



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



**UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMEN**  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE, DE LA TERRE ET DE  
L'UNIVERS  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à  
l'environnement « LAMAABE »

**THESE**

Présentée par

Mlle AFIF CHAUCHE Thanina

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Biologie  
Option : Microbiologie appliquée

**Etude ethno-pharmacologique et évaluation de l'activité antimicrobienne  
et antioxydante de quelques plantes médicinales de la région de  
Tizi Ouzou - Algérie**

Soutenue le 18/10/2015

Devant le jury

Président	ABDELOUAHID D.E.	Professeur	U. de Tlemcen
Examinateur	LAZOUNI H.A.	Professeur	U. de Tlemcen
Examinateur	AIT KAKI - TLILI Y.	Professeur	U. d'Annaba
Examinateur	GANNA - KEBOUCHÉ S.	MCA	U. de Boumerdes
Co-directeur de thèse	BENDAHOU M.	Professeur	U. de Tlemcen
Directeur de thèse	ARAB K.	Professeur	U. de Boumerdes

**Année universitaire : 2014/2015**

## Remerciements

Ce travail a été réalisé dans trois laboratoires de recherche: le Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) de l'Université Abou Bekr Bekaid- Tlemcen, le Laboratoire de Valorisation et Conservation des Ressources Biologiques (VALCOR) de l'université M'Hamed Bouguerra - Boumerdes et le Laboratoire Aquitaine Microbiologie de Bordeaux-France.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à monsieur ARAB Karim, professeur à l'université de Boumerdes (laboratoire VALCOR) et à Monsieur BENDAHOU M., Professeur à l'université de Tlemcen (laboratoire LAMAABE), pour avoir dirigé de près le travail de cette recherche et de m'avoir orienté tout le long du chemin. Je vous remercie pour votre patience.

Je remercie le professeur Moussa-Boudjemaa Boumediène, directeur du laboratoire LAMAABE à l'université de Tlemcen, et responsable de la formation doctorale « Microbiologie appliquée» de m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse.

Mes remerciements sont particulièrement adressés à Mr ABDELOUAHID D.E., professeur à l'université de Tlemcen, de m'avoir honoré par sa présence pour présider le jury de cette thèse.

Je remercie infiniment monsieur LAZOUNI H.A., professeur à l'université de Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens aussi à remercier mesdames les examinatrices, Mme GANA-KEBBOUCHE S., maître de conférences A à l'université de Boumerdes et Mme AIT KAKI-TLILI Y., professeur à l'université d'Annaba, pour s'être déplacées pour examiner ce travail et contribuer à d'éventuelles améliorations.

Un profond merci pour Mr BITAM I., Maître de conférences à l'ENV, vos conseils et votre aide ont toujours été plus que précieux.

Je veux exprimer ici ma vive reconnaissance également à Madame M'ZALI F., responsable du laboratoire Aquitaine Microbiologie, Bordeaux, France, qui m'a accueilli dans son laboratoire avec toute la générosité et la sympathie qui réside en sa personne.

Mes vifs remerciements vont aussi à Madame AFIRI Malika, Professeur à l'hôpital de Tizi Ouzou, d'avoir fait tout l'effort pour m'intégrer au laboratoire à l'hôpital de Tizi Ouzou.

Toute ma gratitude et un profond merci à tout le personnel de l'Université de Tlemcen, particulièrement Mr AZZI Rachid, chargé de la Post-graduation, qui m'a toujours aidé et répondu à mes questions.

Je tiens aussi à remercier Mr BOUKHELIF Nacer de m'avoir facilité l'accès et le travail au CRD de Sonatrach de Boumerdes, Dr IHEDENE Zaher, enseignant à l'EMP d'Alger qui m'a beaucoup aidé et initié à l'utilisation et l'interprétation de la CG-SM et m'a consacré un temps précieux, ainsi qu'aux responsables du service des analyses chromatographiques du CRD de SAIDAL d'Alger.

J'adresse également un grand merci aux techniciens de laboratoires à l'université de Boumerdes, spécialement Mr BOURNISSA Hamid, Technicien de laboratoire de biochimie à la faculté INGM de Boumerdes, pour son aide, son accueil et surtout sa générosité.

Un immense merci à Mademoiselle MALEK Malia, qui a eu la patience de m'initier à l'utilisation du Maldi-Tof (Unité des Rickettsies, URMITE UMR 63, Faculté de Médecine de la Timone, Université de la Méditerranée, Aix-Marseille2), je lui souhaite un excellent parcours dans ses recherches.

Je ne peux remercier tous cela sans parler des collègues en particulier AISSAT Faiza, ARAB-BOUCHENAK Ouahiba, BENHABYLES Narimene, BOUMAZA Sarah et YAHIAOUI Karima. Travailler avec vous était un plaisir depuis toutes ces années.

Je remercie enfin toute personne ayant participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier mes très chers parents. Je leur exprime ma profonde reconnaissance pour leur amour, leur confiance, leur soutien moral ainsi que pour leurs efforts, sacrifices et encouragements durant tout mon parcours vers un avenir meilleur. Je remercie également ma sœur Kahina qui est toujours présente à mes côtés, je lui souhaite une meilleure réussite dans ses études. Je ne cesserai de remercier Amine qui m'a tant aidé dans mon travail et a toujours été présent tout au long de sa réalisation. Je remercie profondément mes grands parents pour leur amour et dévouement, mes tantes, leurs époux et leurs petits, mes cousins et cousines, mes amies et tous les gens que j'aime et qui m'aiment. Je leur dédie cette thèse...

Nina

## Sommaire

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

### Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : les maladies infectieuses	
1. Généralités .....	3
2. Etat des lieux en Algérie .....	3
3. Causes, aspects et défis.....	4
3.1. Causes .....	4
3.2. Certains aspects de l'infectiologie moderne .....	5
3.3. Les défis à soulever.....	6
3.3.1. La résistance des germes à la chimiothérapie antimicrobienne.....	6
3.3.2. L'émergence des maladies infectieuses.....	6
3.3.3. La réémergence des maladies infectieuses .....	6
4. Les maladies infectieuses respiratoires .....	7
4.1. Infections respiratoires hautes .....	8
4.1.1. La sinusite.....	8
4.1.2. L'angine .....	8
4.1.3. La pharyngite.....	9
4.2. Les infections respiratoires basses .....	9
4.2.1. La bronchite.....	9
4.2.2. Les pneumonies .....	10
4.2.3. La tuberculose .....	10
4.3. Diagnostic bactériologique des infections respiratoires.....	11
4.3.1. L'expectoration.....	12
4.3.2. Ecouvillonnage de l'oropharynx postérieur.....	12

4.3.3. Méthodes invasives.....	12
4.3.3.1. Prélèvement distal protégé (PDP).....	12
4.3.3.2. Lavage broncho-alvéolaire (LBA).....	12
4.3.3.3. Aspiration bronchique.....	12
4.3.4. Autres prélèvements.....	12

## Chapitre II : les molécules anti infectieuses

1. Les antibiotiques.....	13
2. Les principales classes d'antibiotiques.....	15
2.1. Antibiotiques agissant sur la biosynthèse de la paroi cellulaire .....	15
2.2. Antibiotiques agissant sur la biosynthèse des protéines bactériennes .....	16
2.3. Antibiotiques bloquant la réplication de l'ADN.....	17
2.4. Antibiotiques inhibant la synthèse des folates.....	17
3. Principales familles d'antibiotiques.....	18
3.1. Antibiotiques de structure betalactamine.....	18
3.1.1. Les pénicillines.....	18
3.1.2. Les céphalosporines.....	18
3.2. Les Cyclines.....	18
3.3. Les macrolides, lincosamides, synergistines et les kétolides.....	19
3.4. Les quinolones.....	20
3.5. Dérivés phosphoniques.....	20
3.6. Les sulfamides .....	20
4. Molécules antifongiques.....	21
5. Les molécules utilisées en chimiothérapie virale.....	21
6. Autres molécules .....	22

## Chapitre III : Résistance des germes aux anti-infectieux

1. Résistance des bactéries aux antibiotiques .....	23
2. Résistance aux antifongiques.....	25
3. Résistance aux antiviraux.....	25

## Chapitre VI : Les remèdes à la résistance aux anti-infectieux

1. Nouvelles stratégies pour la recherche de nouveaux antibiotiques et l'extension de	26
---	----

leur durée de vie.....	
1.1. Recherche de nouvelles cibles.....	26
2. Recherche de composés non antibiotiques.....	28
3. Place des plantes médicinales dans la lutte contre les résistances aux antibiotiques.	28

## Chapitre V : Aperçu sur les plantes étudiées

1. La Bourrache: <i>Borago Officinalis</i> L.....	30
1.1. La famille des <i>Boraginaceae</i> .....	30
1.2. Classification et appellations vulgaires .....	30
1.3. Description botanique de <i>Borago officinalis</i> L.....	31
1.4. Usages.....	32
2. La Ronce: <i>Rubus fruticosus</i> L.....	33
2.1. Le genre <i>Rubus</i> L.....	33
2.2. Classification et appellations vulgaires .....	34
2.3. Description botanique et origine de <i>Rubus fruticosus</i> L.....	34
2.4. Usages.....	36
3. L'ortie: <i>Urtica dioïca</i> L.....	36
3.1. La famille des <i>Urticaceae</i> .....	36
3.2. Classification et appellations vulgaires .....	36
3.3. Description botanique et origine d' <i>Urtica dioïca</i> L.....	37
3.4. Usages .....	38

## Chapitre VI : les molécules bioactives

1. Les flavonoïdes.....	39
2. Biosynthèse des flavonoïdes.....	40
3. Structure et classification.....	42
4. Propriétés pharmacologique des flavonoïdes.....	44
4.1. Propriétés anti-inflammatoires et immunologiques.....	44
4.2. Propriétés antivirales et antibiotiques.....	44
4.3. Propriétés antinéoplasiques.....	45
4.4. Propriétés antioxydantes .....	45
4.5. Autres .....	45
5. Les huiles essentielles .....	46

6. Structure et composition.....	46
7. Activités biologiques des huiles essentielles.....	47
7.1. Activités antimicrobienne, antifongique et insecticide.....	47
7.2. Activité anti-inflammatoire.....	47
7.3. Activité antioxydante .....	48
7.4. Activités anticancéreuse et cytotoxique .....	48

## **Matériel et méthodes**

I. Matériel.....	50
1. Souches microbiennes .....	50
2. Milieux de culture.....	50
3. Matériel d'identification biochimique.....	51
4. Antibiotiques.....	51
5. Matériel végétal .....	51
6. Solvants organiques .....	52
7. Autre matériel .....	52

## **II. Méthodes**

1. Isolement des souches microbiennes .....	53
2. Identification des souches isolées.....	53
2.1. Diagnostic direct.....	54
2.1.1. Mode opératoire.....	54
2.2. Identification morphologique.....	54
2.2.1. Aspect macroscopique.....	54
2.2.2. Aspect microscopique.....	54
2.3. Identification biochimique.....	54
2.3.1. Recherche de l'oxydase.....	54
2.3.2. Recherche de la catalase.....	55
2.4. Les galeries biochimiques.....	55
2.5. Tests spécifiques.....	55
2.5.1. Test d'agglutination pour l'identification de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	55
Mode opératoire .....	55

2.5.2. Camp-test pour l'identification d' <i>Haemophilus influenzae</i> .....	56
2.5.3. Test de sensibilité à l'optochine à <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	56
2.5.4. Test de solubilité par les sels biliaires à <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	56
2.5.5. Test de Blastèse .....	56
3. Identification par MALDI- TOF-SM .....	56
3.1. Principe .....	57
3.2. Caractérisation de l'appareillage .....	57
3.3. Etapes .....	57
3.3.1. Préparation de la matrice .....	57
3.3.2. Préparation de la cible .....	58
3.3.3. Interprétation des résultats .....	58
4. Antibiogramme .....	58
5. Etude ethno pharmacologique .....	59
6. Screening phytochimique .....	61
7. Extraction des huiles essentielles .....	62
8. Extraction des flavonoïdes .....	63
9. Caractérisation des extraits .....	64
9.1. CG-SM des huiles essentielles .....	64
9.2. CLHP des flavonoïdes .....	64
9.3. Dosage des flavonoïdes par spectrophotomètre .....	65
10. Evaluation de l'activité antimicrobienne .....	65
11. Réalisation des échiquiers en milieu solide .....	65
12. Evaluation de l'activité antioxydante .....	67
12.1. Méthode qualitative .....	67
12.2. Méthode quantitative .....	67
13. Etude statistique .....	68

## **Résultats et discussion**

1. Prévalence des souches microbiennes isolées .....	69
2. Identification des souches microbiennes isolées .....	70
2.1. Examens microscopique et macroscopique .....	70
2.2. Les galeries biochimiques .....	71

2.3. Tests spécifiques.....	74
2.3.1. Test d'optochine pour l'identification de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	74
2.3.2. Camp-test pour l'identification de <i>Haemophilus influenzae</i> .....	74
2.3.3. Test de Staphorex pour l'identification des <i>Staphylococcus sp</i> .....	75
2.4. Fréquence des germes isolés.....	75
3. Tests de sensibilité aux antibiotiques.....	76
3.1. Souches résistantes.....	79
3.2. Identification de <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. aureus</i> par MALDI – TOF.....	80
4. Enquête ethnopharmacologique.....	83
4.1. Parties utilisées.....	87
4.2. Méthodes de préparation: recettes.....	88
4.3. Domaines d'indications thérapeutiques.....	88
4.4. Choix des plantes à étudier.....	89
5. Screening phytochimique.....	90
6. Rendements et caractérisation des huiles essentielles.....	91
6.1. Rendements et caractéristiques organoleptiques.....	91
6.2. Caractérisation des huiles essentielles.....	92
7. Rendements et caractérisation des flavonoïdes.....	94
7.1. Rendements.....	94
7.2. Dosage.....	95
7.3. Caractérisation des flavonoïdes par CLHP.....	96
7.3.1. La Bourrache.....	96
7.3.2. La Ronce.....	97
7.3.3. L'Ortie.....	98
8. Pouvoir antimicrobien des extraits des plantes.....	99
8.1. Etude qualitative.....	99
8.2. Concentrations Minimales Inhibitrices.....	105
8.2.1. Extraits de la Bourrache.....	108
8.2.2. Extraits de la Ronce.....	109
8.2.3. Extraits de l'Ortie.....	110
8.3. Échiquier en milieu solide.....	112
8.3.1. Association antibiotique – flavonoïde.....	112
8.3.2. Association flavonoïde - flavonoïde.....	113

9. Activité antioxydante.....	115
9.1. Méthode qualitative .....	115
9.2. Méthode quantitative au DPPH.....	116
9.2.1. Extraits de la Bourrache.....	116
9.2.2. Extraits de la Ronce .....	117
9.2.3. Extraits de l'Ortie.....	118
Conclusion .....	121
Références bibliographiques .....	123
Annexes	
Communications et publications nationales et internationales	

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Structure du système respiratoire humain.....	07
<b>Figure 2 :</b> Lieux d'actions des antibiotiques dans la cellule bactérienne.....	15
<b>Figure 3:</b> Partie aérienne de la bourrache.....	32
<b>Figure 4:</b> Partie aérienne de la Ronce.....	35
<b>a-</b> Fruits de la Ronce.....	35
<b>b-</b> Fleurs et feuilles de la Ronce.....	35
<b>Figure 5:</b> Partie aérienne de l'ortie.....	37
<b>Figure 6:</b> Voie de biosynthèse des flavonoïdes .....	41
<b>Figure 7 :</b> Communes de la Wilaya de Tizi Ouzou .....	52
<b>Figure 8 :</b> Machine de Steers .....	59
<b>Figure 9 :</b> Dispositif de l'hydrodistillation .....	62
<b>Figure 10 :</b> Schéma représentant le protocole d'extraction des flavonoïdes .....	63
<b>Figure 11:</b> Résultats obtenus par les galeries biochimiques Api 20 E.....	72
<b>a.</b> Résultat de la galerie biochimique pour l'identification de <i>Enterobacter cloacae</i> ....	71
<b>b.</b> Résultat de la galerie biochimique API 20 E pour l'identification d' <i>Escherichia coli</i> .....	71
<b>c.</b> Résultat de la galerie biochimique API 20 E pour l'identification d' <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	72
<b>d.</b> Résultat de la galerie biochimique API20E pour l'identification de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	72
<b>Figure 12 :</b> Résultats obtenus par les galeries API 20 NE.....	73
<b>a.</b> Résultat de la galerie biochimique API 20 NE pour l'identification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	72
<b>b.</b> Résultat de la galerie biochimique API 20 NE pour l'identification de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	73
<b>c.</b> Résultat de la galerie biochimique API 20 NE pour l'identification de <i>Burkholderia cepacia</i> .....	73
<b>d.</b> Résultat de la galerie biochimique API 20 NE pour l'identification de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> .....	73
<b>Figure 13:</b> Test d'optochine.....	74
<b>Figure 14 :</b> Camp-test.....	74

<b>Figure 15 :</b> Le test de Staphorex.....	75
<b>Figure 16 :</b> Fréquence des souches microbiennes isolées de patients atteints d'infections respiratoires.....	75
<b>Figure 17:</b> Histogramme représentant le pourcentage de souches résistantes.....	80
<b>Figure 18:</b> Courbes d'indentification de <i>S. aureus</i> et de <i>P. aeruginosa</i> .....	82
<b>Figure 19:</b> Parties utilisées de la plante.....	87
<b>Figure 20 :</b> Méthodes de préparation (recettes).....	88
<b>Figure 21 :</b> Domaines d'indications thérapeutiques.....	89
<b>Figure 22 :</b> Méthode qualitative de l'activité antioxydante.....	115
<b>Figure 23:</b> Activité antioxydante des extraits de la bourrache et de l'acide ascorbique.	116
<b>Figure 24 :</b> Activité antioxydante des extraits de la ronce et de l'acide ascorbique.....	117
<b>Figure 25 :</b> Activité anti oxydante des extraits de l'ortie et de l'acide ascorbique.....	118

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Infections liées au système respiratoires et germes en cause .....	10
<b>Tableau 2:</b> Date de découverte et microorganismes d'origine de quelques antibiotiques.....	14
<b>Tableau 3:</b> Antibiotique, site d'action et molécule cible .....	17
<b>Tableau 4 :</b> Antibiotique, début d'utilisation et date d'apparition des résistances .....	23
<b>Tableau 5 :</b> Classes des flavonoïdes .....	43
<b>Tableau 6:</b> Origine des souches de référence testée.....	50
<b>Tableau 7 :</b> Screening phytochimique .....	61
<b>Tableau 8 :</b> Concentrations des extraits de l'échiquier.....	66
<b>Tableau 9:</b> Interprétation des résultats de l'échiquier.....	66
<b>Tableau 10:</b> Résultats de l'examen microscopique et macroscopique des germes.....	70
<b>Tableau 11:</b> Tableau des souches résistantes et sensibles aux antibiotiques.....	77
<b>Tableau 12:</b> Valeurs des scores obtenus par le Maldi – tof.....	81
<b>Tableau 13:</b> Plantes médicinale, partie utilisée, recette et indications thérapeutiques..	83
<b>Tableau 14:</b> Résultats du screening phytochimique.....	90
<b>Tableau 15 :</b> Rendements, couleurs, textures et odeurs des huiles essentielles.....	92
<b>Tableau 16:</b> CG-SM des huiles essentielles de <i>Borago officinalis</i> L.....	92
<b>Tableau 17:</b> CG-SM des huiles essentielles de <i>R. fruticosus</i> L.....	93
<b>Tableau 18:</b> CG-SM des huiles essentielles d' <i>U. dioïca</i> .....	94
<b>Tableau 19 :</b> Rendements de l'extraction des flavonoïdes.....	95
<b>Tableau 20:</b> Résultats du dosage des flavonoïdes de la bourrache, la ronce et l'ortie...	96
<b>Tableau 21:</b> Résultats de la CLHP des flavonoïdes de la Bourrache.....	97
<b>Tableau 22:</b> Résultats de la CLHP des flavonoïdes de la Ronce.....	98
<b>Tableau 23:</b> Résultats de la CLHP des flavonoïdes de l'Ortie.....	98
<b>Tableau 24:</b> Diamètre d'inhibition des extraits des trois plantes.....	100
<b>Tableau 25:</b> Tableau représentant les CMI des six extraits.....	105
<b>Tableau 26:</b> Association Flavonoïde – Antibiotique.....	112
<b>Tableau 27 :</b> Association Flavonoïde – flavonoïde.....	113

## Liste des abréviations

**API 20 E** : Galeries biochimique pour les Entérobactéries  
**API 20 NE** : Galeries biochimique pour les Non Entérobactéries  
**ATCC** : American type culture collection  
**BLSE** : Bétalactamase à spectre élargi  
**CCM** : Chromatographie sur couche mince  
**GSC** : Gélose au sang cuit  
**GSF** : Gélose au sang frais  
**GN** : Gélose nutritive  
**MH**: Muller Hinton  
**MHS** : Muller Hinton au sang  
**DPPH**: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl  
**nm** : Nanomètre  
**UV** : Ultraviolet  
**µl** : Microlitre  
**Rt** : Temps de rétention  
**R** : Résistant  
**S** : Sensible  
**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice  
**IC 50** : Concentration Inhibitrice 50%  
**PENI**: Pénicilline  
**AMO**: Amoxiciline  
**CEF**: Cefazoline  
**LEV**: Levoflaxine  
**CIPRO** : Ciprofloxacine  
**Cefta** : Ceftazidim  
**Azyth** : Azythromycine,  
**Gent** : Gentamycine,  
**Ciprof** : Ciproflaxine,  
**Tica** : Ticarcilline,  
**Ac.cl**: Acide Clavulanique,  
**Pope** : poperacilline,

**Imi** : Imipenème,

**Ofla** : Ofloxacin,

**Tobr** : Tobramycine,

**Piper** : Piperaciline,

**Cefox** : Cefoxitine,

**Coli** : Colistine,

**Oflax** : Ofloxacin,

**Amik** : Amikacine,

**Levo** : Levofloxacin,

**Vanco** : Vancomycine,

**Chlor** : Chloramphenicol,

**Cotrim**: Cotrimoxazole,

**Tetra** : Tetracycline,

**Ceph** : cephalotine,

**Cefep** : Cefepime,

**Cefo** : Cefotaxime.

# Introduction

La relation entre l'Homme et les microorganismes est très problématique car elle peut se manifester sous divers aspects allant de la simple symbiose jusqu'à la pathogénèse qui peut avoir la mort comme aboutissement dans beaucoup de cas et qui a fait payer l'humanité un lourd tribut à travers son existence.

La conception de la maladie infectieuse par l'être humain fut passée par plusieurs étapes. La microbiologie moderne est issue des travaux intéressants de certains pionniers comme Pasteur, Jenner et Jablot, cependant, l'avancée spectaculaire était la considération de ces maladies sous l'angle de leurs agents causatifs (Talaro et Chess, 2015).

Aujourd'hui, le défi que l'on a cru gagné semblerait être perdu et notre champ d'action régresse face aux microbes à cause d'un côté, de l'hyper-adaptabilité des germes et l'évolution de ces derniers, mais aussi des erreurs dans l'action humaine face à ces germes.

Actuellement, les maladies infectieuses sont un élément à prendre sérieusement dans les politiques de la santé publique. Il y a un risque accru d'apparition de nouvelles épidémies et de leur propagation à l'échelle planétaire dans un monde connecté comme il n'a jamais été. Mais le problème le plus dur à affronter demeure la résistance acquise des germes aux molécules utilisées dans la chimiothérapie antimicrobienne. Il faut noter que les antibiotiques utilisés dans le traitement des maladies infectieuses représentent une classe particulière de médicament et ce, est du essentiellement au fait que leur mauvaise utilisation n'engendre pas uniquement des effets non souhaitables au plan individuel mais aussi des effets délétères pour la communauté (Walsh et Wanbcezwicz, 2013). La rapidité avec laquelle se développe la résistance pèse lourdement au moment où la marge de manœuvre est de plus en plus réduite.

Quel choix alors peut-on faire face à cette évolution qui échappe à notre control ?

Il y a deux visions qui ne sont pas totalement en rupture et qu'on peut même considérer comme complémentaires. La première tend à faire prolonger la durée de vie des molécules existantes sur le marché, essentiellement par une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques des germes en cause, mais aussi, des mécanismes d'action des antibiotiques à l'échelle moléculaire, tout cela accompagné d'une rationalisation de la prescription et l'utilisation de ces médicaments (Meridith *et al.*, 2015). Une autre pensée se penche plutôt vers la recherche de nouvelles molécules. Il est à noter que l'évolution de cette branche de thérapie était historiquement portée par deux courants distincts et parallèles, celui de la recherche de molécules dans la nature et de l'autre côté la synthèse de molécules nouvelles par des procédés purement chimiques (Walsh et Wencewikc, 2014). Dans cette perspective, les molécules isolées à partir des règnes de la nature notamment des espèces végétales constituent un choix indétournable pour la recherche.

Ainsi, cette thèse s'inscrit dans ce cadre. L'essentiel de ce travail est d'essayer d'évaluer d'éventuelles activités antimicrobiennes et antioxydantes des composés de plantes médicinales sur quelques germes en cause d'infections respiratoires ayant développé des résistances aux antibiotiques.

La présente thèse est structurée en trois parties :

- Dans la première partie, nous aborderons une synthèse bibliographique sur les maladies infectieuses avec un focus sur les maladies respiratoires d'origine infectieuses et une introduction sur les molécules naturelles, suivie de monographies détaillées des plantes utilisées et de leurs composés actifs.
- Dans la deuxième partie expérimentale, nous exposons le matériel et les méthodes en expliquant les techniques et les protocoles adoptés dans ce travail.
- Enfin, la troisième partie est consacrée aux résultats obtenus et discussions suivis des perspectives pour la valorisation de ce travail et une conclusion générale.

# Synthèse bibliographique

# Chapitre I :

## Les maladies infectieuses

---

### 1. Généralités

Depuis la nuit des temps, les maladies infectieuses ont coûté la vie à un nombre d'humains qui dépasse celui provoqué par l'ensemble des guerres, des maladies non infectieuses et des catastrophes naturelles réunies. Cela est dû au fait que les agents en cause sont de puissants facteurs de sélection naturelle qui ont accompagné l'évolution de l'espèce humaine (Robert et Manchester, 2010). L'avènement des antibiotiques et de la vaccination au cours du 20<sup>ème</sup> siècle a contribué efficacement dans la lutte contre ces maladies et a semé un sentiment de confort chez les praticiens de la santé. Aujourd'hui, les maladies infectieuses deviennent une vraie menace pour la santé des êtres humains. En 2002, la mortalité due aux infections était estimée à 15 millions de décès par an, ce qui équivaut à 26,3% de la mortalité à l'échelle planétaire (OMS, 2012). Si on décortique cette mortalité, on trouve en tête les infections respiratoires aiguës (3.9 millions de décès), le SIDA (2.9 millions), les maladies diarrhéiques (2 millions), la tuberculose (1.6 millions), le paludisme (1.1 millions) et la rougeole qui a fait 745000 de décès en un seul an en dépit de l'existence d'un vaccin efficace (Sansone et Orth, 2006). D'autres maladies infectieuses causent des mortalités mais à de faibles pourcentages. Selon ces auteurs, les conséquences de ce redéploiement des maladies infectieuses en matière de mortalité et de la dimension socio-économique de ces affections peuvent être estimées à l'aide de l'index Daly (Disability adjusted life years), qui intègre le nombre annuel de vies perdues à cause d'une maladie donnée, multiplié par un coefficient de ressources par individu. En tête de liste, les maladies infectieuses ont un index DALY de 30 %, ce chiffre résume l'impact désastreux tant sur le plan individuel que collectif et ce largement devant les maladies neuropsychiatriques (12,9 %), la traumatologie (12,2 %), la pathologie maternelle périnatale (11 %), les maladies cardio-vasculaires (9,9 %) et le cancer (5,1 %). L'étude de cet ensemble de phénomènes ainsi que la proposition de moyens pour les contrer semblent plus que jamais nécessaires (Sansone et Orth, 2006; OMS, 2002).

### 2. Etat des lieux en Algérie

Il est utile d'essayer à travers des chiffres de l'OMS de situer l'Algérie en matière de maladies infectieuses, un bon indicateur de leur impact sur la santé publique étant le taux de mortalité.

Pour l'an 2012, les maladies infectieuses ont causé la mort de 98 personnes pour 100000 habitants, ce qui représente 11.36 % des décès. Ce chiffre situe l'Algérie dans un rang intermédiaire entre des pays où les maladies infectieuses sont minimales en tant que causes de mortalité: Danemark (6.33%) et d'autres pays où c'est un facteur très pesant comme le Zimbabwe (51.07 %). Un autre paramètre peut mesurer plus ou moins l'impact économique des décès causés par les infections: le nombre d'années de vie perdues à cause des infections est estimé à 4810 ce qui n'est pas négligeable. Néanmoins, on peut se féliciter de la tendance nettement baissière de la mortalité causée par les infections entre 2000 et 2012 (OMS, 2014).

### **3. Causes, aspects et défis**

Les chiffres ci-dessus sont annonciateurs d'un vrai défi pour les praticiens de la santé, la communauté scientifique mais également les décideurs politiques. La lutte contre les maladies infectieuses nécessite une approche multidisciplinaire et pas uniquement des mesures prises en riposte à des cas plus ou moins isolés.

Il faut distinguer entre les facteurs qui ont abouti au retour redoutable des maladies infectieuses, les diverses facettes de ce retour et les défis auxquels on fait face aujourd'hui en matière de lutte contre les infections.

#### **3.1. Causes**

Plusieurs facteurs accentuent la menace induite par les agents pathogènes. En dehors des facteurs plus ou moins « humains » qui en sont responsables, il ne faut pas omettre de rappeler la grande capacité d'adaptation des germes infectieux aux diverses sollicitations du milieu extérieur. Cela trouve une explication plausible au niveau génétique. En effet, lors de la transposition, des fragments mobiles d'ADN se délocalisent tout en transférant horizontalement des caractéristiques différentes y compris la résistance aux antibiotiques et, même certains mécanismes pathogènes comme la production des toxines (Madigan *et al.*, 2015). Selon ces auteurs, l'adaptation plus ou moins rapide des agents infectieux restera inéluctable malgré les précautions extrêmes dans la prise en charge de la maladie infectieuse. La résistance de plus en plus féroce des agents infectieux aux molécules utilisées dans la chimiothérapie antimicrobienne constitue le second facteur de l'émergence des maladies infectieuses. La résistance bactérienne aux antibiotiques est un phénomène précoce (Bennet, 2015).

D'autres facteurs sont directement liés au changement du mode de vie d'une grande partie des humains. La croissance de la population mondiale a une nette tendance vers le développement rapide dans les zones qui souffrent le plus des endémies infectieuses. L'urbanisation qui peut être considérée comme une évolution dans le bon sens de l'espèce humaine peut être certes associée à un niveau de vie plus élevé et à de meilleures conditions de santé sauf qu'au sein de l'urbanisation massive contemporaine, il règne des inégalités qui font des parties les plus défavorisées des villes, des endroits pires que les zones non urbaines avec la propagation de maladies comme la fièvre typhoïde, les diarrhées et les maladies respiratoires. La globalisation et l'augmentation sans précédent de la connectivité des humains liées à la multiplication des liens de tout ordre: politique, culturel, économique, social ont contribué à la lutte contre certaines pathologies y compris les maladies infectieuses. Cependant, les individus en déplacement permanent entre les quatre coins du monde sont de vrais «transporteurs de la maladie» et l'exemple de la grippe aviaire H1N1 est édifiant (Heiman *et al.*, 2012).

Il ne faut pas omettre dans ce contexte la considération d'un facteur qui alourdit le bilan épidémiologique des maladies infectieuses. Il s'agit de l'augmentation du nombre de personnes à statut immunitaire compromis et l'émergence de la notion des infections opportunistes (Sepkowitz, 2002).

L'accès à grande échelle aux soins et les hospitalisations parfois prolongées du malade au niveau des structures de la santé peuvent avoir aussi un effet négatif: les infections nosocomiales (Jones *et al.*, 2014). Ces auteurs ont noté l'existence d'une corrélation entre l'augmentation du nombre de malades reçus, l'augmentation de l'importation des germes résistants et l'augmentation de l'acquisition des maladies nosocomiales par les malades.

### **3.2. Certains aspects de l'infectiologie moderne**

Les aspects révélateurs de cette résurgence des maladies infectieuses sont nombreux. Le débat lancé sur l'utilisation des antibiotiques et les possibilités de l'amélioration et la rationalisation de leur utilisation, en adoptant de bonnes pratiques lors de leur usage, est en soi même un aveu du risque qui guette la santé publique (Van de Bosch *et al.*, 2015).

Un autre aspect se montre dans les épidémies qui prennent un espace considérable même dans les médias non spécialisés. L'an 2014 a connu une épidémie sans précédent du virus Ebola qui a fait en quelques mois 1603 cas avec un taux de mortalité qui avoisine les 55% (Del Rio *et al.*, 2014). Les épidémies ont parfois des aspects cycliques avec réapparition imprévisible

dans le temps et dans l'espace. Au cours de cette période silencieuse où on assiste parfois à des cas sporadiques, les germes en cause s'engagent dans des mécanismes génétiques d'adaptation les rendant plus résistants et pathogènes. Le cas des épidémies de la grippe en est un excellent exemple (Zimmer et Burke, 2009).

### **3.3. Les défis à soulever**

#### **3.3.1. La résistance des germes à la chimiothérapie antimicrobienne**

Il y a des défis majeurs aujourd'hui face au monde des micro-organismes pathogènes. Le premier étant la propagation du phénomène de la résistance des germes aux thérapies existantes (essentiellement les antibiotiques). Ce phénomène induit essentiellement par la pression sélective des antibiotiques, a permis à certains germes de subsister même à des antibiotiques considérés jusque là infaillibles. La découverte en Juillet 2002 aux états unis d'une souche de *S. aureus* résistante à la vancomycine en est un exemple édifiant. Le risque ne concerne pas uniquement le pronostic vital des malades affectés par des souches résistantes, il rend l'impact économique lourd: aux Etats Unis, le cout du traitement d'une tuberculose à germes sensibles avoisine les 2000 USD alors que ce même cout revient à 180000 USD lorsqu'il s'agit d'une souche multi-résistante (Guilfoile, 2007).

#### **3.3.2. L'émergence des maladies infectieuses**

Le second défi est celui de l'émergence de certaines maladies infectieuses jusque là inconnues. Cette catégorie inclu des maladies infectieuses dont l'incidence chez l'être humain a augmenté durant les deux dernières décennies ou présentent un haut potentiel de l'être à l'avenir. Le nombre de ces affections affiche une tendance à la hausse depuis les années 1940 avec un pic dans les années 1980 puis un léger recul depuis les années 1990 (Heiman *et al.*, 2012).

#### **3.3.3. La réémergence des maladies infectieuses**

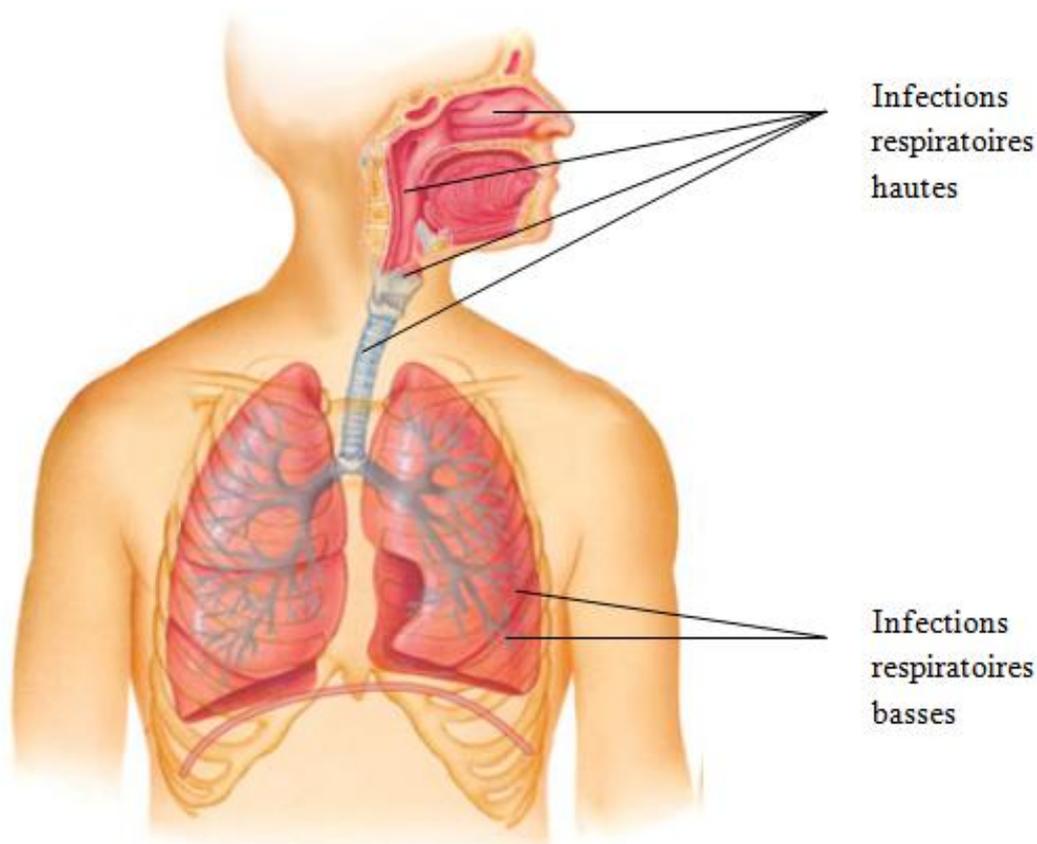
Ce sont des maladies qui renaissent aujourd'hui sous une nouvelle forme dotée d'un pouvoir pathogène accentué, par la sélection naturelle d'un coté et la sélection induite par l'usage des antibiotiques de l'autre. La tuberculose en est un exemple vivant, selon l'OMS, 9.1 millions de cas de tuberculose à travers le monde ont été déclarés en 2008 (Therese *et al.*, 2012). L'exemple des épidémies de la coqueluche aux Etats Unis illustre bien une défaillance perceptible de la vaccination, avec un taux d'incidence parfois plus élevé qu'avant

l'introduction de la vaccination (Cherry, 2012). Cet auteur a nettement signalé que cette situation est due à la fois au changement de vaccin utilisé contre cette maladie, à son caractère cyclique dans le temps et aussi à une modification dans l'agglutination des filaments du germe induite par des changements génétiques apparus suite à l'introduction de la vaccination.

#### 4. Les maladies infectieuses respiratoires

L'infection respiratoire peut être définie comme l'ensemble des pathologies d'origine bactérienne, virale ou parasitaire, touchant l'appareil respiratoire (Remond *et al.*, 2007).

On distingue les infections respiratoires hautes qui concernent la partie épi-glottique de l'appareil respiratoire et les infections respiratoires basses touchant l'étage sous-glottique (Fig. 1).



**Figure 1** : Structure du système respiratoire humain (Black, 2012)

La pluralité des infections et leur impact lourd sur la santé publique sont dus à trois facteurs d'ordre différents. Le premier facteur étant anatomo-physiologique. L'exposition directe du système respiratoire au milieu extérieur constitue la porte d'entrée de plusieurs éléments exogène incluant les microbes. (Fishman, 2008). Le deuxième facteur est d'ordre anatomique. Il est en relation directe avec la complexité structurale de l'appareil respiratoire. Ce dernier se subdivise en plusieurs segments avec des caractères anatomiques et histologiques différents. C'est cette organisation qui détermine des susceptibilités différentes vis-à-vis de l'agression des agents infectieux (Lencher *et al.*, 2011). Le troisième facteur est d'ordre épidémiologique. Leur mode de transmission direct qui implique un simple contact dans plusieurs maladies leur permettent une propagation rapide, tout en prenant en considération les multitudes sources et réservoirs pour ces agents infectieux: animaux domestiques, oiseaux, matériel contaminé, l'exposition nosocomial et enfin le bioterrorisme dans un monde qui sombre de plus en plus dans des conflits (Fishman, 2008).

#### **4.1. Infections respiratoires hautes**

80% des infections respiratoires touchent le nez, la gorge, les oreilles et le sinus regroupant ainsi des situations cliniques différentes: sinusite, angine, amygdalite, pharyngite et otite (Lissauer et Clayden, 1997).

##### **4.1.1. La sinusite**

Il s'agit de l'inflammation des sinus osseux de la face avec des tableaux cliniques variables selon la localisation, l'étiologie et le terrain. Certaines sont d'origine nasale, survenant après une rhinite, une grippe et surtout des bains. Les personnes atteintes d'une sinusite présentent des douleurs à irradiations multiples, des écoulements purulents, toux et une asthénie intellectuelle (Mallay *et al.*, 2001).

Les agents impliqués dans les sinusites d'origine infectieuses sont multiples. Selon la classification de l'agent infectieux on peut distinguer les sinusites virales, bactériennes et fongiques (Tableau 1) (Skinner, 2013).

##### **4.1.2. L'angine**

C'est une infection bactérienne ou virale des structures lymphoïdes de l'oropharynx et principalement les amygdales. La vulnérabilité à cette pathologie varie essentiellement selon l'âge, sa fréquence est maximale à l'enfance et à l'adolescence puis elle diminue. Face à un tableau clinique évocateur d'une angine, le clinicien doit décider d'une antibiothérapie

immédiatement au moindre suspect d'une infection à streptocoque hémolytique de type A. Cette dernière peut avoir des séquelles graves que ce soit pour l'enfant et l'adolescent avec le rhumatisme articulaire aigu et ses complications pouvant atteindre les valvules cardiaques, ou bien pour l'adulte qui peut subir après une telle infection l'arthrite post streptococcique avec moins d'impact cardiaque mais plus de souffrance au niveau des articulations (Anglaret et Mortier, 2002). Quoiqu'elle soit plus commune au printemps et en automne, on l'observe cependant en toute saison (Andral, 1999). L'irritation de la gorge, la fièvre, le renflement et la difficulté d'avaler sont les principaux symptômes (Baughman et Hackley, 1998).

#### **4.1.3. La pharyngite**

La pharyngite est une inflammation de la muqueuse pharyngée causée par *streptococcus pyogenes*. Favorisée par le froid et l'humidité, les pharyngites entraînent plus une gêne modérée qu'une véritable douleur. L'examen met en évidence un œdème inflammatoire du pharynx et la présence parfois de granulations lymphoïdes. Les patients peuvent présenter des écoulements nasaux, toux, enrouements, dysphagies et fièvres (Remond *et al.*, 2007).

### **4.2. Les infections respiratoires basses**

Ce sont les infections les plus redoutables. En 2012, l'OMS a classé les infections respiratoires basses comme deuxième cause de mortalité prématurée, entraînant la perte d'une moyenne de plus de 7 ans par rapport à l'espérance de vie. Les femmes étant plus exposées comparativement aux hommes à cette mortalité précoce (OMS, 2014). On peut citer :

#### **4.2.1. La bronchite**

La bronchite est une inflammation des bronches, le plus souvent d'origine virale et parfois liée à des bactéries. Causée en générale par *Mycoplasma pneumoniae* et *Streptococcus pneumoniae*. C'est une pathologie fréquente, en particulier en automne et en hiver où son évolution est généralement favorable. Elle peut être grave chez les sujets fragilisés (insuffisance respiratoire, asthmatique, ...). La maladie débute souvent dans la sphère ORL (sinusite, laryngite). Au bout de quelques jours, apparaît une toux rauque et pénible surtout nocturne, une expectoration d'abord muqueuse ensuite purulente, et parfois une dyspnée (Molinier *et al.*, 2007). La toux peut durer des semaines (Montani et Tcherakian, 2006).

#### 4.2.2. Les pneumonies

Principalement caractérisée par un exsudat pharyngé et une effusion pleurale. Cette infection peut être causée par divers agents dont le plus connu est *Streptococcus pneumoniae* (Tableau 1) (Black, 2012).

#### 4.2.3. La tuberculose

La tuberculose est une maladie infectieuse provoquée par *Mycobacterium tuberculosis*. L'apparition de souches résistantes a compliqué la prise en charge des personnes atteintes de cette maladie (Black, 2012).

L'atteinte par le germe en cause ne signifie pas la maladie. En effet, un bon nombre d'humains ont déjà été contaminés par le germe, 10 % approximativement vont développer la maladie qui s'annonce par la formation de nodules au niveau des poumons (Finer, 2003).

Le tableau 1 montre les principaux agents pathogènes du système respiratoire.

**Tableau 1:** Infections liées au système respiratoires et germes en cause  
(Kayser *et al.*, 2008; Mandell *et al.*, 2010; Black, 2012)

	<b>Germe</b>	<b>La / les maladies causées</b>
<b>Virus</b>	Adenovirus.	Rhume, bronchite, bronchiolite, pneumonie.
	Coronavirus.	Rhume, syndrome respiratoire aigu sévère.
	Orthomyxovirus/ Influenza virus.	Grippe, rhume, pharyngite, bronchite, bronchiolite, pneumonie.
	Paramyxovirus/ Para influenza virus.	Rhume, laryngite, bronchite, bronchiolite, pneumonie.
	Human metapneumovirus.	Bronchiolite, rhume.
	Coxsackievirus.	Pharyngite vésiculeuse.
	Rhinovirus.	Rhume.
	Herpes simplex virus.	Pharyngite aiguë, pharyngite ulcérateuse, trachéite, pneumonie (immunodéprimés).
	Cytomegalovirus.	Pharyngite aiguë et chronique.
	Human immunodeficiency virus (HIV).	Pharyngite lors de la primo infection, infections pulmonaires secondairement.

	Papillomavirus.	Papillomatose laryngale et trachéale.
<b>Bactéries</b>	<i>Streptococcus pyogenes.</i>	Pharyngite
	<i>Haemophilus influenzae,</i>	Laryngite
	<i>Streptococcus pneumoniae,</i>	
	<i>Moraxella.</i>	
	<i>Staphylococcus aureus,</i>	Otite
	<i>Pseudomonas aeruginosa,</i>	
	<i>Streptococcus pneumoniae, S.</i>	
	<i>pyogenes, H. influenzae.</i>	
	<i>H. influenzae, S. pneumoniae, S.</i>	Sinusite
	<i>pyogenes, S. aureus.</i>	
	<i>Streptococcus pneumoniae,</i>	Bronchite
	<i>Mycoplasma pneumoniae...</i>	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pneumonie
<i>Haemophilus influenzae</i>	Pneumonie	
<i>S. aureus</i>	Pneumonie	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculose	
<i>Corynebacterium diphtheriae.</i>	Diphthérie	
<b>Fungi</b>	<i>Histoplasma capsulatum.</i>	Histoplasmose pulmonaire.
	<i>Blastomycosis dermatitidis.</i>	Blastomycose pulmonaire.
	<i>Aspergillus sp.</i>	Aspergillose pulmonaire chronique.

### 4.3. Diagnostic bactériologique des infections respiratoires

Le diagnostic bactériologique repose principalement sur l'isolement de l'agent pathogène responsable de l'infection et son identification (Blic *et al.*, 2002). Le laboratoire de microbiologie devra identifier avec précision l'agent causal des infections respiratoires et si possible, établir sa sensibilité aux antibiotiques. La bonne qualité des prélèvements et les conditions d'un bon acheminement des échantillons au laboratoire sont indispensables pour un bon diagnostic bactériologique (Yernault et Demedts, 1993).

