.; Hans, J.; Matern, U. Biosynthesis of Phenylpropanoids and Related Compounds. In Annual Plant Reviews online; Roberts, J. A., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, **2018**; 182–257.

- [14] Sıdika, E.; Oktay, Y.; Hatice, E. T.; Aşlı, A.; Merve, A. u. Chemical Composition, Antimicrobial Activity and Antioxidant Capacity of Some Medicinal and Aromatic Plant Extracts. *Afr. J. Microbiol. Res*, **2013**, 7 (5), 383–388.
- [15] Tsao, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, **2010**, 2 (12), 1231–1246.
- [16] Ververidis, F.; Trantas, E.; Douglas, C.; Vollmer, G.; Kretzschmar, G.; Panopoulos, N. Biotechnology of Flavonoids and Other Phenylpropanoid-Derived Natural Products. Part I: Chemical Diversity, Impacts on Plant Biology and Human Health. *Biotechnol. J*, **2007**, 2 (10), 1214–1234.
- [17] De Souza Farias, S. A.; da Costa, K. S.; Martins, J. B. L. Analysis of Conformational, Structural, Magnetic, and Electronic Properties Related to Antioxidant Activity: Revisiting Flavan, Anthocyanidin, Flavanone, Flavonol, Isoflavone, Flavone, and Flavan-3-Ol. *ACS Omega* **2021**, 6 (13), 8908–8918.
- [18] Hennebelle, T.; Sahpaz, S.; Bailleul, F. Polyphénols Végétaux, Sources, Utilisations et Potentiel Dans La Lutte Contre Le Stress Oxydatif. *Phytothérapie*, **2004**, 2 (1), 3–6.
- [19] Golubović, T. D.; Stojanović, G. S.; Kitić, D. V.; Zlatković, B. K.; Pavlović, D. R.; Jovanović, S. Č.; Lazarević, J. S. Comparative Study of the Ethanol Extracts of Six *Acinos Miller* Species: Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidative Activities. *Not Bot Horti Agrobi* **2020**, 48 (1), 53–65.
- [20] Pîrvu, L. Studies on *Acinos Alpinus* L.: Polyphenols and Terpenoids Compounds Profile, Antimicrobial Activity, Antioxidant Effect and Release Experiments on the Ethanol and Propylene Glycol Extracts. *FARMACIA*, **2019**, 67 (6), 1025–1033.
- [21] Stojanović, G.; Golubović, T.; Kitić, D.; Pali, R. *Acinos* Species: Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidative Activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, **2009**, 3(13), 1240-1247.
- [22] Saouli, N.; Rahmani, H.; Smara, H.; Khalfallah, N. Trichomes Micromorphology And Cytological Investigation On *Acinos Alpinus* Subsp. *Meridionalis* In Algeria. **2018**.
- [23] Quézel, P.; Santa, S. Nouvelle Flore de l'Algérie et Des Régions Désertiques Méridionales; **1962**.
- [24] Pardo de Santayana, M.; Morales Valverde, R.; Tardío, J.; Molina, M. *Inventario español de los conocimientos tradicionales relativos a la biodiversidad: segunda fase*, **2018**, 404.
- [25] <https://Efloramaghreb.Org> (**2021**).

- [26] Velasco-Negueruela, A.; Pérez-Alonso, M. J.; Jiménez, S. M.; García, F. M. The Volatile Constituents Of *Acinus Alpinus* (L.) Moench Ssp. *Meridionalis* (Nyman) P. W. Ball Growing in Spain. *Flavour Fragr. J.*, **1993**, *8* (3), 127–130.
- [27] Kaya, A. The Essential Oil of *Acinos alpinus* (L.) Moench Growing in Turkey. **1999**, *Flavour Fragr. J.*, *14*, 55±59.
- [28] Skaltsa, H. D.; Lazaris, D. M.; Loukis, A. E. Composition of the Essential Oil of *Acinos Alpinus* (L.) Moench. from Greece. *Journal of Essential Oil Research*, **1999**, *11* (1), 35–37.
- [29] Golubovic, T.; Palic, R.; Kitic, D.; Stojanovic, G.; Zlatkovic, B.; Ristic, M.; Pavlovic, D. Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanol Extracts of Some *Acinos* Miller Species. *Natural Product Communication*, **2014**, *9* (5).
- [30] Jovanovic, T.; Palic, R.; Kitic, D.; Ristic, M.; Zlatkovic, B. Fatty Acids of *Acinos Alpinus* and *A. Hungaricus*. *Chem Nat Compd*, **2008**, *44* (2), 231–233.
- [31] Gherib, M.; Bekhechi, C.; Paoli, M.; Atik Bekkara, F.; Bighelli, A.; Casanova, J.; Tomi, F. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Aerial Parts of *Micromeria Debilis* Pomel from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, **2016**, *28* (5), 383–390.
- [32] Gherib, M.; Bekhechi, C.; Paoli, M.; Bekkara, F. A.; Bighelli, A.; Casanova, J.; Tomi, F. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Aerial Parts of *Micromeria Debilis* Pomel from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, **2016**.
- [33] <https://www.Teline.Fr/> (2021).
- [34] Yakoubi, M.; Hamini-Kadar, N.; Gherib, M.; Amrouche, A.; Yezli, W.; Benichou, S. L.; Kihal, M. Inhibitory Effect of Essential Oils from *Pulicaria Mauritanica* and *Micromeria Debilis* on Growth of *Alternaria* Spp., the Causal Agent of Tomato Early Blight. *Environ Exp Biol*, **2019**.
- [35] <https://Fr.Wikipedia.Org.> (2021).
- [36] Gul, R.; Jan, S. U.; Faridullah, S.; Sherani, S.; Jahan, N. Preliminary Phytochemical Screening, Quantitative Analysis of Alkaloids, and Antioxidant Activity of Crude Plant Extracts from *Ephedra Intermedia* Indigenous to Balochistan. *The Scientific World Journal*, **2017**, *2017*, 1–7.
- [37] Alqethami, A.; Aldhebiani, A. Y. Medicinal Plants Used in Jeddah, Saudi Arabia: Phytochemical Screening. *Saudi Journal of Biological Science*, **2021**, *28* (1), 805–812.