#### **4.3.1. L'expectoration**

Dans la mesure du possible, il faut éviter la contamination des échantillons par la salive ou par la flore buccale (Yernault et Demedts, 1993). Pour une bonne expectoration, il faut que le nombre de polynucléaires neutrophiles soit supérieur ou égal à 25 et que le nombre de cellules épithéliales soit inférieur à 10 par champ (Blic *et al.*, 2002).

#### **4.3.2. Ecouvillonnage de l'oropharynx postérieur**

Ce type de prélèvement est réalisé lorsqu'on suspecte une infection au niveau de l'oropharynx postérieur (Ramdani et Rahal, 2005). Il se fait à l'aide d'un écouvillon sur l'oropharynx.

#### **4.3.3. Méthodes invasives**

Les techniques invasives sont généralement réservées aux patients dont l'évolution clinique semble être péjorative malgré une antibiothérapie bien conduite (Blic *et al.*, 2002).

##### **4.3.3.1. Prélèvement distal protégé (PDP)**

Cette technique permet théoriquement d'éviter une contamination par la flore oropharyngée. Elle est indiquée chez les patients sous ventilation assistée. Elle peut être réalisée sous contrôle fibroscopique ou par une technique dite à l'aveugle (Blic *et al.*, 2002).

##### **4.3.3.2. Lavage broncho-alvéolaire (LBA)**

Le lavage broncho-alvéolaire est une technique d'investigation simple qui permet le recueil dans les espaces aériens périphériques, des agents infectieux, des substances chimiques et des particules minérales (Yernault et Demedts, 1997).

##### **4.3.3.3. Aspiration bronchique**

Elle permet de maintenir la perméabilité des voies aériennes supérieures, de prévenir la formation d'un bouchon muqueux, et d'améliorer les échanges gazeux. Ce genre de prélèvement est indiqué en cas d'encombrement bronchique afin d'améliorer le confort respiratoire du patient lors d'expectorations difficiles voire impossible (Houbert, 2010).

#### **4.3.4. Autres prélèvements**

Il existe d'autres types de prélèvements adaptés à certains malades tels que : Aspiration endotrachéale (Roulin, 2006), Aspiration nasopharyngée, ponction transtrachéale, ponction transtrachéale à aiguille fine et ponction pleurale (Léophonte, 2001).

## Chapitre II : Les molécules anti infectieuses

---

### 1. Les antibiotiques

Le terme antibiotique est utilisé pour désigner tout agent antibactérien d'origine naturelle, synthétique ou hémi synthétique, agissant à faibles concentrations. Ce terme est largement réservé aux substances actives sur des bactéries. Celles agissant sur les virus sont désignées souvent comme antivirales (Swingleton et Sainsbury, 2006).

Il faut mentionner que le terme antibiotique couvre un large groupe de composés dont l'activité peut s'exercer par deux mécanismes principaux: les antibiotiques qui stoppent la croissance des microbes, appelés bactériostatiques, et ceux qui les tuent sont appelés bactéricides. Certains antibiotiques peuvent être bactériostatiques dans certaines circonstances et concentrations, et bactéricides dans d'autres (Walsh, 2003).

Les antibiotiques sont destinés à bloquer sélectivement des processus cruciaux dans les cellules microbiennes. La plupart des molécules introduites en thérapeutique des maladies infectieuses dans les 60 dernières années ont été des produits naturels, élaborés par des microorganismes dans des conditions particulières pour affecter les microbes voisins, soit pour réguler leur croissance, soit pour les tuer (Murray *et al.*, 2009).

La production de substances antimicrobiennes à partir des microorganismes repose sur un phénomène de compétitivité. Cependant, elle nécessite également des mécanismes de "self-protection" des producteurs afin de se protéger de l'action létale des antibiotiques. Il y a plusieurs stratégies parmi lesquelles l'efflux de l'antibiotique de la cellule productrice au milieu extérieur de façon à maintenir de faibles concentrations intracellulaires. D'autres antibiotiques comme la streptomycine et l'oléandomycine, sont excrétés à l'état inactif et la dernière étape de maturation enzymatique se fait à l'extérieur de la cellule. Certains microorganismes producteurs d'antibiotiques altèrent la structure de leurs propres parois cellulaires, modifient par exemple la peptidyltransférase de la synthèse protéique ou produisent des mutations structurales désensibilisant à l'antibiotique, pour se protéger de l'autodestruction (Walsh, 2003; Yao et Moellering, 2003).

Le tableau 2 montre un bref aperçu sur l'historique de la découverte des antibiotiques mis au marché jusqu'à aujourd'hui:

**Tableau 2:** Date de découverte et microorganismes d'origine de quelques antibiotiques  
(Prescot *et al.*, 2003)

Nom de l'antibiotique	Date de la découverte	Microorganisme producteur
Pénicilline	1929	<i>Penicillium notatum</i>
Tyrothricine	1939	<i>Bacillus brevis</i>
Griséofulvine	1939	<i>Penicillium griseofulvum</i> <i>Penicillium janczewski</i>
Streptomycine	1944	<i>Streptomyces griseus</i>
Bacitracine	1945	<i>Bacillus licheniformis</i>
Chloramphénicol	1947	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Polymixine	1947	<i>Bacillus polymyxa</i>
Framycétine	1947	<i>Streptomyces lavendulae</i>
Néomycine	1949	<i>Streptomyces fradiae</i>
Oxytétracycline	1950	<i>Streptomyces rimosus</i>
Erythromycine	1952	<i>Streptomyces erythreus</i>
Vancomycine	1956	<i>Streptomyces orientalis</i>
Acide fucidique	1960	<i>Fusidium coccineum</i>
Gentamicine	1963	<i>Micromonospora purpurea</i>
Josamycine	1964	<i>Streptomyces narbonensis</i> var <i>josamyceticus</i>
Tobramycine	1968	<i>Streptomyces tenebraeus</i>
Ribostamycine	1970	<i>Streptomyces ribosidificus</i>
Rosaramicine	1972	<i>Micromonospora rosaria</i>

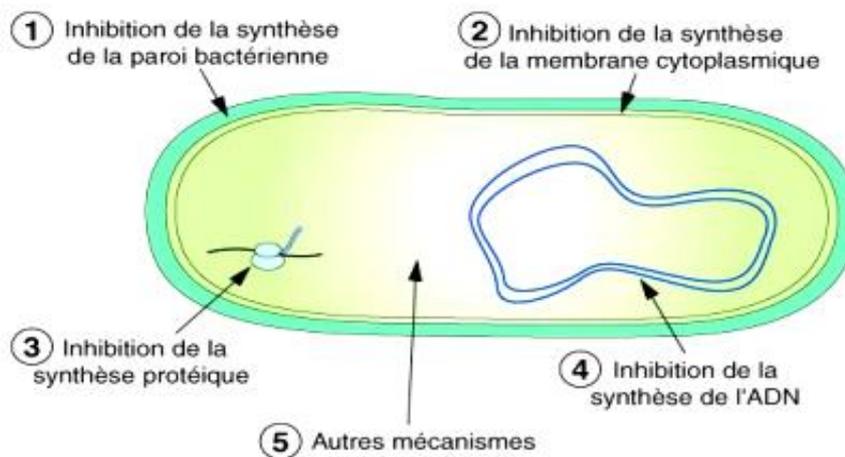
L'analyse de ce tableau révèle deux faits essentiels:

- Une grande partie des antibiotiques utilisés en cliniques sont les produits de microorganismes. Ces antibiotiques demeurent largement utilisés malgré le phénomène de la résistance. On observe un ralentissement dans la découverte de nouveaux antibiotiques produits par des microorganismes et ceux de synthèse depuis les années 1970 ;
- Aucun antibiotique à base de plantes médicinales n'est mis sur le marché.

## 2. Les principales classes d'antibiotiques

Pour classer les antibiotiques, le critère le plus utilisé est la cible anatomique ou moléculaire au niveau de la bactérie. On compte quatre classes (Fig. 2 et Tableau 3):

- Antibiotiques agissant sur la synthèse de la paroi bactérienne ;
- Antibiotiques agissant sur la synthèse des protéines par les bactéries ;
- Antibiotiques agissant sur la synthèse de l'ADN ou de l'ARN bactérien ;
- Antibiotiques agissant sur la synthèse des folates.



**Figure 2 :** Lieux d'action des antibiotiques dans la cellule bactérienne (Tortora *et al.*, 2010)

### 2.1. Antibiotiques agissant sur la biosynthèse de la paroi cellulaire

A ce groupe font parti les familles des B-lactamines, aminoglycosides et certains antituberculeux. Bien que la structure des bactéries Gram+ et Gram- soit différente, les parois de ces germes ont en commun la même structure de base en matière de chaîne macromoléculaire. Il s'agit du N-acetyl glucosamine en alternance avec son éther de lactyl. Ainsi, la substance de base des parois bactériennes est le peptidoglycane dont l'épaisseur varie entre les bactérie Gram+ et Gram-. Les antibiotiques de cette famille exercent leur action antibactérienne par l'interférence de différentes étapes de la synthèse du peptidoglycane (Finch, 2010).

Dans les bactéries Gram+, le passage des B-lactamines et l'atteinte de leur cible est simple. Pour les bactéries Gram-, les B-lactamines doivent traverser une couche hydrophobe constituée essentiellement de lipopolysaccharide et lipoprotéine. La capacité de traverser cette

barrière dépend des propriétés physico-chimiques de chaque antibiotique, et pour que l'activité ait lieu, l'antibiotique doit échapper à l'inactivation par les B-lactamases responsables de l'ouverture du noyau structural constitutif des B-lactamines. L'ouverture du noyau est responsable de la perte d'activité des B-lactamines (Tozuka et Mirakawa, 2007).

Les glycopeptides agissent en complexant les brins de peptides non liés et en bloquant la transpeptidation. Ils ne traversent pas les pores des membranes externes des Gram- et ne sont donc utilisés que contre les Gram+ (Murray *et al.*, 2009).

## 2.2. Antibiotiques agissant sur la biosynthèse des protéines bactériennes

La complexité du processus aboutissant à la biosynthèse des protéines et son impact sur le fonctionnement cellulaire font de ce processus une cible de choix pour inhiber la croissance bactérienne. Ainsi, vu le grand nombre d'étapes impliquées, qui vont de l'activation des 20 amino-acides protéinogènes par l'amino-acyl tRNA synthétase, aux multiples étapes de l'initiation, de l'élongation et de la terminaison de la chaîne des polypeptides sur les ribosomes, il est naturel que certains antibiotiques ciblent une ou plusieurs étapes de la biosynthèse des protéines (Murray *et al.*, 2009).

Ainsi, les macrolides dont le premier élément découvert fut l'érythromycine en 1952, suivi par la découverte et l'introduction dans la thérapeutique d'autres molécules comme l'azythromycine et la clarithromycine dans les années 1990, agissent en inhibant la transcription de l'ARNm en protéine au niveau de la sous-unité 50S. La cible moléculaire est la peptidyl-transférase. Quelques antibiotiques de cette famille interagissant avec d'autres cibles peuvent aussi donner lieu à une activité antibiotique, mais toujours au niveau de la sous-unité 50S (Jain *et al.*, 2001).

Les tétracyclines produites par *Streptomyces aureofaciens* et *Streptomyces rimosus* sont des antibiotiques bactériostatiques agissant au niveau de la sous-unité ribosomale 30s, en bloquant le transport des aminoacyl t-RNA (Yao et Moellering, 2003; Walsh, 2003).

Les aminoglycosides sont des antibiotiques à grand potentiel et à large spectre d'actions. Ils conservent une place de choix dans le traitement des infections sérieuses. Leur action se fait par liaison irréversible avec la sous-unité 30S au niveau du ribosome, et leur cible moléculaire est le 16S rRNA (Kim et Nicolau, 2007).

Le linézolide est un antibiotique totalement synthétique qui agit en bloquant la synthèse des protéines. Il occuperait le site P dans le centre de la peptidyl transférase du ribosome, bloquant ainsi la première étape de formation des peptides dans la synthèse des protéines (Yao et Moellering, 2003; Walsh, 2003).

### 2.3. Antibiotiques bloquant la réplication de l'ADN

Cette classe est représentée par les quinolones dont le mécanisme d'action n'est pas parfaitement élucidé. Cependant, il semblerait qu'une liaison entre les quinolones, l'ADN gyrase et topoisomérase entraîne un effet bactériostatique. La mort cellulaire serait induite par la fragmentation chromosomique dont le mécanisme varie selon la structure du quinolone (Cheng *et al.*, 2013).

### 2.4. Antibiotiques inhibant la synthèse des folates

Cette classe comprend la combinaison de sulfaméthoxazole et de triméthoprime. L'association de ces deux molécules montre qu'une synergie peut avoir lieu avec la combinaison de deux molécules dans le traitement des infections bactériennes. Chacune des molécules bloque une étape de la synthèse des folates. Le sulfaméthoxazole bloque la dihydroptéroate synthétase, tandis que le triméthoprime inhibe la dihydrofolate réductase, enzyme clé fournissant les thymidylates pour la biosynthèse de l'ADN (Murray, 2009; Tortora *et al.*, 2010).

**Tableau 3:** Antibiotique, site d'action et molécule cible (Finch, 2010)

Site d'action	Antibiotique	Cible moléculaire
Paroi cellulaire	Pénicillines	Transpeptidase
	Céphalosporines	Transpeptidase
	Bacitracine	Isoprenyl-phosphate
	Vancomycine	Acyl-o-alanyl-o-alanine
	Isoniazide	Synthèse de l'acide mycolique
	Ethambutol	Arabinosyl transférase
Ribosome	Chloramphénicol	Peptidyl-transférase
	Tétracyclines	Site A du ribosome
	Aminoglycosides	Complexe d'initiation de la traduction
	Macrolides	Sous unité 50S ribosomale
Acides nucléiques	Lincosamides	Sites A et P du ribosome
	Quinolones	ADN gyrase sous unité alpha et

---

		topoisomérase IV
	Novobiocine	ADN gyrase sous-unité bêta
	Rifampicine	ARN polymérase
Membranes cellulaire	Polymixine	Phospholipides membranaires
	Daptomycine	Phospholipides membranaires
Synthèse des folates	Sulfonamides	Pteroate synthétase
	Diaminopyrimidines	Dihydrofolate réductase

---

### 3. Principales familles d'antibiotiques

#### 3.1. Antibiotiques de structure betalactamine

##### 3.1.1. Les pénicillines

Les antibiotiques du groupe pénicilline ont toutes en commun la structure chimique appelée acide 6 aminopénicillanique. A partir de cette structure, on peut distinguer différentes familles selon la nature des radicaux pouvant s'y greffer. Les pénicillines G et V sont dites «naturelles», synthétisées par des champignons de la famille des *Penicillium*. De plus, c'est la pénicilline G ou benzylpénicilline qui donne naissance à la pénicilline V par la modification de la chaîne latérale par hémi synthèse (Moulin *et al.*, 2002).

Leur mode d'action est un effet bactériostatique. En effet, ces antibiotiques empêchent la paroi des bactéries pathogènes de se structurer. Ces composés inhibent la formation de liaisons interpeptidoglycanes, entravant ainsi l'élaboration du peptidoglycane (Gaudi *et al.*, 2005).

##### 3.1.2. Les céphalosporines

Les céphalosporines constituent l'autre grande classe des betalactamines. Leur structure présente de grandes similitudes avec les pénicillines, en particulier le noyau de base.

Les céphalosporines, comme les pénicillines, agissent au niveau de la paroi bactérienne des agents pathogènes. Elles exercent un effet bactériostatique en empêchant la biosynthèse du peptidoglycane. Ces antibiotiques ont aussi un effet bactéricide (Bingen *et al.*, 2001).

#### 3.2. Les Cyclines

Les premières molécules de cette famille ont été isolées à partir de souches du genre *Streptomyces*. On distingue aujourd'hui deux familles correspondant à deux générations. La

première génération rassemble la tétracycline, l'oxytétracycline et la chlortétracycline. La seconde génération rassemble des dérivés hémi synthétiques (doxycycline, minocycline ...).

La structure de base des tétracyclines correspond à un noyau à quatre cycles de type naphtacène carboxamide (Moulin *et al.*, 2002).

Les cyclines ont une action bactériostatique. Elles bloquent la synthèse protéique des bactéries en se fixant sur la sous-unité 30s des ribosomes bactériens.

Elles agissent au niveau intracellulaire des bactéries en passant la barrière de l'enveloppe cellulaire grâce à un système de transport actif transmembranaire (Gaudi *et al.*, 2005).

### **3.3. Les macrolides, lincosamides, synergistines et les kétolides**

Ce sont d'une part des molécules naturelles et d'autre part des molécules obtenues par hémi synthèse.

Ces trois groupes d'agents antibactériens ont été rassemblés bien qu'il s'agisse de familles qui ont des structures chimiques différentes, car elles présentent toutes les trois un mécanisme d'action et un spectre antibactérien similaire (Gaudi *et al.*, 2005).

Notons qu'un nouveau groupe a fait son apparition au coté des macrolides, il s'agit des kétolides. Ils sont considérés comme des macrolides de dernière génération.

Les macrolides présentent tous un macrocycle avec une fonction lactone comportant 14, 15 ou 16 carbones. Sur ce macrocycle s'associent deux ou plusieurs sucres.

La première molécule qui fut découverte et isolée en 1952 à partir de *Streptomyces Erythreus*, est l'érythromycine. Les autres macrolides ont été obtenus par hémi synthèse à partir de dérivés naturels comme l'érythromycine.

Les lincosamides constituent un groupe restreint de deux molécules, la lincomycine et la clindamycine. Ce dernier dérivé (7 chloro 7 déoxylincomycine) est aujourd'hui le plus utilisé car c'est le plus actif. La structure des lincosamides est différente de celle des macrolides classiques.

Les synergistines appelées aussi streptogramines sont obtenues par hémi synthèse et constituent au niveau thérapeutique un groupe de deux molécules, à savoir la pristinamycine et la quinupristine/dalfopristine (Gaudi *et al.*, 2005).

Ce groupe d'antibiotiques agit sur le ribosome bactérien, en se fixant sur la sous unité 50 s au niveau du site P. Il bloque de cette façon l'action de la transpeptidase qui permet le transfert des acides aminés sur la chaîne protéique en cours de formation.

Selon leur concentration et selon le germe, les antibiotiques de ce groupe auront une activité bactériostatique ou bactéricide (Page *et al.*, 1999).

Par ailleurs, les kétolides se distinguent des autres macrolides par la présence de deux points d'ancrage au niveau de la peptidyltransférase ce qui empêche l'assemblage des deux sous unités ribosomales. Ils possèdent une activité antibactérienne supérieure à celle des autres classes, et ils exercent une action sur davantage de souches pathogènes (Zhanel *et al.*, 2002).

### 3.4. Les quinolones

Les quinolones rassemblent dans une classe très large des agents anti-infectieux obtenus par synthèse chimique. C'est à partir de la chloroquine qu'a été synthétisée la première quinolone, à savoir l'acide nalidixique. On dénombre ainsi quatre générations de quinolones.

A la première génération s'est ajoutée la deuxième génération qui possède un atome de fluor en position 6, ce sont les fluoroquinolones. La molécule la plus connue est la ciprofloxacine.

Quant aux troisième et quatrième générations de quinolones, beaucoup plus récentes, elles ont des propriétés pharmacocinétiques ainsi qu'un spectre d'action plus vaste. Parmi elles on peut citer la lévofloxacine, très efficace sur les infections respiratoires.

Les quinolones et fluoroquinolones exercent leur action sur l'ADN gyrase (topoisomérase II) et la topoisomérase IV, qui sont des enzymes catalysant la réplication et la transcription de l'ADN bactérien. Une fois fixées au complexe "EnzymeADN", ces molécules inhibent l'enroulement de la double hélice et induisent des cassures au niveau de la chaîne hélicoïdale (Nauciel, 2005).

### 3.5. Dérivés phosphoniques

La fosfomycine est un antibiotique bactéricide atypique. Elle est produite par des bactéries du genre *Streptomyces* et par *Pseudomonas Aeruginosa*. C'est un dérivé de l'acide phosphonique, plus précisément l'acide Lcis 12 Epoxypropyl phosphonique.

La fosfomycine agit en inhibant la synthèse du peptidoglycane. Elle présente une structure proche du PEP (phosphoénolpyruvate) et interagit avec le pyruvate UDPN acetyl glucosamine transférase. Elle bloque ainsi la synthèse de l'acide N acetyl muramique qui est un composant essentiel du peptidoglycane.

### 3.6. Les sulfamides

Les sulfamides caractérisent une famille d'agents antibactériens souvent utilisés pour lutter contre certaines infections urinaires. Un sulfamide est souvent associé à une molécule de la famille des 2,4 diaminopyridines le triméthoprime, une autre molécule bactériostatique.

Aujourd'hui, le principal sulfamide encore utilisé par voie orale est le sulfaméthoxazole. La structure du sulfaméthoxazole est comparable à celle de l'acide paraaminobenzoïque et est présentée avec le triméthoprime (Moulin *et al.*, 2005).

Les sulfamides ont un mode d'action de type bactériostatique. Ils interviennent sur la croissance bactérienne en agissant comme antimétabolites. La bactérie pour sa croissance synthétise de l'acide folique, et pour cela, elle a besoin de paminobenzamide.

C'est là que le sulfamide agit, car très proche structurellement du paminobenzamide, il se substitue à lui et bloque la formation d'acide folique empêchant la bactérie de développer.

Pour améliorer l'activité des sulfamides, on leur adjoint un composé de la famille des diaminopyridines, le triméthoprime. Il présente également une activité bactériostatique de part son inhibition sélective de la dihydrofolate réductase bactérienne.

L'association des deux composés présente alors une activité bactéricide et le risque d'apparition de résistances est diminué (Johnson, 2002).

#### **4. Molécules antifongiques**

L'amphotéricine B étant le premier antifongique à usage systémique depuis les années 1950, et reste le seul médicament de cette classe à usage systémique jusqu'à l'avènement des dérivés triazoliques à la fin des années 1980. C'est un composé produit par un actinomycète, *Streptomyces nodosus*.

Depuis, d'autres groupes de molécules sont utilisés. Les allylamines sont un groupe de molécules de synthèse à large spectre utilisées dans le traitement des dermatophytoses et des formes superficielles de la candidose, incluant plusieurs molécules dont la naftifine et la terinafine. Un autre groupe important et largement utilisé dans la thérapeutique contemporaine est celui des dérivés azolés. Il inclut des molécules de synthèse, tel que le fluconazole et l'itraconazole, utilisés dans le traitement des maladies fongiques et de certaines maladies d'origine bactérienne. Le mécanisme d'action est principalement fongistatique. Le troisième groupe est celui des echinocandines, qui renferme des molécules hémi synthétiques notamment l'anidulafungine et la caspofungine agissant par l'interférence de la synthèse de la paroi cellulaire. Ce groupe est particulièrement efficace contre les *Candida* (Walsh, 2003; Murray *et al.*, 2009).

#### **5. Les molécules utilisées en chimiothérapie virale**

On compte actuellement environ 40 molécules utilisées dans le traitement des maladies d'origine virale. La plupart de ces molécules exercent leur activité au niveau du génome et de

sa réplication. La classe des inhibiteurs de la nucléoside reverse transcriptase est de loin la plus connue, incluant la zidovudine, le didanosine, la zalcitabine, la stavudine, la lamivudine, l'abacavir et l'emtricitabine. Une autre classe est représentée par les inhibiteurs de la nucléotide reverse transcriptase, incluant le tenofovir et le disoproxil fumarate. La classe des inhibiteurs de la reverse transcriptase non nucléotidique renferme des molécules comme la nevirapine, delavirdine et les inhibiteurs de la protéase incluant saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir et amprenavir entre autres (Ismail *et al.*, 2013).

## **6. Autres molécules**

Une autre classe des médicaments anti-infectieux est celle des anti-protozoaires. Plusieurs molécules anti infectieuses ont été développées entre 1920 et 1930. On peut citer parmi les molécules utilisées dans ce sens, les organométalliques qui sont des dérivés de l'arsenic et de l'antimoine comme le melarsoprol et l'antimoine de méglumine. Une autre classe est celle des quinolines, largement utilisée comme traitement au paludisme. Pour cette classe, la chloroquine fut la première molécule découverte suivie d'autres molécules comme la méfloquine et l'amodiaquine. Enfin, les molécules de la classe des diamodines telles que la pentamidine et la propamidine utilisées dans le traitement des trypanosomiasés, mais aussi d'autres maladies due à des protozoaires (Croft et Seifert, 2010).

## Chapitre III : Résistance des germes aux anti-infectieux

### 1. Résistance des bactéries aux antibiotiques

D'après Gualerzi (2014), la résistance bactérienne à un antibiotique donné doit être définie en fonction des critères pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de la molécule concernée. Lorsque la concentration minimale inhibitrice dépasse la concentration maximale permise d'un point de vue pharmacocinétique-pharmacodynamique, il y a alors risque que l'objectif thérapeutique ne soit pas atteint et le germe est donc classé résistant.

La résistance bactérienne aux antibiotiques avait été observée dès les premières années d'utilisation. En effet, des résistances aux pénicillines, à la streptomycine et aux autres antibiotiques étaient observées. Le tableau 4 donne une idée sur le temps écoulé entre le début d'utilisation de certains antibiotiques et l'apparition de germes résistants.

**Tableau 4:** Antibiotique, début d'utilisation et date d'apparition des résistances  
(Palumbi, 2001; Robiczek, 2006)

Antibiotique	Début d'utilisation	Apparition des résistances
Sulfonamides	Les années 1930	Les années 1940
Pénicilline	1943	1946
Streptomycine	1943	1948
Chloramphénicol	1947	1959
Néomycine	1949	1950
Erythromycine	1952	1988
Vancomycine	1956	1988
Meticilline	1960	1961
Ampicilline	1961	1973
Clindamycine	1969	1970
Piperacilline	1980	1981
Imipénème	1985	1985
Ciprofloxacine	1987	1987
Quinupristine	1999	2000
Linezolide	2000	2002

Le phénomène de résistance est ancien, mais lors des dernières années le risque est accentué vu la conjugaison de deux facteurs:

- La diminution du nombre de nouveaux antibiotiques.
- La diminution considérable du temps qui sépare l'introduction d'un antibiotique en thérapeutique et l'apparition de souches résistantes à cet antibiotique. Pour certains antibiotiques, l'apparition de souches résistantes était presque concomitante à la mise sur le marché (Imipenème, Quinupristine).

Sur le plan génétique, il paraît utile d'associer la virulence d'un germe avec sa résistance aux antibiotiques. Il arrive parfois que le même déterminant peut être impliqué dans des mécanismes de virulence et de résistance (Martinez et Baquero, 2002). Ces auteurs révèlent également que certains mécanismes sont communs entre la virulence et la résistance, et d'autres sont communs entre ceux qui enclenchent l'expression des gènes de la virulence et ceux qui peuvent enclencher les gènes de la résistance. Ces facteurs sont la température, le pH faible et les faibles concentrations en fer. La résistance peut aussi être considérée sous un autre angle. Elle peut être endogène ou exogène. Dans le premier cas, elle implique des mécanismes génétiques propres à la bactérie sans qu'il y ait induction de l'environnement. Cette résistance peut avoir lieu par le biais de plusieurs mécanismes, comme les mutations simples réduisant l'affinité à la cible de l'antibiotique. Ce mécanisme est responsable de la résistance pour la rifamycine, la streptomycine et l'acide fucidique entre autres. Les multiplications peuvent diminuer l'affinité de la cible et la remodeler. Ceci est impliqué dans la résistance au fluoroquinolones, vancomycine et polymyxine. Ces mêmes mécanismes endogènes peuvent influencer sur la perméabilité en modifiant l'efflux par la diminution de l'expression des porines et des perméases, rencontrée dans la résistance aux carbapénèmes et à la fosfomycine. En revanche, les mécanismes exogènes de la résistance sont dus à l'intervention de facteurs extrinsèques dont le plus important demeure l'exposition aux antibiotiques. Parmi les mécanismes impliqués, on peut citer la dégradation ou la modification des antibiotiques par des enzymes spécifiques. L'exemple le plus connu est l'inactivation des bêta-lactamines par les bêta-lactamases. Cependant, ces mécanismes peuvent aussi inclure la substitution de la cible par une cible de moindre affinité. Ceci concerne entre autres les bêta-lactamines, l'acide fucidique et la vancomycine. Un dernier mécanisme à citer est la séquestration de la cible, rencontré avec l'acide fucidique (Silver, 2011).

Bien que plusieurs facteurs peuvent jouer un rôle dans l'apparition d'une résistance lors de l'usage d'un antibiotique, la relation de causalité entre usage d'antibiotique et résistance est évidente, et ce en vu de plusieurs corrélations. En premier lieu, l'association est solide dans diverses études et diverses population entre les deux. En second lieu, la relation était aussi établie entre la dose administrée et l'apparition de la résistance. De plus, le changement dans l'utilisation des antibiotiques induit un changement dans la résistance à cet antibiotique (Schechner *et al.*, 2013). La rationalisation de l'usage des antibiotiques devrait être mise selon ces mêmes auteurs en avant pour essayer de parer contre ce phénomène.

## **2. Résistance aux antifongiques**

La résistance aux antifongiques continue à croître et à évoluer, compliquant ainsi la prise en charge des malades. Divers mécanismes sont impliqués. Pour le genre *Candida*, largement isolé en clinique, la résistance aux dérivés azolés intervient par un mécanisme influant l'efflux médié par des pompes membranaires. La résistance à l'échinocandine intervient par une mutation modifiant la cible moléculaire de cet antifongique (Pfaller, 2012).

Parmi les stratégies proposées pour pallier à la résistance des champignons, on peut citer la recherche de nouvelles molécules, l'étude approfondie de la relation champignon-hôte et l'étude génomique. Ceci peut mettre en évidence de nouvelles possibilités de traitements, et permet par la même occasion la détection de nouvelles cibles (Vandiputte *et al.*, 2011).

## **3. Résistance aux antiviraux**

Pour les agents antiviraux, le traitement qui est déjà de longue durée crée un climat favorable pour le développement des résistances et conduit le plus souvent à l'échec des thérapies. Un moyen pour pallier à cette éventualité est la pratique de test de sensibilité avant la prescription des traitements ou lorsqu'on constate l'absence d'amélioration après l'administration d'un traitement donné. Une autre solution pour vaincre la résistance est l'association de plusieurs molécules antivirales efficaces et dirigées contre des cibles cellulaires différentes. Ces résistances sont plus élucidées lorsqu'il s'agit de virus impliqués dans des maladies endémiques. Par ailleurs, l'HIV reste le virus où la résistance est un défi pour l'intelligence humaine. Des chercheurs signalent que parmi les risques majeurs induits par l'émergence de la résistance est celui lié à la continuation dans un traitement de première ligne qui a échoué. Il s'agit de l'accumulation des mutations virales qui vont même compliquer la prise en charge par les thérapies de deuxième ligne (Sigalof *et al.*, 2011).

---

## Chapitre IV :

# Les remèdes à la résistance aux antibiotiques

---

### 1. Nouvelles stratégies pour la recherche de nouveaux antibiotiques et l'extension de leur durée de vie

Le développement rapide de résistances nécessite la poursuite des recherches en vue de trouver de nouveaux antibiotiques et de prolonger la durée d'utilisation des antibiotiques existants. Parmi les stratégies envisageables, il y a la recherche de nouvelles cibles, la découverte de nouvelles molécules et le sondage de composés non-antibiotiques pouvant soigner les infections.

#### 1.1. Recherche de nouvelles cibles

Les biologistes caractérisent sans cesse de nouveaux gènes ou enzymes essentiels à la survie des bactéries ou à leur virulence. C'est à partir de ces cibles moléculaires que les laboratoires de recherche envisagent les antibiotiques du futur, qu'il s'agisse des modifications de molécules actuelles ou de molécules radicalement nouvelles (Tytgat *et al.*, 2009).

L'exploration des processus métaboliques essentiels des bactéries et la caractérisation des enzymes qui les catalysent constituent donc des voies importantes pour la recherche de nouveaux points d'attaque potentiels. Cela permet d'espérer la mise au point de nouveaux antibiotiques contre lesquels les bactéries n'ont encore développé aucune résistance. Autrefois empirique, la démarche des laboratoires devient donc plus rationnelle: c'est à partir des protéines cibles parfaitement connues que des molécules inhibitrices sont recherchées, et certaines de ces molécules deviendront probablement les antibiotiques de demain (Falconer et Brown, 2009). Un exemple de cette démarche est le cas de la platensimycine et de la platencine, deux molécules isolées de *Streptomyces platensis*, qui s'attaquent à une cible non encore exploitée à savoir l'inhibition des voies de synthèse d'acides gras de type II (Wright et Reynolds, 2007).

Les laboratoires partent souvent des antibiotiques connus pour développer des dérivés plus actifs, soit en modifiant la molécule d'origine de manière à la faire agir sur une cible légèrement différente, soit en lui adjoignant un inhibiteur de résistance lorsque le mécanisme est connu. Dans certains cas, la modification structurale peut aboutir à un changement de mécanisme d'action. Ainsi par exemple :

- Les kétolides sont efficaces sur les pneumocoques pourtant résistant aux autres macrolides. En plus de leur action, commune aux macrolide, inhibitrice de la synthèse protéique en se fixant sur les ribosomes, ces molécules se fixent sur un site ribosomique supplémentaire (Walsh, 2003).
- Les quinolones empêchent la réplication de l'ADN et sa transcription en ARN en inhibant l'ADN-gyrase, enzyme impliquée dans le contrôle tridimensionnel de l'ADN. Il existe d'autres quinolones, dérivées des premières, qui interagissent avec la topoisomérase IV, une autre enzyme contrôlant la conformation de l'ADN. Cette topoisomérase serait la cible principale des quinolones chez les staphylocoques, alors que la gyrase serait particulièrement visée chez les Gram négatif. Le développement de molécules agissant sur les deux cibles à la fois pourrait donner des antibactériens particulièrement efficaces (Walsh, 2003; Murray *et al.*, 2009).

La recherche basée sur les nouvelles cibles doit se faire dans le cadre d'une stratégie à plus long terme pour créer de nouvelles classes d'antibiotiques agissant sur des cibles jusqu'ici inexplorées. L'idée est de tenter d'inhiber une étape de biosynthèse propre aux procaryotes, ce qui limite la toxicité du produit pour l'homme (walsh, 2003). L'action pourrait être envisagée à plusieurs niveaux :

- La synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne est un processus hautement spécifique. Elle nécessite plusieurs étapes enzymatiques, les bêtalactamines agissant à la dernière étape d'assemblage des monomères, l'identification de cibles parmi les réactions précédentes est une option intéressante. La stratégie consiste à inhiber le gène qui code pour l'enzyme catalysant la réaction choisie et à vérifier ainsi son importance pour la synthèse du peptidoglycane chez les bactéries pathogènes visées (Walsh, 2003).
- La division cellulaire est aussi une étape importante qui fait intervenir certaines protéines propres aux procaryotes comme FtsZ, constituant principal du fuseau de division. C'est un phénomène fort complexe dans lequel interviennent de nombreuses enzymes et molécules, d'où la tendance de certains chercheurs à perturber les mécanismes généraux d'interactions entre protéines au lieu d'inhiber telle ou telle enzyme (Falconer et Brown, 2009).
- Au niveau de la synthèse protéique, il y a des différences entre les bactéries et les eucaryotes, comme l'allongement de la chaîne peptidique, qui est contrôlé par le

«facteur d'élongation» bactérien EF-Tu, ou la maturation post-traductionnelle qui comprend une étape d'hydrolyse de la formylméthionine N-terminale. Ces étapes typiquement bactériennes constituent des cibles potentielles pour un effet spécifique (Walsh, 2003).

- L'analyse du génome des bactéries représente une autre voie d'approche. A partir des gènes propres aux procaryotes, on peut espérer remonter vers des protéines cibles inconnues. La taille du génome bactérien et son organisation particulière (un seul chromosome, des gènes sans introns) permettent d'espérer des résultats à de brèves échéances (Walsh, 2003).

## **2. Recherche de composés non antibiotiques**

L'usage des antibiotiques exerce une pression sélective sur les bactéries en les obligeant à procéder à des modifications induisant une résistance. Une des stratégies efficaces de limiter l'apparition de la résistance serait d'utiliser des composés «attaquant» les bactéries différemment. C'est le cas par exemple des inhibiteurs du quorum sensing (QS). A la différence des antibiotiques, l'inhibition du QS n'a pas d'action directe sur la croissance bactérienne, mais sur la virulence (Ruimy et Andremont, 2004). Il est ensuite nécessaire que le système immunitaire du patient élimine les microorganismes rendus moins virulents (Geddes, 2005). Cette voie thérapeutique ne sera cependant efficace que si la souche responsable de l'infection exerce une virulence principalement contrôlée par le QS.

## **3. Place des plantes médicinales dans la lutte contre les résistances aux antibiotiques**

La résistance des microorganismes aux antibiotiques est devenue un sérieux problème de santé publique qui concerne presque tous les antibiotiques et qui se manifeste dans tous leurs champs d'application, d'où l'intérêt sans cesse croissant de chercher de nouveaux composés pouvant agir soit directement sur les microorganismes, soit indirectement en inhibant un ou plusieurs mécanismes de résistance. Cette recherche nécessite de disposer des méthodes d'évaluation des propriétés antimicrobiennes des extraits de plantes et des composés purs. Les méthodes les plus couramment utilisées sont la microdilution qui permet de déterminer la CMI et la diffusion sur agar permettant de mesurer le diamètre d'inhibition.

Si ces méthodes classiques permettent d'évaluer l'effet antimicrobien des composés testés, une fois l'activité établie, des méthodes plus élaborées sont requises pour élucider le mécanisme d'action de ces composés.

Les nouveaux composés actifs peuvent être recherchés dans les plantes médicinales, car celles-ci constituent une source potentielle de composés antimicrobiens et inhibiteurs des mécanismes de résistances aux antibiotiques. En effet, de nombreux composés d'origine végétale ont déjà démontré des propriétés antimicrobiennes. Ils agissent selon plusieurs mécanismes à savoir, la formation de complexes avec des macromolécules telles que les protéines et les polysaccharides inhibant ainsi leurs fonctions (polyphénols), la rupture de membranes microbiennes (flavonoïdes lipophiles, terpénoïdes, défensines) et l'inhibition de l'adhésion de protéines microbiennes aux récepteurs polysaccharidiques de l'hôte (polypeptides). Les plantes médicinales fournissent également des composés qui n'ont pas nécessairement un effet direct sur les microorganismes, mais qui augmentent ou restaurent l'activité des antibiotiques en inhibant les mécanismes de résistance. Ces composés appartiennent à diverses classes phytochimiques et agissent comme inhibiteurs des pompes à efflux (flavonoïdes, terpénoïdes, alcaloïdes), inhibiteurs des PBP 2a (quinones, terpénoïdes), provoquant la perméabilité des membranes bactériennes (terpénoïdes) et inhibiteurs des bêtalactamases (alkyls gallates).

En plus des mécanismes d'action et des classes phytochimiques auxquelles appartiennent les composés actifs présentés ci-dessus, il y a lieu d'ajouter quelques résultats importants publiés récemment comme :

- La formation de biofilms par les agents infectieux rend ces derniers inaccessibles aux antibiotiques, leur conférant ainsi une résistance. Inhiber la formation des biofilms constitue donc une stratégie permettant aux antimicrobiens d'atteindre les agents infectieux. Les métabolites secondaires de plantes médicinales peuvent jouer ce rôle. Ainsi, les huiles essentielles de *Cymbopogon citratus* et *Syzygium aromaticum* inhibent la formation des biofilms chez *Candida albicans* (Khan et Ahmad, 2012). L'extrait aqueux d'un mélange de cinq drogues, présente une double action, d'une part il inhibe la formation des biofilms chez *Pseudomonas aeruginosa* et d'autre part il tue les microorganismes se trouvant dans la matrice (Wang *et al.*, 2011).
- Une macrolactone contenant le D-xylose et le L-rhamnose, la pescapréine, a montré un effet inhibiteur sur les pompes à efflux des MRSA, augmentant ainsi l'action de la norfloxacine (Escobedo Martinez *et al.*, 2010).
- La liaison de deux triterpènes, l'acide oléanolique et l'acide ursolique, augmente l'activité de bêtalactames vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis* et *Listeria monocytogenes* (Kurek *et al.*, 2012).

# Chapitre V :

## Aperçu sur les plantes étudiées

### 1. La Bourrache: *Borago Officinalis* L.

#### 1.1. La famille des *Boraginaceae*

La famille des *Boraginaceae* comprend environ 100 genres pour 2000 espèces regroupant des arbustes, des arbres, des plantes herbacées et des lianes (Evans, 2009). Les feuilles sont souvent entières, simples, alternées, exstipulées, et possèdent des poils rigides. Les cellules des feuilles possèdent des cristaux d'oxalate de calcium. Les fleurs, qui sont le plus souvent hermaphrodites, ont un calice à lobes imbriqués et une corolle tubuleuse campanulée, divisée en 5 lobes relativement réduits et munis d'écailles ou de poils au centre (Bremer *et al.*, 2003). Les plantes de cette famille sont rencontrées dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées des cinq continents. Elles sont utilisées comme plantes ornementales (*Echium*, *Myosotis*), pour le bois (*Cordia*) ainsi que pour des propriétés médicinales: la Bourrache (*Borago officinalis*), la Grande consoude (*Symphytum officinale*), la Pulmonaire (*Pulmonaria officinalis*) et la Vipérine (*Echium vulgare*). Cette famille contient également des plantes tinctoriales (*Alkanna tinctoria*) (SNHF, 1999). Elle contient des naphtoquinones, l'allantoïne, des acides phénoliques et des tanins. La présence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques suscite des inquiétudes quant à l'usage médicinal des espèces de cette famille (Evans, 2009).

#### 1.2. Classification et appellations vulgaires

D'après Gareth *et al.*, (1996), la position systématique de la Bourrache est la suivante :

<b>Règne :</b>	<i>Plantae</i>
<b>Super division :</b>	<i>Spermatophyta</i>
<b>Division :</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Classe :</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Sous classe :</b>	<i>Asteridae</i>
<b>Ordre :</b>	Lamiales
<b>Famille :</b>	<i>Boraginaceae</i>
<b>Genre :</b>	<i>Borago</i> L.
<b>Espèce :</b>	<i>Borago officinalis</i> L.

L'espèce est communément appelée comme suit :

- **Nom français:** La Bourrache
- **Nom anglais:** Borage
- **Nom arabe:** El harcha, Chikh ibkoul
- **Nom Kabyle:** Echikh vou levkoul

### 1.3. Description botanique de *Borago officinalis* L.

La Bourrache est une plante herbacée, annuelle, vivace et hérissée de poils raides. Cette plante fleurit du mois de Mars au mois de Mai et donne des fleurs bleues violettes.

Elle contient un calice à 5 divisions profondes et égales. Les étamines sont à anthères conniventes en cône aigu. Cette espèce est caractérisée par des feuilles bleues ovales ou oblongues et pétiolées, sauf parfois les supérieures. Enfin, les Akènes sont carénés sur les 2 faces, striés et tuberculeux au sommet (Fig. 3).





**Figure 3:** Partie aérienne de la bourrache (AFIF CHAOUCHE T., 2014. Photo prise de Tadmait, Tizi Ouzou)

#### 1.4. Usages

Vu ses vertus thérapeutiques, cette espèce se trouve citée dans la pharmacopée européenne 2007 et la pharmacopée britannique 2007. Son usage n'est pas exclusivement médicinal, mais aussi culinaire. Cette plante contient des alcaloïdes, des mucilages, des huiles essentielles, des flavonoïdes et des acides organiques. En médecine populaire, elle est connue pour de nombreuses vertus thérapeutiques: expectorante, tonique, galactagogue, agissant aussi contre la toux, la fièvre et la dépression. De plus, la Bourrache a l'avantage d'être d'une grande innocuité à cause de sa faible teneur en alcaloïdes pyrrolizidiniques (Barnes *et al.*, 2007).

Par ailleurs, Gilani *et al.* (2007) ont révélé que cette plante médicinale possède un éventuel effet pharmacologique représenté par une activité spasmolytique importante, qui peut s'exercer au niveau des appareils cardiovasculaire, respiratoire et gastro-intestinale via un mécanisme antagoniste avec les ions de calcium.

De même, Jager *et al.* (2013) ont montré par leur étude que l'extrait éthanolique de la partie aérienne présente une grande affinité vis-à-vis du transporteur de la sérotonine, ce qui lui confère un effet antidépresseur. Enfin, Tan *et al.*, (2015) ont mis en évidence le potentiel de cette plante dans le traitement neurodégénératif, des troubles de mémoire et des troubles de comportement liés à la dégénérescence du système nerveux central.

Cette multitude d'effets s'explique essentiellement par la richesse de cette plante en divers composés, en particulier en acide gras (Gupta et Singh, 2010).

Cependant, comme toute plante, la Bourrache peut subir une forte influence du milieu extérieur modifiant ainsi sa composition chimique. En dehors des facteurs classiques comme l'humidité, la chaleur et l'altitude, un facteur particulier peut avoir une grande influence : c'est la salinité du milieu. Ainsi, l'augmentation de la salinité peut induire des changements morphologiques de composition notamment en acides gras insaturés. (Jaffel *et al.* 2011).

## **2. La Ronce: *Rubus fruticosus* L.**

### **2.1. Le genre *Rubus* L.**

Le genre *Rubus* peut se découper en trois sous-genres qui sont unanimement reconnus par l'ensemble des botanistes.

Il y a les framboises avec leurs fruits rouges, recouverts de nombreux poils courts, c'est le «sous-genre *idaeobatus*». Il y a un petit *Rubus* qui donne des fruits rouges vifs avec peu de drupéoles (petites boules qui forment le fruit) toutes glabres qui forme à lui seul le «sous-genre *Cylactis*», Et enfin et surtout, il y a le sous-genre des ronces qui donnent comme fruit ce que nous appelons les mûres et qui se nomme «sous-genre *Rubus*». L'intérêt botanique du genre se situe au niveau du sous-genre *Rubus*.

Pourquoi les ronces (sous-genre *Rubus*) sont elles si difficiles à identifier et donc à nommer et classer ?

Il y a à cela une raison aussi complexe que simple: le concept d'espèce !

Le concept d'espèce classique (celui de Linné) qui veut dire que les différentes espèces soient séparées par des barrières rendant leur croisement soit impossible, soit rare et dans ce cas là stérile, n'est guère transposable pour le sous-genre *Rubus*. En effet, peu de ronces se reproduisent exclusivement par voie sexuelle. C'est un peu là tout le problème qui fait débat entre les différents botanistes pour savoir s'il est utile et sérieux de nommer les diverses ronces ou si elles ne sont que des formes plus ou moins différentes d'une même espèce linnéenne qui depuis longtemps aurait pu se nommer: *Rubus fruticosus* L. (Belhacene, 2004).

## 2.2. Classification et appellations vulgaires

D'après Bock (2013), la position systématique de la Ronce est la suivante :

<b>Règne :</b>	<i>Plantae</i>
<b>Sous règne :</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>Super division :</b>	<i>Spermatophyta</i>
<b>Division :</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Classe :</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Sous classe :</b>	<i>Rosidae</i>
<b>Ordre :</b>	Rosales
<b>Famille :</b>	<i>Rosaceae</i>
<b>Genre :</b>	<i>Rubus</i>
<b>Espèce :</b>	<i>Rubus fruticosus</i> L.

D'après Lim (2012), plusieurs noms vernaculaires sont attribués à cette plante :

- **Nom français:** Ronce commune, Ronce des bois, Ronce des haies, Ronce européenne, Mures sauvages;
- **Nom Anglais:** Blackberry;
- **Nom Arabe:** Tût el Ullayq;
- **Nom Kabyle:** Thizwey

## 2.3. Description botanique et origine de *Rubus fruticosus* L.

La Ronce commune mesure en moyenne 4 m de hauteur. Il s'agit d'une plante vivace, semi-caduques et épineuse. Les feuilles sont vertes portant trois lobes, garnies de poils épars sur les deux faces. Elles comportent cinq folioles souvent plissées et finement dentées. La fleur se trouve construite selon le schéma propre à cette famille: Cinq pétales roses ou presque blanches, cinq sépales verts sur le dos, étalées et concaves et de nombreuses étamines plus courtes que les styles ou les égalant à peine. Les fruits sont des grappes de baies noires (Bruzzese *et al.*, 2000; Lim, 2012; Bock, 2013) (Fig. 4).



**a-** Fruits de la Ronce



**b-** Partie aérienne de la Ronce

**Figure 4:** Partie aérienne de la Ronce (AFIF CHAUCHE T., 2014. Photos prises de Tadmait, Tizi Ouzou)

Quand à sa répartition géographique, l'espèce est présente sur tout l'hémisphère nord, des régions froides aux régions tempérées, du bord de mer balayé par les embruns au bord des glaciers à 2300 mètres d'altitude. Le Mûrier sauvage s'est acclimaté en Amérique et en Australie. Il pousse surtout dans les haies et les forêts (Iserin, 2001).

## 2.4. Usages

La Ronce est connue pour ses propriétés astringentes, et donc souvent utilisée dans le traitement des inflammations de la gencive, des ulcères de la cavité buccale et de la toux. Elle est dotée aussi de propriétés anti diarrhéiques, diurétiques et anti hémorroïdaires (Zia-Ul-Haq *et al.*, 2014). D'après Riaz *et al.* (2011), l'espèce en question dispose également d'un pouvoir anxiolytique par depression du système nerveux central. Ce dernier est plus élevé dans les fruits et est minime dans les tiges. En plus de ces activités, l'étude menée par Gomar *et al.* (2014), met en évidence un effet protecteur des difficultés cognitives, conséquentes au diabète.

## 3. L'ortie: *Urtica dioïca* L.

### 3.1. La famille des Urticacées

La famille des Urticacées comprend une cinquantaine de genres et près de 700 espèces, réparties à travers le monde.

Les Urticacées sont des plantes herbacées, élancées, à feuilles stipulées et opposées par deux. Les fleurs mâles possèdent quatre sépales et quatre étamines. Les fleurs femelles sont formées de quatre sépales et d'un carpelle, et donnent naissance à un fruit sec appelé akène (Bertrand, 2002; Bezanger-Beauquesne *et al.*, 1975; Bezanger-Beauquesne *et al.*, 1980).

### 3.2. Classification et appellations vulgaires

D'après APGII (2003), la position systématique de l'Ortie est la suivante :

<b>Règne :</b>	<i>Plantae</i>
<b>Sous règne :</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>Super division :</b>	<i>Spermatophyta</i>
<b>Division :</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Classe :</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Sous classe :</b>	<i>Rosidaeae</i> dialycarpellées
<b>Ordre :</b>	Urticales
<b>Famille :</b>	<i>Urticaceae</i>
<b>Genre :</b>	<i>Urtica</i>
<b>Espèce :</b>	<i>Urtica dioïca</i> L.

D'après Bertrand (2002) et la présente étude, plusieurs noms vernaculaires sont attribués à cette plante:

- **Nom français :** Ortie piquante
- **Nom anglais :** Nettle
- **Nom arabe :** Harayig
- **Nom berbère :** Azegtouf

### 3.3. Description botanique et origine d'*Urtica dioïca* L.

Parmi les espèces du genre *Urtica*, *Urtica dioïca* L. est la plus grande et la plus répandue. D'un vert sombre, l'Ortie est une plante élancée, mesurant de 60 à 90 cm de haut et pouvant dépasser 1 m 50. Elle se caractérise par ses feuilles opposées et ses petites fleurs en grappes ou en boulettes de couleur verdâtre (Bezanger-Beauquesne, 1980) (Fig. 5).



**Figure 5:** Partie aérienne de l'ortie (AFIF CHAOUICHE T., 2014. Photo prise de Tadmait, Tizi Ouzou)

L'espèce est présente dans presque toutes les régions du monde: l'Europe, l'Afrique du Nord, l'Asie ainsi qu'en Amérique du Nord et du Sud et aussi en Afrique (Bertrand, 2002).

Présente jusqu'à 2400 mètres d'altitude, l'Ortie est une plante inféodée au voisinage des habitations, les décombres et lieux incultes. Elle pousse sur les terres humifères et légères. On la rencontre dans les haies, au bord des chemins, dans les champs et les jardins.

### **3.4. Usages**

L'ortie est inscrite sur la liste des plantes médicinales retenues comme telles par la Pharmacopée Française (1993) et par la pharmacopée européenne (2005). Les drogues utilisées sont les parties aériennes et les racines (Draghi, 2005).

Cette espèce est traditionnellement utilisée pour ses propriétés antihémorragique, contre les éruptions cutanées et l'eczéma. Par ailleurs, certaines de ses activités ont été approuvées: activité anti inflammatoire pour le système urinaire et effet bénéfique sur le rhumatisme (Barnes, 2007).

D'autres effets pharmacologiques ont été signalés. Il s'agit du pouvoir de compensation de potassium chez les malades souffrant de déplétion potassique, consécutive à la prise de certains médicaments antihypertenseurs (Palmer, 2004), de la capacité de son extrait éthanolique d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du colon (Aydos *et al.*, 2011).

Aujourd'hui les propriétés médicinales de l'Ortie sont reconnues de tous. La plupart des pratiques populaires ancestrales ont été confirmées par l'analyse et l'expérimentation. L'espèce rentre dans la composition d'une multitude de médicaments allopathiques ou homéopathiques, et les recherches se poursuivent et viennent confirmer certaines utilisations empiriques (Bertrand, 2002).

## Chapitre VI : Les molécules bioactives

---

### 1. Les flavonoïdes

Le nom flavonoïde est dérivé du mot «Flavus» en latin, qui signifie jaune. L'intérêt nutritionnel pour les flavonoïdes date de la découverte de la vitamine C (Bruneton, 1993).

Ce sont des pigments quasi universels des végétaux presque toujours hydrosolubles. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles assurant ainsi la protection des tissus contre les ultraviolets (Bruneton, 1993; Rajnera yanama *et al.*, 2001).

Cette famille de composés a divers rôles dans la nature, et paraît bénéfique pour la santé vu leurs nombreux effets. Deux rôles sont assurés principalement par les flavonoïdes; la protection des plantes des rayons solaires UV et la coloration (Jager et Sabi 2011).

Ces composés sont présents chez les plantes supérieures et chez les plantes inférieures y compris les algues. D'un point de vue chimique, les flavonoïdes sont des dérivés du 1-3 diphénylpropane.

D'un point de vue quantitatif, la famille des flavonoïdes constitue la famille la plus large des polyphénols. Une grande partie est sous forme de glycosides et d'autres composés sont rencontrés à l'état libre (Evan et Tree, 2002).

D'un point de vue structural, la structure de base des flavonoïdes est constituée de deux noyaux benzéniques, le premier appelé noyau A qui provient de la voie d'acétate tandis que le deuxième appelé noyau B qui provient de la voie de l'acide shikimique (Sarker et Nahar 2007).

Les flavonoïdes sont des composés solubles dans l'eau et dans le méthanol mais insolubles dans les solvants organiques. Ils ont une très haute solubilité en milieu alcalin donnant généralement une coloration jaune qui disparaît par l'addition d'acides (Evans et Tree 2002).

La bibliographie des recherches portant sur cette classe de molécules est très riche, divers effets sont attribués à ces composés, par exemple :

- La consommation de quantités suffisantes de flavonoïdes semble avoir un effet positif sur les fonctions cognitives, en plus, un effet retardateur des pathologies neurodégénératives. Ceci est attribué probablement à un mécanisme permettant le maintien du nombre et de la qualité des connexions synaptiques dans des zones clés du cerveau (Williams et Spencer, 2012).

- Des études sur des modèles animaux ont montré un haut potentiel des flavonoïdes dans la correction des troubles métaboliques incluant l'insulinorésistance, l'obésité, l'hypercholestérolémie, l'hypertriglycidémie et le retardement de la progression des lésions de l'artériosclérose (Burke *et al.*, 2014).

Des études épidémiologiques ont montré que la consommation de quantités élevées de flavonoïdes peut avoir un effet protecteur contre la maladie de Parkinson, cet effet semblerait être plus perceptible chez les hommes (Gao *et al.*, 2012).

Sur le plan activité pharmacologique, il semblerait que les effets biologiques des flavonoïdes sont dus à l'action de leurs métabolites. Il ne faut pas omettre de rappeler que les flavonoïdes sont caractérisés par un métabolisme rapide (Zhang *et al.*, 2012). En fait, l'absorption des flavonoïdes se fait essentiellement au niveau du colon, cette étape est précédée par la libération et l'absorption de la partie osidique au niveau de l'intestin grêle. Au niveau du colon, il y a un clivage de l'aglycone en acides phénoliques mais aussi d'autres produits résultant de la fission des cycles aromatiques. Ces produits se trouvent après dans la circulation systémique soit sous forme libre ou conjugués (Spencer et Crozier, 2012).

Les flavonoïdes constituent un sujet de grande importance, jusqu'à 2012, plus de 35000 articles portaient sur les flavonoïdes dont plus de 10000 sur un seul à savoir la quercétine (Perez-Vizcaino *et al.*, 2012).

## 2. Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont synthétisés au niveau du chloroplaste et participent à la phase lumineuse de la photosynthèse comme transporteurs d'électrons. Certains quittent le chloroplaste et s'accumulent dans les vacuoles (Elicoh-Middleton, 2000).

Les composés de départ de la biosynthèse des flavonoïdes sont le malonyl CoA et les dérivés CoA de l'acide cinnamique, le cinnamoyl CoA (Gerhard, 1993). Ces composés sont formés suite à deux voies complémentaires, voie acétate malonate et voie shikimate (Hollman *et al.*, 1999; Elicoh-Middleton, 2000). La voie shikimate conduit à la synthèse de l'acide cinnamique et donc au cycle B et à la chaîne en C3 qui formera le cycle oxygéné C de la structure de base des flavonoïdes. Les précurseurs de cette voie sont l'érythrose 4-phosphate de la voie des pentoses et le PEP résultant de la glycolyse (Marfak, 2003). La voie acétate malonate constitue la voie de synthèse du noyau A. Ce système aromatique est formé par condensation répétée d'unités d'acétate (Gerhard, 1993). Ces deux voies sont alors condensées pour engendrer un précurseur commun la 4, 2', 4', 6' tétrahydroxychalcone avec la

catalyse de la chalcone synthase (Elicoh-Middleton, 2000). Ce pigment jaune est métabolisé en différentes classes des flavonoïdes sous l'action d'enzymes spécifiques (Fig. 6).

Des réactions post-biosynthétiques sont enfin effectuées pour donner la structure finale aux flavonoïdes telles que la glycosylation et l'acylation, formes natives sur lesquelles se trouvent in vivo (Marfak, 2003). Il existe cependant des flavonoïdes non glycosylés comme la quercétine (Bruneton, 1993 ; Remesy *et al.*, 1996 ; Elicoh-Middleton, 2000).

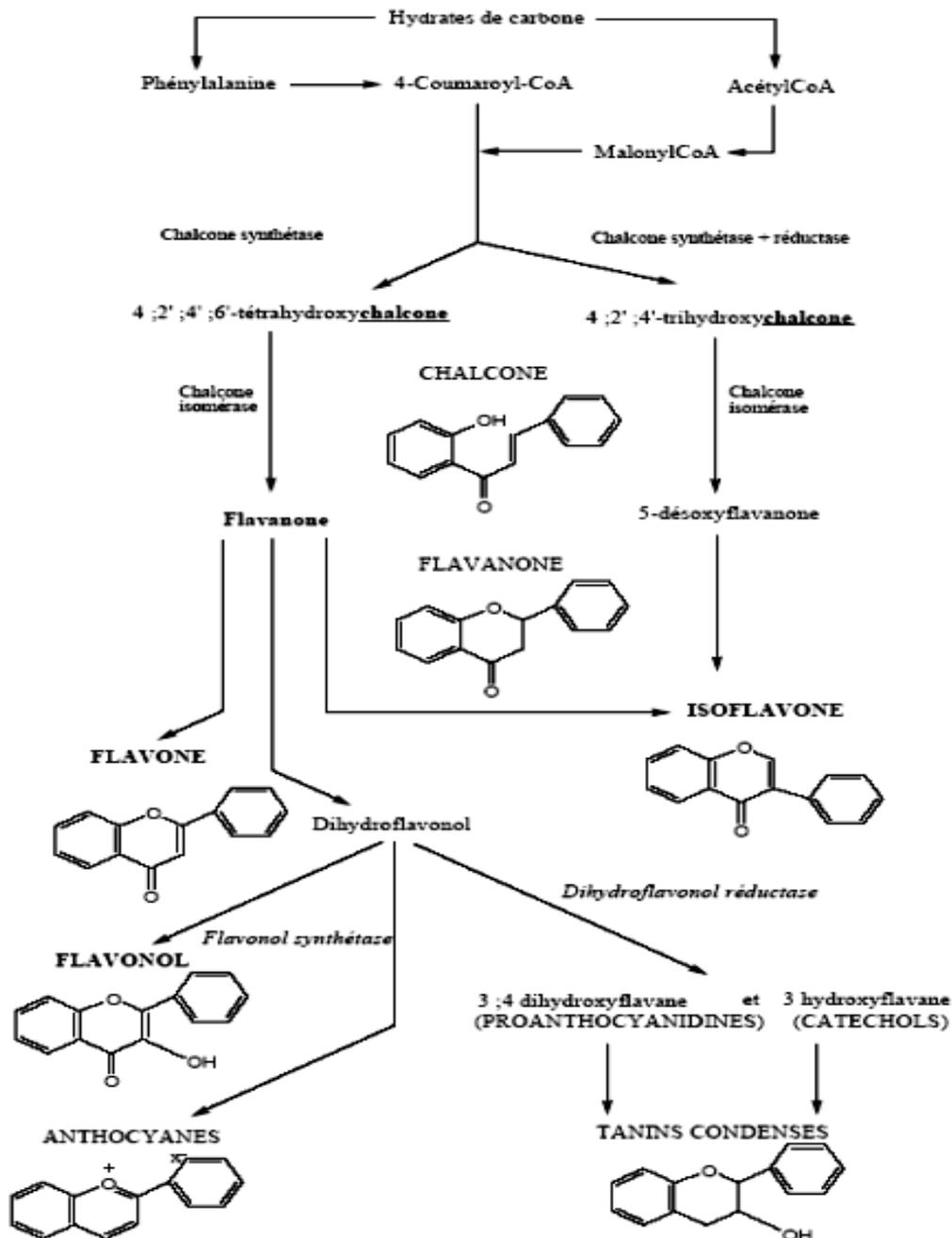


Figure 6: Voie de biosynthèse des flavonoïdes (Gerhard, 1993).

### 3. Structure et classification

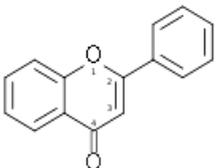
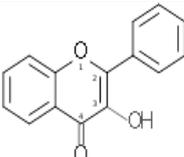
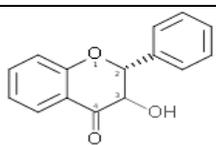
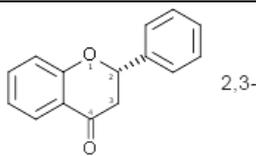
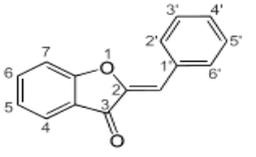
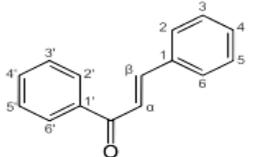
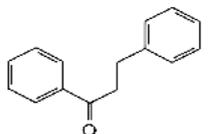
Les flavonoïdes se répartissent en quinze familles de composés, dont les plus importantes sont les suivantes: flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, isoflavones, isoflavanones, chalcones, aurones et anthocyanes (Harborne et William, 2000 ; Kuresh *et al.*, 2002).

Les composés de chaque sous classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle intermédiaire (Julies et Christin, 2002).

Les flavonoïdes se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme d'hétérosides, résultant d'une combinaison du groupe réducteur d'un ose avec une substance non glucidique: l'aglycone ou la génine avec élimination d'eau. La partie osidique peut être mono-, di- ou tri-saccharidique. La deuxième partie est formée soit d'hexoses (D-glucose, D-galactose, Dallose...), de pentoses (D-apiose, L-arabinose, L-ramnose...) ou d'acides (D-glucuronique, D-galacturonique...). Elle peut être linéaire ou ramifiée (Gerhard, 1993).

La liaison génine-OSE existe entre un hydroxyle phénolique ou un hydroxyle de l'hétérocycle oxygéné et un -OH ou un -CH de la fonction hémiacétalique ou des ose(s). On obtient alors des O-Heterosides ou des C-Heterosides (Tableau 5) (Milane, 2004).

**Tableau 5:** Classes des flavonoïdes (Brunetton, 2009)

Flavonoïdes				
Classe	Squelette	Aglycone	Hétérosides	Dérivés méthoxylés
Flavone	 <p>2-phénylchromen-4-one</p>	Luteolol Apigenol	Apiine	Tangéritine Nobilétine
Flavonol	 <p>3-hydroxy-2-phénylchromen-4-one</p>	Quercetol Kaempferol Myricetol Fisetol	Rutine	Pachipodol Rhamnazine
Flavanonol	 <p>3-hydroxy-2,3-dihydro-2-phénylchromen-4-one</p>	Dihydrokaempferol Dihydroquercetol	Hespéridine Naringine	
Flavanone	 <p>2,3-dihydro-2-phénylchromen-4-one</p>	Naringetol, eriodictyol, butine		Hesperétine Homoeriodictyol
Aurone		Hispidol, aureusidine, sulfurétine, maritimétine		
Chalcone		Isoliquiritigénine, butéine		Xanthohumol
Dihydrochalcone		Phlorétine	Aspalatine	

## 4. Propriétés pharmacologique des flavonoïdes

### 4.1. Propriétés anti-inflammatoires et immunologiques

De nombreux travaux montrent que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Da Silva *et al.*, 1994; Galati *et al.*, 1994; Middleton, 1996). La quercétine a un effet anti-inflammatoire en inhibant les enzymes de synthèse: la cyclooxygénase pour les prostaglandines et la li-oxygénase pour les leucotriènes, principaux médiateurs de l'inflammation (Middleton et Drzewiecki, 1984).

Les flavonoïdes sont également de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (Mookerjee *et al.*, 1986; Namgoong *et al.*, 1994). Leur effet sur les lymphocytes B ou T peut être variable. En effet, les flavones (apigénine, lutéoline et 7,3',4' hydroxyflavone) et les flavonols (kaempférol, quercétine et myricétine) inhibent la prolifération des lymphocytes T, alors que la myricétine est active sur les lymphocytes B (Mookerjee *et al.*, 1986). L'effet antiprolifératif des flavonoïdes pourrait s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine Kinase C ou protéine tyrosine kinase) (Mookerjee *et al.*, 1986; Namgoong *et al.*, 1994). Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes (Middleton and Drzewiecki, 1984).

### 4.2. Propriétés antivirales et antibiotiques

Les flavonoïdes sont capables d'agir au niveau de la synthèse des protéines virales. Vrijssen *et al.* (1987) ont noté une bonne protection des souris vis-à-vis d'une infection virale à la suite d'une administration journalière de 3-O-méthylquercétine à raison de 20 mg/kg pendant 9 jours. Muecsi et Pragai (1985) ont également montré une corrélation entre l'effet inhibiteur de certains flavonoïdes sur divers virus de l'herpès, et leur capacité à augmenter les taux intracellulaires en AMPc dans des cellules infectées. Spedding *et al.*, 1989 ont mis en évidence un impact des flavonoïdes sur le rétrovirus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Ils ont démontré que les flavonoïdes sont de bons inhibiteurs de la reverse transcriptase.

Cependant, leur impact semble plus fort sur l'ADN et l'ARN polymérase de la cellule hôte que sur la reverse transcriptase virale (Ono *et al.*, 1990). Les travaux de Mahmood *et al.*, (1993) ont montré que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV (la gp120) et en empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte. Ces métabolites seraient susceptibles d'inhiber l'intégrase

rétrovirale du virus HIV-1 qui assure l'intégration du génome viral à celui de la cellule hôte (Mahmood *et al.*, 1993; Fesen *et al.*, 1994).

D'autre part, l'évidence de l'effet bactéricide de différentes flavanones sur l'ADN gyrase d'une bactérie, en particulier *Staphylococcus aureus*, a été décrite par les études de (Ohemeng *et al.*, 1993; Sato *et al.*, 1995). Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, il faut citer: l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes; la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne, la chélation de métaux tels que le fer et l'inhibition du métabolisme microbien (Mila et Scalbert, 1994).

#### **4.3. Propriétés antinéoplasiques**

Des études réalisées chez la souris ont révélé les effets protecteurs des flavonoïdes vis-à-vis des promoteurs de tumeurs (Kato *et al.*, 1983). La quercétine, par exemple, est l'un des composés phénoliques capables de diminuer, chez le rat, l'incidence des tumeurs mammaires induites par le DMBA (7,12 diméthylbenz (a) anthracène) ou la NMU (Nnitrosométhylurée) (Verma *et al.*, 1988).

#### **4.4. Propriétés antioxydantes**

Les polyphénols et surtout les flavonoïdes sont des antioxydants puissants, susceptibles d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules (Van Acker *et al.*, 1995). En effet, les flavonoïdes sont des piègeurs efficaces des radicaux libres les plus prooxydants, particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique. Ils formeraient des espèces radicalaires intermédiaires peu réactives (Laughton *et al.*, 1989; Puppo, 1992). De plus, ils ont une activité chélatrice des métaux tels que le cuivre et le fer qui, à l'état libre, peuvent être à l'origine de la production de radicaux libres (Puppo, 1992; Van Acker *et al.*, 1995).

#### **4.5. Autres**

Les flavonoïdes empêchent également l'agrégation des plaquettes dans les artères (artérioscléroses); cette influence serait indirecte, en effet, ils agiraient sur les enzymes responsables et les récepteurs (Van De Wiel, 2001).

## 5. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances volatiles qui diffèrent par leurs propriétés physicochimiques des huiles fixes. Ces substances se trouvent généralement liées à d'autres composés comme les gommes et les résines et ont d'ailleurs même la tendance de se transformer en résine quand elles sont exposées à l'air libre (Evan et Tree, 2002).

La définition de la norme française (AFNOR, 1980) met l'accent beaucoup plus sur l'aspect procédé. Ainsi, selon cette norme, l'huile essentielle est «un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques, soit par distillation sèche».

## 6. Structure et composition

Les composants des huiles essentielles sont génériquement dits «aromatiques» en raison de leur caractère odoriférant et non pour indiquer leur structure chimique, ce qui peut prêter à confusion. Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable. La plupart sont poly moléculaires, c'est à dire composées d'une grande diversité de composés (jusqu'à 500 molécules différentes dans l'huile essentielle de Rose). A côté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), on retrouve des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces. Il existe quelques huiles dites mono-moléculaires, telle le Bois de Rose (*Aniba rosaeodora*), la Menthe Pouliot (*Mentha pulegium*) ou la Gaulthérie couchée (*Gaultheria procubens*) qui sont constituées presque exclusivement d'une molécule majoritaire. La Sauge sclérée (*Salvia sclarea*), le Citron (*Citrus reticulata*) et le Clou de Girofle (*Eugenia Caryophyllus*) sont bi- et tri-moléculaires. Les huiles essentielles sont aussi homogènes ou hétérogènes dans leur composition au regard de la structure chimique des composés. Extrêmement nombreux, près de 10000 sont chimiquement définis, on peut les grouper dans les différentes familles de composés chimiques. Les composés des huiles essentielles ont une masse moléculaire relativement faible, ce qui leur confère un caractère volatil.

La structure des composés des huiles essentielles est constituée d'un squelette hydrocarboné, constituant une chaîne plus ou moins longue. Sur ce squelette de base est souvent présent un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents. La majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés avec un ou plusieurs atomes d'oxygène (O), pour quelques groupes fonctionnels azotés -N ou soufrés -S.

Cette structure varie selon (Franchomme *et al.*, 1990; Mailhebiau, 1994) en fonction de plusieurs caractères à savoir:

- Le nombre d'atomes de carbone qui la constitue. En effet, on parle de monoterpènes lorsque ce nombre est inférieur à 10, de sesquiterpènes quand il est compris entre 10 et 15, et rarement de diterpènes lorsque le nombre est supérieur à 20 ;
- Le caractère saturé ou insaturé des liaisons ;
- La conformation linéaire ou cyclique ;
- La configuration spatiale (forme de chaise, de bateau, de trièdre...) ;
- La nature des groupes fonctionnels.

## 7. Activités biologiques des huiles essentielles

### 7.1. Activités antimicrobienne, antifongique et insecticide

L'effet le plus étudié pour les huiles essentielles est leur pouvoir antibactérien. Certaines huiles essentielles comme le géranium ou certains composés comme le géranol montrent une bonne activité antimicrobienne contre des germes résistants (Solorzano Novalles, 2011).

Il a été même suggéré d'utiliser l'effet antimicrobien des huiles essentielles dans l'industrie agroalimentaire et principalement dans la conservation des aliments et leur protection des phénomènes de dégradation liés à la présence des germes, et même en solution pour le lavage des fruits et légumes (Burt, 2004).

L'effet antifongique est aussi caractéristique des huiles essentielles, à titre d'exemple, l'huile essentielle de la coriandre a montré une bonne activité contre les souches de *Candida albicans*, la même huile avait un effet synergique avec l'amphotéricine B ce qui pourrait conduire à une éventuelle réduction de la dose médicamenteuse à prendre lors de ces infections (Silva *et al.*, 2011).

Un effet insecticide a été montré pour certaines huiles essentielles de l'Algérie, ce qui suggère une éventuelle utilisation pour le remplacement des pesticides utilisés actuellement dont le problème majeur demeure l'effet polluant prononcé de ces produits (Zoubiri et Baali, 2011).

### 7.2. Activité anti-inflammatoire

Certains composés des huiles essentielles ont montré une activité anti-inflammatoire et antalgique sur des modèles animaux. Ainsi, la cineole a montré un effet anti-inflammatoire perceptible chez la souris et un effet antalgique dont le mécanisme semblerait être non-opioïde ce qui ouvre une porte de recherche de nouveaux antalgiques qui épargnent l'effet

dépresseur du système nerveux central induit lors de l'utilisation des opioïdes (Santos et Rao, 2000).

### 7.3. Activité antioxydante

L'activité antioxydante est aussi présente dans les huiles essentielles, cette activité, mesurée par le biais de plusieurs méthodes dont le DPPH, est nettement élevée chez certaines espèces à l'image du *Thymus vulgaris* et *Eucalyptus globulus* (Aaza *et al.*, 2011).

### 7.4. Activités anticancéreuse et cytotoxique

Le potentiel thérapeutique très varié des huiles essentielles a attiré, ces dernières années, l'attention des chercheurs quant à leur possible activité contre le cancer. De ce fait, les huiles essentielles et leurs constituants volatils font dorénavant l'objet d'études dans la recherche de nouveaux produits naturels anticancéreux (Edris, 2007). Les huiles essentielles agissent au niveau de la prévention du cancer ainsi qu'au niveau de sa suppression. Il est bien connu que certains aliments, comme l'ail ou le curcuma, sont de bonnes sources d'agents anticancéreux utiles pour prévenir l'apparition de cancer (Béliveau *et al.*, 2006).

Certains de ces aliments contiennent des composés volatils dont l'activité chimiopreventive a été mise en évidence. L'huile essentielle d'ail par exemple, est une bonne source de composés sulfurés (Pyun *et al.*, 2006) reconnus pour leur effet préventif contre le cancer (Milner, 2001; Milner, 2006). Le diallyl sulfide, diallyl disulfide et le diallyl trisulfide en sont des exemples. Ces composés activent, chez le rat, les enzymes intervenant dans le processus de detoxification hépatique de phase I (désagrégation des liaisons chimiques qui relient les toxines carcinogènes les unes aux autres) et de phase II (liaisons des toxines libérées à des enzymes détoxifiantes telle la glutathione S-transférase) (Wu *et al.*, 2002). Un autre exemple est la myristicine, un allylbenzène présent dans certaines huiles essentielles, spécialement celle de noix de muscade (*Myristica fragrans*). Cette molécule est connue pour activer la glutathione S-transférase chez la souris (Ahmad *et al.*, 1997) et inhiber la carcinogénèse induite par le benzo(a) pyrène au niveau des poumons de la souris (Zheng *et al.*, 1992). Récemment, il a été découvert que la myristicine induit l'apoptose des neuroblastomes (SK-N-SH) chez l'humain (Lee *et al.*, 2005).

Pour terminer, certaines études ont mis en évidence l'activité cytotoxique des huiles essentielles dans leur ensemble. En voici quelques exemples: l'huile essentielle de *Myrica gale*, *Croton flavens* (Sylvestre *et al.*, 2005) et *Artemisia annua* (Li *et al.*, 2004).

Les bienfaits des huiles essentielles ne doivent pas amener à négliger les effets indésirables voir parfois dangereux associés à leur utilisation, certains de ces effets ne sont pas dus aux huiles elles même mais à leur environnement: ainsi, il a été démontré que les pesticides utilisés à large échelle peuvent se retrouver dans les huiles après le procédé de la distillation, les solvants utilisés peuvent avoir aussi des effets dangereux, ainsi, le benzène longuement utilisé est substitué par le cyclohexane dont le caractère cancérigène reste toujours mal évalué (Tisserand et Young, 2014).

D'autres effets sont liés à la nature même des huiles essentielles, ces effets sont multiples allant des manifestations dermatologiques (Photosensibilité, dermatite de contact) aux lésions au niveau de la cavité buccale lorsque l'huile est administrée oralement, des brûlures gastriques ont aussi été reportées (Tisserand et Young, 2014).

En Algérie, la culture des espèces à huiles essentielles a connu un recul ces dernières années, le marché des huiles essentielles semble attractif et nécessitant une attention particulière pour faire de lui un moyen de conservation de l'héritage ethno botanique, une source de matières premières à grande capacité pour l'industrie pharmaceutique et cosmétique ainsi qu'un moyen de développement durable (Boukhatem *et al.*, 2011).

# Matériel et méthodes

## I. Matériel

### 1. Souches microbiennes

Dans le présent travail nous avons utilisé des souches de référence conservées au laboratoire VALCOR et au laboratoire Aquitaine Microbiologie de Bordeaux (Tableau 6). Aussi, des souches cliniques étaient isolées des malades atteints d'infections respiratoires nosocomiales au niveau des services d'infectiologie et de réanimation médicale à l'hôpital de Tizi Ouzou.

**Tableau 6:** Origine des souches de référence testées

Souche	Référence	Origine
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11229	VALCOR
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	Aquitaine microbiologie
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	VALCOR
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 10211	Aquitaine microbiologie
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 10015	Aquitaine microbiologie
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	VALCOR
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	VALCOR
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	VALCOR

### 2. Milieux de culture

- Milieu Sabouraud ;
- Gélose nutritive ;
- Milieu Mueller Hinton ;
- Milieu Hecktoen ;
- Milieu Viande-Foi ;
- Gélose Chapman ;
- Gélose au sang du mouton à 5% ;
- Mac Conkey ;
- Milieux de conservation.

### **3. Matériel d'identification biochimique**

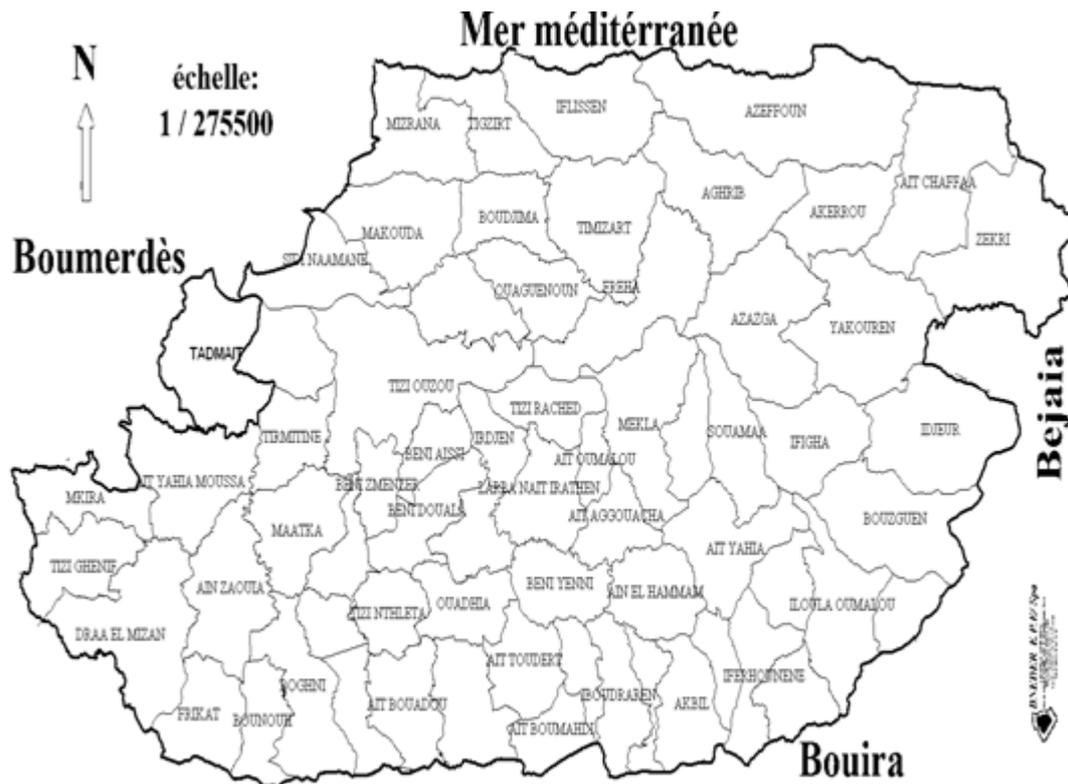
Pour l'identification biochimique, nous avons utilisé des galeries Api 20 E, Api 20 NE, ainsi que certains réactifs.

### **4. Antibiotiques**

Les antibiotiques utilisés sont: Gentamycine, Ciproflaxine, Ticarcilline, Acide Clavulanique, poperacilline, Cefotaxime, Imipenème, Oflaxacine, Ciproflaxine, Tobramycine, Netilmicine, Colistine, Amoxiciline, Piperaciline, Cefazoline, Cefoxitine, Colistine, Ciproflaxacine, Oflaxacine, Tobramycine, Amikacine, Erythromycine, Clindamycine, Levoflaxacine, Vancomycine, Chloramphenicol, Cotrimoxazole, Tetracycline, cephalotine, Cefepime (Sigma-aldrich).

### **5. Matériel végétal**

La récolte des plantes et l'étude ethnopharmacologique ont été faites dans la zone de Tizi Ouzou, située au nord-est de l'Algérie, à 80 Km environ de la capitale Alger. Tizi Ouzou s'étend sur une superficie de 2958 Km<sup>2</sup> (Agence nationale d'intermédiation et de régulation foncière, 2013). Tizi Ouzou est limitée au sud par la wilaya de Bouira, à l'est par la wilaya de Bejaia, à l'ouest par la wilaya de Boumerdes et est ouverte au nord sur la mer méditerranée (Fig.7).



**Figure 7 :** Communes de la Wilaya de Tizi Ouzou (BNEDER, 2009).

Les plantes médicinales utilisées dans ce travail ont toutes été récoltées de la région de Tizi Ouzou, précisément de la région de Tadmaït. Il s'agit de la Bourrache (*Borago officinalis*), la Ronce (*Rubus fruticosus*) et l'Ortie (*Urtica dioïca*). La récolte des plantes a été faite au stade de pleine floraison.

L'identification des plantes a été faite par un botaniste du département de Biologie de l'Université de Boumerdes. Des spécimens des plantes retenues sont déposés dans l'herbier du laboratoire VALCOR de l'université de Boumerdes.

## 6. Solvants organiques

Les solvants organiques utilisés pour l'obtention des extraits sont l'Ether di éthylique, le Méthanol, l'Ether de pétrole, l'Acétate d'éthyle et le Butanol (Sigma-Aldrich).

## 7. Autre matériel

- DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (Sigma-Aldrich);
- Eau distillée;

- Plaque Elisa (Aquitaine Microbiologie);
- Densitomètre (DEN-1);
- Machine à Steers (Aquitaine Microbiologie);
- Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionisation- Time- Of- Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) (Microflex LT MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics)).

## **II. Méthodes**

### **1. Isolement des souches microbiennes**

Les prélèvements ont été obtenus des patients souffrant d'infections respiratoires hautes ou basses, hospitalisés au service de réanimation médicale ou au service infectieux du centre hospitalo-universitaire de Tizi Ouzou, par aspiration bronchique, écouvillonnage ou bien à partir des crachats. Un total de 250 prélèvements a été collecté durant la période allant de Janvier 2012 à Juin 2013. Pour l'isolement des souches microbiennes, les prélèvements obtenus ont été mis dans un volume d'eau physiologique (1ml), mélangés au vortex, puis ensemencés en stries sur différents milieux de culture: Milieu Sabouraud, Gélose nutritive, Milieu Hektoen, Milieu Viande-Foi, Gélose Chapman et Mac Conkey. L'incubation a été faite à 37°C pendant 24H pour les bactéries et à 28°C pendant 48H pour les champignons (NCCLS, 2006).

### **2. Identification des souches isolées**

L'identification des souches a été faite en trois étapes :

- Analyse des caractères macroscopiques (forme, relief, odeur, contour, taille et couleur) ;
- Analyse des caractères microscopiques (coloration de Gram, forme des germes) ;
- Analyse des caractères biochimiques (API 20E, API 20 NE, réactif approprié (Biomérieux®, France) ;
- Confirmation de certaines souches par la spectrométrie de masse de type Maldi-Tof-MS.

## **2.1. Diagnostic direct**

Selon Ramdani et Rahal (2005), le principe repose sur une coloration au bleu de méthylène à l'état frais. Ce test est utilisé pour rechercher des cellules épithéliales et des polynucléaires neutrophiles, afin de détecter une éventuelle infection.

### **2.1.1. Mode opératoire**

- Réaliser un frottis à partir d'une parcelle de crachat et du liquide bronchique.
- Mettre le frottis sur lame et le colorer avec du bleu de méthylène sur toute sa surface.
- Attendre 20 minutes pour apprécier la réaction leucocytaire et la présence des germes.
- Rincer la lame sous un filet d'eau.
- Passer à l'observation sous microscope optique à grossissement G x 100.

## **2.2. Identification morphologique**

### **2.2.1. Aspect macroscopique**

Les caractères recherchés après incubation sont : l'aspect des colonies (grandes, petites, plates, concaves, muqueuses...), l'hémolyse sur la gélose et l'acidification des sucres pour les entérobactéries.

### **2.2.2. Aspect microscopique**

L'aspect microscopique des bactéries a été révélé par le biais de la coloration de Gram. Cette dernière permet de différencier la paroi bactérienne et de scinder les bactéries en Gram+ et Gram -.

## **2.3. Identification biochimique**

### **2.3.1. Recherche de l'oxydase**

- Sur une boîte de Pétri, on dépose un carré de papier filtre imbibé avec quelques gouttes de la solution N-diméthyl paraphénylène diamine.
- On prélève à l'aide d'une pipette Pasteur une colonie du germe à étudier, qu'on dépose sur ce papier.

Après 30 secondes, l'apparition d'une couleur bleu violacée indique la présence de l'oxydase.

### 2.3.2. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme qui décompose l'eau oxygénée en eau et en oxygène.

- Sur une lame propre et sèche, déposer une goutte d'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- A l'aide d'une pipette Pasteur, prélever une colonie du germe à étudier et la plonger dans la goutte d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puis observer.

L'apparition de bulles affirme la présence de l'enzyme catalase.

### 2.4. Les galeries biochimiques

Les galeries utilisées sont: l'Api 20 E pour l'identification des entérobactéries et l'Api 20 NE pour l'identification des non entérobactéries.

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 h, on prépare une suspension bactérienne ayant une concentration de 0,5 Mc Farland.
- On dépose soigneusement quelques gouttes de la suspension dans chaque cupule à l'aide d'une seringue stérile.
- On ajoute de l'huile de vaseline dans les cupules là où les noms des tests sont soulignés, et on remplit jusqu'au bout celles dont les noms sont encadrés avec la suspension bactérienne.
- On incube les galeries pendant 24 heures à 30°C pour les non-entérobactéries et à 37 °C pour les entérobactéries.

Les réactions se traduisent par le changement de couleur spontané ou par l'addition des réactifs spécifiques.

Les résultats obtenus ont été marqués sur la fiche de lecture puis insérés dans un logiciel informatique « Api Web ».

### 2.5. Tests spécifiques

#### 2.5.1. Test d'agglutination pour l'identification de *Staphylococcus aureus*

Le réactif de Pastorex Staph contient des particules de latex qui permettent la recherche des *Staphylococcus*.

#### Mode opératoire :

- Mettre une goutte du réactif Staphorex sur une plaque d'agglutination.

- Prélever une à deux colonies de la culture bactérienne.
- Emulsionner les colonies pendant 10 secondes.

La présence du *Staphylococcus aureus* se manifeste par une réaction d'agglutination.

### **2.5.2. Camp-test pour l'identification d'*Haemophilus influenzae***

Ce test consiste à fournir des facteurs de croissance à l'*Haemophilus influenzae*. Il s'agit des facteurs X et V. Le facteur X peut être apporté par un milieu enrichi au sang. Le facteur V peut être apporté par l'ajout des colonies de *Staphylococcus aureus*.

- Ensemencer sur milieu GSF la souche présumée *Haemophilus influenzae*.
- Faire une strie de *Staphylococcus aureus* sur la boîte ensemencée.
- Incuber pendant 24 heures à 37°C sous CO<sub>2</sub>.

### **2.5.3. Test de sensibilité à l'optochine à *Streptococcus pneumoniae***

Le principe de ce test repose sur la sensibilité de *Streptococcus pneumoniae* à l'optochine. Ce dernier est un éthyhydrocupréine, dérivé proche de la quinine.

- Ensemencer sur milieu GSF la suspension bactérienne présumée *Streptococcus pneumoniae*.
- A l'aide d'une pince flambée et refroidie, déposer un disque imprégné d'optochine dans la partie la plus dense de l'isolement, à 1,5 cm du bord de la boîte de Pétri.
- Incuber pendant 24 heures à 37 °C sous 5% de CO<sub>2</sub>.

La sensibilité à l'optochine se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition supérieure à 12 mm.

### **2.5.4. Test de Blastèse**

Prendre 1 colonie dans 0,5 mL de milieu de blastèse, incuber 3 h à 37 °C.

Réalisation d'un état frais et recherche de tubes germinatifs spécifiques de *Candida albicans*.

## **3. Identification par MALDI- TOF-SM**

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une nouvelle technologie apparue ces dernières années en microbiologie. Elle permet d'identifier les microorganismes en analysant directement leurs protéines.

### 3.1. Principe

Le spectromètre de masse MALDI-TOF est un spectromètre utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI = Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (TOF = Time-Of-Flight). La méthode MALDI-TOF s'applique aux biomolécules plus fragiles comme les peptides, les protéines, les glycoprotéines et les oligonucléotides.

### 3.2. Caractérisation de l'appareillage

- Microflex LT MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics)
- Ionisation: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)
- Mass Analyser: linear Time Of Flight (TOF)
- Mass Range: 0-150 000 Da
- Applications: Biotyping, Protein Profiling, Total Protein Average Mass
- Software: FlexControl, MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics)

### 3.3. Etapes

- Préparation de la matrice MALDI et du témoin positif. La matrice doit être préparée avant chaque série d'analyses et conservée à 4 °C à l'abri de la lumière.
- Dépôt des échantillons sur la cible.
- Lancement d'une acquisition MALDI-TOF-MS via le logiciel Biotyper RTC.
- Validation des résultats d'identification. Nettoyage des cibles MALDI.

#### 3.3.1. Préparation de la matrice

- Dans un tube polypropylène de 1,5 ml, introduire 2 pointes de spatules d'alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (HCCA) ;
- Ajouter 500 µl d'acétonitrile HPLC ;
- Ajouter 475 µl d'eau HPLC ;
- Ajouter 25 µl de TFA (Trifluoroacetic acid) ;
- Vortexer ou secouer vigoureusement ;
- Soniquer 10 min puis centrifuger pendant 5 min à 13000 g ;
- Transférer le surnageant dans un tube polypropylène de 1,5 ml propre.

### **3.3.2. Préparation de la cible**

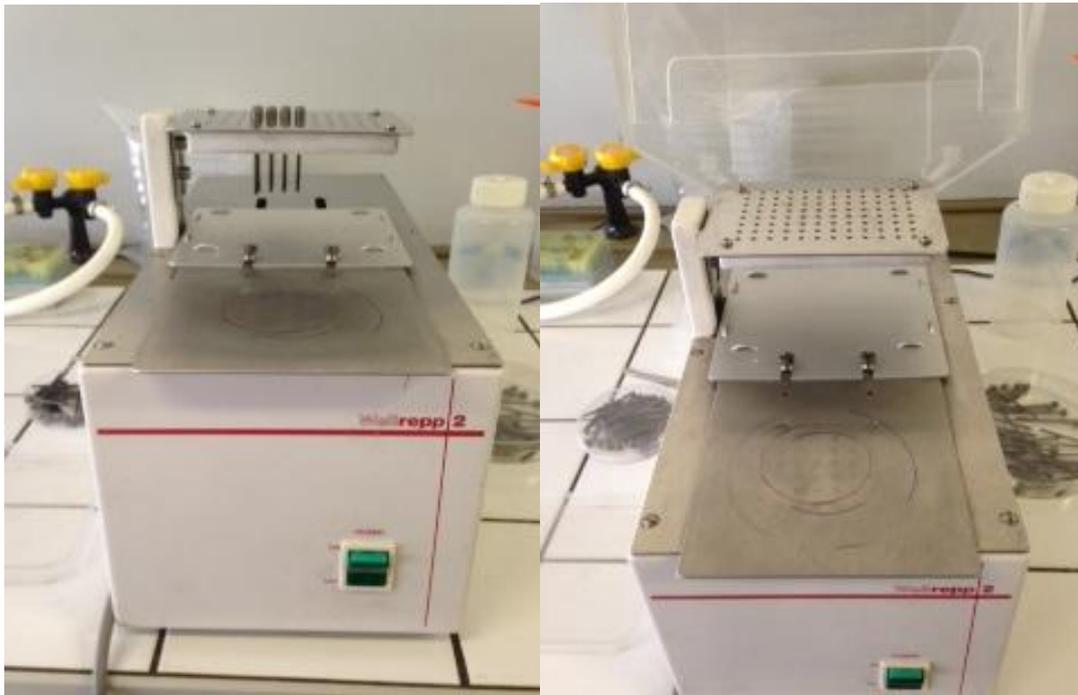
A l'aide d'un embout stérile, étaler une colonie bactérienne bien jeune (de 18h à 24h) sur le cercle de la cible. 2µl de la solution de la matrice sont ajoutés sur les taches cibles de l'analyse. Après séchage, la matrice est insérée dans le MALDI- TOF- MS.