- [38] Yadav, R.; Agarwala, M. Phytochemical Analysis of Some Medicinal Plants. *Journal of Phytology* **2011**, *5*.
- [39] Bekro, Y.-A.; Rosine, M.; Allangba, A.; Kadja, A.; Guessennd, N.; Kouadio, J.; Janat Akhanovna, M.-B. Etude Phytochimique Bio-Guidée, Activités Antibactérienne et Analgésique de Décoctions Éthanoliques d'une Mimosaceae de Côte d'Ivoire. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, **2016**, *18*, 2028–9324.
- [40] BaoDuy, N. L.; Trang, D. T. D.; Trang, N. P. M. Preliminary phytochemical analysis of leaf extracts of *ofthuja orientalis* (L.). *International journal of research science & management*.**2015**, *5*.
- [41] Ali-RACHEDI, F.; Meraghni, S.; Touaibia, N. Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *Scabiosa Atropurpurea* sub. *Maritima* (L.). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, **2018**, *87*, 10.
- [42] Georgé, S.; Brat, P.; Alter, P.; Amiot, M. J. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *J. Agric. Food Chem*, **2005**, *53* (5), 1370–1373.
- [43] Aktumsek, A.; Zengin, G.; Guler, G. O.; Cakmak, Y. S.; Duran, A. Assessment of the Antioxidant Potential and Fatty Acid Composition of Four *Centaurea* L. Taxa from Turkey. *Food Chemistry*, **2013**, *141* (1), 91–97.
- [44] Philippon, A.; Arlet, G. Les bêta-lactamases chez les bacilles à Gram-négatif: que de nouveautés en 15 ans. *Antibiotiques*, **2005**, *7* (4), 247–259.
- [45] EL BRAHMI, R. et EL RHAZI, K. Profil épidémiologique et de résistance des bactéries multi résistantes au chu Hassan II de Fès. Thèse de doctorat, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Maroc, **2013**.
- [46] Benbelaïd, F.; Khadir, A.; Abdoune, M. A.; Bendahou, M. Phytochemical Screening and in Vitro Antimicrobial Activity of *Thymus Lanceolatus* Desf. from Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* **2013**, *3* (6), 454–459.
- [47] Das, K.; Tiwari, R. K. S.; Shrivastava, D. K. Techniques for Evaluation of Medicinal Plant Products as Antimicrobial Agent: Current Methods and Future Trends. *Medicinal Plants Research*, **2010**, *4*(2),104-111.
- [48] Ponce, A. G.; Fritz, R.; del Valle, C.; Roura, S. I. Antimicrobial Activity of Essential Oils on the Native Microflora of Organic Swiss Chard. *LWT - Food Science and Technology*, **2003**, *36* (7), 679–684.

- [49] Wiegand, I.; Hilpert, K.; Hancock, R. E. W. Agar and Broth Dilution Methods to Determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Antimicrobial Substances. *Nat Protoc*, **2008**, 3 (2), 163–175.
- [50] Chaouche, T. M.; Haddouchi, F.; Atik-Bekara, F.; Ksouri, R.; Azzi, R.; Boucherit, Z.; Tefiani, C.; Larbat, R. Antioxidant, Haemolytic Activities and HPLC–DAD–ESI–MSn Characterization of Phenolic Compounds from Root Bark of Juniperus Oxycedrus Subsp. Oxycedrus. *Industrial Crops and Products*, **2015**, 64, 182–187.
- [51] Macheix, J.-J.; Fleuriet, A.; Jay-Allemand, C. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *PPUR presses polytechniques*, **2005**.
- [52] Gironi, F.; Piemonte, V. Temperature and Solvent Effects on Polyphenol Extraction Process from Chestnut Tree Wood. *Chemical Engineering Research and Design*, **2011**, 89 (7), 857–862.
- [53] Vladimir-Knezevic, S.; Blazekovic, B.; Bival Stefan, M.; Alegro, A.; Koszegi, T.; Petrik, J. Antioxidant Activities and Polyphenolic Contents of Three Selected Micromeria Species from Croatia. *Molecules*, **2011**, 16 (2), 1454–1470.
- [54] Mansour, W.; Bouallegue, O.; Dahmen, S.; Boujaafar, N. 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). *Pathologie Biologie*, **2008**, 56 (3), 116–120.
- [55] Goossens, H.; Grabein, B. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Data for Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase– and AmpC-Producing Enterobacteriaceae from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997–2004). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **2005**, 53 (4), 257–264.
- [56] Société Française de Microbiologie- Comité Européen Des Tests de Sensibilité Aux Antimicrobiens. Ed; **2020**.
- [57] Golubovic, T. D.; Stojanovic, G. S.; Kitic, D. V.; Zlatkovic, B. K.; Pavlovic, D. R.; Jovanovic, S. C.; Lazarevic, J. S. Comparative Study of the Ethanol Extracts of Six *Acinos Miller* Species: Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidative Activities. *Not Bot Horti Agrobo* **2020**, 48 (1), 53–65.
- [58] Poole, K. Multidrug Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, **2001**, 4 (5), 500–508.