### **3.3.3. Interprétation des résultats**

L'interprétation a été faite à partir d'un graphe nommé spectre de masse, véritable empreinte digitale de la bactérie analysée. La comparaison de spectre obtenue à une banque de données de spectres, nous permet d'avoir une idée sur le score de la souche bactérienne. L'identification est validée lorsque le score est supérieur à 1,9 et si on retrouve le même germe pour les deux dépôts.

## **4. Antibiogramme**

L'antibiogramme a été fait afin de pouvoir sélectionner les souches résistantes. Dans ce travail, il a été réalisé dans un inoculum multiple de type Steers. Cet appareil permet d'évaluer le pouvoir antimicrobien d'une substance et de calculer aussi la concentration minimale inhibitrice. Le protocole suivi était celui établi par la Société Française de Microbiologie (2012). Pour cela, l'antibiotique est directement dilué dans le milieu de culture, Mueller Hinton ou bien Mueller Hinton mélangé à 5% de Sang de Mouton pour les bactéries et dans le milieu Sabouraud pour les champignons, puis laisser solidifier. Des suspensions bactériennes à 0,5 Mc Farland de concentration sont ensemencées en spot (Fig. 8).



**Figure 8 :** Machine de Steers (Photo prise du laboratoire Aquitaine Microbiologie)

### 5. Etude ethnopharmacologique

L'étude ethnopharmacologique a été réalisée à l'aide de 300 questionnaires simples et aléatoires (voir ci-dessous) auprès des usagés des plantes médicinales de la région de Tizi Ouzou.

#### Questionnaire :

Nom : .....

Prénom : .....

Age : .....

Sexe : .....

Fonction : .....

Les plantes médicinales que vous connaissez :

Utilisation de chaque plante :

Partie utilisée de la plante :

Avez-vous déjà utilisé une de ces plantes ?.....

- Précisez :.....

Quel était le résultat ?

.....

Source de l'information sur les bienfaits de la plante :

.....

Où avez-vous trouvé la plante ?

.....

Si vous l'avez acheté, quel est son prix ? D'où l'avez-vous acheté ?

.....

Le dépouillement des questionnaires nous a permis de sélectionner trois plantes médicinales *Borago Officinalis* L., *Rubus fruticosus* L. et *Urtica dioïca* L. Le choix de ces plantes a été basé sur :

- L'utilisation traditionnelle dans le traitement des infections respiratoires.
- Le manque d'étude sur les flavonoïdes et les huiles essentielles des plantes.
- La disponibilité de la plante.

## 6. Screening phytochimique

Il englobe une série de méthodes colorimétriques qui permettent d'établir la présence ou l'absence de métabolites secondaires dans la plante à partir de sa poudre ou de l'infusé.

Le screening aide à chercher: les anthocyanes, les leuco-anthocyanes, les tannins totaux, les irridoïdes, les tannins galliques les tannins cathéchiques, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les sénosides, les quinones, les coumarines et les mucilages. Le tableau 7 montre la méthode appliquée à la recherche de chacun de ces métabolites secondaires.

**Tableau 7:** Screening phytochimique (Harborne *et al.*, 1998; Raaman *et al.*, 2006)

Métabolite secondaire	Méthodes	Résultat attendu
Anthocyanes	5ml d'infusé + quelques gouttes d'HCL.	Coloration rouge
Leuco-anthocyanes	2 g de poudre+ 20 ml de propanol / acide chlorhydrique (1/1). Porter à ébullition au bain Marie.	Coloration rouge
Tanins totaux	5ml d'infusé + quelques gouttes de FeCl <sub>3</sub>	Coloration bleue noire
Irridoïdes	2 ml d'infusé + quelques gouttes d'acide chlorhydrique. Chauffer un peu.	Coloration bleue
Tanins galliques	1ml d'infusé + 2g d'acétate de sodium+quelques gouttes de FeCl <sub>3</sub> .	Coloration bleue foncée
Alcaloïdes	5g de poudre + 50 ml d'ether : chloroforme 3/1 Filtrer après 24h puis épuiser avec du HCL.	Précipité rouge
Flavonoïdes	À 5 ml d'infusé + 5 ml d'acide chlorhydrique + un coupon de Zinc +1 ml d'alcool iso-amylque.	Coloration rouge orangée
Sénosides	2,5 g de poudre + 50 ml d'eau distillée + 2 ml d'acide chlorhydrique concentré. Chauffer pendant 15 min+40 ml d'éther. La couche étherée est séparée, séchée avec le sulfate de sodium anhydre, évaporée+ 5 ml d'ammoniaque diluée (1/2) au résidu refroidi.	Coloration violette rouge
Quinones	Humecter 2 g de poudre par 2 ml d'acide chlorhydrique+ 20 ml de chloroforme. Après 3 heures, le filtrat est agité avec 5 ml d'ammoniaque (1/2).	Coloration rouge
Coumarines	Faire bouillir à reflux 2 g de poudre dans 20 ml d'éthanol pendant 15 minutes. 5 ml du filtrat+ 10 gouttes d'hydroxyde de potassium à 10 %+	Formation d'un trouble

	quelques gouttes d'acide chlorhydrique à 10 %.	
Mucilages	5 ml d'éthanol absolu sont ajoutés à 1 ml d'infusé. Le mélange est incubé pendant 15 minutes.	Précipité floconneux
Saponosides	A 2 ml d'infusé, on ajoute quelques gouttes d'acétate de plomb.	Formation d'un précipité blanc.

### 7. Extraction des huiles essentielles

100 g de la partie aérienne fraîche: feuilles, fleurs, tiges et graines ont été mis dans un ballon rempli de 600 ml d'eau distillée puis portée à ébullition pendant 3 heures (Fig. 9). L'eau recueillie en fin d'extraction subie deux lavages à l'éther di éthylique afin de séparer l'huile extraite. Après évaporation de l'éther di éthylique, l'huile est collectée dans un flacon opaque et conservée à 4°C jusqu'à utilisation. Le rendement est calculé avec la formule suivante:

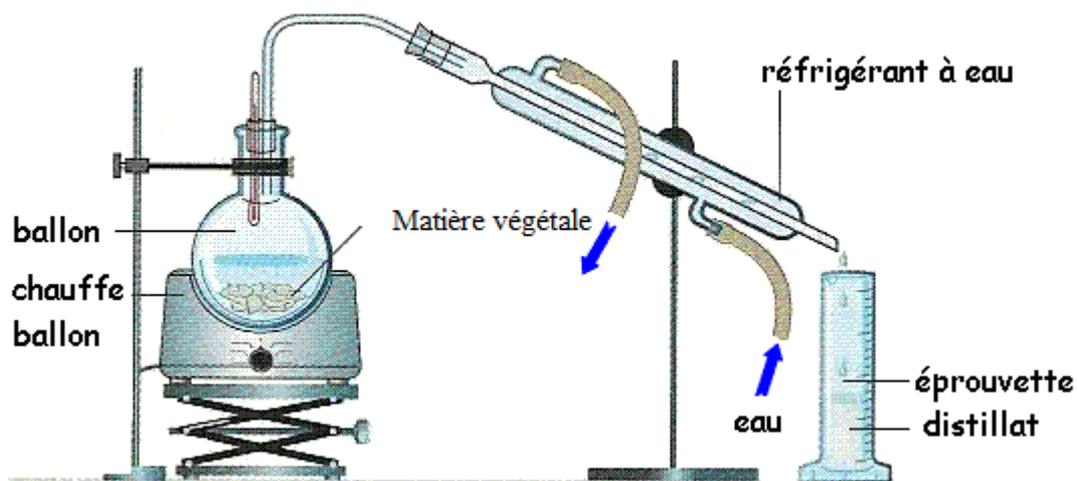
$$R = \frac{M - M_o}{M_v} \times 100$$

Avec:

$M$  : Masse du flacon rempli d'huile

$M_o$  : Masse du flacon vide

$M_v$  : Masse initiale de la matière végétale utilisée (Pharmacopée européenne, 2005).



**Figure 9:** Dispositif d'hydrodistillation

## 8. Extraction des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes a été faite suivant le protocole de Bruneton (1999). L'extraction est basée sur le degré de solubilité des flavonoïdes dans les solvants organiques. A la fin, seul le dernier extrait, qui représente les flavonoïdes très polaires, est pris en considération, et fera l'objet d'analyses chimiques et biologiques (Fig.10).

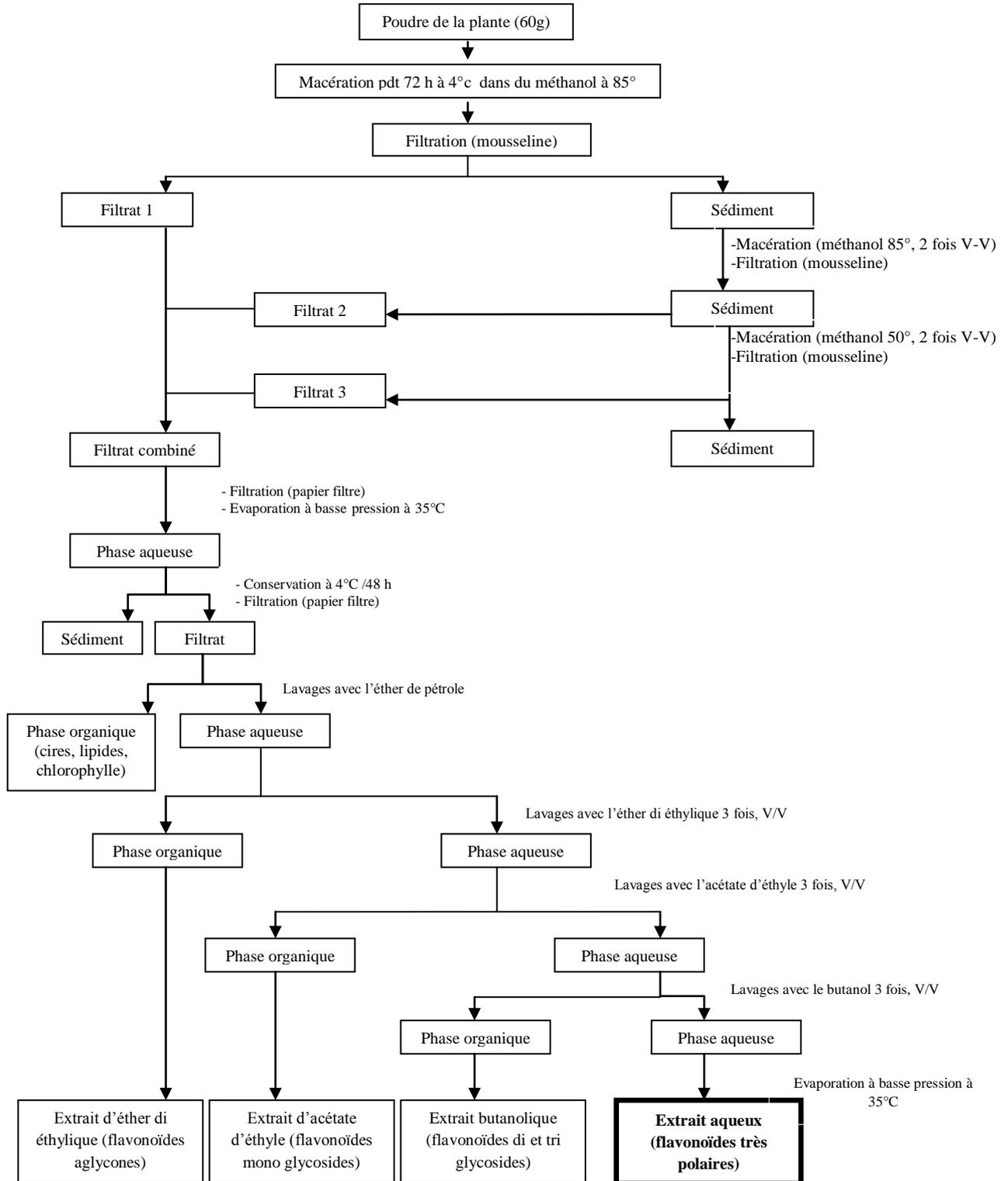


Figure 10: Schéma représentant le protocole d'extraction des flavonoïdes

## 9. Caractérisation des extraits

### 9.1. CG-SM des huiles essentielles

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle a été faite par chromatographie en phase gazeuse couplée de spectrométrie de masse de marque Perkin Elmer 600 dans les conditions opératoires suivantes :

- Une colonne Rtx-VMS (60m de long, 250 $\mu$ m de diamètre).
- Le gaz vecteur est l'Hélium.
- Un débit de 1ml/ min.
- Une température de 70°C pendant 1 min, rampe de 3°C jusqu'à 160°C, pendant 1 min, rampe 2°C/min jusqu'à 230°C pendant 5 min.
- La température de l'injecteur est de 230°C.
- 0,2  $\mu$ l de l'huile à analyser injectée à l'aide d'une seringue spéciale.

L'identification des composants a été basée sur :

- La comparaison de leurs indices de rétention par rapport au temps de rétention d'une série de n-alcanes avec une interpolation linéaire, avec les composés authentiques ou des données de la littérature ;
- L'ordinateur correspondant à des bibliothèques spectrales de masses commerciales (Adams 1995; Köning et al., 2001; Mc Lafferty et Stauffer, 1994; NIST, 1999).

### 9.2. CLHP des flavonoïdes

L'analyse qualitative de l'extrait des flavonoïdes a été effectuée par CLHP (Type HPLC 1100 hp hewlett packard).

- La phase stationnaire est une colonne en silice (C18 phase inverse) de 125mm sur 4,6 mm de dimension.
- La phase mobile est un mélange d'eau/méthanol/acide acétique aux proportions (50/47/2,5) en système isocratique avec un débit de 1ml/min.
- Les extraits et les standards sont préparés à des concentrations de 0,5 mg/ml.
- Un volume d'extrait et de standards de 20 $\mu$ l est injecté. La détection des composés est faite avec un détecteur UV-visible à une longueur d'onde de 254 nm (Amarowicz, 2005).

### 9.3. Dosage des flavonoïdes par spectrophotomètre

L'évaluation quantitative des flavonoïdes a été réalisée selon la méthode de trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al.*, 1996). A 1 ml de chaque échantillon est ajouté 1ml d' $\text{AlCl}_3$  à 2% dans le méthanol. Dix minutes après le début de la réaction, l'absorbance est lue avec un spectrophotomètre (Optizen 2120 UV) à 430 nm.

Une gamme étalon a été établie séparément avec la quercétine pour calculer la concentration des flavonoïdes (annexe 2). Les résultats du dosage ont été exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de flavonoïdes.

### 10. Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne a été faite par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Ainsi, des boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller Hinton pour les bactéries ou la gélose Sabouraud pour les champignons ont étéensemencées avec la suspension à 0.5 Mc Farland suivant les recommandations de NCCLS (2006). Ensuite, des disques de 6 mm de diamètre, imprégnés de 10  $\mu\text{l}$  de l'extrait à différentes concentrations ont été placés au centre de chaque boîte.

Après incubation à 37°C pendant 24h pour les bactéries ou à 28°C pendant 48h pour les champignons, le pouvoir antimicrobien de l'extrait est déterminé par la mesure du diamètre d'inhibition. Tous les tests ont été répétés trois fois pour calculer les moyennes et les erreurs standards à la moyenne.

### 11. Réalisation des échiquiers en milieu solide

Le but de l'échiquier est d'étudier l'effet d'une association entre deux antibiotiques à différentes concentrations. Il permet aussi d'étudier l'effet d'une association entre un extrait de plante médicinale et un antibiotique, ou bien l'effet de l'association de deux extraits végétaux (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, 2012). Dans le présent travail, nous avons réalisé deux échiquiers: association de l'extrait flavonoïdique de la Bourrache et d'un antibiotique (la pénicilline) et association des deux extraits flavonoïdiques de la Bourrache et de la Ronce.

L'échiquier a été réalisé dans un appareil à Steers suivant la méthode citée ci-dessus, sur une des souches microbiennes montrant une grande résistance (*S. aureus*) aux antibiotiques et aux extraits des plantes étudiées.

Les extraits bruts des flavonoïdes sont utilisés, puis des dilutions au demi ont été faites suivant le tableau ci-dessous :

**Tableau 8:** Concentrations des extraits (ou antibiotique) de l'échiquier

Flavonoïde (Antibiotique) B (mg/ml)										
Flavonoïde (Antibiotique) A (mg/ml)	1/256	1-1/256	½-164	¼-1/256	1/8-1/256	1/16-1/256	1/32-1/256	1/64-1/256	1/128-1/256	1/256-1/256
	1/128	1-1/128	½-1/128	¼-1/128	1/8-1/128	1/16-1/128	1/32-1/128	1/64-1/128	1/128-1/128	1/256-1/128
	1/64	1-1/64	½-1/64	¼-1/64	1/8-1/64	1/16-1/64	1/32-1/64	1/64-1/64	1/128-1/64	1/256-1/64
	1/32	1-1/32	½-1/32	¼-1/32	1/8-1/32	1/16-1/32	1/32-1/32	1/64-1/32	1/128-1/32	1/256-1/32
	1/16	1-1/16	½-1/16	¼-1/16	1/8-1/16	1/16-1/16	1/32-1/16	1/64-1/16	1/128-1/16	1/256-1/16
	1/8	1-1/8	½-1/8	¼-1/8	1/8-1/8	1/16-1/8	1/32-1/8	1/64-1/8	1/128-1/8	1/256-1/8
	1/4	1-1/4	½-1/4	¼-1/4	1/8-1/4	1/16-1/4	1/32-1/4	1/64-1/4	1/128-1/4	1/256-1/4
	1/2	1-1/2	½-1/2	¼-1/2	1/8-1/2	1/16-1/2	1/32-1/2	1/64-1/2	1/128-1/2	1/256-1/2
	1	1-1	½-1	¼-1	1/8-1	1/16-1	1/32-1	1/64-1	1/128-1	1/256-1
	0	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256

Les résultats et l'interprétation sont présentés dans le tableau 9.

**Tableau 9:** Interprétation des résultats de l'échiquier

<b>FIC<sub>A</sub></b>	<b>mg/ml</b>										
	1/256	100			100	100	100	100	100	100	100
0,06	1/128	100			1	100	100	100	100	100	100
0,125	1/64	100			0	0	1	100	100	100	100
0,25	1/32	100			0	0	0	0	100	100	100
0,5	1/16	100			0	0	0	0	100	100	100
1	1/8	1									
	1/4	0									
	1/2	0									
	1	0									
	0	100	0	0	100	100	100	100	100	100	100
	<b>mg/ml</b>	0	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
<b>FIC<sub>B</sub></b>				1	0,5	0,25	0,125	0,06			

$$FIC_A = CMI \text{ de A avec B} / CMI \text{ de A}$$

La lecture et l'interprétation des résultats ont été faites comme suit :

- Une lecture du nombre de survivants dans chaque boîte après 24h d'incubation (présence ou absence des colonies).
- Détermination du pourcentage de survivants dans chaque boîte comparativement aux boîtes témoins (+ = 100% survivants ; - = aucun survivant).
- Détermination dans chacune des boîtes, des FIC ou Fractions de Concentration Inhibitrice de A et B soit  $FIC_A$  et  $FIC_B$ , représentant les coordonnées de chaque boîte.

**Exemple :**

- Si  $FIC \leq 0,5$ , on parle d'effet synergique
- Si  $FIC > 2$ , on parle d'effet antagoniste
- Si FIC compris entre 1 et 2, on parle d'indifférence

## **12. Evaluation de l'activité antioxydante**

Afin de déterminer le pouvoir antioxydant des extraits utilisés, la méthode de piégeage au DPPH a été adoptée.

### **12.1. Méthode qualitative**

La méthode utilisée pour évaluer qualitativement l'activité antioxydante des extraits des flavonoïdes et des huiles essentielles est celle donnée par Huang *et al.* (2005). Elle est généralement basée sur l'inhibition de l'accumulation de produits oxydés. Dans ce cas, les radicaux libres sont bloqués par l'ajout de molécules antioxydantes. Dans cet essai, les extraits et l'acide ascorbique (témoin) ont été dilués dans du méthanol pur à des concentrations différentes: 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 1 mg/ml. Un volume de 10  $\mu$ l de chaque concentration de l'extrait et du standard a été déposé sur la plaque CCM. Après séchage des spots, la plaque est entièrement trempée pendant 10 secondes dans une solution de DPPH. Des taches jaunes apparaissent révélant une activité antioxydante. La qualité de la réaction est évaluée en fonction de l'intensité de la couleur des taches.

### **12.2. Méthode quantitative**

Pour déterminer quantitativement l'effet antioxydant des extraits, nous avons utilisé la méthode proposée par Sanchez Moreno *et al.* (1998). Elle consiste à préparer des

concentrations de 0,00125 ; 0,0025 ; 0,005 ; 0,01 ; 0,031 ; 0,0625 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 et 1 mg / ml à partir de la solution mère de ces deux extraits, obtenus par dissolution dans du méthanol.

Pour l'huile essentielle, 1 ml de chaque concentration est mélangé avec 4 ml de la solution de DPPH a une concentration de 0,0024 g / ml.

Pour les flavonoïdes, nous avons réalisé un mélange de 25 µl de chaque concentration avec 975 µl de la même solution de DPPH. L'acide ascorbique a également été préparé selon la même méthode. La mesure de la variation de l'absorbance a été effectuée 30 minutes après l'introduction dans les cuves de spectrophotomètre UV-visible (UV Optizen 2120), piloté par un système informatique à la longueur d'onde de 517 nm. Les valeurs obtenues ont été transformées en pourcentages d'inhibition en utilisant la formule suivante:

$$I\% = 100 \times \frac{A_{\text{référence}} - A_{\text{test}}}{A_{\text{référence}}}$$

$A_{\text{Référence}}$  représente l'absorbance du contrôle (contenant le réactif sans extrait ajouté).

$A_{\text{Test}}$  représente l'absorbance de l'extrait.

### 13. Etude statistique

Les résultats ont été exprimés en  $\pm$  ES ou bien analysés par le test ANOVA à un facteur, en utilisant le logiciel Statistica, version 6.

# Résultats et discussion

## 1. Prévalence des souches microbiennes isolées

De Janvier 2012 à Juin 2013, 250 prélèvements ont été obtenus à partir des patients atteints d'infections respiratoires dans les services de réanimation médicale et des maladies infectieuses de l'hôpital de Tizi Ouzou. 70 prélèvements sont d'origine d'infections respiratoires hautes (ORL), 180 prélèvements sont issus d'infections respiratoires basses.

Les patients hospitalisés présentant des infections respiratoires nosocomiales ou bien des infections respiratoires communautaires sont âgés de 16 à 82 ans.

Concernant la nature des prélèvements, il est à noter que dans les infections ORL, le nombre est plus important au niveau de l'oreille et de la gorge. Ceci serait dû à une fréquence relativement élevée des angines et des otites durant la période d'étude. Pour les prélèvements bronchiques, on note une fréquence élevée des pneumonies. La prévalence de ces infections est observée habituellement à la fin de l'hiver et le début du printemps, période maximale de cueillette des prélèvements.

La répartition par sexe des patients ayant fait l'objet de nos prélèvements, nous montre que la majorité des infections hautes touche le sexe féminin. Par contre, les infections basses affectent plus le sexe masculin.

Parmi les 80% des prélèvements infectés, 50% contenaient plus d'un germe.

Un pourcentage nettement inférieur a été signalé par Bezzaoucha *et al.* (1994) suite à une enquête épidémiologique menée au CHU de Bab El Oued d'Alger sur 426 malades hospitalisés. En effet ces auteurs ont révélé un taux de 16,2%, dont 12,2% seulement souffraient de pneumonies.

Une autre étude faite en Egypte sur les infections nosocomiales, a montré que le système respiratoire est le plus touché avec un taux de 59,9% (Daef et Elsherbiny, 2012).

L'étude menée par Khadir en 2013, a montré la prédominance des infections à staphylocoque doré dans les pays d'Afrique. La prédominance de ces infections a été déterminée dans huit pays africains entre 1996 et 1997 et était relativement haute au Nigeria, Kenya et au Cameroun (21 à 30 %) et au-dessous de 10 % en Tunisie et en Algérie. En Algérie, l'augmentation du taux des infections à SARM était de 14 % en 2001. Ces chiffres montrent la présence de ces infections dans les pays de tiers monde où les conditions d'hygiène ne sont pas respectées.

Il est donc important de par cette comparaison de faire ressortir l'importance des risques posés par ce type d'infections dans les milieux hospitaliers.

## 2. Identification des souches microbiennes isolées

### 2.1. Examens microscopique et macroscopique

Les résultats des examens microscopique et macroscopique sont consignés dans le tableau 10.

**Tableau 10:** Examen microscopique et macroscopique des germes isolés

Aspect microscopique		Aspect macroscopique		Culture		Tests biochimiques		Nom du germe
Etat frais	Coloration de Gram	Forme	Taille	Milieux	Conditions	Oxydase	Catalase	
Cocci Immuable	Gram négatif	Petites colonies jaunâtres	2mm	Gélose nutritive	24H/ 37°C	-	+	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Bacille Mobile	Gram négatif	Grosses colonies muqueuses	3mm	Gélose au sang frais	24H/ 37°C	+	+	<i>Burkholderia cepacia</i>
Bacille Immuable	Gram positif	Petites colonies jaunâtres	2mm	Gélose au sang frais	24H/ 37°C	+	+	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
Bacille mobile	Gram négatif	Petites colonies pales	1mm	Gélose nutritive	24H/ 37°C	-	+	<i>Enterobacter cloacae</i>
Bacille Immuable	Gram négatif	Grosses colonies jaunâtres	3mm	Hectoén	24H/ 37°C	-	+	<i>Escherichia coli</i>
Petit bâtonnet Immuable	Gram négatif	Très petites colonies brillantes	1mm	Gélose au sang frais	24H/ 37°C/ 5% CO <sub>2</sub>	+	+	<i>Haemophilus influenzae</i>
Bacille Immuable	Gram négatif	Grosses colonies muqueuses jaunâtres	3mm	Gélose au sang frais	24H/ 37°C	-	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Bacille Peu mobile	Gram négatif	Grosses colonies verdâtres	4mm	Hectoén	24H/ 37°C	+	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Bacille Mobile	Gram négatif	Grosses colonies verdâtres	3mm	Hectoén	24H/ 37°C	+	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Cocci	Gram positif	Petites colonies	2mm	Gélose au sang	24H/ 37°C	-	+	<i>Staphylococcus aureus</i>

Immobile		jaunâtres		frais				
Diplocoque Immobile	Gram positif	Petites colonies grises ombiliquées	1mm	Gélose au sang cuit	24H/ 37°C/ 5% CO <sub>2</sub>	-	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
/	/	Colonies blanches, crémeuses et assez grandes	2mm	Sabouraud+ chloramphénicol	24H à 48H / 30°C	/	/	<i>Candida albicans</i>

## 2.2. Identification par les galeries biochimiques

Les résultats obtenus par les galeries API sont représentés par les figures 11 et 12 :



a. API 20E pour l'identification d'*Enterobacter cloacae*.



b. API 20E pour l'identification d'*Escherichia coli*.

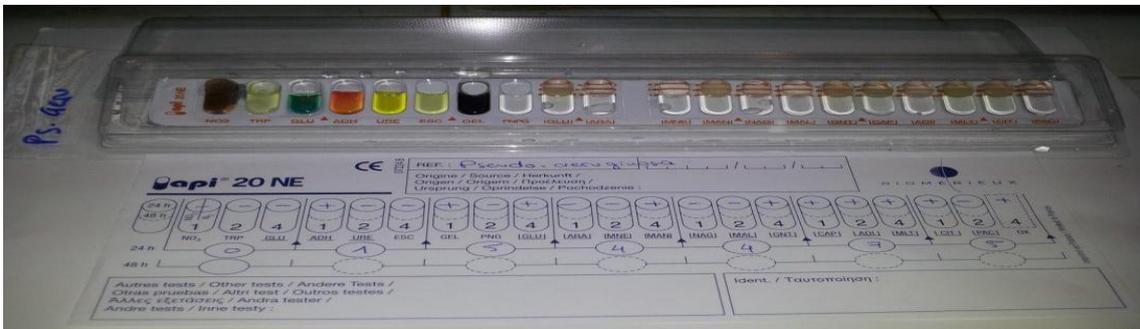


c. API 20 E pour l'identification d'*Acinetobacter baumannii*.



d. API 20 E pour l'identification de *Klebsiella pneumoniae*.

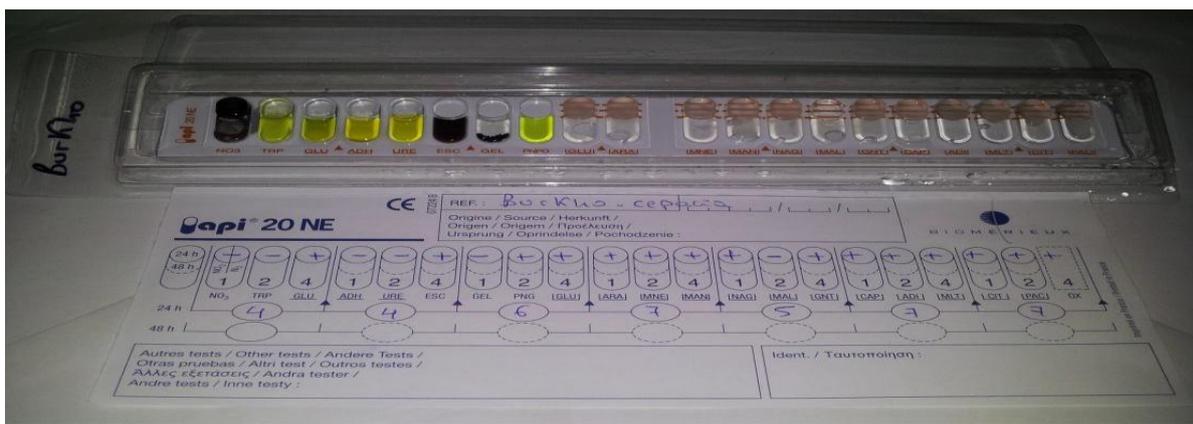
**Figure 11:** Galeries biochimiques Api 20 E.



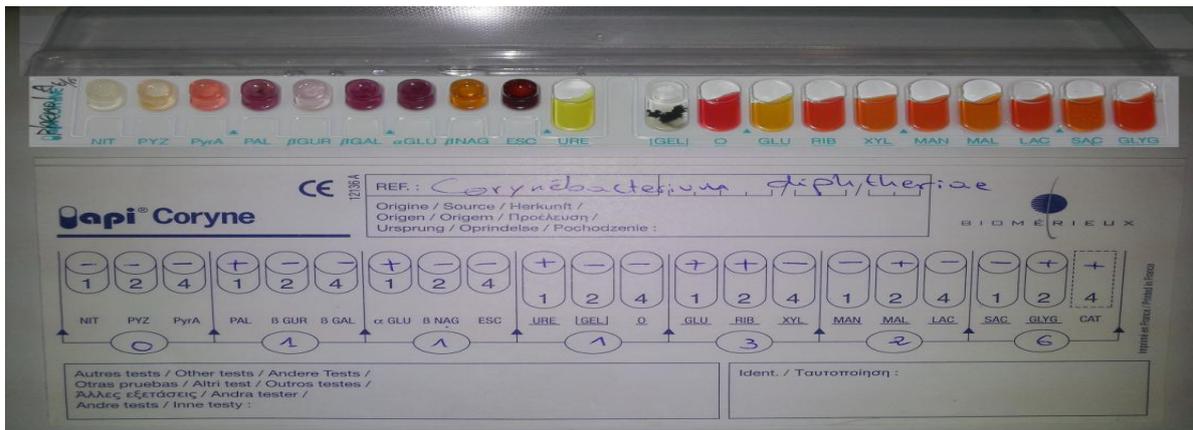
a. API 20 NE pour l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*.



b. API 20 NE pour l'identification de *Pseudomonas fluorescens*.



c. API 20 NE pour l'identification de *Burkholderia cepacia*.



d. API 20 NE pour l'identification de *Corynebacterium diphtheriae*.

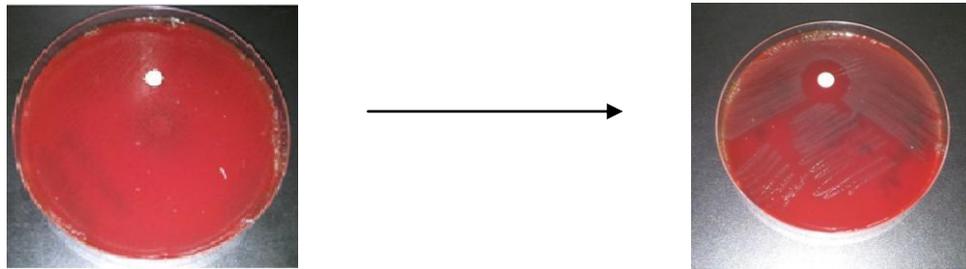
**Figure 12 :** Galeries API 20 NE.

Une collection de 10 souches de chaque bactérie a été retenue pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne, pour la seule levure isolée, seulement 4 ont fait l'objet de cette étude.

## 2.3. Tests spécifiques

### 2.3.1. Test d'optochine pour l'identification de *Streptococcus pneumoniae*

Le résultat du test d'optochine appliqué pour la bactérie présumée *Streptococcus pneumoniae* est illustré dans la figure 13 ci-dessous :

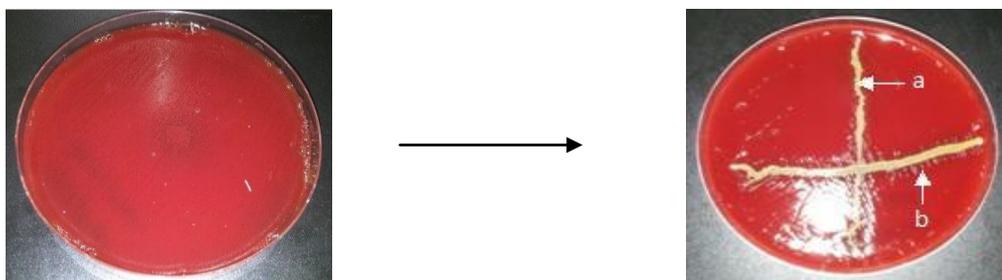


**Figure 13:** Test d'optochine

La figure montre une sensibilité vis-à-vis du disque imbibé d'optochine, ceci confirme l'espèce *Streptococcus pneumoniae*.

### 2.3.2. Camp-test pour l'identification de *Haemophilus influenzae*

Le résultat du Camp-test appliqué pour la bactérie présumée *Haemophilus influenzae* est représenté dans la figure 14.



**a:** Croissance de *Staphylococcus aureus*

**b:** Croissance de l'*Haemophilus influenzae*

**Figure 14 :** Camp-test

La figure 14 montre la croissance de colonies brillantes de l'*Haemophilus influenzae* tout au tour de *Staphylococcus aureus*.

### 2.3.3. Test de Staphorex pour l'identification des *Staphylococcus sp.*

Le résultat du test Staphorex a fait ressortir une réaction d'agglutination entre *Staphylococcus aureus* et les particules de latex et ça permet de dire qu'il s'agit de *S. aureus* (Figure 15).

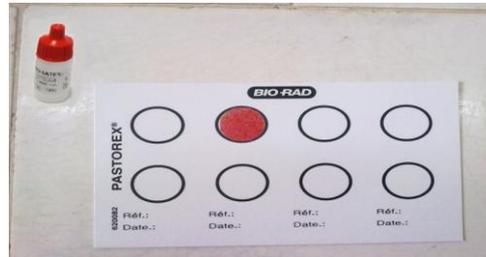


Figure 15 : Test de Staphorex

## 2.4. Fréquence des germes isolés

La figure suivante montre la fréquence des bactéries isolées.

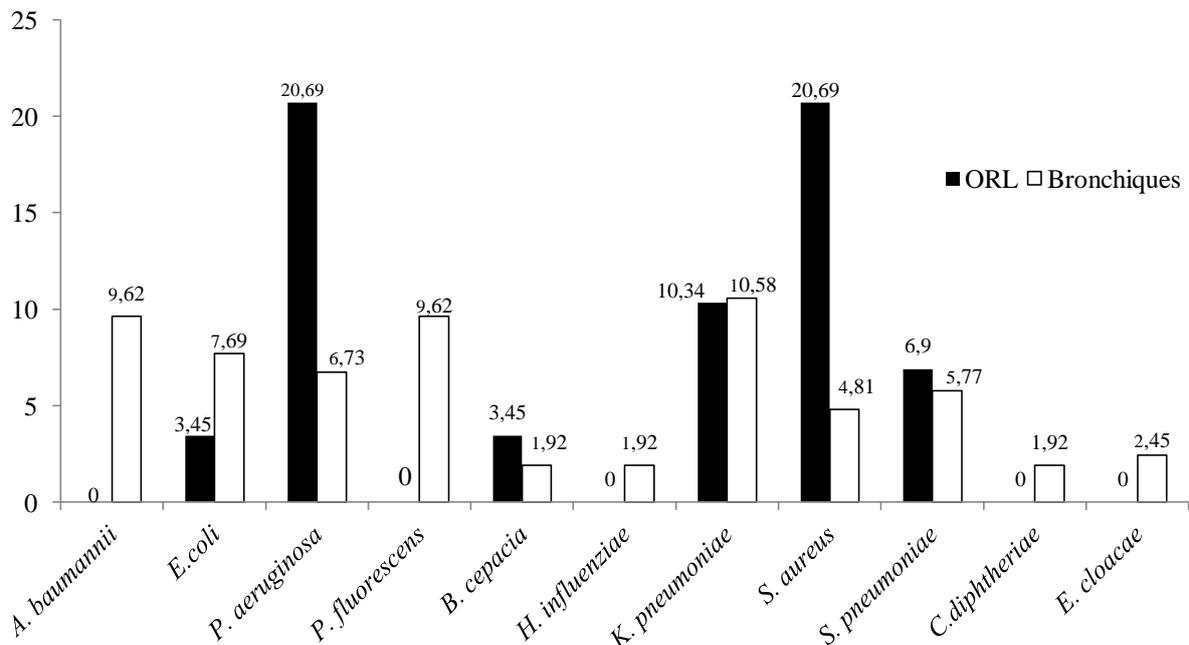


Figure 16 : Fréquence des souches microbiennes isolées de patients atteints d'infections respiratoires

Grâce aux différentes techniques appliquées ci-dessus, nous avons isolé 12 espèces, à savoir: *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* et *Candida albicans*.

D'après la figure 16, les deux bactéries les plus fréquentes sont *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Ces deux bactéries sont dominantes dans les infections ORL. On retrouve en deuxième position *A. baumannii*, *E. coli*, *P. fluorescens*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, puis viennent *B. cepacia*, *E. cloacae*, *H. influenzae* et *C. diphtheriae*.

Il est à signaler que certaines bactéries sont isolées uniquement de la sphère basse. Il s'agit de *A. baumannii*, *P. fluorescens*, *H. influenzae*, *C. diphtheriae* et *E. cloacae*. Ces mêmes germes ont été cités par Black (2012) comme étant des colonisateurs des voies respiratoires basses.

Une comparaison avec une enquête réalisée au Maroc par Lazrak *et al.*, (2011) pour une période d'une année (du 06/2009 au 06/2010) a montré que les auteurs ont isolé 65 souches bactériennes à partir des prélèvements bronchiques. A l'aide des méthodes conventionnelles, ils ont identifié *A. baumannii* (21,5%), suivie de *P. aeruginosa* (18,5), *Staphylococcus aureus* (18,5%), *Klebsiella pneumoniae* (16,9%) et *Proteus mirabilis* (6,1%). Les résultats trouvés par ces auteurs ressemblent aux résultats obtenus, sauf que *A. baumannii* a été trouvée en quantité moyenne par rapport à *S. aureus* et à *P. aeruginosa*.

Une autre étude faite par Daef et Elsherbiny, (2012) a montré que 59,9% des isollements sont des infections respiratoires dont 54,2% sont infectés par *Klebsiella spp.* Le nombre de *S. aureus* retrouvé dans notre travail dépasse largement 23,6%. Cette différence serait probablement due aux habitudes du personnel hospitalier, aux patients et à l'environnement.

### 3. Tests de sensibilité aux antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme appliqué aux différentes souches microbiennes isolées sont présentés dans le tableau 11.

**Tableau 11:** Résistance et sensibilité des germes isolés aux antibiotiques

Souches	Antibiotiques																
	Tic	Tic+Ac.cl	Pope	Cefo	Imep	Ofla	Cipr	Tobr	Netil	Colis							
<i>A. baumannii</i> 1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S							
<i>A. baumannii</i> 2	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S							
<i>A. baumannii</i> 3	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S							
<i>A. baumannii</i> 4	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S							
<i>A. baumannii</i> 5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S							
<i>A. baumannii</i> 6	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S							
<i>A. baumannii</i> 7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S							
<i>A. baumannii</i> 8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S							
<i>A. baumannii</i> 9	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S							
<i>A. baumannii</i> 10	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S							
	Amo	Amo+ac.cl	Tica	Tica+ac.cl	Pipe	Cefa	Cefo	Cefox	Imi	Gent	Ami	Tobr	Ofla	Cipr	Colis		
<i>B. cepacia</i> 1	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S		
<i>B. cepacia</i> 2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
<i>B. cepacia</i> 3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
<i>B. cepacia</i> 4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
<i>B. cepacia</i> 5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
<i>B. cepacia</i> 6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
<i>B. cepacia</i> 7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
<i>B. cepacia</i> 8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
<i>B. cepacia</i> 9	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
<i>B. cepacia</i> 10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
	Oxa	Eryt	Ofla	Rifa	Clin	Levo	Vanc	Chlo	Cotri	Tetra							
<i>C. diphtheriae</i> 1	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S							
<i>C. diphtheriae</i> 2	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R							
<i>C. diphtheriae</i> 3	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R							
<i>C. diphtheriae</i> 4	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R							
<i>C. diphtheriae</i> 5	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R							
	Amo+ac cl		Amo		Imi		Cefo		Ceftr		Cefta						
<i>E. cloacae</i> 1	S		R		S		R		R		S						
<i>E. cloacae</i> 2	S		S		S		S		S		S						
<i>E. cloacae</i> 3	S		S		S		R		S		S						
<i>E. cloacae</i> 4	S		R		S		S		S		R						
<i>E. cloacae</i> 5	S		S		R		S		R		R						
<i>E. cloacae</i> 6	S		R		R		R		R		R						
<i>E. cloacae</i> 7	R		R		R		R		R		R						
<i>E. cloacae</i> 8	R		R		R		R		R		R						
<i>E. cloacae</i> 9	R		R		R		R		R		R						
<i>E. cloacae</i> 10	R		R		R		R		R		R						
	Amo	Ceft	Cipr	Cefo	Cefu	Ticar	Ceph	Trim/sulf	Amik	Cefep	Colist	Fosto	Imi	Mero	Pipe	Tige	Amp



<i>P. fluorescens</i> 7	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>P. fluorescens</i> 8	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>P. fluorescens</i> 9	S	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R
<i>P. fluorescens</i> 10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Cotri	Vanc	Rifa	Oxa	Gent	Amik	Tobr	Tetra	Cipr	Cefo	Amp	
<i>S. aureus</i> 1	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>S. aureus</i> 2	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S	R	R
<i>S. aureus</i> 3	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R
<i>S. aureus</i> 4	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R
<i>S. aureus</i> 5	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S
<i>S. aureus</i> 6	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	R
<i>S. aureus</i> 7	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R	R
<i>S. aureus</i> 8	R	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R
<i>S. aureus</i> 9	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R
<i>S. aureus</i> 10	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R
	Azit	Cefa	Ceft	Cefu	Eryt	Peni	Tetra	Amo	Chlo	Vanc	Trim	
<i>S. pneumoniae</i> 1	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
<i>S. pneumoniae</i> 2	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S
<i>S. pneumoniae</i> 3	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>S. pneumoniae</i> 4	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S
<i>S. pneumoniae</i> 5	R	S	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R
<i>S. pneumoniae</i> 6	S	S	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R
<i>S. pneumoniae</i> 7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>S. pneumoniae</i> 8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>S. pneumoniae</i> 9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>S. pneumoniae</i> 10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

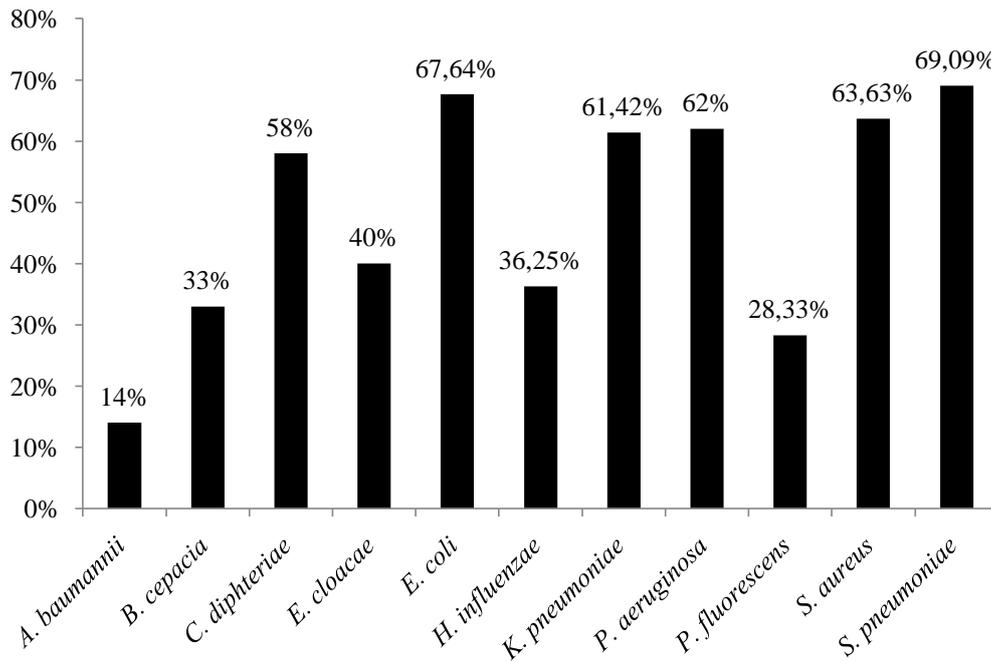
R : résistante S : sensible

**PENI:** Pénicilline , **AMO:** Amoxiciline , **CEF:** Cefazoline , **LEV:** Levoflaxine , **CIPRO :** Ciprofloxacine , **Cefta :** Ceftazidime , **Azyth :** Azythromycine , **Gent :** Gentamycine , **Ciprof :** Ciproflaxine , **Tica :** Ticarcilline , **Ac.cl:** Acide Clavulanique , **Cefo :** Cefotaxime , **Imi :** Imipenème , **Ofla :** Ofloxacin , **Tobr :** Tobramycine , **Piper :** Piperacilline , **Cefox :** Cefoxitine , **Coli :** Colistine , **Oflax :** Ofloxacin , **Amik :** Amikacine , **Levo :** Levoflaxacin , **Vanco :** Vancomycine , **Chlor :** Chloramphenicol , **Cotrim:** Cotrimoxazole , **Tetra :** Tetracycline , **Ceph :** cephalotine , **Cefep :** Cefepime.

### 3.1. Souches résistantes

D'après le tableau ci-dessus, on remarque que la résistance aux antibiotiques est rencontrée chez les bactéries Gram + et Gram -. Les germes les plus résistants sont *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. euruginosa*, *C. diphtheriae* et *S. pneumoniae* (Fig.17).

La fréquence des souches résistantes aux ATB est illustrée par la figure 17. Aussi, on constate que la seule levure *Candida albicans* isolée dans ce travail semble être sensible au traitement antibiotique.



**Figure 17:** Histogramme représentant le pourcentage de souches résistantes.

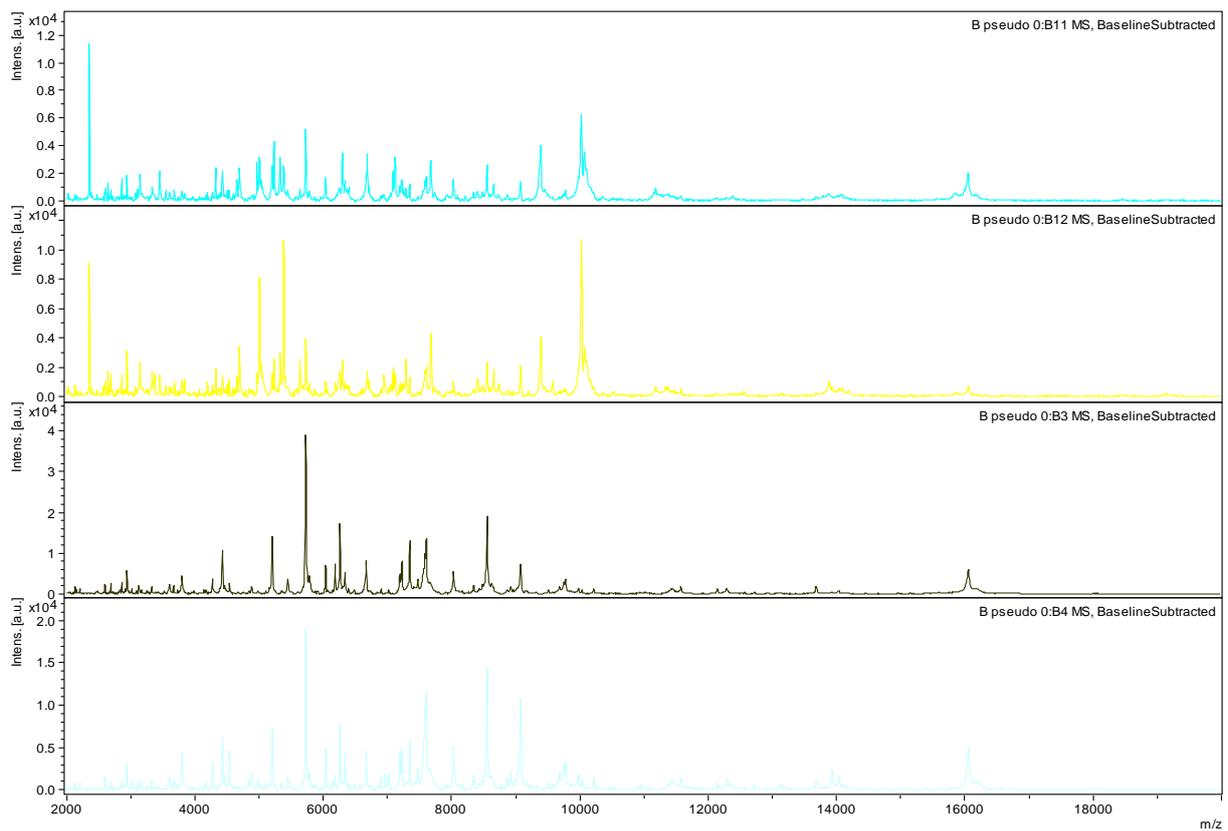
Des études sur le profil de résistance des germes isolés de patients atteints d'infections respiratoires réalisées dans un hôpital au Maroc ont montré une grande résistance d'*Acinetobacter baumannii* au Ciprofloxacine (soit 90.1%), suivie de *P. aeruginosa* qui montre une multi-résistance aux antibiotiques (soit 85,3% à la Ciprofloxacine et 14,2% à la Ceftazidim) (Lazrak *et al.*, 2011). En revanche, aucune résistance chez *S. aureus* n'a été enregistrée. La plupart de ces souches résistantes développent des mécanismes d'adaptation aux antibiotiques, soit avec un gène de résistance, soit avec des récepteurs membranaires ou bien la longue durée d'exposition de ces germes aux antibiotiques (Silver, 2011).

### 3.2. Identification de *P. aeruginosa* et *S. aureus* par MALDI – TOF

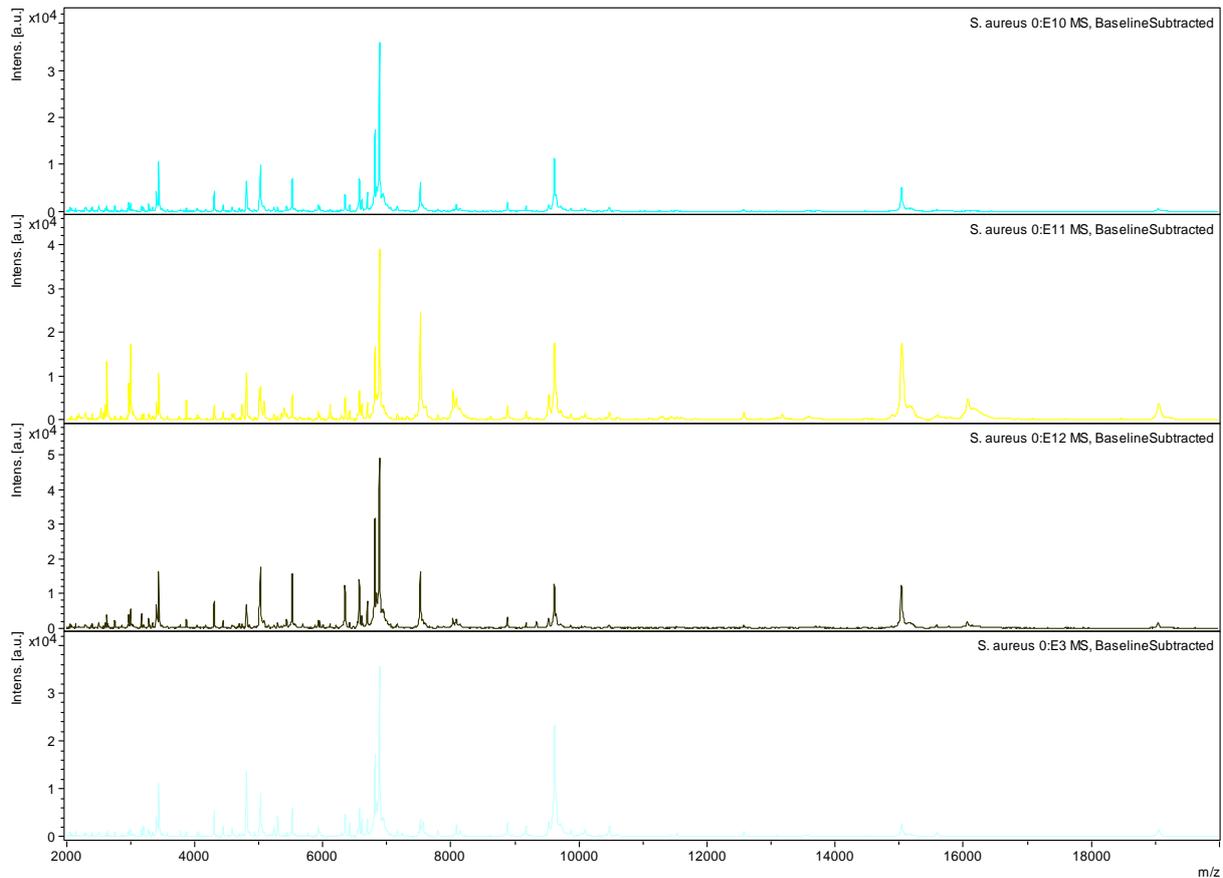
L'identification par MALDI-TOF a été faite seulement pour deux souches de deux espèces, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, en raison de leur fréquence d'isollements et de leur résistance aux antibiotiques. Les valeurs des scores obtenus sont notées sur le tableau 12. Les spectres MALDI-TOF caractéristiques de chacune des deux souches identifiées sont portés sur la figure 18.

**Tableau 12:** Valeurs des scores obtenus par le MALDI - TOF

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value
<a href="#">E1</a> (++) (A)	41AB	Pseudomonas aeruginosa	213
<a href="#">E2</a> (++) (A)	41AB	Pseudomonas aeruginosa	221
<a href="#">E3</a> (+++)(A)	S. aureus	Staphylococcus aureus	2432
<a href="#">E4</a> (++) (A)	S. aureus	Staphylococcus aureus	205



**a :** *Pseudomonas aeruginosa*



**b** : *S. aureus*

**Figure 18:** Spectre d'indentification MALDI-TOF de *S. aureus* et de *P. aeruginosa*

Les spectres de masse obtenus ont montré une très haute ressemblance génétique avec la base de données. Les scores obtenus sont compris entre 2.05 et 2.432. Les deux espèces *S. aureus* et *P. aeruginosa* identifiées précédemment sont confirmées par le MALDI-TOF. La fiabilité de distinguer *Staphylococcus aureus* des autres Staphylocoques est signalée par Cariello (2012). De plus, le Vitek MS permet d'obtenir rapidement l'identification à l'espèce de tous les Staphylocoques non-aureus. Ce dernier point est très utile pour l'identification des Staphylocoques non-aureus responsables d'infections nosocomiales dues à des corps étrangers (prothèses osseuses, valves cardiaques, cathéters...) ou à des infections urinaires (*Staphylococcus saprophyticus*).

On peut dire que le Vitek MS est un atout majeur dans l'identification des Staphylocoques. Sa rapidité d'analyse permet de prendre les dispositions nécessaires (antibiogramme, recherche de MRSA...) de manière plus fiable et rapide, utile surtout pour l'identification des germes

dans les hémocultures positives. Aussi, le Vitek MS est très utile pour l'identification des *Pseudomonas*. Il permet d'éliminer l'utilisation de la gélose PAID pour le *Pseudomonas aeruginosa*. Il est également pratique dans la différenciation des *Pseudomonas* des autres non fermentatifs, oxydase positive (*Schewanella*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*) (Cariello, 2012).

#### 4. Etude ethnopharmacologique

Le tableau 13 donne les résultats de l'étude ethnopharmacologique des plantes utilisées dans la région de Tizi Ouzou.

**Tableau 13:** Etude ethnopharmacologique

Noms latins	Noms vernaculaires (Arabe ou Kabyle)	Parties utilisées	Recettes	Indications thérapeutiques
<b>Famille : <i>Aliaceae</i></b>				
<i>Allium porum</i> L.	Akourrath	Partie aérienne	Décoction, se mange	Furoncle, antihelminthique, anémie
<b>Famille : <i>Aloceae</i></b>				
<i>Aloe vera</i> L.	Sebbar	Suc	Application du suc	Cicatrisant, brulures, problèmes de la peau
<i>Aloe succotrina</i> ALL.	Mor o svar	Suc	Application du suc	Hémorroïdes, diarrhée
<b>Famille : <i>Apiaceae</i></b>				
<i>Thapsia garganica</i> L.	Bounafaa	Fleurs	Infusion	Bronchite
<i>Ptychotis saxifraga</i> L.	Nounkha	Partie aérienne	Infusion	Infections buccales
<i>Pimpinella anisum</i> L.	Habat hlawa	Graines	Décoction	Problèmes de l'intestin, colon
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Kousbar	Partie aérienne, graines	Décoction	Ballonnement, mauvaise digestion
<i>Foeniculum vulgare</i> L.	Besbes	Graines	Décoction	Coliques, infections respiratoires, appétissant
<i>Carum carvi</i> L.	Kémoun	Graines	Décoction	Colique, crampes, indigestion
<i>Petroselinum crispum</i> MILL.	Maadnous	Partie aérienne	Décoction	Rhumatisme, ménopause
<b>Famille : <i>Apocynaceae</i></b>				
<i>Nerium oleander</i> L.	Ililli, défla	Feuilles	Infusion	Indigestion, froid, toux
<b>Famille : <i>Araliaceae</i></b>				
<i>Hedera helix</i> L.	Louway	Feuilles	Infusion, Compresses	Toux, infection bronchiques
<b>Famille : <i>Asteraceae</i></b>				
<i>Dittrichia viscosa</i> L.	Amagramane	Feuilles	Infusion	Maux d'estomac
<i>Artémisia vulgaris</i>	Echih	Partie aérienne	Infusion	Vomissement, douleur abdominale
<i>Tanacetum parthenium</i> L.	Babounej	Feuilles, fleurs	Infusion	Mal de tête, antihelminthique
<i>Lactuca virosa</i> L.	Sem mesmoum	Feuilles	Boire le jus	Bronchite, insomnie, diarrhée
<i>Cynara scolymus</i> L.	Lkarnoun	Décoction	Décoction	Colon, maladies du foie, ballonnement, cholestérol
<i>Calendula arvensis</i> L.	Amzough ghilef, thouzalth	Feuilles	Décoction	Maux d'estomac

<i>Centaurea cyanus</i> L.	/	Fleurs	Décoction, compresses	Infections urinaires, ulcère
<i>Cirsium eriophorum</i> L.	Chouk lahmar	Plante entière	Décoction	Infections urinaires, infections cutanées
<i>Taraxacum officinale</i> W.	Thijedjguine	Feuilles	Se mange	Maladies du foie, maladies rénales, indigestion
<b>Famille : Boraginaceae</b>				
<i>Borago officinalis</i> L.	Thirizoua, Isan ethour	Fleurs	Se mange, décoction	Bronchite, rhumatisme
<b>Famille : Berberidaceae</b>				
<i>Berberis vulgaris</i> L.	/	Partie aérienne, racines	Décoction	Indigestion, maladies de la peau
<b>Famille : Brassicaceae</b>				
<i>Brassica oleracea</i> L.	Krombite	Feuilles	Se mange, infusion	Blessures, amincissant
<i>Nasturtium officinale</i> R.	Heb errechad	Graines	Se mange, écrasé	Anémie
<b>Famille : Caesalpiniaceae</b>				
<i>Senna alexandrina</i> MIL.	Snan mekka	Graines	Se mange, décoction	Colon
<b>Famille : Caprifoliaceae</b>				
<i>Sambucus nigra</i> L.	Akhelouane	Feuilles	Décoction	Mauvaise haleine, antihelminthique, froid
<b>Famille : cistaceae</b>				
<i>Cistus monspeliensis</i> L.	/	Partie aérienne	Compresse	Infections cutanées
<b>Famille : Cucurbitaceae</b>				
<i>Ecballium elaterium</i> L.	Afkous aghyoul	Feuilles, racines	Décoction	Purgatif
<b>Famille : Cupressaceae</b>				
<i>Cupressus sempervirens</i> L.	Azel	Feuille, Fruit	Décoction	Froid, tonic, infections respiratoire s
<b>Famille : Dennsteadthceae</b>				
<i>Pteridium aquilinum</i> L.	Ifilkou	Partie aérienne	Décoction	nerf sciatique, rhumatisme
<b>Famille : Ephedraceae</b>				
<i>Ephedra sinica</i> STAPT.	Arzoum	Partie aérienne	Décoction	Asthme, bronchite
<b>Famille : Ericaceae</b>				
<i>Arbustus unedo</i> L.	Assisnou	Fruit	Se mange	Infections urinaires, douleurs de la gorge
<b>Famille : Fabaceae</b>				
<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	Lhalba	Graines	Se mange avec du miel	Anémie, appétissant, anti-inflammatoire
<i>Ceratonia siliqua</i> L.	Akharouv	Feuilles	Décoction	diarrhée
<i>Cytisus scoparius</i> L.	Aguendoul	Feuilles, fleurs	Décoction	Abcès, œdème, régule le rythme cardiaque
<b>Famille : Fagaceae</b>				
<i>Quercus robur</i> L.	Avlouth	Feuilles, fruit	décoction	Eczéma, œdème
<b>Famille : Fumariceae</b>				
<i>Fumaria officinale</i> L.	Thijoujar	Partie aérienne	Décoction	Indigestion, maladies rénales
<b>Famille : Juglandaceae</b>				
<i>Juglans nigra</i> L.	Thajoujth	Feuilles, fruit	Décoction	Cholestérol, douleurs intestinales
<b>Famille : Lamiaceae</b>				
<i>Origanum majorana</i> L.	Arezma	Feuilles	Décoction	Nausée, Anxiété, maux intestinaux
<i>Teucrium chamaedrys</i> L.	Akhendous	Partie aérienne	Décoction	Amaigrissante

<i>Melissa officinalis</i> L.	Thizizoui, thizizouth	Feuilles	Décoction	Indigestion, herpes, rhumatisme
<i>Lavandula stoechas</i> L.	Amezir, lhalhal	Feuilles	Décoction	Anti-inflammatoire, mycose
<i>Thymus serpyllum</i> L.	Ziitra n lakhla	Partie aérienne	Décoction	Grippe, froid, bronchite.
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Aiitra, adjertil	Partie aérienne	Décoction	Infections buccales, tension artérielle, anti-transpirant
<i>Mentha piperita</i> L.	Naanaa	Feuilles	Décoction	Anxiété, indigestion, maux abdominaux
<i>Marrubium vulgare</i> L.	Mariweth	Feuilles	Inhalation	Nausée, maux abdominaux
<i>Origanum vulgare</i> L.	Zaathar	Partie aérienne	Décoction	Froid, bronchite, problèmes de menstruations
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Iklil, iklil el djabal	Partie aérienne	Décoction	Antistress, maux abdominaux
<i>Mentha pulegium</i> L.	Fliyou	Feuilles	Se mange	Mauvaise digestion, maux intestinaux, maux d'estomac
<i>Salvia officinalis</i> L.	Khiat ldjrouh	Feuilles	Décoction	Inflammation des gencives, fatigue, mal de tête, froid
<i>Lavandula officinalis</i> L.	Amzir	Partie aérienne	Décoction	Apaisante, bronchite, antispasmodique
<b>Famille : Lauraceae</b>				
<i>Cinnamomum verum</i> J.P.	Lkarfa	Ecorce	Infusion	Maux intestinaux
<b>Famille : Liliaceae</b>				
<i>Allium sativum</i> L.	Ethoum, thicherth	Fruit	Écrasé, se mange	Tension artérielle
<b>Famille : Malvaceae</b>				
<i>Malva sylvestris</i> L.	Amedjir, khobeiza	Partie aérienne	Décoction	Pharyngites, toux, aphte
<i>Althaea officinalis</i> L.	Amdjir	Partie aérienne	Décoction	Bronchite, pharyngites, toux, infections buccales
<b>Famille : Moraceae</b>				
<i>Artocarpus altilis</i> Fosberg	Zkougou	Fruit, feuilles	Compresse	Brûlures, plaies
<i>Ficus carica</i> L.	Akarmous	Fruit	Se mange	Constipation
<b>Famille : Myrtaceae</b>				
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill	Ikafour	Feuilles	Inhalation	Toux, bronchite, grippe
<i>Eucalyptus rostrata</i> Dehnh.	Lkalitous	Feuilles	Décoction	Toux, bronchites, infections urinaires
<i>Myrtus communis</i> L.	Chilmoune, rihane	Partie aérienne	Décoction	Indigestion
<b>Famille : Oleaceae</b>				
<i>Olea europea</i> L.	Ahéchadh	Feuille, Fruit	Décoction	Diabète, cholestérol, infections
<i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl	Asléne, dardar	Feuilles	Décoction	Goute, rhumatisme
<b>Famille : Papaveraceae</b>				
<i>Papaver rhoeas</i> L.	Ben naamane	Fleurs	Décoction	Apaisant, somnolent, toux
<b>Famille : Plantaginaceae</b>				
<i>Plantago major</i> L.	Hani bchbch	Feuilles	Compresse	Bronchite, asthme, allergie
<b>Famille : Punicaceae</b>				
<i>Punica granatum</i> L.	Aroumane	Ecorce des fruits	Infusion	Hypertension, diarrhée
<b>Famille : Poaceae</b>				
<i>Elytrigia repens</i> L.	Anajil	Partie	Décoction	Maladies rénales, infections urinaires

		aérienne		
<i>Triticum aestivum</i> L.	Kamh	Graines	Moulues	Cholestérol, acné
<i>Hordeum vulgare</i> L.	Chiir	Graines	Moulues	Anémie, hémorroïdes
<b>Famille : Ranunculaceae</b>				
<i>Clematis flammula</i> L.	Azenzou	Feuilles, fleurs	Application locale	Infections buccales, gale
<i>Nigella sativa</i> L.	Sanoudj	Graines, huile	Se mange, décoction	Hypertension, fièvre, infection de la peau
<b>Famille : Rhamnaceae</b>				
<i>Rhamnus alaternus</i> L.	Imlillesse	Feuilles	Décoction	Ictère
<b>Famille : Rosaceae</b>				
<i>Prunus cerasus</i>	Hab lemlouk	Tiges, fruit	Se mange, infusion	Calcul biliaire, infections urinaires
<i>Cydonia vulgaris</i> Pers.	Thakthounia	Feuilles, fruit	Décoction	Douleur de la gorge, diarrhée
<i>Geum urbanum</i> L.	Lahchicha Imebrouka	Partie aérienne	Décoction, infusion	Fièvre, diarrhée, infections buccales
<i>Rubus fruticosus</i> L.	Alayig-attout	Fruit, feuilles	Décoction, se mange	Cholestérol, infection respiratoire, rhumatisme
<i>Rubus idaeus</i> L.	Ettout el bari	Feuilles	Décoction	Indigestion
<b>Famille : Rutaceae</b>				
<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.	Lkarés	Feuilles, fruit, jus	Décoction, jus	Maux de gorge, vomissement
<i>Citrus sinensis</i> L.	Tchina	Fruit, feuilles	Décoction	Grippe, nerfs, indigestion
<i>Ruta graveolens</i> L.	Lfidjel	feuilles	Décoction, inhalation	Personnes possédées, eczéma, conjonctivite, Problèmes d'estomac
<i>Citrus aurantium</i> L.	Narendj	Fruit	Se mange	Surpoids, anxiété
<b>Famille : Scrophulariaceae</b>				
<i>Verbascum thapsus</i> L.	Meslah eddar	Partie aérienne	Compresse	Infection respiratoire, incontinence urinaire
<b>Famille : Solanaceae</b>				
<i>Solanum tuberosum</i> L.	L batata	Fruit	Application locale	brulures, ulcère d'estomac
<b>Famille : Thymelaeaceae</b>				
<i>Daphne gnidium</i> L.	Lazaz, alzaz	Feuilles, graines	Décoction	Piqures d'insectes
<b>Famille : Urticaceae</b>				
<i>Urtica dioica</i> L.	Lharayg, azegtouf	Partie aérienne	Infusion, compresse	Rhumatisme, infections respiratoires
<b>Famille : Verbenaceae</b>				
<i>Aloysia citrodora</i> Palau	Tizana	Partie aérienne	Décoction	Froid, anxiété
<b>Famille : Zingiberaceae</b>				
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Zanjabir	Racines, tige	Infusion	Froid, estomac
<b>Famille : Zygophyllaceae</b>				
<i>Peganum harmala</i> L.	Harmel	Partie aérienne, graine	Inhalation	Stérilité, froid

D'après les résultats obtenus des questionnaires, la zone de Tizi Ouzou renferme une flore floristique importante. Cependant, il faudrait mettre en valeur et bénéficier de cette richesse.

On recense 88 espèces appartenant à 43 familles. Les plus importantes sont les *Lamiaceae* (14,77%), les *Asteraceae* (8,91%) et les *Apiaceae* (7,95%).

Une seule étude menée par Derridj *et al.* (2009) s'est intéressée à cette zone (Les régions de Boghni et des Ouadhias). Ces auteurs ont répertorié 114 plantes médicinales appartenant à 52 familles botaniques.

L'importance de l'effet thérapeutique des *Asteraceae* à Tassili N'ajjer (Sud Algérien) est signalée par Hammiche et Maiza (2006). En effet, ces auteurs signalent dans leur étude que 15% des plantes médicinales utilisées appartiennent à cette famille.

Une autre étude faite au Maroc a montré l'utilisation des *Asteraceae* et des *Lamiaceae* (18% et 15% respectivement). Ceci confirme l'intérêt de ces deux familles en thérapeutique (Benkhniq *et al.*, 2011).

#### 4.1. Parties utilisées

Toutes les parties des plantes semblent être bénéfiques pour soigner des maladies, à commencer des feuilles jusqu'aux racines. Cependant, les molécules bioactives sont présentes en abondance dans la partie aérienne, en particulier dans les feuilles. Les informations obtenues au près des personnes interviewées montrent que dans 33,94% des cas, les feuilles sont utilisées pour des préparations traditionnelles. L'étude a fait ressortir également que 22,95% des personnes interviewées utilisent toute la partie aérienne, 15,95% confectionnent des recettes à base de fruits, 10,09% appliquent des graines et 5,5% se soignent par des fleurs (Fig. 19).

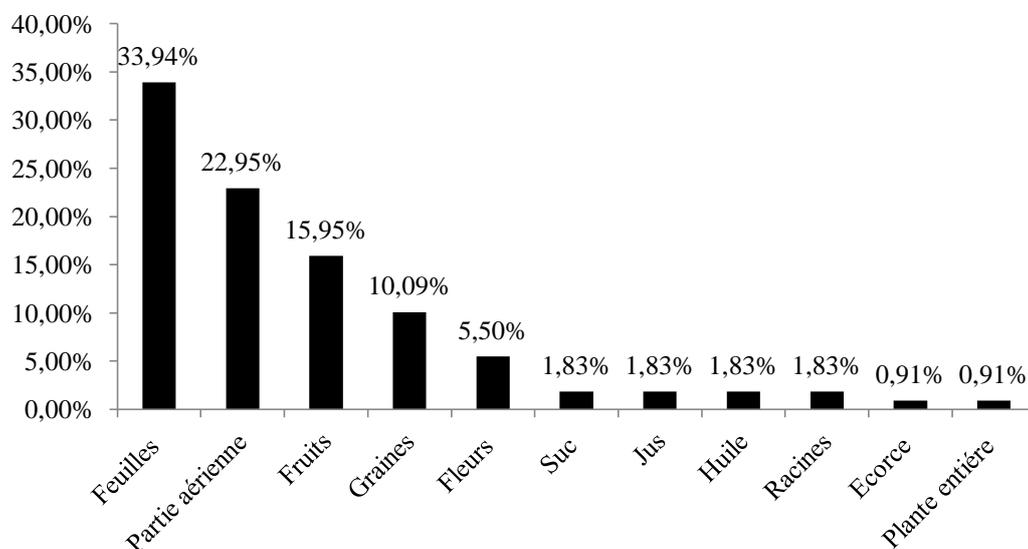
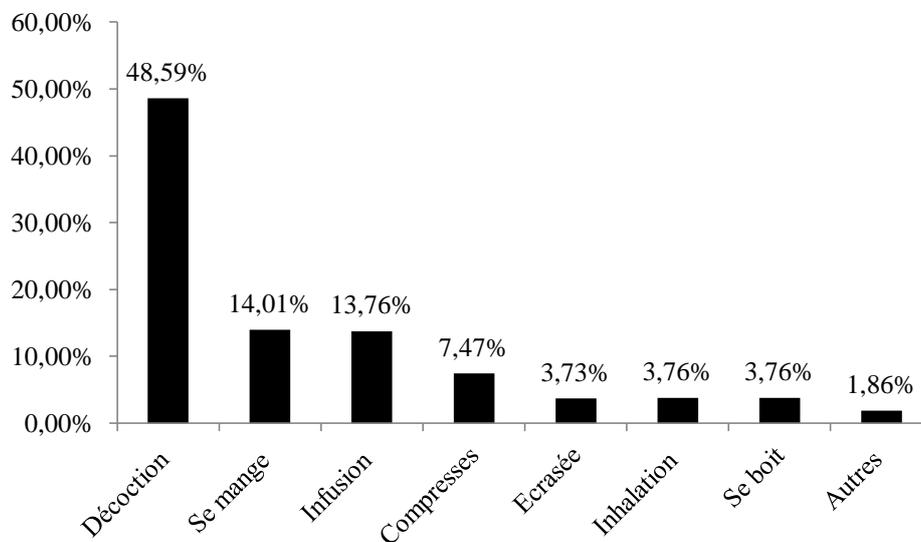


Figure 19: Parties utilisées de la plante

L'importance de la partie aérienne dans la médecine traditionnelle chez une population de Cote d'Ivoire est signalée par Adjanohoun et Aké Assi (1979). Ces derniers ont montré que les feuilles sont les plus utilisées avec un pourcentage de 59,10%. Zirihi (1991) a révélé que les feuilles étaient employées à 64,49 % par la population de Maroc.

#### 4.2. Méthodes de préparation: recettes

Il est important de signaler que les méthodes de préparation dépendent de la nature des métabolites et de la maladie à traiter. Dans la région d'étude, l'étude a fait ressortir que 48,59 % des préparations sont des décoctions. Les autres formules telles que les infusions et l'inhalation sont faiblement utilisées avec des pourcentages allant de 1,86% à 14,01% (Fig.20).



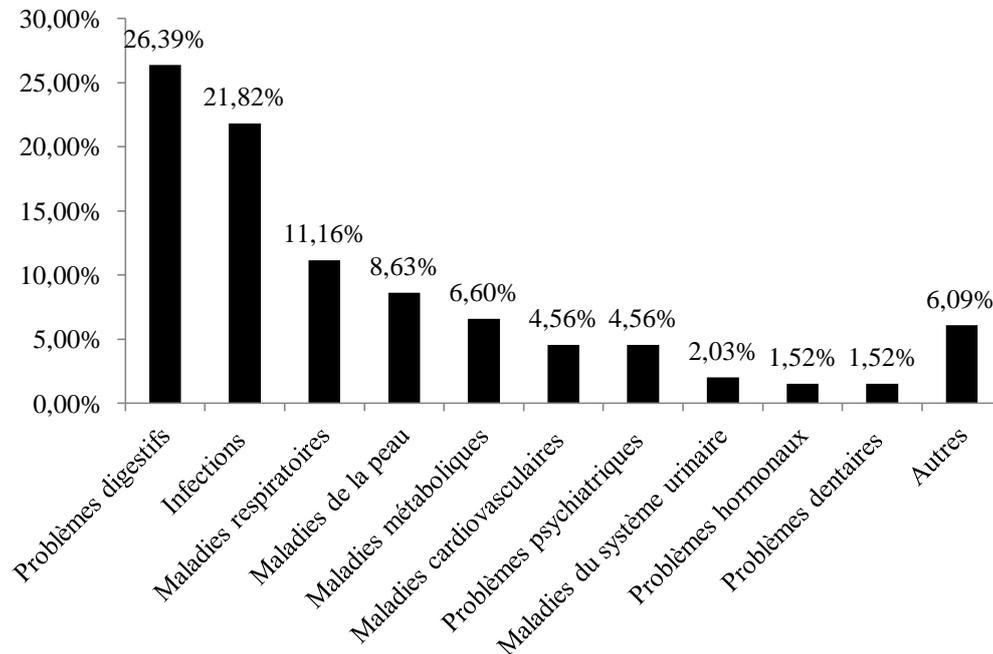
**Figure 20** : Méthodes de préparation (recettes)

Aux états Unis, et selon Rigat *et al.* (2007), la population de River Ter Valley prépare les plantes par décoction, que ce soit pour une utilisation interne ou externe. D'après ces auteurs, 86,9% des personnes interrogées préparent les plantes par décoction.

#### 4.3. Domaines d'indications thérapeutiques

Dans la zone d'étude, les plantes médicinales ont un large spectre d'application. Les résultats du questionnaire établi, montrent que certaines plantes ont une seule application, tel que

*Rhumnus alaternus*. Cette plante est utilisée uniquement pour remédier à l'ictère, d'autres plantes, comme *Urtica dioïca*, sont utilisées comme anti inflammatoires et antimicrobiennes. D'autre part, sur les 88 plantes recensées, 26,39% des usages sont consacrés pour remédier aux problèmes du système digestif et 21,82% pour les maladies infectieuses. Ceci montre que les plantes médicinales de la région de Tizi Ouzou sont vraiment recherchées dans les cas des infections (Fig. 21).



**Figure 21** : Domaines d'indications thérapeutiques

Il est important de signaler que la plupart des plantes utilisées par ce groupe autochtone sont utilisées par d'autres populations au Maroc, en Tunisie ou ailleurs en Algérie. Cependant, leurs domaines d'application sont parfois différents. A titre d'exemple, *Eucalyptus globulus*, utilisé au Maroc pour les soins de l'appareil circulatoire (Hseini et Kahouadji, 2007), est indiqué en Algérie (dans la zone étudiée) pour soigner les infections respiratoires.

Il faut noter aussi que quelques plantes médicinales sont parfois contre indiquées, c'est le cas de *Ruta graveolens* L., elle devient toxique à partir d'une certaine concentration.

#### 4.4. Choix des plantes retenues

De l'étude ethnopharmacologique, trois plantes ont été choisies: *Borago officinalis* L., *Rubus fruticosus* L. et *Urtica dioïca* L. Le choix de ces trois plantes a été basé sur :

- Les indications thérapeutiques des plantes (toux, bronchites) ;
- La disponibilité ;
- Le manque d'études de ces plantes sur les infections respiratoires.

### 5. Screening phytochimique

Les résultats du screening phytochimique des trois plantes retenues sont présentés dans le tableau 14.

**Tableau 14:** Screening phytochimique

Composant	<i>B. officinalis</i>	<i>R. fruticosus</i>	<i>U. dioïca</i>
<b>Tannins totaux</b>	++	++	+
<b>Tannin galliques</b>	-	++	++
<b>Tannins catéchiques</b>	+	++	++
<b>Flavonoïdes</b>	++	++	+
<b>Anthocyanes</b>	+	-	++
<b>Leuco anthocyanes</b>	-	-	-
<b>Alcaloïdes</b>	++	-	++
<b>Sénosides</b>	-	+	-
<b>Saponines</b>	++	++	++
<b>Irridoïdes</b>	-	-	-
<b>Glycosides</b>	++	-	++
<b>Mucilages</b>	++	-	++
<b>Coumarines</b>	-	++	-
<b>Quinones</b>	-	-	-

++ Richesse

+ Présence

- Absence

D'après les résultats obtenus, les trois plantes analysées contiennent les tannins totaux, les tannins catéchiques, les flavonoïdes et les saponines. On note l'absence de leuco anthocyanes, d'irridoïdes et de quinones. Les plantes, *U. dioïca* et *R. fruticosus* sont riches en tannins galliques, alors que *B. officinalis* et *U. dioïca* sont riches en anthocyanes, en alcaloïdes, en glycosides et en mucilages. Enfin, seule *R. fruticosus* contient les sénosides et les coumarines.

Pour *U. dioïca*, les résultats obtenus sont en accord avec ceux de Kais Kassim *et al.* (2013) en Irak. Ces auteurs ont trouvé des tannins, des flavonoïdes, des alcaloïdes et des glycosides. La seule différence réside dans le fait qu'*U. dioïca* récoltée du nord de l'Algérie contient d'autres molécules notamment des anthocyanes, des saponines et des mucilages. Un autre screening phytochimique sur *U. dioïca* récoltée du Pakistan montre l'absence des saponines et des coumarines (Khan *et al.*, 2011). Concernant les coumarines, une étude faite en Serbie a montré la présence de ce métabolite secondaire dans la partie aérienne de l'Ortie (Dejan Orčić, 2014).

D'autres travaux ont trouvé que les principaux composants chimiques d'*Urtica dioïca* sont les flavonoïdes, les tanins, les composés volatils, des acides gras, des polysaccharides, des stérols, des terpènes, des protéines, des vitamines et des minéraux (Bombardelli *et al.*, 1997 ; Ellnain-Wojtaszek, 1986; Krystofova, 2010).

Pour ce qui est de la Bourrache, Soroshzadeh *et al.* (2008) ont trouvé des tannins, des alcaloïdes et des mucilages dans les feuilles et les fleurs de la Bourrache récoltée en Iran. Ces résultats sont en accord avec ceux notés lors de notre étude. De même, N'Guessan *et al.* (2009), ont révélé la richesse de *Cordia vignei*, une plante de la même famille récoltée en Cote d'ivoire, en flavonoïdes, saponosides et alcaloïdes.

Concernant la Ronce, l'étude de Rameshwar Verma *et al.* (2014) a montré la présence des alcaloïdes, des flavonoïdes, des tannins, des saponines et des glycosides.

Ces résultats présentent une légère similitude avec ceux de notre étude. La différence concerne l'absence de glycosides et la présence d'autres composés tels que les sénosides et les coumarines dans la partie aérienne de la Bourrache récoltée à Tizi Ouzou.

Ces différences de composition phytochimique ne sont que le reflet de l'influence des facteurs biotiques et abiotiques sur la synthèse des métabolites secondaires par les plantes. En effet, il existe plusieurs facteurs externes pouvant influencer la composition chimique des métabolites secondaires: le sol, les agents pathogènes, la température, la lumière et le taux d'humidité (Bourgaud, 2012).

## **6. Rendements et caractérisation des huiles essentielles**

### **6.1. Rendements et caractéristiques organoleptiques**

Les rendements en huiles essentielles et les caractéristiques organoleptiques sont résumés dans le tableau 15.

**Tableau 15** : Rendements, couleurs, textures et odeurs des huiles essentielles

Plante	Rendement %MF	Couleur	Texture	Odeur
<i>Borago officinalis</i> L.	0.054 ± 0.009%	Transparente à blanchâtre	Limpide	Spécifique
<i>Rubus fruticosus</i> L.	0.05 ± 0.01%	Pale	Limpide	Citronnée
<i>Urtica dioïca</i> L.	0.1 ± 0.02 %	Jaune très clair	Limpide	Spécifique et forte

MF : matière fraîche

Le rendement en huiles essentielles est très faible surtout pour les deux plantes : la Bourrache et la Ronce. Selon Bruneton (1999), les trois plantes étudiées ne sont pas considérées comme étant des espèces végétales aromatiques, mais comme des plantes médicinales non aromatiques, d'où les faibles rendements en huiles. Les travaux de Salem *et al.* (2013) sur la Bourrache récoltée en Tunisie, dans les régions de Korba et de Beja, ont montré qu'au stade de la floraison, le rendement était de  $0,95 \pm 0,03\%$  et de  $0,29 \pm 0,03\%$  respectivement.

Pour les paramètres organoleptiques, les huiles des trois espèces ont une couleur claire, de transparente à jaune claire. Elles sont limpides sauf l'huile de la Bourrache, elle est transparente. L'odeur est caractéristique, excepté celle de la Ronce, elle est citronnée.

## 6.2. Caractérisation des huiles essentielles

Les résultats de la caractérisation par CG-SM des huiles essentielles de chaque plante sont représentés dans les tableaux 16, 17 et 18 (Annexe 1) :

**Tableau 16:** CG-SM des huiles essentielles de *Borago officinalis* L.

N°	R <sub>t</sub> (min)	Nom du composant	Famille	%
1	42,55	Trifluoromethyl	/	6,11
2	45,22	Thymol	Monoterpène	9,69
3	48,31	Verrucarol	/	06,93
4	55,87	<b>Spathulenol</b>	Sesquiterpène	<b>38,24</b>
5	56,19	Globulol	Sesquiterpène	10,02
6	57,60	Gamma-Himachalène	Sesquiterpène	07,84
7	59,07	Guaiol	Sesquiterpène	12,87
<b>Total</b>				91,70

L'analyse par CG-SM de l'huile essentielle de la Bourrache montre que les sesquiterpènes sont dominants dont le Spathulenol est le composé majoritaire avec un taux de 38,24%. Les monoterpènes sont minoritaires dont le plus représentatif est le thymol avec un taux de 9,69%. Ces résultats divergent avec ceux de M'hamedi *et al.* (2007). En effet ces auteurs ont trouvé comme composé majoritaire un sesquiterpène, le  $\beta$ - Caryophyllène (26%), non identifié lors de notre étude.

**Tableau 17:** CG-SM des huiles essentielles de *R. fruticosus* L.

N°	R <sub>t</sub> (min)	Nom du composant	Famille	%
1	26,42	Limonene	Monoterpène	13,09
2	27,16	Trans-3-carene-2-ol	/	4,21
3	42,55	Caryophyllène	Sesquiterpène	3,13
4	45,22	Thymol	Monoterpène	5,59
5	48,30	Veridiflorol	Sesquiterpène	4,02
6	53,23	Epiglobulol	Sesquiterpène	4,22
7	55,84	<b>Lanceol</b>	Sesquiterpène	<b>20,22</b>
8	56,18	Globulol	Sesquiterpène	5,15
9	59,07	Methyl steviol	/	14,12
10	63,78	Fenitrothion	Organophosphoré	12,85
11	65,43	Benzène, dodecyl	/	12,01
<b>Total</b>				<b>98,61</b>

D'après le tableau, le composé majoritaire est également un sesquiterpène, le Lanceol représentant 20,22%. Pour cette plante, les sesquiterpènes identifiés totalisent 36,74%.

Par manque de travaux sur la Ronce, nous avons comparé les résultats avec ceux d'une espèce de la même famille à savoir *Rosa damascena* Mill., l'huile essentielle de cette espèce récoltée en Iran, renferme 43 composés dont le citronellol comme composé dominant (25,1%) (Almasirad *et al.*, 2007). Il est clair que le composé majoritaire diffère de celui trouvé dans cette étude.

**Tableau 18:** CG-SM des huiles essentielles d'*U. dioïca*

N°	R <sub>t</sub> (min)	Nom du composant	Famille	%
1	1,11	Naphthalene	/	3,81
2	2,85	Thymol	Monoterpène	7,00
3	4,05	<b>Carvacrol</b>	Monoterpène	<b>20,10</b>
4	4,06	Eugenol	/	6,09
5	4,26	Terpineol	Monoterpène	7,52
6	4,61	Acide octanoïque	Acide	1,09
7	5,37	Acide decanoïque	Acide	9,85
8	20,14	Pyridoxine	/	3,99
9	22,77	Acide butanoïque	Acide	3,21
<b>Total</b>				<b>62,66</b>

A travers les résultats, l'huile essentielle de l'Ortie semble renfermer 9 composés totalisant un taux de 62,66%. Pour cette plante, les acides sont présents et les monoterpènes sont dominants : le carvacrol (20,10%), l'acide decanoïque (9,85%), le terpineol (7,52%) et le thymol (7,00%).

Des résultats similaires sont trouvés en Turquie. L'analyse de l'huile essentielle d'*U. dioïca* par GC-MS a révélé 43 composés, totalisant un taux de 95,8%. Le composé majoritaire identifié est le Carvacrol avec un taux de 38,2%. Les autres composés détectés sont le naphthalène (3,81%), le carvone (9,0%), (E)-anéthol (4,7%), l'hexahydrofarnesyl acetone (3,0%), (E)-geranyl acetone (2,9%), (E)- $\beta$ -ionone (2,8%) et le phytol (2,7%) (Gül *et al.*, 2012). Il est à noter à travers ces résultats que le carvacrol est un composé répandu chez l'Ortie avec un taux assez important.

## 7. Rendements et caractérisation des flavonoïdes

### 7.1. Rendements

Pour les trois plantes, l'extrait aqueux obtenu présente un aspect gélatineux. La couleur est rouge brique à marron pour l'extrait de la Bourrache et de la Ronce et verdâtre pour l'extrait de l'Ortie. Les rendements obtenus relatifs aux différents extraits (diéthylique, acétate

d'éthyle, butanolique et aqueux) à partir de 30 g de poudre végétale sont regroupés dans le tableau 19.

**Tableau 19:** Rendements de l'extraction des flavonoïdes

Les rendements en % de :	<i>Borago officinalis</i>	<i>Rubus fruticosus</i>	<i>Urtica dioïca</i>
Extraits d'ether di éthylique (flavonoïdes aglycones)	2,06%	2,99%	5,26%
Extraits d'acétate d'éthyle (flavonoïdes mono glycosides)	16,10%	3,10%	27,50%
Extraits butanoliques (flavonoïdes di et tri glycosides)	18,16%	63,20%	6,06%
Extraits aqueux (Flavonoïdes très polaires)	37,60%	29,39%	45,86%

Il ressort des données du tableau 19 que la Bourrache est riche en flavonoïdes très polaires (37,60%) mais très pauvre en flavonoïdes aglycones (2,06%). Par manque d'études sur les flavonoïdes de la Bourrache ce résultat n'a pu être comparé.

Le rendement en polyphénols de la même espèce récoltée en Iran était de 64,1 mg/g. Ce rendement élevé en polyphénols ne fait que confirmer la richesse de la Bourrache en métabolites secondaires (Aliakbarlu *et al.*, 2012).

L'Ortie est également riche en flavonoïdes polaires avec un pourcentage de 45.86% mais aussi pauvre en flavonoïdes aglycones (5,26%).

Par contre la Ronce a environ 30% de flavonoïdes très polaires (faible) contre plus de 60 % d'extrait butanolique (l'extrait le plus abondant) dans la plante de la présente étude. Les polyphénols totaux d'une *Rosaceae* totalisent un rendement d'environ 140 mg/100 g de la matière. Ce rendement est assez élevé, mais on ne peut pas connaître le pourcentage de chaque extrait phénolique (Benvenuti, 2006).

## 7.2. Dosage

Les résultats du dosage des flavonoïdes très polaires sont donnés dans le tableau 20.

**Tableau 20:** Résultats du dosage des flavonoïdes de la Bourrache, la Ronce et de l'Ortie

<b>Plantes</b>	<b>Concentration en mg équivalent de quercétine/ml</b>
<b>Bourrache</b>	81,12 mg/ml
<b>Ronce</b>	84,27 mg/ml
<b>Ortie</b>	71,093 mg/ml

Les résultats du dosage des flavonoïdes très polaires révèlent que les extraits de la Bourrache, de la Ronce et de l'Ortie contiennent respectivement 81,12, 84,27 et 71,093 mg équivalent de quercétine/ ml d'extrait (Annexe 2). Il ressort ainsi, que la teneur en flavonoïdes est plus élevée chez la Ronce.

L'unique étude réalisée sur les flavonoïdes de l'Ortie a donné une concentration de  $20,29 \pm 0,48$  mg de quercétine par ml de l'extrait (Kukrić, 2012). Cette plante est beaucoup moins riche en flavonoïdes que la notre qui contient 81,12 mg/ml.

Une étude du dosage des flavonoïdes dans l'extrait aqueux de la Bourrache a donné une concentration de  $20,79 \pm 2,95$  mg/g. Ce rendement est relativement faible, il faut noter aussi que l'extrait aqueux contient en plus des flavonoïdes d'autres métabolites secondaires (Zemmouri *et al.*, 2014).

Ces plantes étudiées sont riches en flavonoïdes d'après les résultats obtenus, mais appart une seule étude de l'Ortie et de la Bourrache, aucune étude faite sur les flavonoïdes ne permet de comparer nos résultats.

### **7.3. Caractérisation des flavonoïdes par CLHP**

#### **7.3.1. La Bourrache**

Les résultats sont consignés dans le tableau 21.

**Tableau 21:** La CLHP des flavonoïdes de la Bourrache

N°	R <sub>t</sub> (min)	Nom de la molécule
1	18,0	Acide gallique
2	28,0	Acide caféique
3	34,0	Acide <i>p</i> -coumaric
4	44,0	Rutine
5	46,0	Acide rosmarinique
6	62,0	Quercetine

L'analyse qualitative des flavonoïdes par CLHP a montré la présence de 21 composés (Annexe 3) dont six ont pu être identifiés avec succès selon la disponibilité des flavonoïdes standards. Les composés identifiés sont: acide gallique, acide caféique, acide *p*-coumarique, rutine, acide rosmarinique et quercetine.

En comparant nos résultats avec ceux trouvés par M'Hamedi *et al.*, on retrouve quelques composés en commun entre la Bourrache récoltée en Algérie et celle récoltée en Tunisie. Les auteurs ont identifié l'acide gallique (22,06 mg/100 g), l'acide chlorogénique (54,26 mg/100 g), l'acide rosmarinique (165,64 mg/100 g), l'acide syringique (23,93 mg/100 g), l'acide *p*-coumarique (91,17 mg / 100 g) et l'acide trans-cinnamique (49,64 mg/100 g). La rutine et la quercétine sont décrites pour la première fois dans ce travail.

Wettasinghe *et al.*, (2001) ont identifié l'acide rosmarinique dans les graines de Bourrache. De même, Bandoniene et Murkovic (2002) ont montré la présence de cet acide phénolique également dans des feuilles de Bourrache.

### 7.3.2. La Ronce

Les résultats sont donnés dans le tableau 22.

**Tableau 22:** La CLHP des flavonoïdes de la Ronce

N°	R <sub>t</sub> (min)	Nom de la molécule
1	17,5	Acide gallique
2	24,0	Gallocatechine
3	26,5	Acide protocatechique
4	30,0	Catechine
5	34,5	Acide caffeique
6	40,5	Rutine
7	50,0	Acide ellagique
8	56,0	Myricetine

On remarque pour l'extrait flavonoïdique de l'Ortie, huit composés sur dix huit ont été identifiés par l'analyse CLHP. Ces composés sont l'Acide syringique, l'acide coumarique, l'acide férulique, la rutine, l'acide ellagique, le myricétine, la quercétine et le kaempférol.

Des études précédentes ont montré que les acides phénoliques, comme l'acide ellagique, l'acide gallique, l'acide caféique et l'acide p-coumarique, ainsi que les flavonoïdes, tels que la quercétine, l'hypéroside, le kaempférol, le myricitin, la catéchine, l'épicatéchine, le gallate d'épicatéchine, la procyanidines B1 et la quercétine-3-D-glucoside, ont été identifiés dans les fruits et les feuilles de *R. fruticosus* (Milivojevic *et al.*, 2011; Carlsen *et al.*, 2003; Radovanović *et al.*, 2013).

Beaucoup de ces composés ont été identifiés dans cette étude, les autres pourraient être présents mais non identifiés.

### 7.3.3. L'Ortie

Les résultats sont présentés dans le tableau 23.

**Tableau 23:** La CLHP des flavonoïdes de l'ortie

N°	R <sub>t</sub> (min)	Nom de la molécule
1	27,0	Acide syringique
2	33,5	Acide coumarique
3	37,0	Acide férulique

<b>4</b>	44,0	Rutine
<b>5</b>	52,5	Acide ellagique
<b>6</b>	57,0	Myricétine
<b>7</b>	62,5	Quercétine
<b>8</b>	65,5	Kaempférol

Pour cette plante, huit composés sur dix sept ont été identifiés par l'analyse CLHP des flavonoïdes. Les composés sont: Acide syringique, acide coumarique, acide férulique, rutine, acide ellagique, myricétine, quercétine, kaempférol.

Une étude sur la CLHP de l'extrait méthanolique de l'Ortie réalisée en Chine a montré la présence de huit constituants chimiques identifiés, qui sont: l'acide protocatéchuique, l'acide salicylique, la lutéoline, la gossypétine, la rutine, le kaempférol-3-O-rutinoside, le Kaempférol-3-O-glucoside et l'acide chlorogénique (Sobia Ramzan, 2014). Les composés retrouvés en commun dans notre étude sont la rutine et le kaempferol.

Une autre recherche réalisée en 2012 par Farhan *et al.* (2012) a abouti aussi à la détection du Kaempferol dans les feuilles de l'Ortie.

Enfin, une CLHP des composés phénoliques des racines, tiges, feuilles (plante entière) de l'Ortie a montré la présence de 45 composés phénoliques, dont les plus abondant sont l'acide 5-O-caféylquinique, la rutine et l'isoquercitrine (Dejan Orčić *et al.*, 2014).

L'acide caféique a été détecté pour la première fois dans les feuilles de l'Ortie dans une étude faite par Grevsen (2008).

Des composés comme l'acide ellagique et la mirycétine ont été détectés pour la première fois chez l'Ortie récoltée au nord de l'Algérie (La présente étude).

## **8. Pouvoir antimicrobien des extraits des plantes**

### **8.1. Etude qualitative**

L'étude qualitative du pouvoir antimicrobien des extraits bruts de *B. officinalis*, *R. fruticosus* et *U. dioïca* est évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition. Le tableau 24 montre l'effet antimicrobien avec les diamètres d'inhibition des extraits des plantes étudiées :

**Tableau 24:** Diamètre d'inhibition des extraits des trois plantes

Souche	Diamètres d'inhibition (mm) de :					
	<i>Borago officinalis</i>		<i>Rubus fruticosus</i>		<i>Urtica dioïca</i>	
	H.E.	Flavonoïde	H.E.	Flavonoïde	H.E.	Flavonoïde
<i>Acinetobacter baumannii</i>						
1	6,0	17,8±0,1	6,0	20,3±0,3	6,0	<b>14,7±0,9</b>
2	6,0	17,5±0,1	6,0	17,4±0,1	6,0	13,6±0,1
3	6,0	<b>19,3±0,9</b>	6,0	<b>21,6±0,9</b>	6,0	10,2±0,1
4	6,0	14,6±0,1	6,0	21,0±0,2	6,0	9,3±0
5	6,0	13,7	6,0	16,8	6,0	11,4
6	6,0	15,9	6,0	15,3	6,0	10,5
7	6,0	18,3	6,0	17,8	6,0	10,0
8	6,0	18,0	6,0	14,3	6,0	8,6
9	6,0	16,4	6,0	21,5	6,0	9,1
10	6,0	18,0	6,0	20,0	6,0	6,9
<i>Burkholderia cepacia</i>						
1	6,1±0	25,0±0,2	10,2±0,2	25,2±0,1	10,2±0,9	15,9±0,2
2	9,8±0	<b>25,9±0,9</b>	10,5±0,1	24,8±0,4	10,5±0,5	16,2±0
3	7,5±0,2	20,9±0,2	9,9±0,2	22,1±0,2	9,9±0,1	<b>16,8±0,4</b>
4	8,2±0	22,8±0,0	10,5±0,1	22,9±0	10,5±0,3	15,8±0,1
5	8,0	25,6	10,8	22,6	10,8	17,8
6	7,9	24,5	9,5	23,6	9,5	14,3
7	6,1	24,9	11,0	25,8	10,9	12,9
8	9,0	24,8	<b>11,2</b>	25,9	10,8	13,5
9	9,2	22,9	11,0	<b>26,0</b>	<b>11,0</b>	13,4
10	<b>9,9</b>	23,2	10,6	25,8	11,0	13,6
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>						
1	8,0±0,5	6,0±0,9	9,8±0,1	6,0	8,1±0	6,0
2	12,1±0,1	6,0	<b>11,5±1,1</b>	6,2±0	<b>8,4±0,1</b>	6,0
3	<b>15,5±0,3</b>	<b>8,9±0,1</b>	8,9±0,6	6,5±0	7,9±0,1	<b>6,9±0,1</b>
4	14,1±0,1	8,1±0,3	8,2±0	<b>6,8±0</b>	8,4±0,1	6,0
<i>Escherichia coli</i>						
1	<b>8,2±0,1</b>	15,5±0	9,0±0,2	<b>21,5±1</b>	6,5±0	10,9±0
2	8,0±0	22,1±0,1	9,0±0	16,02±1,1	6,4±0	12,5±0,4
3	6,4±0	12,8±0,2	8,9±0,1	12,0±0,8	6,0	11,3±0,1
4	6,4±0	14,3±0,1	9,5±0,1	13,6±0,1	6,0	12,0±0,1
5	8,1	<b>24,8</b>	9,9	13,5	<b>6,8±0,1</b>	12,0
6	7,9	23,9	<b>10,0</b>	15,8	6,2±0	<b>12,9</b>

7	6,0	9,9	8,5	12,01	6,0	12,0
8	6,0	8,1	8,1	12,0	6,0	11,1
9	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
10	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
<i>Enterobacter cloacae</i>						
1	9,1±0	14,9±0,2	6,8±0,1	15,2±0,2	6,9±0,1	<b>14,8±0,9</b>
2	<b>9,8±0</b>	12,3±0	6,0	14,2±0,2	7,5±0	13,4±0,1
3	9,6±0	<b>15,0±0,8</b>	7,5±0,1	15,1±0	6,0	13,6±0,2
4	8,3±0	9,2±0,1	6,4±0	14,9±1	6,0	7,9±0,1
5	9,2	14,1	8,2±0,1	11,8	6,3±0	13,9
6	7,6	14,5	8,4	12,3	<b>10,0±0</b>	13,9
7	7,9	10,9	7,4	14,5	8,4	11,9
8	7,8	11,5	7,9	<b>15,1</b>	6,0	11,3
9	8,9	12,3	<b>8,5</b>	14,9	6,7	12,0
10	9,3	13,1	8,0	15,2	6,1	12,0
<i>Haemophylus Influenisiae</i>						
1	<b>8,9±0,1</b>	20,8±0,2	8,1±0,1	17,0±0,9	7,1±0	18,1±0,4
2	8,5±0	<b>24,0±0,3</b>	8,4±0,1	17,9±0,8	6,8±0,1	17,4±0,2
3	8,7±0,6	20,1±1	<b>8,9±0,5</b>	16,5±0,1	6,0	<b>18,1±0,6</b>
4	8,5±0	20,5±0	8,1±0,1	19,5±0	7,6±0,1	15,1±0,1
5	8,0	20,4	8,0	21,6	<b>7,7</b>	18,0
6	8,2	20,5	8,3	20,8	6,5	17,3
7	8,9	23,8	7,9	15,9	6,0	17,0
8	7,1	22,3	7,4	<b>22,1</b>	6,1	17,4
9	6,0	19,5	6,0	6,0	6,0	16,0
10	6,0	19,9	6,0	6,0	6,0	16,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>						
1	<b>6,8±0</b>	14,8±0,9	6,5±0,2	16,1±0,3	6,0	10,6±0,1
2	6,1±0	14,0±0	7,2±0,4	14,9±0,2	6,0	9,9±0,2
3	6,0	14,2±0,2	6,9±0,1	14,5±0,5	6,0	12,0±0
4	6,0	14,1±0,4	6,0	15,3±0,1	6,0	13,0±0,1
5	6,9	<b>15,2</b>	6,5±0	11,6	6,0	12,0
6	6,6	15,3	6,9	14,3	6,0	<b>13,5</b>
7	6,4	14,1	6,0	<b>16,9</b>	6,0	13,1
8	6,0	6,0	<b>7,3</b>	15,3	6,0	6,5
9	6,0	14,5	6,0	10,2	6,0	6,0
10	6,0	6,0	6,0	11,1	6,0	6,0
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>						
1	6,2±0	24,01±0,6	6,9±0,1	<b>20,09±1,1</b>	6,0	12,1±0,4
2	<b>8,9±0,1</b>	<b>24,9±0,9</b>	9,1±0	18,01±0,5	<b>6,9±0</b>	<b>12,5±0</b>

3	7,6±0,1	20,09±0,8	9,2±0,1	18,4±0,2	6,7±0,1	11,9±0,2
4	7,4±0,1	19,0±0	<b>9,5±0</b>	12,1±0,3	6,8±0,3	12,0±0
5	7,1	19,5	9,1	12,9	6,8	12,1
6	7,9	19,9	9,3	12,0	6,9	12,2
7	6,9	19,5	9,5	12,0	6,5	12,2
8	6,0	15,0	9,1	12,6	6,0	10,0
9	6,0	15,6	7,1	12,1	6,0	10,2
10	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>						
1	7,3±0,1	10,9±0,6	10,0±0	14,9±0,2	6,0	14,1±0,1
2	8,1±0,5	14,5±0	6,9±0,3	17,9±0	6,0	13,8±0
3	7,9±0,1	14,3±0,1	7,1±0,1	20,1±0,1	6,0	17,6±0
4	<b>8,4±0</b>	12,3±0,4	10,0±0	19,2±0,1	6,0	<b>21,3±0,9</b>
5	7,9	10,1	7,8	<b>25,1</b>	6,0	11,9
6	7,9	13,9	8,3	23,9	6,0	17,2
7	7,1	14,3	<b>10,1</b>	16,0	6,0	18,9
8	6,0	10,8	6,0	22,2	6,0	17,8
9	6,0	<b>15,2</b>	6,5	14,2	6,0	17,8
10	6,0	11,6	6,0	14,8	6,0	10,9
<i>Staphylococcus aureus</i>						
1	8,5±0	26,1±0,8	10,2±0,1	16,8±0,2	<b>13,1±0</b>	8,2±0,1
2	12,0±0	<b>26,9±0,1</b>	9,9±0	16,4±0,4	12,9±0	8,9±0
3	7,9±0,1	25,1±0,3	8,1±0,1	<b>16,9±0,3</b>	10,2±0,1	7,5±0,2
4	10,5±0	25,5±0	6,3±0,2	16,5±0,1	12,8±0	10,8±0,1
5	11,2	18,1	11,8	16,2	13,0	9,6
6	9,1	22,2	10,3	16,1	13,1	9,9
7	<b>12,8</b>	26,2	10,5	16,3	12,2	10,1
8	6,0	21,5	<b>13,6</b>	16,3	10,4	<b>12,1</b>
9	7,1	24,7	12,9	12,6	10,6	7,8
10	6,9	22,9	12,2	16,9	10,0	6,0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>						
1	13,2±0,2	19,5±0,5	10,9±0,1	21,9±0,1	11,0±0	6,0
2	12,9±0,1	17,0±0,2	10,5±0,2	20,2±0,2	<b>11,1±0,1</b>	6,0
3	<b>13,5±0,1</b>	22,1±0,9	11,2±0,1	22,0±0	10,8±0,1	6,0
4	13,1±0,1	19,9±0	11,0±0	19,8±0,3	11,0±0,1	6,0
5	13,0	19,8	12,5	11,6	10,5	6,0
6	12,8	19,3	12,3	19,9	10,7	6,0
7	11,5	18,7	10,4	19,5	11,0	6,0
8	12,5	20,3	11,9	12,8	10,9	6,0
9	12,8	<b>26,0</b>	<b>12,6</b>	<b>26,1</b>	10,1	6,0

<b>10</b>	13,1	25,0	12,0	19,1	9,8	6,0
<i>Candida albicans</i>						
<b>1</b>	9,2±0,2	12,0±0,1	9,6±0,1	17,2±0,3	7,2±0,1	<b>15,2±0,3</b>
<b>2</b>	8,9±0,1	21,5±0	9,6±0,5	18,9±0,3	10,9±0,2	13,0±0
<b>3</b>	11,1±0,1	19,5±0	9,4±0	<b>22,6±0,5</b>	9,2±0,1	13,0±0,1
<b>4</b>	10,3±0,1	22,6±0,9	<b>9,9±0,2</b>	19,5±0,4	9,6±0,1	11,4±0
<b>5</b>	<b>11,3</b>	<b>22,3</b>	9,0	17,8	<b>11,4</b>	14,6

Selon l'effet des extraits des plantes, on remarque qu'*E. coli* est sensible aux flavonoïdes de la Bourrache avec un diamètre d'inhibition maximale de 24,8 mm et aux flavonoïdes de la Ronce et de l'Ortie avec des zones d'inhibition atteignant les 21,5 mm et 12,9 mm respectivement. Par contre, les huiles essentielles sont moins efficaces avec des zones d'inhibition inférieures à celles des flavonoïdes: 8,2 mm pour l'huile de la Bourrache, 10,0 mm pour l'huile de la Ronce et 6,8 mm pour l'huile de l'Ortie.

Les souches d'*Acinetobacter baumannii* sont toutes sensibles aux flavonoïdes, avec des zones d'inhibition maximales de 19,3 mm pour la Bourrache, de 21,6 mm pour la Ronce et de 14,7 mm pour l'Ortie. Mais toutes sont résistantes aux huiles essentielles.

*Burkholderia cepacia* est une bactérie généralement sensible à certains antibiotiques comme la pipéraciline, la ceftazidime et la ciproflaxine (Plésiat, 1999), parfois résistante à d'autres. Dans ce travail, elle n'a montré aucune résistance vis-à-vis des extraits. Avec les flavonoïdes de la Ronce, les diamètres d'inhibition atteignent 26,0 mm, qui est une zone d'inhibition très importante. Pour les huiles essentielles, le diamètre d'inhibition atteint 11 mm seulement.

Pour *Enterobacter cloacae*, elle est sensible à tous les extraits testés, mais ne présente pas de diamètres d'inhibition très grands comme pour *Burkholderia cepacia* par exemple. Le diamètre d'inhibition calculé est de 15,1 mm, enregistré avec les flavonoïdes de la Ronce. Les huiles essentielles se sont montrées quand à elles moins actives avec des diamètres d'inhibition ne dépassant pas les 10,0 mm.

Certaines souches de *Klebsiella pneumoniae* sont résistantes aux extraits, d'autres en sont sensibles. La plus sensible présente un diamètre d'inhibition de 16,9 mm aux flavonoïdes de la Ronce toujours.

*Haemophilus Influenzae* est aussi une bactérie qui s'est montrée sensible aux extraits des plantes étudiées dans ce travail. Les diamètres d'inhibition sont assez importants, avec un pic de 24,0 mm pour les flavonoïdes de la Bourrache et de 8,9 mm pour les huiles essentielles.

Pour *Pseudomonas aeruginosa*, la plus grande sensibilité est enregistrée avec les flavonoïdes de la Bourrache avec une zone d'inhibition égale à 24,9 mm. Les autres soit résistantes, soit sensibles mais présentent un petit diamètre d'inhibition.

Concernant *Pseudomonas fluorescens*, il s'avère qu'elle est considérablement sensible aux flavonoïdes des trois plantes avec des diamètres d'inhibition allant jusqu'à 25,1 mm pour la Ronce. Certaines souches se sont montrées résistantes aux huiles essentielles de l'Ortie surtout, d'autres en sont sensibles à des diamètres d'inhibition ne dépassant pas les 10,1 mm.

Pour les souches de *Corynebacterium diphtheriae*, la plupart d'entre elles ne sont pas très sensibles aux extraits flavonoïdiques des plantes étudiées. Les diamètres d'inhibition sont très faibles, allant de 8,9 mm à 6,2 mm. L'extrait qui a donné un diamètre de 8,9 mm est le flavonoïde de la Bourrache. Cependant, les huiles essentielles ont donné des diamètres d'inhibition atteignant 15,5 mm. Les huiles ont été plus actives contre cette bactérie Gram +. *Staphylococcus aureus*, bactérie renommée par sa résistance, était moyennement sensible aux flavonoïdes des plantes étudiées avec des zones d'inhibition maximales rencontrées chez la Bourrache (26,9 mm). Les huiles essentielles ont été également actives contre cette bactérie Gram + donnant des diamètres d'inhibition de 12,8 mm, 13,6 mm et 13,1 mm pour la Bourrache, la Ronce et l'Ortie respectivement.

Quant à *Streptococcus pneumoniae*, les flavonoïdes de la Bourrache et de la Ronce ont donné des diamètres d'inhibition de 26,0 mm et 26,1 mm respectivement. Alors que ceux de l'Ortie ont donné un diamètre maximale de 11,1 mm. Les huiles essentielles ont été aussi actives contre cette bactérie Gram +. Les diamètres d'inhibition sont de 13,5 mm, 12,6 mm et 11,1 mm.

Même pour les bactéries Gram+ qui sont généralement sensibles aux huiles essentielles, nos huiles essentielles ont donné des activités plus fortes par rapport à celle Gram – mais les diamètres d'inhibition ne dépassent pas les 16 mm.

La seule levure isolée dans ce travail, *Candida albicans*, elle s'est révélée largement sensible et a montré sa plus grande sensibilité face à l'extrait flavonoïdique de la Bourrache et de la Ronce (22,3 mm, 22,6 mm).

D'après les résultats obtenus ci-dessus, on remarque clairement que les flavonoïdes sont plus actifs contre les souches microbiennes que les huiles essentielles en présentant des zones d'inhibition largement plus importantes. Les plantes les plus actives sur les souches testées sont *Borago officinalis* et *Rubus fruticosus*.

Ces résultats sont confirmés par les tests significatifs avec un  $p < 0,05$ .

## 8.2. Concentrations Minimales Inhibitrices

Les résultats des CMI sont présentés dans le tableau 25. Les CMI de l'extrait brut qui n'a pas été actif n'ont pas été faites.

**Tableau 25:** Tableau représentant les CMI des six extraits

Souche	CMI (mg/ml) de :					
	<i>Borago officinalis</i>		<i>Rubus fruticosus</i>		<i>Urtica dioïca</i>	
	H.E.	Flavonoïde	H.E.	Flavonoïde	H.E.	Flavonoïde
<i>Escherichia coli</i>						
1	E.B.	1/2	E.B.	1/16	E.B.	1/2
2	E.B.	1/8	E.B.	1/8	E.B.	1/2
3	E.B.	1/2	E.B.	1/4	E.B.	1/2
4	E.B.	1/4	E.B.	1/4	E.B.	1/2
5	E.B.	<b>1/16</b>	E.B.	1/4	E.B.	1/2
6	E.B.	<b>1/16</b>	1/2	1/4	E.B.	1/2
7	6.00	E.B.	E.B.	1/2	6.00	1/2
8	6.00	E.B.	E.B.	1/2	6.00	1/2
9	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
10	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
ATCC 11229	E.B.	1/16	1/2	1/16	E.B.	1/4
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>						
1	E.B.	<b>1/16</b>	E.B.	1/16	6.00	1/4
2	1/2	<b>1/16</b>	1/2	1/8	E.B.	1/4
3	E.B.	1/8	1/2	1/8	E.B.	1/4
4	E.B.	1/8	1/2	1/4	E.B.	1/4
5	E.B.	1/4	1/2	1/4	E.B.	1/4
6	E.B.	1/4	1/2	1/2	E.B.	1/2
7	E.B.	1/4	1/2	1/4	E.B.	1/2
8	6.00	1/4	1/2	1/4	6.00	E.B.
9	6.00	1/4	E.B.	1/4	6.00	1/2
10	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
ATCC 15442	1/2	1/16	1/4	1/16	1/2	1/16
<i>Burkholderia cepacia</i>						
1	6.1	<b>1/64</b>	1/2	1/64	E.B.	1/4
2	E.B.	1/32	1/2	1/32	E.B.	1/4
3	E.B.	1/16	E.B.	1/8	E.B.	1/4
4	E.B.	1/16	1/2	1/16	E.B.	1/4
5	E.B.	1/32	1/2	1/8	E.B.	1/4

6	E.B.	1/16	E.B.	1/16	E.B.	1/4
7	E.B.	1/16	1/4	1/32	E.B.	1/2
8	E.B.	1/16	1/2	1/32	1/2	1/4
9	E.B.	1/8	1/2	<b>1/64</b>	1/2	1/4
10	1/2	1/8	1/2	1/32	1/2	1/4
<i>Haemophilus Influenisiae</i>						
1	1/2	1/16	E.B.	1/4	E.B.	1/4
2	E.B.	<b>1/32</b>	E.B.	1/4	E.B.	1/4
3	E.B.	1/16	E.B.	1/4	6.0.	1/8
4	E.B.	1/16	E.B.	1/8	E.B.	1/4
5	E.B.	1/16	E.B.	1/8	E.B.	1/8
6	E.B.	1/16	E.B.	1/8	E.B.	1/4
7	E.B.	1/16	E.B.	1/8	6.00	1/2
8	E.B.	1/16	E.B.	1/16	6.1	1/8
9	6.00	1/8	6.00	6.0	6.00	1/4
10	6.00	1/8	6.00	<b>6.0</b>	6.00	1/4
ATCC 10211	1/4	1/32	½	1/8	E.B.	1/4
<i>Pseudomonas fluorescens</i>						
1	E.B.	1/2	1/2	1/16	6,0	1/4
2	E.B.	<b>1/8</b>	E.B.	1/8	6,0	1/4
3	E.B.	<b>1/8</b>	E.B.	1/8	6,0	1/4
4	E.B.	1/8	1/2	1/8	6,0	1/8
5	E.B.	1/2	E.B.	1/64	6,0	1/2
6	E.B.	1/4	E.B.	1/16	6,0	1/4
7	E.B.	1/4	1/2	1/32	6,0	1/4
8	6.00	1/2	6.00	1/8	6,0	1/4
9	6.00	1/8	E.B.	1/16	6,0	1/4
10	6.00	1/4	6.00	1/16	6,0	1/2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>						
1	E.B.	1/4	E.B.	1/4	6.0	E.B.
2	6,0	1/4	E.B.	1/4	6.0	E.B.
3	6.0	1/4	E.B.	1/4	6,0	1/2
4	6.0	1/4	6.0	1/4	6.0	1/2
5	E.B.	1/8	E.B.	1/2	6,0	1/2
6	E.B.	1/8	E.B.	1/4	6,0	1/2
7	E.B.	1/4	6.0	<b>1/8</b>	6.0	1/2
8	6.0	6.0	E.B.	1/4	6.0	E.B.
9	6.0	1/4	6.0	E.B.	6.0	6.0
10	6.0	6.0	6.0	1/2	6.0	6.0
ATCC 13883	E.B.	1/8	E.B.	1/8	1/2	1/2

<i>Acinetobacter baumannii</i>						
1	6.0	1/4	6.0	1/8	6.0	1/4
2	6.0	1/4	6.0	1/4	6.0	1/4
3	6.0	<b>1/8</b>	6.0	1/8	6.0	1/2
4	6.0	1/4	6.0	1/8	6.0	E.B.
5	6.0	1/2	6.0	1/4	6.0	1/2
6	6.0	1/4	6.0	1/4	6.0	1/2
7	6.0	1/4	6.0	1/4	6.0	1/2
8	6.0	1/8	6.0	1/4	6.0	E.B.
9	6.0	1/4	6.0	1/8	6.0	E.B.
10	6.0	1/4	6.0	1/8	6.0	E.B.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>						
1	1/8	1/4	1/16	1/2	1/4	¼
2	1/16	1/4	1/32	1/2	1/4	¼
3	1/16	1/2	1/16	1/4	1/4	1/8
4	1/8	1/4	1/16	1/2	1/4	¼
5	1/8	<b>1/8</b>	1/16	1/2	E.B.	6.0
6	1/16	<b>1/8</b>	1/16	1/2	1/8	1/4
7	1/8	<b>1/8</b>	1/16	1/2	½	E.B.
8	1/16	1/4	1/16	<b>1/4</b>	¼	1/2
9	1/16	6.0	1/8	6.0	1/4	1/4
10	1/16	6.0	1/8	6.0	E.B.	6.0
ATCC 10015	1/16	1/8	1/32	1/8	1/8	1/8
<i>Staphylococcus aureus</i>						
1	1/8	1/8	1/2	1/8	1/8	1/8
2	1/32	1/4	1/4	1/8	1/8	1/4
3	1/16	1/8	1/2	1/8	1/4	1/4
4	1/32	1/8	1/4	1/8	1/2	1/4
5	1/8	1/8	1/8	1/16	1/2	1/2
6	1/16	1/4	1/4	1/8	1/2	1/2
7	1/16	1/4	1/4	1/4	1/2	1/2
8	1/16	1/16	1/4	1/16	1/4	1/2
9	1/8	<b>1/64</b>	1/8	<b>1/64</b>	1/4	1/2
10	1/16	1/32	1/8	1/32	1/4	1/2
ATCC 6538	1/32	1/16	1/8	<b>1/64</b>	1/4	1/8
<i>Enterobacter cloacae</i>						
1	1/2	1/4	1/2	1/4	1/4	1/4
2	E.B.	1/4	1/2	1/4	1/4	1/4
3	1/2	<b>1/8</b>	1/2	1/4	6.0	1/4
4	E.B.	1/2	E.B.	E.B.	6.0	E.B.

5	1/2	1/4	1/2	1/2	6,3	1/4
6	E.B.	1/4	1/2	1/4	1/4	1/4
7	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
8	1/2	1/2	1/4	1/2	6,0	1/2
9	1/4	1/2	1/4	1/2	E.B.	1/2
10	1/2	1/4	1/2	1/4	6,1	1/2
<b>ATCC 13047</b>	1/4	1/8	1/4	1/4	1/2	1/4
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>						
1	1/2	6.0	1/4	6.0	1/2	½
2	1/4	6.0	1/8	1/2	1/4	½
3	1/16	1/2	1/2	E.B.	E.B.	E.B.
4	1/8	1/2	1/4	E.B.	1/2	E.B.
<i>Candida albicans</i>						
1	1/2	1/2	1/2	1/8	1/2	1/4
2	E.B.	1/16	1/2	1/8	1/2	1/8
3	1/2	1/16	1/2	1/16	1/2	1/8
4	1/2	1/32	1/2	1/8	1/2	1/4
5	1/2	1/16	½	1/8	1/4	1/4
<b>ATCC 10231</b>	1/4	1/32	1/4	1/16	1/8	1/16

Au vu des résultats obtenus, on remarque que l'activité antimicrobienne des flavonoïdes extraits à partir des trois plantes est plus importante que celle des huiles essentielles. Ceci peut être dû à la nature et la richesse de chacun de ces extraits en composants antimicrobiens. En effet, les huiles essentielles riches en sesquiterpènes et en monoterpènes hydrocarbonés possèdent de faibles activités antibactériennes par rapport aux molécules phénoliques (Plésiat, 2011). Concernant les flavonoïdes, ils sont riches en rutine, en kaempferol et en quercétine, connus par leur puissant pouvoir antimicrobien (Mukherjee, 2009).

### 8.2.1. Extraits de la Bourrache

Les flavonoïdes de cette espèce semblent être plus actifs sur les bactéries Gram négatif. Les CMI obtenues varient de ½ (40,56mg/ml) pour *E. coli* à 1/64 (1,26mg/ml) pour *Burkholderia cepacia*. Plésiat (2011) signale que certaines bactéries Gram négatif tel que *Haemophilus influenzae* et *Burkholderia cepacia* sont sensibles aux flavonoïdes. La facilité de pénétration des flavonoïdes est due à la nature de la membrane cellulaire, en particulier à l'épaisseur de la couche de peptidoglycane.

D'autre part, les huiles essentielles agissent plus sur les bactéries Gram positif, notamment *C. diphtheriae*, *S. aureus* et *S. pneumoniae*. Ceci est expliqué par le fait que les huiles essentielles sont connues pour leur affinité aux membranes des Gram +. En effet, la résistance des Gram - aux huiles essentielles est attribuée à leur membrane externe hydrophile qui peut bloquer la pénétration des molécules hydrophobes dans l'intérieur de la cellule (Burt et Reinders, 2003).

Une étude faite sur l'extrait aqueux des feuilles de la Bourrache récoltée en Italie, ayant ciblé des microorganismes isolés des aliments tels que *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter spp.* et *Salmonella enterica*, a montré un effet inhibiteur sur les bactéries Gram négatif, avec des CMI allant jusqu'à 10 mg/ml (Miceli *et al.*, 2014). Cependant, l'extrait aqueux de cette même espèce récoltée en Irak, n'a montré aucun effet sur neuf souches d'*E.coli*, cinq souches de *Salmonella typhi* et six souches de *Candida albicans* (Mahmood *et al.*, 2010). Ce résultat est en désaccord avec le notre, car *E. coli* et *Candida albicans* se sont montrées sensibles aux deux extraits de la Bourrache testés. Cette différence est probablement due à la richesse de l'extrait en molécules antimicrobiennes, aux facteurs biotiques (la nature du sol et les germes associés), aux facteurs abiotiques (le climat), la période de récolte, la partie de la plante utilisée et à la méthode d'extraction adoptée (Mukherjee, 2009).

### 8.2.2. Extraits de la Ronce

Les CMI obtenues concernant les flavonoïdes de la Ronce se rapprochent de celles trouvées pour les flavonoïdes de la Bourrache. Les valeurs sont comprises entre la dilution 1/2 (42,13 mg/ml) pour *E.coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *C. diphtheriae*, *E. cloacae* et la dilution 1/64 (1,31mg/ml) pour *B. cepacia*, *P. fluorescens*, *S. aureus*. Les huit souches qui ont montré une résistance pour ces métabolites secondaires sont *E. coli* (2), *P. aeruginosa* (1), *H. influenzae* (2), *S. pneumoniae* (2) et *C. diphtheriae* (1).

Concernant les huiles essentielles, elles sont nettement plus actives sur des bactéries Gram+ à savoir *C. diphtheriae*, *S. aureus* et *S. pneumoniae*.

Cavanagh *et al.* (2003) ont enregistré un effet bactériostatique des métabolites secondaires de la Ronce sur la croissance des souches microbiennes. Le jus de fruits de cette plante a inhibé la croissance d'*Escherichia coli* et de deux espèces de *Bacillus*.

Krisch *et al.* (2008) ont montré que l'extrait méthanolique des parties aériennes de *R. fruticosus* inhibe la croissance de *M. tuberculosis* avec une CMI de 1 mg / ml.

Riaz *et al.* (2011), en étudiant l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques de diverses parties de la plante, ont noté que tous les extraits testés ont inhibé la croissance des bactéries suivantes: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacteri sp.* et *Pseudomonas aeruginosa*. L'ordre de puissance de l'inhibition, selon les parties de la plante, décrit par ces auteurs est: racines> feuilles> fruits. Les mêmes auteurs ont également analysé le pouvoir antifongique de l'extrait méthanolique contre neuf souches de champignons pathogènes (*Yersinia aldovae*, *Aspergillus parasiticus*, *Candida albicans*, *Aspergillus Niger*, *Aspergillus effusus*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium solani*, *Trichophyton rubrum*, *Saccharomyces cerevisiae*) sans enregistrer aucune activité inhibitrice.

Radovanović *et al.*, (2013) ont trouvé qu'un extrait de fruit de la Ronce présente un fort potentiel antimicrobien contre les bactéries Gram - : *S. enteritidis* ATCC 1307, *Clostridium perfringens* ATCC 19404, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Sarcina lutea* ATCC 9341 et *Micrococcus flavus* ATCC 40240.

Yang *et al.* (2014) ont rapporté que le jus de fruits de *R. fruticosus* a un fort potentiel antimicrobien contre des agents pathogènes isolés des aliments, comme *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus rhamnosus*. Ces auteurs suggèrent l'utilisation potentielle de jus comme agent de conservation dans les industries de transformation des aliments.

Pour *Candida albicans*, les flavonoïdes et les huiles essentielles ont exercé une bonne activité avec une CMI allant jusqu'à la dilution 1/16 (5,26 mg/ml) pour les flavonoïdes et 1/4 (21,06 mg/ml) pour les huiles essentielles.

Les résultats enregistrés montrent l'importance du pouvoir antimicrobien des composés phénoliques de cette plante médicinale contre différents germes hospitaliers.

### 8.2.3. Extraits de l'Ortie

Les flavonoïdes de cette espèce sont moins actifs sur l'inhibition des souches microbiennes que ceux de la Bourrache et de l'Ortie. Les CMI obtenues varient de la dilution 1/2 (35,54 mg/ml) pour *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. diphtheriae*, *H. influenzae*, *P. fluorescens*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* et *C. albicans* à 1/8 (8,88 mg/ml) pour *S. pneumoniae*, *P. fluorescens* et *H. influenzae*. Cependant, deux souches d'*E. coli* et une souche de *P. aeruginosa* se sont montrées résistantes.

De nombreuses études ont évoqué le pouvoir antimicrobien de l'Ortie. Les résultats de Marino *et al.* (2011) ont révélé que l'extrait d'acétate d'éthyle est efficace sur tous les isolats bactériens, avec un diamètre d'inhibition maximal de 24 mm, excepté pour *B. cereus* et *A. hydrophila* qui présentent une certaine résistance. Ghaima *et al.* (2013) ont constaté que l'Ortie a donné une large zone d'inhibition avec *S. typhi* (22 mm).

Une autre étude a montré que l'extrait des feuilles d'Ortie a donné une forte activité antibactérienne contre les souches de *B. subtilis* IP 5832 et *E. coli* isolées des aliments, avec les valeurs de CMI supérieures ou égales à 36,21 mg/ml (Kukrić *et al.*, 2012). Ces auteurs ont noté la résistance de *P. aeruginosa* (144,86 mg/ml). Une autre étude menée par Gülcin *et al.*, (2004) a également montré une résistance de *P. aeruginosa* ATCC 9027 vis-à-vis de l'extrait aqueux des feuilles de l'ortie. Dans notre étude, la CMI calculée pour *P. aeruginosa* est de 17.77 mg/ml. L'extrait flavonoïdique de l'Ortie récoltée à Tizi Ouzou serait donc plus riche en molécules antimicrobiennes.

La sensibilité d'*E. coli* et de *S. aureus* a été également signalée par Farhan *et al.* (2012). Ces auteurs ont indiqué que les concentrations de 0,3 ; 0,5 ; 1 mg / ml de l'extrait méthanolique ont prouvé un effet antimicrobien différent selon le microorganisme testé.

En revanche, l'huile essentielle de l'Ortie s'est montrée nettement moins efficace que les flavonoïdes. Sur les 109 souches microbiennes cliniques testées, 26 sont résistantes. Les CMI obtenues pour les souches sensibles varient de la dilution  $\frac{1}{2}$  (35,54mg/ml) à  $\frac{1}{8}$  (8,88mg/ml).

En résumé, on peut dire que les extraits phénoliques des trois plantes présentent un meilleur pouvoir inhibiteur de la croissance des germes pathogènes que les huiles essentielles. Quelques différences sont attribuées à la composition chimique, à la période de la récolte de la plante et à son biotope (Mukherjee, 2009)

Cowan (1999) a rapporté que les différentes classes de polyphénols, essentiellement les tanins et les flavonoïdes, peuvent augmenter la toxicité des extraits envers les microorganismes. Cette toxicité est en fonction du site et du nombre de groupements hydroxyles présents sur le composé phénolique. En outre, il est évident que l'augmentation de l'hydroxylation conduit à une augmentation de la toxicité. L'effet antimicrobien de ces phénols peut être expliqué par l'inhibition de la croissance bactérienne suite à leur adsorption sur les membranes cellulaires, l'interaction avec les enzymes et les effecteurs ou la privation en substrats et ions métalliques. La plus grande sensibilité des bactéries Gram+ par rapport aux bactéries Gram- est signalée par plusieurs auteurs (Palmer *et al.*, 1998, Ceylan et Fung, 2004). Cela n'exclut pas une

possible activité des extraits végétaux sur les bactéries Gram-, mais la dose doit être plus élevée. En plus, l'activité antimicrobienne est dépendante des caractères physico-chimiques des composés phytobiotiques et des souches employées (Sari *et al.*, 2006). Kalemba et Kunicka (2003) ont établi la corrélation entre la composition chimique et l'activité antimicrobienne, et ont classé les molécules chimiques selon leur importance du point de vue activités biologiques comme suit: phénols, alcools, aldéhydes, cétones, éther et hydrocarbures.

### 8.3. Échiquier en milieu solide

#### 8.3.1. Association antibiotique – flavonoïde

L'association entre un flavonoïde à forte activité antimicrobienne et un antibiotique est intéressante, elle permet d'avoir une inhibition des germes à une très faible concentration (Tableau 26).

**Tableau 26 :** Association de l'extrait des flavonoïdes de Bourrache (A) et la Pénicilline (B)

<b>FIC<sub>A</sub></b>	<b>mg/ml</b>										
<b>0,031</b>	<b>0,315</b>	100	0	0	0	0	0	100	100	100	100
<b>0,06</b>	<b>0,63</b>	100	0	0	0	100	100	100	100	100	100
<b>0,125</b>	<b>1,26</b>	100	0	0	0	0	0	100	100	100	100
<b>0,25</b>	<b>2,53</b>	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100
<b>0,5</b>	<b>5,07</b>	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100
<b>1</b>	<b>10,14</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100
	<b>20,28</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	<b>40,56</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	<b>81,12</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	<b>0</b>	100	0	0	100	100	100	100	100	100	100
	<b>mg/ml</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>25</b>	<b>12,5</b>	<b>6,25</b>	<b>3,12</b>	<b>1,56</b>	<b>0,78</b>	<b>0,39</b>
<b>FIC<sub>B</sub></b>						<b>0,25</b>	<b>0,125</b>	<b>0,06</b>	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>	

Le tableau montre les résultats de l'association entre un extrait flavonoïdique et un antibiotique, cette association a donné une bonne activité antimicrobienne contre *S. aureus*.

Les calculs des FIC sont donnés les valeurs suivantes :

- FIC 2 = FIC 2 a + FIC 2 b = 0,06 + 0,01 = 0,07 (<0,5)
- FIC 3 = FIC 3 a + FIC 3 b = 0,125 + 0,01 = 0,135 (<0,5)
- FIC 4 = FIC 4 a + FIC 4 b = 0,25 + 0,06 = 0,31 (<0,5)

Jusqu'à la ligne 5, les FIC sont  $\leq 0,5$ , et donc, la relation entre les deux extraits est synergique, au-delà de la ligne 5, les FIC sont supérieurs à 0,5, 100% des germes poussent et donc la synergie est interrompue.

### 8.3.2. Association flavonoïde - flavonoïde

Le résultat de l'association entre les deux extraits de flavonoïdes les plus actifs, ceux de la Bourrache et de la Ronce, est présenté dans le tableau 27:

**Tableau 27:** Association Flavonoïde Bourrache (A) – flavonoïde Ronce (B)

<b>FIC<sub>A</sub></b>	<b>mg/ml</b>										
	<b>0,315</b>	100	0	0	0	0	0	100	100	100	100
<b>0,125</b>	<b>0,63</b>	100	0	0	0	100	100	100	100	100	100
<b>0,25</b>	<b>1,26</b>	100	0	0	0	0	0	100	100	100	100
<b>0,5</b>	<b>2,53</b>	100	0	0	0	0	0	100	100	100	100
<b>1</b>	<b>5,07</b>	100	0	0	0	0	0	100	100	100	100
	<b>10,14</b>	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100
	<b>20,28</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100
	<b>40,56</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100
	<b>81,12</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	<b>0</b>	100	0	0	0	0	0	100	100	100	100
	<b>mg/ml</b>	<b>0</b>	<b>84,27</b>	<b>42,13</b>	<b>21,06</b>	<b>10,53</b>	<b>5,26</b>	<b>2,63</b>	<b>1,31</b>	<b>0,65</b>	<b>0,32</b>
<b>FIC<sub>B</sub></b>								<b>0,5</b>	<b>0,24</b>	<b>0,12</b>	

Le tableau montre les résultats de l'association entre les deux extraits de flavonoïdes qui ont donné une meilleure activité antimicrobienne, Bourrache et Ronce, contre *S. aureus*.

Les résultats montrent :

- $FIC1 = FIC1 a + FIC1 b = 0,125 + 0,12 = 0,245 (<0,5)$
- $FIC2 = FIC2 a + FIC2 b = 0,25 + 0,24 = 0,49 (<0,5)$

Pour les lignes 1 et 2, les FIC sont inférieurs ou égaux à 0,5 et donc il y a synergie entre les deux extraits. Pour le reste des lignes, le FIC est supérieur à 1, donc on parle d'indifférence vu que chaque extrait peut agir seul.

On peut dire que les deux associations étudiées ont montré une synergie avec de faibles concentrations des extraits.

La synergie entre ces deux extraits flavonoïdiques veut dire qu'en les associant dans une thérapie ils donnent un meilleur résultat, et donc ça serait un bon remède aux résistances des bactéries.

L'association entre les huiles essentielles des trois plantes de ce travail avec des antibiotiques a montré un effet neutre.

De nombreuses études ont montré l'effet synergique entre les huiles essentielles et les antibiotiques. La combinaison de l'huile essentielle de *Zataria multiflora* avec la vancomycine sur *S. aureus* MRSA a montré une synergie très intéressante (Mahboubi et Bidgoli, 2010). Khadir *et al.*, (2013) ont étudié l'effet de la combinaison de l'antibiotique Vancomycine avec quatre huiles essentielles. Les auteurs ont montré que les trois huiles essentielles de *Thymus subsp. ciliatus*, *Ammoides verticillata* et *Lavandula multifida* associées séparément avec la vancomycine contre le SARM de référence ATCC 43300 ont une action synergique.

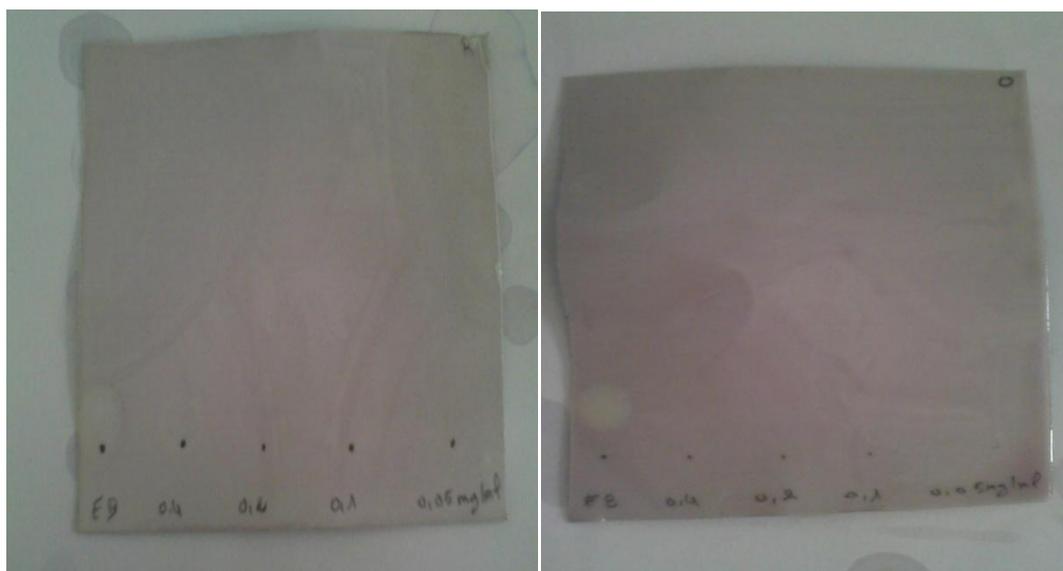
Notre étude a montré que ce n'est pas uniquement les huiles essentielles qui peuvent avoir des activités synergiques, mais aussi les composés phénoliques sont aptes à mieux agir en association, de plus, ils ont montré un effet spectaculaire comparable à celui trouvé dans les deux études citées en dessus.

L'association des deux flavonoïdes et celle du flavonoïde – antibiotique ont montré un bon effet sur les souches testées. A l'image des associations des antibiotiques de plus en plus appliquées en thérapie, l'association des extraits et/ou des molécules de nature végétale est plus intéressante afin d'éviter aux malades d'éventuelles résistances acquises et surtout les effets indésirables des molécules thérapeutiques synthétiques.

## 9. Activité antioxydante

### 9.1. Méthode qualitative

Afin d'évaluer qualitativement l'activité antioxydante des huiles essentielles des trois plantes étudiées, nous avons étudié les propriétés anti radicalaires des huiles essentielles par la méthode qualitative au DPPH en utilisant la chromatographie sur couche mince de silice. L'apparition des taches jaunâtres sur la plaque CCM met en évidence le pouvoir antiradicalaire des composés étudiés (Fig. 22).



**a :** Huiles essentielles de la Ronce

**c :** Huiles essentielles de l'Ortie



**B :** Huiles essentielles de la Bourrache

**d:** Acide ascorbique

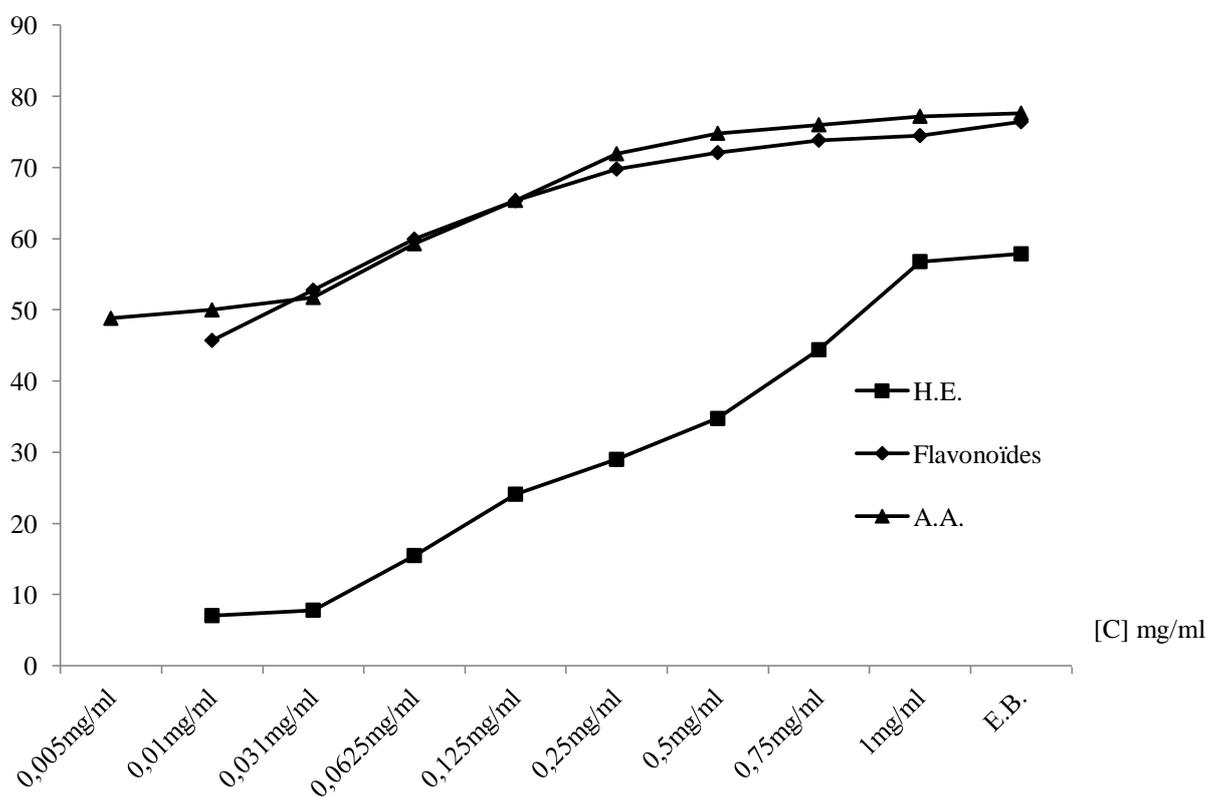
**Figure 22 :** Méthode qualitative de l'activité antioxydante

Selon les couleurs, les résultats montrent que les huiles essentielles des trois plantes ont montré une légère activité antioxydante, celle de l'Ortie se montre un peu plus forte que les deux autres.

## 9.2. Méthode quantitative au DPPH

### 9.2.1. Extraits de la Bourrache

Les résultats de l'activité antioxydante des extraits de la Bourrache sont présentés par la figure 23.



**Figure 23:** Activité antioxydante des extraits de la Bourrache et de l'acide ascorbique

Les résultats montrent que les flavonoïdes de *Borago officinalis* piègent 50% de radicaux libres à une concentration de  $1,8 \pm 0,009$  mg/ml. Cette concentration est proche de celle de l'acide ascorbique, un antioxydant naturel ( $1,46$  mg/ml). En revanche, l'huile essentielle présente une activité plus faible, soit une  $IC_{50} = 8,75 \pm 0,03$  mg/ml.

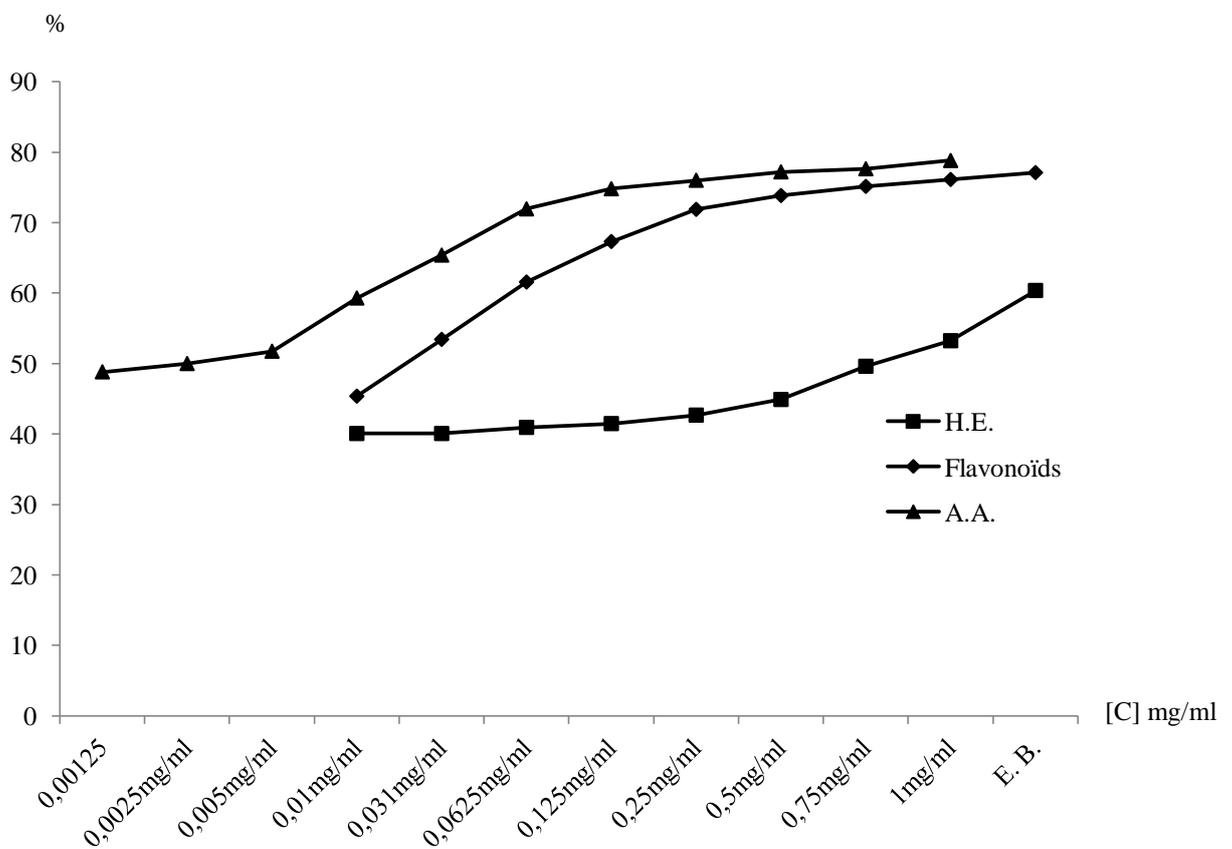
Filomena Conforti *et al.* (2008) ont obtenu par la même méthode (DPPH) une plus forte activité antioxydante de l'extrait hydroalcoolique de la partie aérienne de la Bourrache récoltée en Italie, avec une  $IC_{50}$  de  $58 \pm 0,11 \mu\text{g} / \text{ml}$ .

Par ailleurs, une étude sur l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique de *Borago officinalis* récoltée à l'est algérien a révélé un fort effet inhibiteur également, soit une  $IC_{50}$  de  $92,85 \pm 3,07 \mu\text{g} / \text{ml}$  (Zemmouri *et al.*, 2014).

Ces différentes activités peuvent être interprétées par la richesse de la plante en composés phénoliques, en particulier en flavonoïdes et en tanins. En effet, Il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, tocophérol, flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (De Pooter et Schamp, 1986).

### 9.2.2. Extraits de la Ronce

Les résultats de l'activité antioxydante des extraits de la Ronce sont illustrés par la figure 24.



**Figure 24 :** Activité antioxydante des extraits de la Ronce et de l'acide ascorbique

Les valeurs des  $IC_{50}$  obtenues sont de  $3,57 \pm 0,01$  mg/ml pour les flavonoïdes et de 9,76 mg/ml pour les huiles essentielles. Celle de l'acide ascorbique est de 1,46 mg/ml.

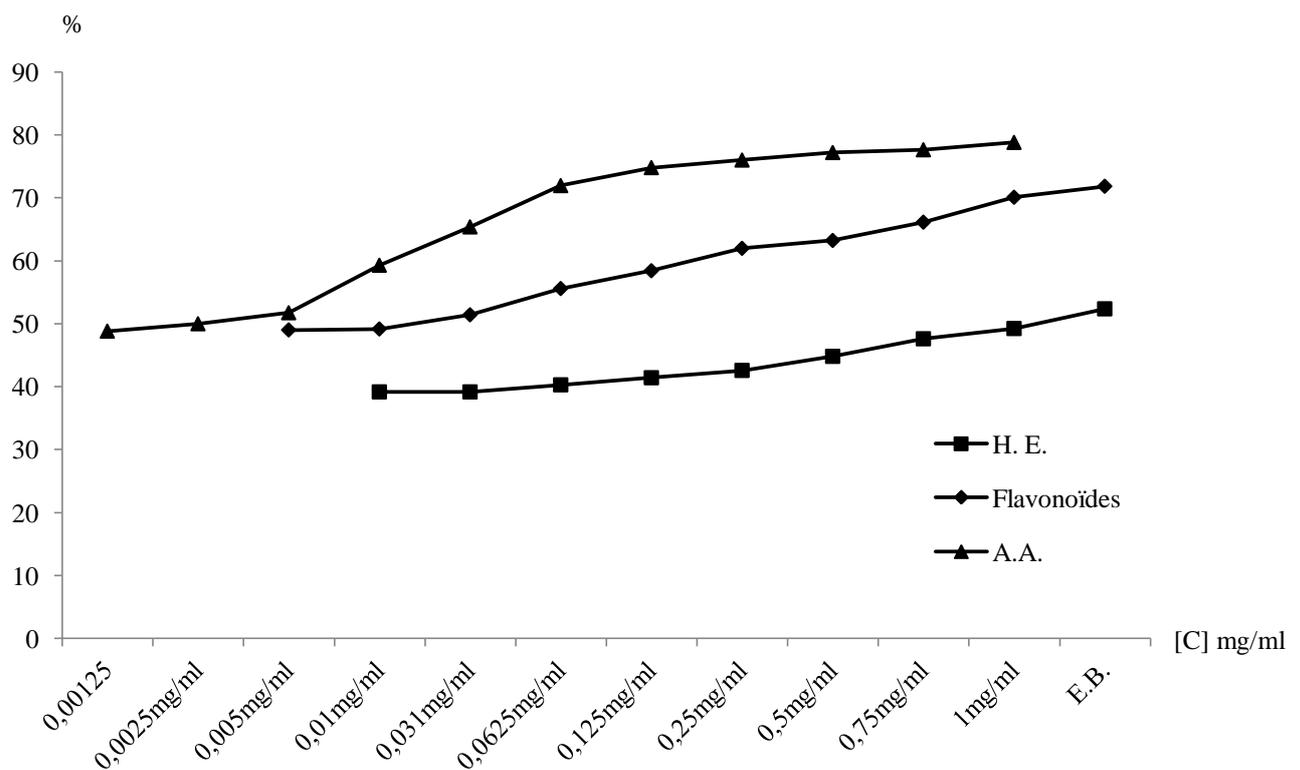
Huang *et al.* (2012) ont indiqué que les extraits du fruit de la Ronce récoltée en Inde présentaient une forte activité de piégeage des radicaux libres (95,37%) à une concentration de 2 mg / ml, soit une  $IC_{50}$  de 0,44 mg / ml.

Une étude de l'activité antioxydante de plusieurs extraits de la Ronce a donné des  $IC_{50}$  allant de 15,2 à 76,5  $\mu$ g/ml pour des extraits aux n-Hexane, Dichloromethane, Chloroforme, Ethyl acétate et Méthanol (Ivanovic *et al.*, 2014). Les extraits phénoliques de la Ronce récoltée de Serbie ont montré des  $IC_{50}$  de 22,19 à 31,18 mg/l (Radovanović *et al.*, 2013).

Ces données permettent de classer les extraits de la Ronce parmi le groupe des antioxydants naturels. En effet, les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (Javanovic *et al.*, 1994).

### 9.2.3. Extraits de l'Ortie

Les résultats du pouvoir antioxydant des extraits d'Ortie sont donnés par la figure 25.



**Figure 25 :** Activité antioxydante des extraits de l'Ortie et de l'acide ascorbique

Les résultats montrent des valeurs d'IC<sub>50</sub> comprises entre  $3,98 \pm 0,4$  mg/ml (extrait flavonoïdique) et 11,55mg/ml (extrait des huiles essentielles).

Selon la bibliographie, il a été trouvé que les extraits méthanoliques d'Ortie ont des valeurs d'IC<sub>50</sub> de 145 mg/mL (Semih, 2012), 105,16 µg/mL (Kataki *et al.*, 2012) et 175 µg/ mL (Nikolova, 2009).

Kukrić *et al.* (2012) ont noté une bonne activité antioxydante de l'extrait éthanolique d'*Urtica dioïca* récoltée en Turquie. Ces auteurs ont obtenu une valeur d'IC<sub>50</sub> de  $31,38 \pm 0,102$  mg/ml. L'activité antioxydante de l'extrait hydro-alcoolique de l'Ortie récoltée en Iran a montré une IC<sub>50</sub> de  $88,33 \pm 2,88$  µg/ml qui est légèrement plus élevée par rapport à celle du standard, l'acide ascorbique qui a donné une IC<sub>50</sub> de  $2,8 \pm 0,62$  µg/ml (Vertika *et al.*, 2012).

Une autre étude faite aussi en Iran sur deux autres extraits mais dans des périodes de développement différentes a montré que pendant la floraison, la plante a un pouvoir de piégeage des radicaux libres plus fort qu'après la floraison, avec des IC<sub>50</sub> de  $8,4 \pm 0,1$  mg/ml pour l'extrait aqueux pendant la floraison,  $11,7 \pm 0,2$  mg/ml après la floraison,  $12,4 \pm 0,1$  mg/ml pour l'extrait d'éther pendant la floraison et  $22,5 \pm 0,2$  mg/ml après la floraison. Le standard a donné une IC<sub>50</sub> de  $5 \pm 0,2$  mg/ml (Monfared *et al.*, 2011).

Vu les résultats ci-dessus, on remarque que les flavonoïdes, qui sont des extraits phénoliques, ont un bon pouvoir antioxydant contrairement aux huiles essentielles. Ceci peut être dû à la composition chimique de chaque extrait en molécules de nature antioxydantes, comme c'est le cas pour la rutine, la quercétine...

La Bourrache et l'Ortie contiennent toutes les deux de la quercétine, un très fort antioxydant voir le plus fort antioxydant parmi les antioxydants des plantes (Marfak, 2003) et la rutine, aussi un bon antioxydant, mais dix fois moins fort que la quercétine (Sokol-Letowska *et al.*, 2007). Les flavonoïdes de la Bourrache seraient donc plus riches en quercétine car ils ont une plus forte activité antioxydante, presque similaire à celle de l'acide ascorbique (Fig. 24).

La Ronce présente aussi une forte activité antioxydante, mais moins forte que celle des flavonoïdes de la Bourrache. Ceci serait dû à l'absence de la quercétine dans la Ronce, mais

en contrepartie, elle contient de la catéchine, un flavonoïde antioxydant deux fois moins fort que la quercétine, mais il est plus fort que la rutine et moins fort que la quercétine. Ce constat appuie les résultats obtenus vu que l'activité antioxydante de la Ronce riche en catéchine est légèrement moins forte que celle de la Bourrache riche en quercétine (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Concernant l'activité antioxydante des huiles essentielles, elles sont moins fortes que celles des composés phénoliques. On peut classer les molécules selon leur importance d'activité comme suit: phénols, alcools, aldéhydes, cétones, éthers and hydrocarbonés (Kalemba *et al.*, 2003).

Conclusion

---

Le travail de cette thèse rentre dans le cadre d'un projet de recherche sur la valorisation des plantes aromatiques et médicinales de la région de Tizi Ouzou. L'objectif assigné à cette étude est d'évaluer les activités antimicrobienne et antioxydante des flavonoïdes et des huiles essentielles de trois espèces végétales largement rencontrées en Algérie : *Borago officinalis*, *Rubus fruticosus* et *Urtica dioïca*.

L'activité antimicrobienne a été appréciée notamment sur des souches de référence mais aussi des souches isolées à partir de prélèvements issus de patients hospitalisés au CHU de Tizi Ouzou. L'utilisation des tests biochimiques, nous a permis d'identifier 105 souches appartenant aux espèces suivantes : *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* et *Candida albicans*. Aussi, l'utilisation du MALDI-TOF-MS nous a permis de confirmer l'identification des souches qui sont couramment isolées lors de ces infections à savoir *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

Les souches isolées présentent des résistances variables dont plus de la moitié sont résistantes à des taux dépassant les 50%. Ces observations confirment encore une fois que la résistance des germes aux antibiotiques est désormais un phénomène quasiment présent en clinique.

Concernant l'activité antimicrobienne, *Borago officinalis* et *Rubus fruticosus* montrent une activité biologique intéressante. Cette activité est plus prononcée pour les flavonoïdes que pour les huiles essentielles. Une association entre les deux extraits flavonoïdiques des deux plantes a montré un résultat intéressant.

S'agissant de l'activité antioxydante, la même constatation est faite. Les extraits flavonoïdiques des trois plantes montrent une activité plus remarquable par rapport aux huiles essentielles.

Bien que les molécules impliquées dans chaque activité soient différentes, principalement la rutine et la quercétine pour les flavonoïdes, le spathulenol et le carvacrol pour les huiles essentielles, la présence concomitante des activités d'extraits des espèces nécessite des recherches fondamentales pour trouver l'origine de cette observation. Pour cela, une

connaissance scientifique et méthodique de la composition chimique s'impose afin d'élucider le potentiel des ressources naturelles.

Cet humble travail s'inscrit alors dans cette démarche en espérant que le relais sera pris par d'autres travaux et par l'industrie pharmaceutique pour tester de manière plus poussée l'efficacité de ces espèces et aussi pour apprécier l'innocuité des composants utiles.

L'engouement aux plantes médicinales doit passer du simple effet de mode et de propagande par les mass-média à une perspective de recherche, d'investissement et de développement durable des plantes aromatiques et médicinales pour des fins de santé et de bien être.

# Références bibliographiques

- Aazza S., Lyoussi B., Miguel M. G. (2011).** Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Activities of Some Commercial Essential Oils and Their Major Compounds. *Molecules*. 16(9): 7672-7690.
- Abachi S., Khademi F., Fatemi H., Malekzadeh F. (2013).** Antibacterial effect of nettle (*Urtica dioica*). *AL-Qadisiya Journal of Veterinary Medicine Science*. 13: 59-63.
- Adams R.P. (1995).** Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation. Carol Stream. Illinois.
- Adjanohoun E., Ake Assi L. (1979).** Contribution au recensement des plantes médicinales de Côte d'Ivoire. Centre National de Floristique, Université d'Abidjan.
- AFNOR (1986).** Procédés de désinfection des surfaces par voie aérienne. AFNOR. Paris. ). NF T 72-281.
- Ahmad H., Tijerina M.T., Tobola A.S. (1997).** Preferential overexpression of a class MU glutathione S-transferase subunit in mouse liver by myristicin. *Biochemistry Biophysics Research Communication*. 236: 825-828.
- Aliakbarlu J., Tajik H. (2012).** Antioxidant and antibacterial activities of various extracts of *Borago officinalis* flowers. *Journal of food processing and preservation*. 36(6): 539–544.
- Almasirad A., Amanzadeh Y., Taheri A., Iranshahi M. (2007).** Composition of a Historical Rose Oil Sample (*Rosa damascena* Mill., Rosaceae). *Journal of Essential Oil Research*. 19(2): 110-112.
- Amarowicz R., Troszynska A., Shahidi F. (2005).** Antioxydant activity of almond seed extract and its fractions. *Journal of Food Lipids*. 12: 344-358.
- Anglaret X. et Mortier E. (2002).** Maladies infectieuses. Ed Estem France. p.287.
- Anane T., Baough L., Bencharif N., Berkani A., Berkouk K., Boudinar F., Boufersaoui A., Boukari R. (2002).** Guide des infections respiratoires aiguës. Ministère de la Santé et de la Population. p.140.
- Andral G. (1999).** Cours de pathologie interne. Edition Tilliard Paris. p.536.
- APGII (2003).** An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 141(4): 399-436.
- Aydos O.S., Acivi A., Ozcan T., Karadag A., Gurleyik E., Altinok B., Sunguruglu A. (2011).** Antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) extract on CML (K562) cell line. *Turkish journal of Medical Science*. 41(4): 657-663.
- Bahar Gürdal, Sükran Kültür (2013).** An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris (Mugla,Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*. 146: 113–126.

- Bahorun T., Grinier B., Trotin F., Brunet G., Pin T., Luncky M., Vasseur J., Cazin M., Cazin C., Pinkas M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*. 46(11): 1086-1089.
- Bandoniène D., Murkovic M. (2002).** The detection of radical scavenging compounds in crude extract of borage (*Borago officinalis* L.) by using an on-line HPLC-DPPH method. *Journal of Biochemistry and Biophysics Methods* 53: 45–49.
- Barnes J., Anderson L.A., Phillipson J. D. (2007).** Herbal Medicines: a guide for healthcare professionals. 2nd edition. Londres. Pharmaceutical Press. 530p.
- Barnes J., Anderson L.A., David Phillipson J. (2007).** Herbal Medicines. Third edition. Pharmaceutical Press. 710 p.
- Baughman D. C. et Hackley J. C. (1998).** Soins infirmiers médecine et chirurgie. Ed DeBoeck. Paris. p.725.
- Belhacene L. (2008).** Le genre *Rubus* L. en Haute-Garonne: Approche générale et première étape. *Isatis31. Ecole vieille*. 8: 161-172.
- Béliveau R., Gingras D. (2005).** Les aliments contre le cancer. Édition du Trécarré. Outremont. p.213.
- Benkhniq O., Zidane L., Fadli M., Elyacoubi H., Rochdi A. et Douira A. (2011).** Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Botanica*. 53: 191-216.
- Bennett J.W. (2015).** Antibiotics current innovations and future trends. Caister Academic Press. Norfolk. The United Kingdom. p. 9.
- Benvenuti B., Pellati F., Melegari M. Bertelli D. (2006).** Polyphenols, Anthocyanins, Ascorbic Acid, and Radical Scavenging Activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *Journal of Food Science*. 69(3): FCT164–FCT169.
- Bertrand B. (2002).** Les secrets de l'Ortie. 7ème édition. Editions de Terran. 128p. (Collection Le Compagnon Végétal; n01).
- Bezanger Beauquesne L., Pinkas M., Torck M. (1975).** Les plantes dans la thérapeutique moderne. Edition Paris Maloine. 529p.
- Bezanger Beauquesne L., Pinkas M., Torck M. (1980).** Plantes médicinales des régions tempérées. Edition Paris Maloine. 439p.
- Bezzaoucha A., Makhlof F., Dekkar N., Lamdjadani N. (1994).** Prevalence of nosocomial infections at the Bab El Oued University Hospital-algiers. *Medicine et maladies infectieuses*. 24(2): 96-101.

- Bhushan Patwardhan (2005).** Ethnopharmacology and drug discovery. Journal of Ethnopharmacology. 100: 50–52.
- Bingen E., Mouton Y., Deboscker Y., Dubreuil L. (2000).** Antibiotiques, antiviraux, anti-infectieux. John Libbey Eurotext. p 85.
- Black J.G. (2012).** Microbiology: principles and exploitations. 8<sup>ème</sup> édition. JOHN WILEY & SONS. p.975.
- Blic J. (2002).** Pneumologie pédiatrique. Ed Doin. Paris. p.330.
- Bock B. (2013).** La ronce des haies. Tela Botanica. BDNF. 4(2):1-3.
- Boukhatemm M.N., Saidi F., Hamaidi M.S., Hakim Y., Mekarnia M. (2011).** Culture et exploitation industrielle du géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) en Algérie: état des lieux et perspectives. Phytothérapie. 9(5): 304-309
- Bourgaud F. (2010).** Plantes à parfum, aromatiques et médicinales. Phytomedicine 17: 548-550.
- Bremer K., Bremer B., Thulin M. (2003).** Introduction to Phylogeny and Systematics of Flowering Plants. Uppsala University. Stockholm. p. 102.
- Bruneton, J. (1993).** Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. 3<sup>ème</sup> édition Tec & Doc. Paris. p. 1120.
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Tec & Doc, Editions médicales internationales. 3<sup>ème</sup> Edition. p.1120.
- Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. Paris, Tec & Doc. Éditions médicales internationales. 4<sup>ème</sup> édition. p.1288.
- Bruzzese E., Mahr E., Faithfull I. (2000).** Blackberry, *Rubus fruticosus* aggregate, best practice management guide for environmental weeds. Ed. CRC for weed Management Systems. 7p.
- Burke A. C., Sutherland B. G., Sawyez C. G., Telford D. E., Umoh J., Drangova M., Huff M. W. (2014).** Conference orale. Intervention avec: Citrus Flavonoids Reverses Existing Metabolic Disorders and Attenuates the Progression of Advanced Atherosclerosis in High Fat-Fed LDLr<sup>-/-</sup> Mice.
- Burt S., Reinders R. D. (2003).** Antibacterial activity of selected plant essential oils against *E. coli* O157:H7. Letters in Applied Microbiology. 36 (3): 162-167.
- Burt S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International Journal of Food Microbiology. 94(3): 223-253.
- Cariello C. (2012).** La spectrométrie de masse MALDI-TOF et le diagnostic microbiologique. ICHV, Laboratoire de microbiologie, Sion. P.75

- Carlsen H., Myhrstad M.C.W., Thoresen M., Moskaug J.O., Blomhoff R. (2003).** Berry intake increases the activity of the gamma-glutamylcysteine synthetase promoter in transgenic reporter mice. *Journal Nutrition*. 133: 2137-2140.
- Ceylan E., Fung D.Y.C. (2004).** Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation Microbiology*. 12 (1): 1-55.
- Chang W.C., Sei C. K., Soon S.H., Bong K.C., Hye J.A., Min Y.L., Sang H.P., Soo K.K. (2002).** Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*. 163: 1161-1168
- Cheng G, Hao H., Dai M., Liu Z., Yuan Z. (2013).** Antibacterial action of quinolones: From target to network. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 66: 555-562.
- Cherry J.D. (2012).** Epidemic Pertussis in 2012. The Resurgence of a Vaccine-Preventable Disease. *The New England Journal of Medicine*. 367:785-787.
- Cowan M. M. (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Revue*. 12: 564-582.
- Croft S. L., Seifert K. (2010).** Antiprotozoal agents. In: Finch Roger G., Greenwood D., Whitley R. J., Norrby S. *Antibiotic and Chemotherapy: Expert Consult (9th Edition)*. Saunders.
- Da Silva E.J.A., Oliveira A. B., Lapa A.J. (1994).** Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 46(2): 118-22.
- Daef E.A., Elsherbiny N.M. (2012).** Clinical and Microbiological Profile of Nosocomial Infections in Adult. *Journal of American Science*. 8(12): 1239-1250.
- De Pooter H.L., Schamp N.M. (1986).** Comparison of the Volatile Composition of Some Calamintha/Satureja Species. *Progress in Essential Oils Research*. 139-150.
- Del Rio C. M. D., Aneesh K., Mehta M. D. G., Marshall Lyon III M. D., Jeannette Guarner M.D. (2014).** Ebola hemorrhagic fever in 2014: the tale of an evolving epidemic. *Annals of internal medicine*. 161 (10): 746-748.
- Depondt Joël, Dimino J. (2001).** *Oto-Rhino-Laryngologie*. Edition Estem Paris. p.265.
- Draghi F. (2005).** L'Ortie dioïque (*Urtica dioica* L.) étude bibliographique. Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré Nancy1. Faculté de Pharmacie.
- Derridj A., Ghemouri G., Meddour R., Meddour-Sahar O. (2009).** Approche ethnobotanique des Plantes médicinales en Kabylie (Wilaya de Tizi Ouzou, Algérie). In *proceedings of International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants*. Djerba, Tunisia. Edited by M. Neffati, A. Ouled Belgacem.

- Dudman S.G., Stene-Johansen K., Vik I.S. (2008).** Viral drug resistance. Europe PubMed Central. 128(22): 2597-2600.
- Edris A. E. (2007).** Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytotherapy Research*. 21: 308-323.
- Elicoh-Middleton Jr., Chithan K., Theoharis C. (2000).** Effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart diseases and cancer. *Pharmacology and Experimental therapeutics*. 4(52): 673-751.
- Elkettani C., Idali B., Mjahed K. (2010).** Le profil bactériologique des pneumopathies nosocomiales acquises sous ventilation mécanique en service de réanimation. 3ème journées maghrébines en hygiène hospitalière. Maroc. p. 26.
- Ellnain-Wojtaszek M., Bylka W., Kowalewski Z. (1986).** Flavanoids compounds in *Urtica dioica* L. *Herbal Poland*. 32:131-7.
- Escobedo-Martinez C., Cruz-Morales S., Fragoso-Serrano M., Rahman M. M., Gibbons S., Pereda-Miranda R. (2010).** Characterization of a xylose containing oligosaccharide, an inhibitor of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*, from *Ipomoea pes-caprae*. *Phytochemistry*. 71(14-15):1796-1801.
- Evans W. C. Trease, Evans (2009).** *Pharmacognosy*. Saunders. London. p. 603.
- Evans W.C., Trease (2002).** *Pharmacognosy*. 15ème édition. Elsevier édition.
- Falconer S. B., Brown E. D. (2009).** New screens and targets in antibacterial drug discovery. *Current Opinion in Microbiology*. 12(5):497-504.
- Fesen M. R., Pommier Y., Leteurtre F., Hiroguchi S., Yung J., Kohn K. W. (1994).** Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochemistry Pharmacology*. 48(3): 595-608.
- Filomena Conforti, Silvio Sosa, Mariangela Marrelli, Federica Menichini, Giancarlo A S, Dimitar Uzunov, Aurelia Tubaro, Francesco Menichini, Roberto Della Loggia. (2008).** In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 116: 144-151.
- Finch R.G., Greenwood D., Norrby S.R., Whitley R.G. (2010).** *Antibiotic and Chemotherapy*. Elsevier Limited. China. p. 11.366.
- Finer K.R. (2003).** *Deadly Diseases and epidemics: Tuberculosis*. Chelsea House Publisher. New York. The United States of America. p. 36.
- Fishman A.P., Elias J.A., Fishman J.A., Grippi M.A., Senior R.M., Pack A.I. (2008).** *Fishman's Pulmonary diseases and disorders*. Mc Graw Hill Companies Inc, The United States of America, pp. 1969-1984.

- Fleurentin J., Balansard G. (2002).** L'intérêt de l'ethnopharmacologie dans le domaine des plantes médicinales. *Médecine Tropicale*. 62 : 23-28.
- Franchomme P. et Péroël D. (1990).** Clefs pour l'aromathérapie. La molécule aromatique: matière, énergie, information. *L'aromathérapie exactement*. R. J. Editeur. Limoges. 2: 73-227.
- Franchomme P. et Péroël D. (1990).** Fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle. *L'aromathérapie exactement*. R. J. Editeur. Limoges. 1: 1-69.
- Franchomme P. et Péroël D. (1990).** Matière médicale aromatique fondamentale. *L'aromathérapie exactement*. R. J. Editeur. Limoges. 4: 317-446.
- Franchomme P. et Péroël D. (1990).** Thérapeutique. Eléments de médecine aromatique. *L'aromathérapie exactement*. R. J. Editeur. Limoges. 3: 230-316.
- Galati E. M., Monforte M. T., Kirjavainen S., Forestieri A. M., Trovato A., Tripodo M. M. (1994).** Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmacologia*. 40(11): 709-12.
- Gao X., Cassidy A., Schwarzschild M.A., Rimm E. B., Ascherio A. (2012).** Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. *Neurology*. 78 (15): 1138-1145.
- Gareth G., Elizabeth Y., Brechany Frances M., Jackson William W., Christie Sten Stymne, Keith Stobart A. (1996).** Distribution and biosynthesis of stearidonic acid in leaves of *Borago officinalis*. *Phytochemistry*. 43(2): 381-386.
- Gaudy C., Buxeraud J. (2005).** Antibiotiques: pharmacologie et thérapeutique. ELSEVIER. p. 3452
- Geddes A. (2005).** The future of infectious diseases. *Antibiotiques*. 7:75-76.
- Gerhard R. (1993).** Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie. Lavoisier Tec and Doc. p. 333-339.
- Ghaima K.K., Hashim N.M., Ali S.A. (2013).** Antibacterial and antioxidant activities of ethyl acetate extract of nettle (*Urtica dioica*) and dandelion (*Taraxacum officinale*). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 3(5): 096-099.
- Ghazghazi H., Aouadhi C., Hasnaoui B. (2013).** Activite antimicrobienne d'huile essentielle et d'extraits des feuilles de *Rosa Canina*. *Revue F. S. B.* XI. 2013: 179-188.
- Gilani A.H., Bashir S., Khan A. (2007).** Pharmacological basis for the use of *Borago officinalis* in gastrointestinal. Respiratory and cardiovascular disorders. *Journal of Ethnopharmacologie*. 114: 393-399.

- Gomar A., Hosseini A., Mirazi N. (2014).** Preventive effect of *Rubus fruticosus* on learning and memory impairment in an experimental model of diabetic neuropathy in male rats. *PharmaNutrition*. 2 (4): 155–160.
- Grevsen K., Frette X.C., Christensen L.P. (2008).** Concentration and composition of flavonol glycosides and phenolic acids in aerial plants of stinging nettles (*Urtica dioica* L.) are affected by nitrogen fertilization and by harvest time. *European Journal of Horticulture Science*.73: 20-7.
- Gualerzi C.O., Brandi L., Fabbretti A., Pon C.L. (2014).** Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim. Germany. p. 73.
- Guilfoile P. G. (2007).** Deadly Diseases and epidemics: Antibiotic-resistant bacteria. Chelsea House Publisher. New York. The United States of America. p. 68-70.
- Gül S., Demirci B., Başer K.H., Akpulat H.A., Aksu P. (2012).** Chemical composition and in vitro cytotoxic, genotoxic effects of essential oil from *Urtica dioica* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 88(5):666-71.
- Gülcin I., Küfreviöglu O.I., Oktay M, Büyükokuroglu M.E. (2004).** Antioxidant, Antimicrobial, Antiulcer and Analgesic Activities of Nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Ethnopharmacology*. 90: 205-215.
- Gupta Mayank, Singh Swati (2010).** *Borago officinalis* LINN. An important medicinal plant of mediterranean region: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 5(1): 27-34.
- Hammiche Vand Maiza K. (2006).** Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology*. 105:358–367.
- Harborne A. J. (1998).** Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis. 3<sup>ème</sup> édition. London. Chapman &Hall. p. 320.
- Heiman (2012).** Atlas of humain infectious diseases. Blackwell publishing Ltd. p. 279.
- Hollman P. C., Bijzman M. N., Van-Gameren V., Gnossen E. P., De Vris J. H., Hatan M. B. (1999).** The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoids glycosides in man. *Free radical Research*. 31: 569-573.
- Houbert Janssens A. (2010).** Cahiers des dispositifs médicaux « les systèmes d'aspiration bronchiques ». *Le moniteur hospitalier*. 229: 1-39.
- Hseini S., Kahouadji A. (2007).** Étude ethnobotanique de la flore médicinale dans la région de Rabat (Maroc occidental). *Lazaroa*. 28: 79-93.

- Huang W., Zhang H., Liu W., Li C. (2012).** Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University*. 13: 94–102.
- Huang D. J., Chen H. J., Lin C. D., Lin Y. H. (2005).** Antioxidant and antiproliferative activities of water spinach (*Ipomoea aquatica* Forssk.) constituents. *Botanical Bulletin Academia Sinica*. 46: 99-106.
- Iserin P. (2001).** *Encyclopédie des plantes médicinales: identification, préparation, soin*. Larousse. Londres. 335p.
- Ismail A.M., Sharma O. P., Kuman M. S., Eapen Eapen C., Kannangau R., Priya A. (2013).** Virological response and antiviral resistance mutations in chronic hepatitis B subjects experiencing entecavir therapy: An Indian subcontinent perspective. *Antiviral research*. 98 (2): 209-216.
- Ivanovic, J., Tadic, V., Dimitrijevic, S., Stamenic, M., Petrovic, S., Zizovic, I. (2014).** Antioxidant properties of the anthocyanin-containing ultrasonic extract from blackberry cultivar. *Cacanska Bestrna. Indust. Crop. Prod*. 53: 274–281.
- Jäger A. K., Lasse Saaby (2013).** Flavonoids and the CNS. *Molecules*. 16 (2): 1471-1485.
- Jain S. C., Singh B., Jain R. (2001).** Antimicrobial activity of triterpenoids from *Heliotropium ellipticum*. *Fitoterapia*. 72 (6): 666-668.
- Jones M., Ying J., Huttner B., Evans M., Maw M., Nielson C., Rubin M.A., Green T., Samore M.H. (2014).** Relationships between the importation, transmission, and nosocomial infections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an observational study of 112 Veterans Affairs Medical Centers. *Clinical infectious diseases*. 58 (1):32-39.
- Jouad H., Haloui M., Rhiouani H., El Hilaly J., Eddouks M. (2001).** Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez–Boulemane). *Journal of Ethnopharmacology*. 77: 175–182.
- Jovanovic SV, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic MG. (1994).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*. 116: 4846-4851.
- Julies A., Christin M. (2002).** Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects and safety. *Annual Review of Nutrition*. 22: 19-44.
- Kalemba D, Kunicka A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10: 813-829.
- Kato R., Nakadate T., Yamamoto S., Sugimura T. (1983).** Inhibition of 12-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced tumor promotion and ornithine decarboxylase

activity by quercetin: possible involvement of lipoxygenase inhibition. *Carcinogenesis*. 4(10): 1301-5.

**Kataki M.S., Murugamani V., Rajkumari A., Mehra S.P., Awasthi D., Yadav R.S. (2012).** Antioxidant, Hepatoprotective and Anthelmintic Activities of Methanol Extract of *Urtica dioica* L. Leaves. *Pharmaceutical Crops*. 3: 38-46.

**Kayser F. H., Böttger E. C., Zinkernagel R. M., Haller O., Eckert J., Deplazes (2008).** *Microbiologie Médicale*. Flammarion. Paris.

**Kelly M.R., Cissy M., Geigerman and George Loo Kelly M.R., Geigerman C.M., Loo G. (2001).** Epigallocatechin gallate protects U937 cells against nitric oxide-induced cell cycle arrest and apoptosis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 81: 647-658.

**Kim A., Nicolau D., Sutherland C.A, Kuti J. (2007).** Optimal Dosing of Piperacillin-Tazobactam for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: Prolonged or Continuous Infusion?. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 27 (11): 1490-1497.

**Khadir (2013).** Effet inhibiteur de certains extraits de plantes aromatiques sur des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline SARM isolées du CHU de Tlemcen. Université de Tlemcen. 158p.

**Khan A.M., Qureshi R.A., Ullah F., Gilani S.A., Nosheen A., Sahreen S., Laghary M.K., Laghari M.Y., Ruhman S.U., Hussain I., Murad W. (2011).** Phytochemical analysis of selected medicinal plants of Margalla Hills and surroundings. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5 (25): 6017-6023.

**Khan M. S., Ahmad I. (2012).** Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacol.* 140(2):416-423.

**Krystofova O., Adam V., Babula P., Zehnalek J., Beklova M., Havel L. (2010).** Effects of various doses of selenite on stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *International Journal of Environmental Health Research*.7: 3804-15.

**Kudritsata S., Filman G., Zagorodskaya L., Chikovanii D. (1986).** Carotenoids of *Urtica dioica*. *Chemical Natural Compounds*. 22: 604-5.

**Kuresh A., Youdim A., Jeremy P. E., Spencer., Hangen S., Rice-Evans C. (2002).** Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Biological Chemistry*. 383: 503-519.

**Kurek A., Nadkowska P., Pliszka S., Wolska K. I. (2012).** Modulation of antibiotic resistance in bacterial pathogens by oleanolic acid and ursolic acid. *Phytomedicine*. 19 (6): 515-519.

- Laughton M.J., Halliwell B., Evans P.J., Hoult J., Robin S. (1989).** Antioxydant and pro oxydantactions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochemical Pharmacology*.38 (17): 2859-2865.
- Lazraq M., Mardi Z., Maanaoui Y., Rhafoune K., Saifaoui N., Haddad W., Cherkab R., Elkettani C., Idali B., Mjahed K. (2010).** Le profil bactériologique des pneumopathies nosocomiales acquises sous ventilation mécanique en service de réanimation. 3ème journées maghrébines en hygiène hospitalière. Maroc. p. 26.
- Lee B.K., Kim J.H., Jung J.W., Choi J.W., Han E.S., Lee S.H., Ko K.H., Ryu J.H. (2005).** Myristicininduced neurotoxicity in human neuroblastoma MSK-N-SH cells. *Toxicology Letters*. 157: 49-56.
- Lencher A.J., Matuschak G.M., Brink D.S. (2011).** Respiratory an integrated approach to disease. Mc Graw-Hill companies. The united states of America. p. 10.
- Léophonte P. (2001).** Pneumonies. Ed John Lebbey . Paris. France. 249 p.
- Li Y., Li M., Wang L., Jiang Z., Li W., Li H. (2004).** Induction of apoptosis of cultured hepatocarcinoma cell by essential oil of *Artemisia annul L.* *Sichuan Da ue Xue Bao Yi Xue Ban* (article en chinois). 35: 337-339.
- Lim T. K. (2012).** Edible Medicinal and Nomo-Medicinal Plants. Springer. 4: 544-554.
- Lissauer T. et Clayden G. (1997).** Pédiatrie manuel illustrée. Edition DeBeock Bruxelles. p.331.
- Madigan (2015).** Brocks biology of microorganisms. Pearson education Inc. p. 209. p.1006.
- Mahboubi M., GhazianBidgoli F.** Antistaphylococcalactivityof *Zataria multiflora* essential oiland its synergywith vancomycin. *Research Center of Barij Essence*. 87135-1178.
- Mahmood U., Kaul V.K., Acharya R. (2004).** *Phytochemistry*. 65: 2163-2166.
- Mahmoud M.A., Al-Dhaher Z., AL-Mizraqchi A.S. (2010).** Antimicrobial activity of aqueous extracts of pomegranate, sumac, sage, anise, hand bull tongue, thyme, cloves, lemon and mint against some food-borne pathogens. *Iraki Journal of Veterinary Medicine*. 34 (2): 85-94.
- Mailhebiau, P. (1994).** La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. Lausanne. p.635.
- Mallay D., Aveline L., Bouggara D., Chauvet J., Crusson J. C., Dagnet D., Daoud Y., Montani D. et Tcherakian C. (2006).** *Pneumologie*. Ed Masson. Paris. p.312.
- Mandell G. L., Bennett J. E., Dolin R. (2010).** Principles and Practice of Infectious Diseases. 7ème édition. Elsevier. Philadelphia. p. 4019.

- Marfak A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoides: Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation des depsides. Thèse de doctorat de l'Université de Limoges. p. 24-42.
- Marino M., Berrami C., Comi R. (2001).** Impedance measurement to study the antimicrobial activity of essential oils from luminaceae and compositae. *International Journal of Food Microbial.* 67: 187-195.
- Martínez J.L., Baquero F. (2002).** Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clinical microbiology research.* 15 (4): 647-79.
- Mehdioui R., Kahouadji A. (2007).** Etude ethnobotanique auprès de la population riveraine de la forêt d'Amsittène : cas de la Commune d'Imi n'Tlit (Province d'Essaouira). *Bulletin of the Scientific Institute, Division of Life Sciences, Rabat.* 29:11-20.
- Mhamdi B., WISSEM A.W., Marzouk B. (2007).** Biochemical evaluation of borage (*Borago officinalis*) rosette leaves through their essential oil and fatty acid composition. *Italian Journal of Biochemistry.* 52: 176–179.
- Mhamdi B., Aidi Wannas W., Bourgou S., Marzouk B. (2009).** Biochemical characterization of Borage (*Borago officinalis l.*) seeds. *Journal of Food Biochemistry.* 33 (3): 331-341.
- Middleton E. J. (1996).** Biological properties of plant flavonoids: an overview. *International Journal of Pharmacology.* 34 (5): 344-348.
- Miceli A., Aleo A., Corona O., Sardina M., Mammina C., Settanni L. (2014).** Antibacterial activity of *Borago officinalis* and *Brassica juncea* aqueous extracts evaluated in vitro and in situ using different food model systems. *Food control.* 40: 157-164.
- Middleton E. J., Drzewiecki G. (1984).** Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. *Biochemical Pharmacology.* 33 (21): 3333-8.
- Milivojevic J., Maksimovic V., Nikolic M., Bogdanovic J., Maletic R., Milatovic D. (2011).** Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild fragaria and Rubus berries. *Journal of Food Quality* 2011. 34: 1–9.
- Milane H. (2004).** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur. p. 13-36.
- Mila I., Scalbert A. (1994).** Tannin antimicrobial properties through iron deprivation: A new hypothesis. *Acta Horticulturae.* 381 (2): 749-755.

- Milner J. Â. (2006).** Preclinical perspectives on garlic and cancer. Significance of garlic and its constituents in cancer and cardiovascular disease. *Journal of Nutrition*. 136: 827-831.
- Milner, J.Â. (2001).** A historical perspective on garlic and cancer. Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as a supplement. *Journal of Nutrition*. 131: 1027- 1031.
- Milivojevic J., Maksimovic, V., Nikolic M., Bogdanovic J., Maletic R., Milatovic D. (2001).** Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild fragaria and rubus berries. *Journal of Food Quality*. 34: 1–9.
- Monfared M, Kamkar A., Ghaffari Khaligh S., Jebelli Javan A., Asadi F., Akhundzadeh Basti A. (2001).** Antioxidative effects of Iranian *Urtica dioica* L. extracts on the oxidation of sunflower oil. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5 (18): 4438-4445.
- Moliner A., Massol J., Druot J. (2007).** Pathologie médicale et pratique infirmière. Ed Lamarre. Paris. p.517.
- Moulin M., Coquerel A. (2002).** Pharmacologie. Elsevier ed. Masson. p168.
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Pfaller M. A. (2009).** Medical Microbiology. Elsevier ed. Philadelphia. p.960.
- Mucsi I., Pragai B. M. (1985).** Inhibition of virus multiplication and alteration of cyclic AMP level in cell cultures by flavonoids. *Experientia*. 41 (7): 930-1.
- Mukherjee M., Ghatak K.L., Ganguly S.N., Antoulas S. (1984).** Rubinic acid, a triterpene acid from *Rubus fruticosus*. *Phytochemistry*. 23: 2581–2582.
- Mukherjee P.K., Houghton P.J. (2009).** Evaluation of herbal medicinal products. The Pharmaceutical Press. 519p.
- Naghdi B.H., Soroshzadeh A., Rezazadeh S.A., Sharifi M., Ghalavand A., Rezai A. (2008).** Evaluation of Phytochemical and Production Potential of Borage (*Borago officinalis* L.) During the Growth Cycle. *Journal of Medicinal Plants*. 7 (4): 7-43.
- N’guessan K., Kadja B., N. Zirihi G., Traoré D., Aké-assi L. (2009).** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d’Ivoire). *Sciences & Nature*. 6 (1): 1 – 15.
- Namgoong S. Y., Son K. H., Chang H. W., Kang S. S., Kim H. P. (1994).** Effects of naturally occurring flavonoids on mutagen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Science*. 54 (5): 313-20.
- NCCLS (2006).** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. 7<sup>ème</sup> édition. Wayne, Pennsylvania. Approved Standard. M7-A7.

- Nikolova M., Dzhurmanski A. (2009).** Evaluation of Free Radical Scavenging Capacity Of Extracts From Cultivated Plants. *Biotechnology. EQ.* 23. SE.
- NIST (1999).** National Institute of Standards and Technology. PC version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. Perkin Elmer Corp: Norwalk CT.
- Ohemeng K.A., Schwender C.F., Fu K.P., Barrett J.F. (1993).** DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1) *Bioorg. Medicinal Chemistry Letters.* 3: 225–230.
- OMS (2012).** Rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé.
- OMS (2002).** Organisation Mondiale de la Santé. Rapport sur la Santé du Monde, <http://www.who.int/whr/2002/fr/>.
- OMS (2014).** **World health organization.** World health statistics. WHO press. Geneva. Switzerland. p. 72.
- Ono K., Nakane H., Fukushima M., Chermann J. C., Barre-Sinoussi F. (1990).** Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *European Journal of Biochemistry.* 190 (3): 469-76.
- Orčić D., Francišković M., Bekvalac K., Svirčević E., Beara I., Lesjak M., Mimica-Dukić N. (2014).** Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food chemistry.* 143: 48-53.
- Page C.P., Curtis M.J., Sutter M.C., Hoffman B.B., Walker M.J. (1999).** Pharmacologie intégrée. De Boeck Université. p433.
- Palmer M. D. (2004).** Managing Hyperkalemia Caused by Inhibitors of the Renin–Angiotensin–Aldosterone System. *The new England journal of medicine.* 351: 585-592.
- Palumbi S.R. (2001).** Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science.* 293: 1786-1790.
- Perez Vizcaino F., Duarte J., Santos Buelga C. (2012).** The flavonoid paradox : conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids. *Journal of the science of food and agriculture.* 92 (9): 1822–1825.
- Pfaller M.A. (2012).** Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment . *The American journal of Medicine.* 125 (1): S3-S13.
- Pharmacopée européenne, (2005).**
- Plésiat P.** Résistance aux Antibiotiques des Espèces du Complexe *Burkholderia cepacia* UFR SMP Besançon.
- Prescott L., Harley J., Klein D. (2003).** Microbiology. 5ème édition. édition De Boeck Université.

- Puppo A. (1992).** Effect of Flavonoids on Hydroxyl Radical Formation by Fenton-Type reactions; Influence of the Iron Chelator. *Phytochemistry*. 31 (1):85-88.
- Pyun M. S., Shin S. (2006).** Antifungal effects of the volatile oils from *Asium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine*. 13: 394-400.
- Raaman N. (2006).** *Phytochemical techniques*. New Delhi, New India. Publishing Agency. p. 306.
- Radovanović A., Radovanović B., Jovančičević B. (2009).** Free radical scavenging and antibacterial activities of southern Serbian red wines. *Food Chemistry*. 117: 326- 331.
- Radovanović B.C., Milenković Anđelković A.S., Radovanović A.B., Anđelković M.S. (2013).** Antioxidant and Antimicrobial Activity of Polyphenol Extracts from Wild Berry Fruits Grown in Southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 12 (5): 813-819.
- Rajnerayanama K., Reddy M., Charluvadi M. R., Krishna D. R. (2001).** Bioflavonoids: Classification, pharmacological, biochemical effect and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*. 33: 2-16.
- Rameshoir V., Gangrade T., Punasiya R., Ghulaxe C. (2014).** *Rubus fruticosus* (Blackberry) use as an herbal medicine. *Pharmacognosy Review*. 8 (16): 101-104.
- Ramdani N., Rahal K. (2005).** Diagnostic bactériologiques des infections respiratoires broncho-pulmonaire. Algérie. p.72.
- Raoult D., Drancourt M., La Scola (2013).** Utilisation des Spectromètres MALDI-TOF pour la recherche. *Fédération de Microbiologie Clinique. Hôpital de la Timone*. p.12.
- Remesy C., Manach C., Demigne C., Texier O., Regeat F. (1996).** *Médecine et Nutriment*. 32: 17-27.
- Remond C., Sénéchal G., Hervé S., Rouquette C. (2007).** *ORL, Stomatologie, Ophtalmologie et soins infirmiers*. Edition Lamarre Paris. p.197.
- Riaz M., Mansoor A., Najmur R. (2011).** Antimicrobial screening of fruit, leaves, root and stem of *Rubus fruticosus*. University of Karachi, Karachi-75270. Pakistan. 5 (24): 5920-5924.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996).** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology Medicine*. 20: 933-956.
- Rigat M., A`ngels Bonet M., Garcia S., Teresa Garnatje, Joan Valle`s (2007).** Studies on pharmaceutical ethnobotany in the high river Ter valley (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology*. 113: 267–277.

- Roberts C., Manchester K. (2010).** The Archeology of Diseases. The History press, Gloucestershire, The United Kingdom. p. 398.
- Ruimy R., Andremont A. (2004).** Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* : molecular mechanism, clinical impact, and inhibition. *Réanimation*. 13: 176-184.
- Roulin M. J. (2006).** Recommandations pour les aspirations endotrachéales chez un patient intubé, Soins intensifs. Département APSI Groupe Respiratoire. Hôpitaux universitaires de Genève.
- Robiczek A., Jacoby G.A., Hooper D.C. (2006).** The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet. Infectious diseases*. 6: 629-640.
- Robert et Manchester (2012).** The archeology of diseases. The history press. p. 829.
- Safanah Ahmed Farhan, Mohammed Faraj, Hadi H. Al-Shemari, Abdul Kadir M. N. Jassim (2011).** Study of Some *Urtica dioica* L. Leaves Components and Effect of Their Extracts on Growth of Pathogenic Bacteria and Identify of Some Flavonoids by HPLC. *Journal of science*. 23 (3): 79.
- Samani Asadi M., Bahmani M., Rafieian-Kopaei M. (2014).** The chemical composition, botanical characteristic and biological activities of *Borago officinalis*: a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 7(1): S22–S28.
- Sanchez Moreno C., Larrauri J. A., Saura Calixto F. (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of Science Food Agriculture*. 79: 270-276.
- Santos F. A., Rao V. S. N. (2000).** Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy Research*. 14 (4): 240-4.
- Sansonetti P. et Orth G. (2006).** La maîtrise des maladies infectieuses: un défi de santé publique, une ambition médico-scientifique. EDP sciences. Académie des Sciences, Les Ulis. 26-47.
- Sari M., Biondi D. M., Kaâbeche M., Mandalari G., D'Arrigo M., Bisignano G., Saija A., Daquino C., Ruberto G. (2006).** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal*. 21: 890-898.
- Sarker S., Nahar L. (2007).** Chemistry for pharmacy students: general, organic and natural product chemistry. John Wiley & Sons.
- Sato M, Tsuchiya H, Miyazaki T, Fujiwara S, Yamaguchi R, Kureshiro H, Iinuma M. (1996).** Antibacterial activity of hydroxychalcone against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 6:227–231.

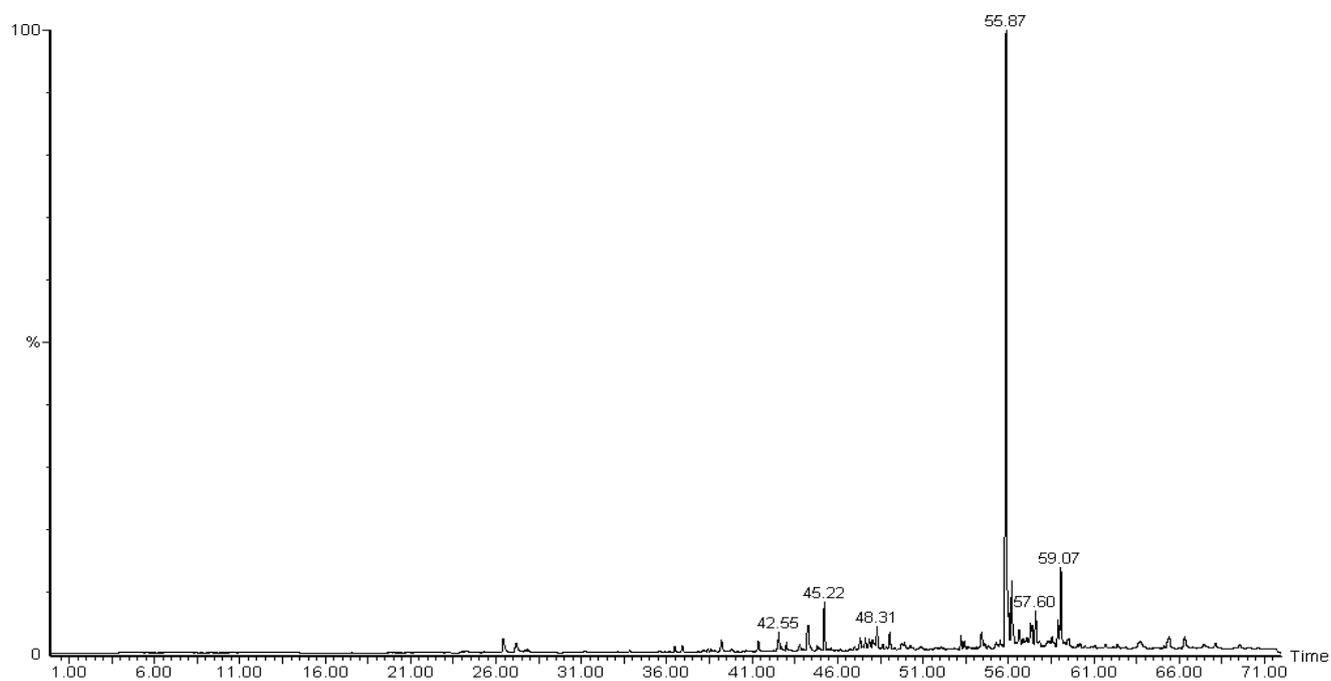
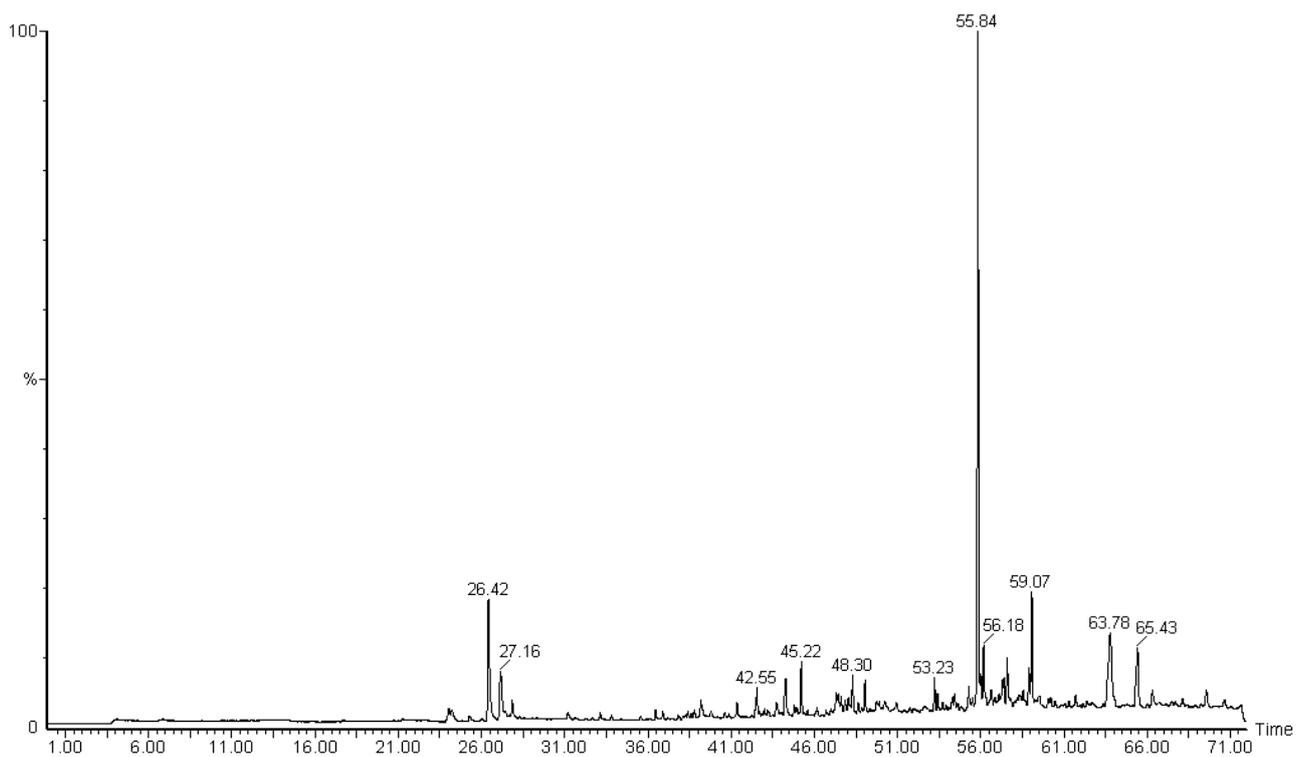
- Schechner V., Temkin E., Harbarth S., Carmeli Y., Schwaber M. (2013).** Epidemiological Interpretation of Studies Examining the Effect of Antibiotic Usage on Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 26 (2): 289-307.
- Semih O., Buket Y. (2012).** Phenolic Compounds Analysis of Root, Stalk and Leaves of Nettle. *The Scientific World Journal*. 1-12.
- Sepkowitz (2002).** *Oxford journals-clinical infectious diseases*. 34 (8): 1098-1107.
- Sigaloff K.C.E., Ramatsebe T., Viana R., Rinke de Wit T.F., Wallis C.L., Stevens W.S. (2012).** Accumulation of HIV Drug Resistance Mutations in Patients Failing First-Line Antiretroviral Treatment in South Africa. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 28(2): 171-175.
- Silva F., Ferreira S., Duarte A., Mendonça D. I., Dominguess F.C. (2011).** Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*. 19 (1): 42-47.
- Silver L.L. (2011).** Challenges of Antibacterial Discovery. *Clinical Microbiology Reviews*. 24 (1): 91-107.
- Skinner D. (2013).** *A B C Ear, Nose and Throat*. Blackwell Publishing Ltd. West Sussex. The United Kingdom. p. 60.
- Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L. (1998).** Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied. Microbiology*. 26: 118–122.
- SNHF (1999).** *L'essentiel sur les Boraginaceae*. 68.
- Sobia Ramzan H. (2014).** Protective Role of *Urtica dioica* methanol extract in treating experimentally induced urinary calculi in rats. *Ethiopian International Journal of Multidisciplinary Research*. 1 (3): 1-10.
- Sokol-Letowska A., Oszmiansk J., Wojdylo A. (2007).** Antioxydant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap. *Food Chemistry*. 103: 853-859.
- Solorzano Santos F., Miranda Novales M. G. (2012).** Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current opinion in Biotechnology*. 23 (2): 136-141.
- Spedding G., Ratty A., Middleton E. J. (1989).** Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antiviral Research*. 12 (2): 99-110.
- Spencer J.P.E., Crozier A.C. (2012).** *Flavonoids and Related Compounds: Bioavailability and Function*. CRC Press Amazon France. Taylor and Francis. p.227.

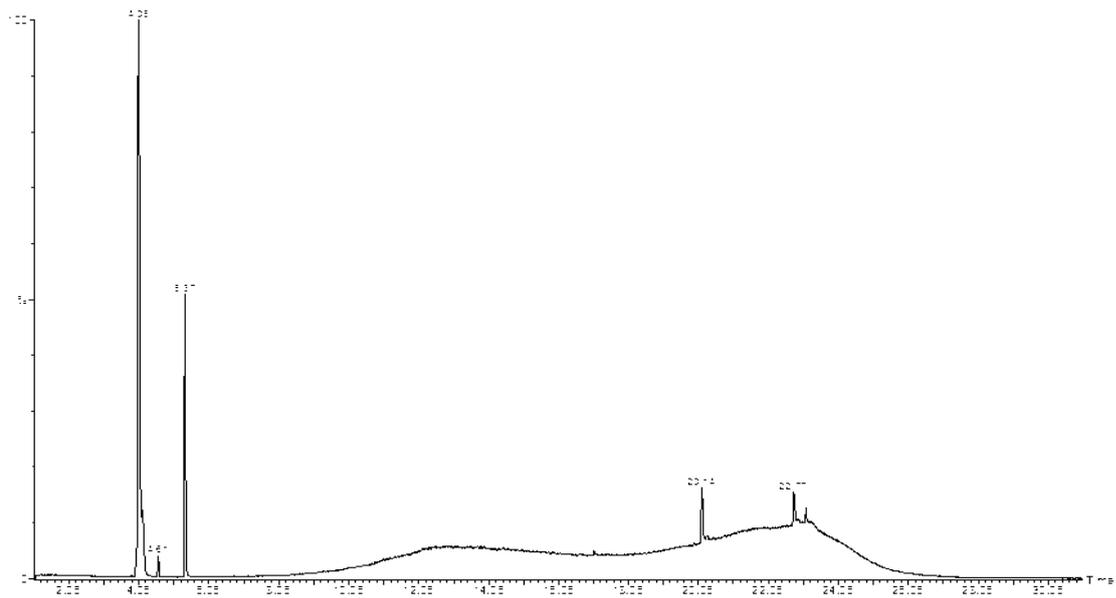
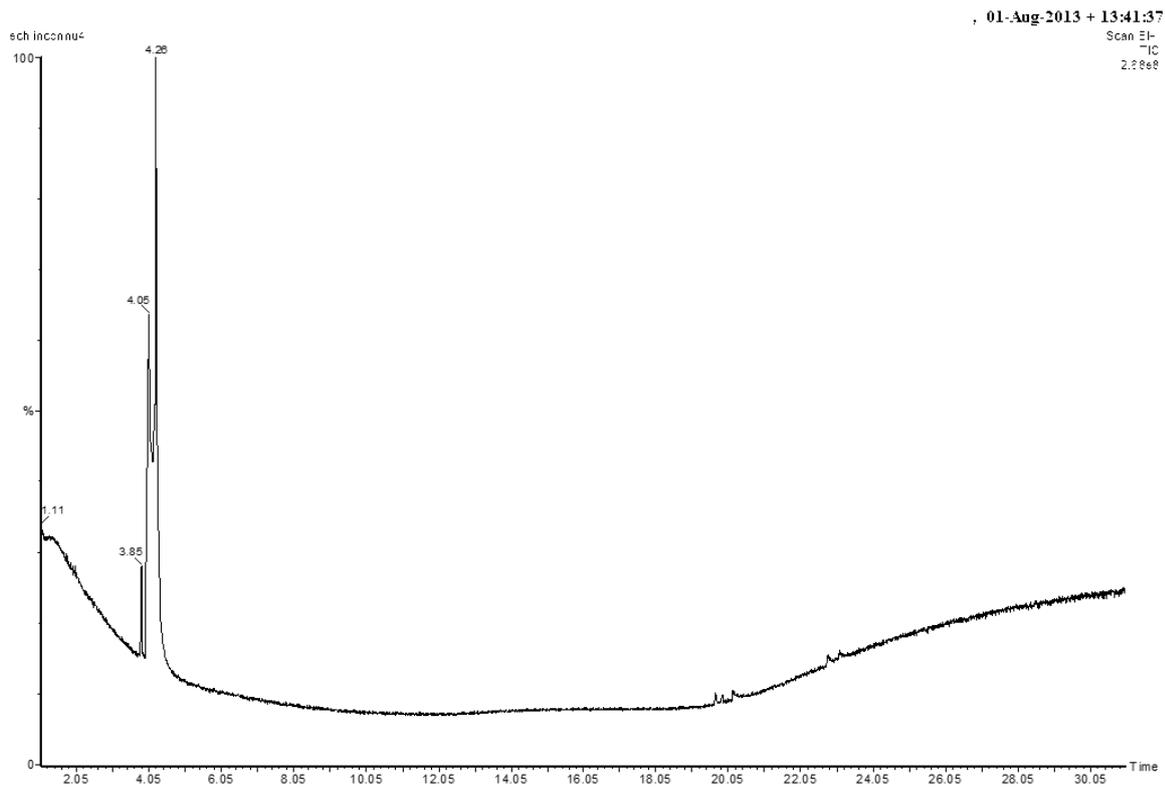
- Spenceley H., Dow C.S., Holah J.T. (1992).** Development of mixed culture biofilms on stainless steel. In: Melo, L.F., Bott T.R., Fletcher, M., Capdeville, B. (Eds.), *Biofilms-Science and Technology*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp. 395–402.
- Stanley N.R., Lazazzera B.A., Britton R.A., Grossman A.D. (2003).** Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarray. *Journal of Bacteriology*. 185: 1951-1957.
- Swingleton P., Sainsbury D. (2006).** *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. John Willey & Sons Ltd, West Sussex. England. pp. 39.
- Sylvestre M., Legault J., Dufour D., Pichette A. (2005).** Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. *Phytomedicine*. 12: 299-304.
- Tan E. K., Amit K. Srivastava, David Arnold D., Mahendra P. Singh, Yiyang Zhang (2015).** Neurodegeneration: Etiologies and New Therapies. ID 272630. 2.
- Therese K.L., Gayathri R., Balasubramanian S., Natrajan S., Madhavan H.N. (2012).** Phenotypic and genotypic characteristics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pediatric population of Chennai, India. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 30 (4):411-417.
- Tibayrenc M. (2010).** *Encyclopedia of infectious diseases*. Willey-Liss. New Jersey. The united states of America. p. XXIX.
- Tisserand R., Young R. (2014).** *Essential oil safety*. 2<sup>ème</sup> Edition. Hardcover. p.784.
- Tortora G.J., Funke B. R., Case C. L. (2010).** *Microbiology An introduction*. Pearson. 10<sup>ème</sup> edition. 847p.
- Tozyka Z., Murakawa T. (2007).** *Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice*. Informa Healthcare USA Inc, New York, the United States of America, pp. 131.
- Tytgat I., Colacino E., Tulkens P. M., Poupaert J. H., Prevost M., Van Bambeke F. (2009).** DD-ligases as a potential target for antibiotics: past, present and future. *Current Medicinal Chemistry*. 16 (20): 2566-2580.
- Van Acker S., Tromp M., Haenen G. R. M. M., van der Vijgh W., Bast A. (1995).** Flavonoids as scavengers of nitric oxide Radical. *Biochemical and Biophysical Research*. 214 (3): 755-9.
- Van den Bosch C.M.A., Suzanne E. Geerlings, Stephanie Natsch, Jan M. Prins, Marlies Hulscher E. J. L. (2015).** Quality Indicators to Measure Appropriate Antibiotic Use in Hospitalized Adults. *Clinical infectious diseases Oxford journals*. 60 (2): 281-291.
- Van De Wiel A., Van Golde P.H. (2001).** *European Journal of Internal Medicine*. 12: 484-489.

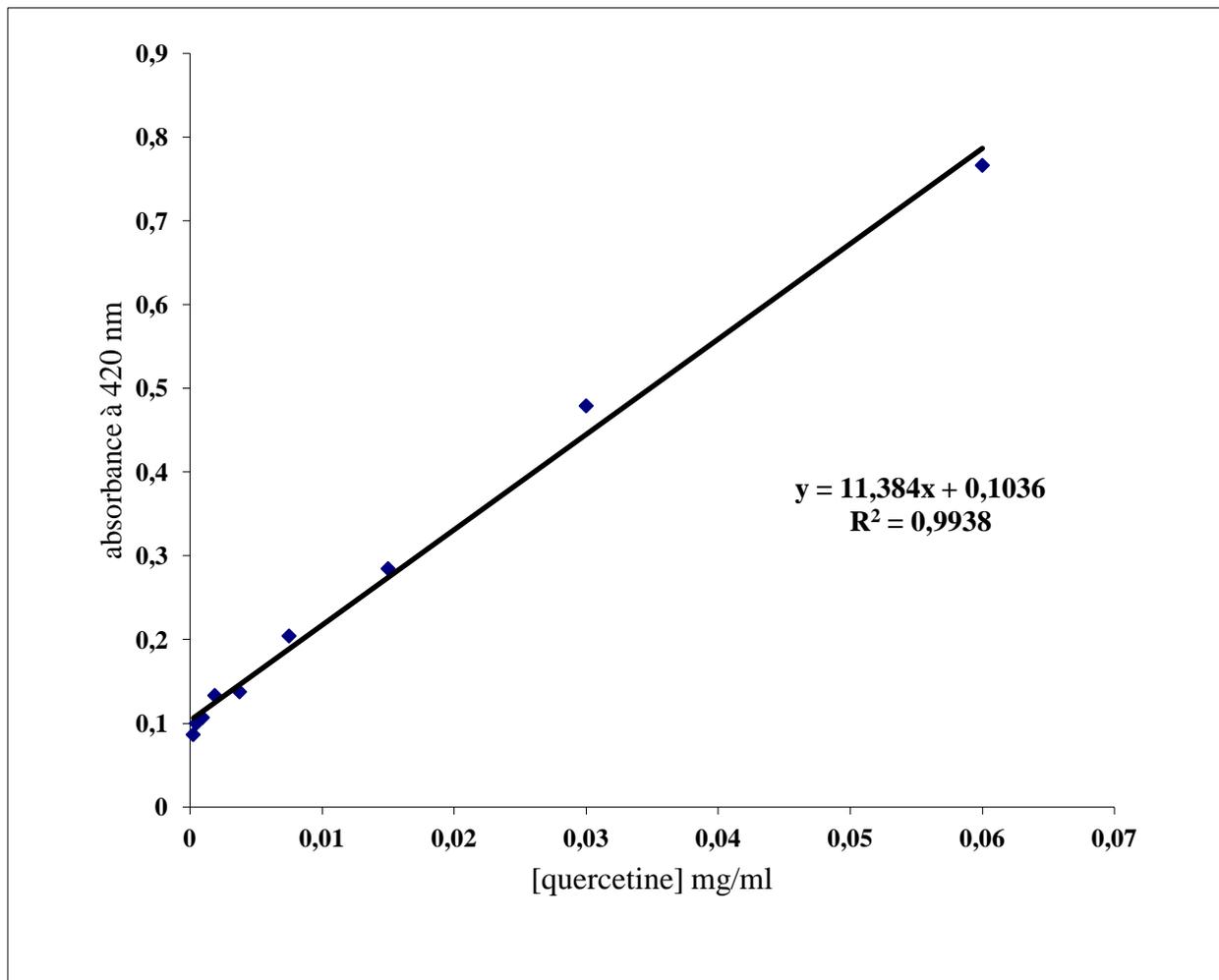
- Vandeputte P., Ferrari S., Coste A.T. (2011).** Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. *International Journal of Microbiology*. 2012: 26p.
- Verma Y. S., Saxena V. K., Nigam S. S. (1977).** Structure of Cordia rothii Roem and Schult mucilage Part II: Methylation and periodate oxidations studies. *Planta Medica*. 32 (2):188-194.
- Vertika Khare, Pradeep Kushwaha, Shikhar Verma, Abhishek Gupta, Sharad Srivastava, Ajay Kumar Singh Rawat (2012).** Pharmacognostic Evaluation and Antioxidant Activity of Urtica dioica L. *Pharmacognosy & Ethnopharmacology*.
- Vrijzen R., Van Hoof L. M., Vlietinck A. J., Vanden Berghe D. A., Boeye A. (1987).** The poliovirus induced shut-off of cellular protein synthesis persists in the presence of 3-methylquercetin, a flavonoid which blocks viral protein and RNA synthesis. *Antiviral Research*. 7 (1): 35-42.
- Walsh C. (2003).** Antibiotics: actions, origins, resistance. ASM Press. Washington. p. 117.
- Wang Y., Wang T., Hu J., Ren C., Lei H., Hou Y., Brantner A. H. (2011).** Anti-biofilm activity of TanReQing, a Traditional Chinese Medicine used for the treatment of acute pneumonia. *Journal of Ethnopharmacol*. 134 (1):165-170.
- Wertheim H.F.L., Horbey P., Woodall J.P. (2012).** Atlas of Human Infectious Diseases. Blackwell publishing Ltd. Oxford. The United Kingdom. p. 5.7.9.21.
- Wettasinghe M., Shahidi F., Amarowic Z.R., Abou-zaid M.M. (2001).** Phenolic acids in defatted seeds of borage (*Borago officinalis* L.). *Food Chemistry*. 75: 49–56.
- William Johnson A. (2002).** Invitation à la chimie organique. De Boeck Université. p 432
- Williams R. J., Spencer J. P. E. (2012).** Flavonoids, cognition, and dementia: Actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 52 (1): 35-45.
- Wright H. T., Reynolds K. A. (2007).** Antibacterial targets in fatty acid biosynthesis. *Current Opinion in Microbiology*. 10(5) : 447-453.
- Wu C.C., Sheen L.Y., Chen H.W., Kuo W.W., Tsai S.J., Lii C.K. (2002).** Differential effects of garlic oil and its three major organosulfur components on the hepatic detoxification system in rats. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50: 378-383.
- Yang H., Hewes D., Salaheen S., Federman C., Biswas D. (2014).** Effects of blackberry juice on growth inhibition of foodborne pathogens and growth promotion of Lactobacillus. *Food Control*. 37: 15–20.
- Yao J., Moellering R.J. (2003).** Antibacterial agents. In: *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press. Washington DC. p. 1039-1073.

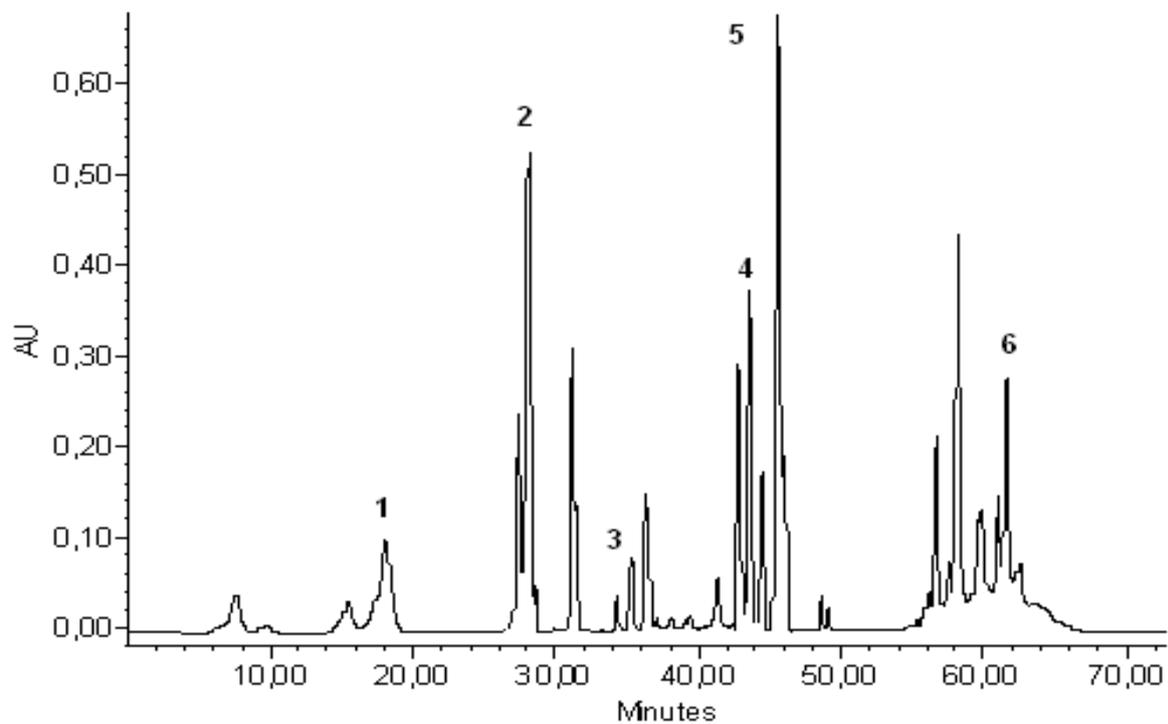
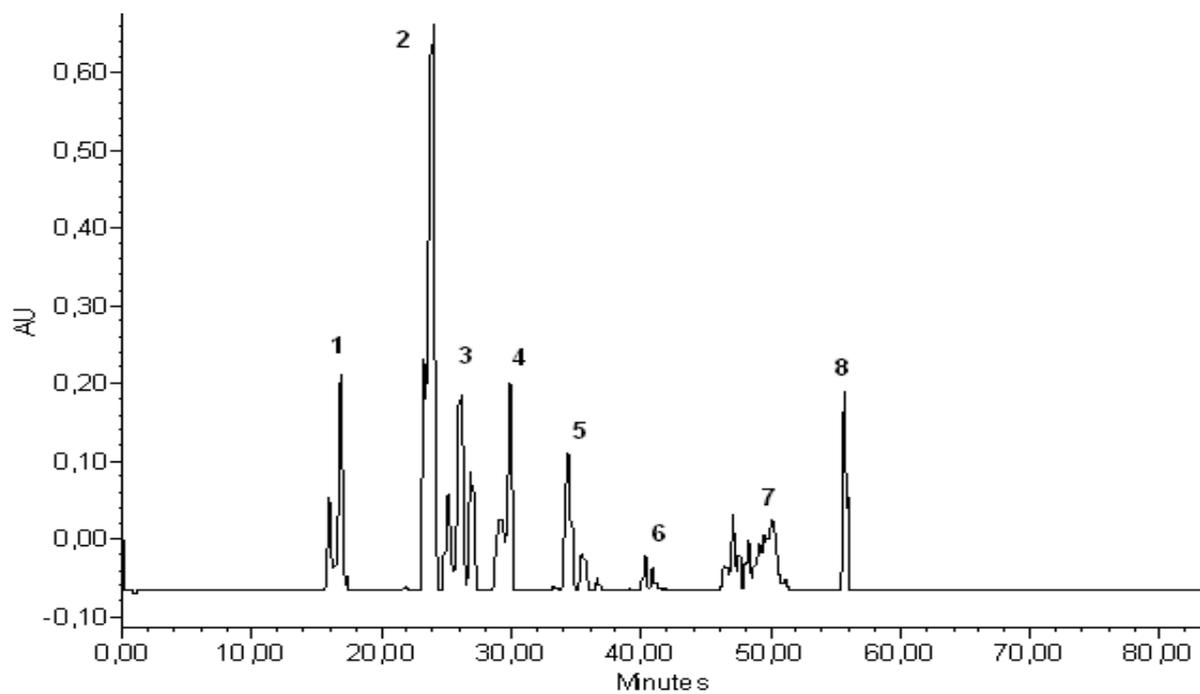
- Yernault J. C. et Demedts M. (1993).** Infections respiratoires en médecine générale. Ed. Garant, Louvain. Belgique. p.241.
- Zaika L. (1988).** Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination. Journal of Food Safety 9: 97-118
- Zemmouri H., Sonda A., Boumendjel A., Messarah M., El Feki A., Bouaziz M. (2014).** Chemical composition and antioxidant activity of *Borago officinalis* L. leaf extract growing in Algeria. King Saud University Arabian Journal of Chemistry. Article in press.
- Zhanel G. G., Walters M., Noreddin A., Vercaigne L. M., Wierzbowski A., Embil J. M., Gin A. S., Douthwaite S., Hoban D.J. (2002).** The ketolides: a critical review. Drugs. 62(12): 1771804.
- Zhang Q., Raheem K. S., Botting N. P., Slawin A. M. Z., Kay C. D., O'Hagan D. (2012).** Flavonoid metabolism: the synthesis of phenolic glucuronides and sulfates as candidate metabolites for bioactivity studies of dietary flavonoids. Tetrahedron. 68 (22): 4194-4201.
- Zheng G., Kenny P., Lam L. (1992).** Inhibition of benzo[a]-pyrene-induced tumorigenesis by myristicin, a volatile aroma constituent of parsley leaf oil. Carcinogenesis. 13: 1921-1923.
- Zia-Ul-Haq M., Riaz M., Vincenzo De Feo , Hawa Z. E. Jaafar, Marius Moga (2014).** *Rubus Fruticosus* L.: Constituents, Biological Activities and Health Related Uses. Molecules. 19: 10998-11029.
- Zimmer S. M., Burke D. S. (2009).** Historical perspective. Emergence of influenza A (H1N1) viruses. New England Journal of Medicine. 361: 279–285.
- Zirihi G. N. (1991).** Contribution au recensement, à l'identification et à la connaissance de quelques espèces végétales utilisées dans la médecine traditionnelle et la pharmacopée chez les Bété du Département d'Issia, Côte d'Ivoire. PhD thesis. Abidjan university.
- Zoran Z., Kukrića, Ljiljana N., Topalić-Trivunovića, Biljana M., Kukavicab Snježana B., Matoša, Svetlana S., Pavičića, Mirela M., Borojab and Aleksandar V. Savića (2012).** Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.). APTEFF. 43: 257-272.
- Zoran Z. Kukrića, Ljiljana N. Topalić-Trivunovića, Biljana M. Kukavicab, Snježana B. Matoša, Svetlana S. Pavičića, Mirela M. Borojab and Aleksandar V. Savića (2012).** Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.). APTEFF. 43: 1-342.
- Zoubiri et Baali O. (2011).** Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils.

Annexes

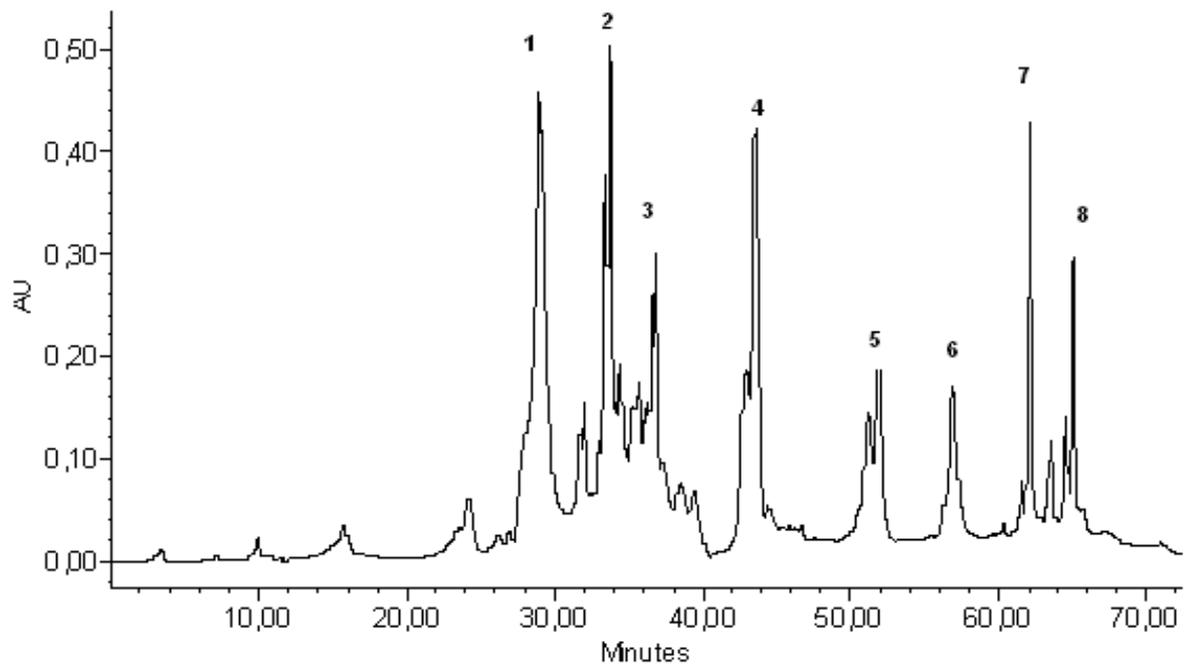
**Annexe 1 : Les chromatogrammes de la CG-SM des huiles essentielles*****B. officinalis******R. fruticosus***

*U. dioica*

**Annexe 2 : Courbe d'étalonnage de quercétine**

**Annexe 3 : Les chromatogrammes de la CLHP des flavonoïdes****Bourrache****Ronce**

**Ortie**



# Communications et publications

## Liste des communications et des publications

### Communications

Ce travail a fait l'objet de quatre communications, deux internationales et deux nationales :

**1.** Deuxième Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources.

Etude phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobiennes des extraits de *Rubus Fruticosus* L.

**Auteurs :** AFIF CHAOUICHE T., ARAB K., BENDAHOU M.

**2.** Premier Congrès International de Biotoxicologie et Bioactivité.

Etude des flavonoïdes de *Borago officinalis* : Phytochimie, activités antimicrobiennes et antioxydante.

**Auteurs :** AFIF CHAOUICHE T., ARAB K., BENDAHOU M., BENHABYLES N., BOUMAZA S., BOUCHENAK O.

**3.** Deuxième Séminaire National : Eau, Environnement et Biodiversité.

Etude de l'activité antimicrobienne des flavonoïdes et des huiles essentielles d'une plante médicinale Algérienne.

**Auteurs :** AFIF CHAOUICHE T., ARAB K., BENDAHOU M.

**4.** Première Journée Nationale de la Société Algérienne de Nutrition.

Effet antibactérien et antioxydant des extraits de deux plantes médicinales algériennes

**Auteurs :** AFIF CHAOUICHE T., ARAB K., BENDAHOU M., BENHABYLES N., BOUMAZA S.

### Publications internationales

Deux publications ont fait l'objet de ce travail :

**1.** AFIF CHAOUICHE Thanina, ARAB Karim, BENDAHOU Mourad (2014). Phytochemical screening of *Borago officinalis* L. and evaluation of its antioxidant and antimicrobial activities against respiratory pathogens. International journal of phytomedicine. 6 (2014): 369-376.

**(Impact Factor : 0,89 ; Abstacting and Indexing : Scopus,Elsevier, CAS, EMBASE,DOAJ, Crossref, Index Copernicus,Worldcat, HINARI, Google Scholar, Open J-Gate, ScopeMed,**

Science Central, EBSCO, Proquest, New Jour, Scirus, Scivee, Proquest, Academic resources, Citeseer, OAIster, Library Intelligencer, University of Nevada, University of Tsukuba Library, York University, Journalseek).

**2.** AFIF CHAOUICHE Thanina, ARAB Karim, BENDAHOU Mourad (2015). Antibacterial activity of two extracts from *Rubus fruticosus L.* against resistant pathogens and their Antioxidant potential. African Journal Of Microbiology Research.

**(Impact Factor: 0,5 ; Abstacting and Indexing :** Hygiene and Communicable Diseases Agricultural, Engineering Abstracts, Agroforestry Abstracts, Animal Breeding Abstracts, Animal Production, Database, Animal Science Database, Biocontrol News and Information, Biofuels Abstracts, Botanical Pesticides, CAB Abstracts).

# Phytochemical screening of Algerian *Borago officinalis* L. and evaluation of its antioxidant and antimicrobial activities against respiratory pathogens

Afif Chaouche Thanina<sup>1\*</sup>, Arab Karim<sup>2</sup>, Bendahou Mourad<sup>1</sup>

## \*Corresponding author:

Afif Chaouche Thanina

<sup>1</sup>Laboratory of Applied Microbiology in Food, Biomedical and Environment (LAMAABE), Department of Biology, Faculty of Nature and Life, Earth and Universe Sciences, Aboubekr Belkaid University of Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria.

<sup>2</sup>Laboratory of valorization and conservation of biological resources (VALCOR), Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Boumerdes, 35000 Boumerdes, Algeria.

## Abstract

Context and purpose of the study: Infectious diseases represent a serious problem of public health in countries where resistance of bacteria to antibiotics is spreading alarmingly. Such situation leads researchers to make efforts so they can isolate or synthesize new antimicrobial molecules or molecules that inhibit the resistance mechanisms. Medicinal plants can represent a rich source of such molecules. In this context, *Borago officinalis* L., a medicinal species which is used traditionally in Algeria to heal infectious diseases of respiratory system is studied. Both of chemical composition and biological activities were explored.

Main findings: GC-MS analysis of the essential oil reveals the Spathulenol as the most abundant component (38.24%). The HPLC applied on flavonoids extract shows the presence of the Caffeic acid, *p*-coumaric acid, Rutin, Rosmarinic acid, Quercetin and the Gallic acid. The test of the antioxidant capacity using the DPPH method reveal an inhibiting effect which is more important with the flavonoid extract with an EC 50 = 4.02± 0.06µg/ml. Otherwise, resistant strains to conventional antibiotics seem to be sensitive to the flavonoids with MICs varying from 10.14µg/ml to 81.12µg/ml.

Brief summary and potential implications: This study indicates that *Borago officinalis* L. has an important antimicrobial effect, which justifies its potential use in infectious diseases. This species remains poorly investigated, further refined studies on its pure secondary metabolites are needed, in the perspective of identifying new antimicrobial molecules from this plant.

**Keywords:** - *Borago officinalis* L., antimicrobial activity, respiratory pathogens, antioxidant activity, essential oil, flavonoids.

## Introduction

Despite serious efforts made by researchers in the hope of synthesizing new molecules, more than 25% of prescribed medicines in developed countries are directly or indirectly derived from plants [1]. However, as a source of medicines, plants remain under exploited and this fact is more remarkable in medical microbiology [2]. Certainly, most of prescribed antibiotics are derived from micro organisms [3], but there are many evidences that antimicrobial agents issued from plantae kingdom have an important place in this category of medicines [4]. Practically, every antibiotic has limited effective lifespan and after a while micro organisms could develop resistance so it becomes less effective or not effective at all. Moreover, in developing countries, these products are expensive, so more than 80% of population use plants to treat many diseases. [2,5]. In these countries, some populations practice self prescription mainly using herb teas [6].

*Boraginaceae* family include some 100 genus and more than 2000 species including bushes, trees, herbaceous plants and liana [7] which are used as decorative plants such as species of genus *Echium*, *Myosotis* and *Eritrichium*, but also for medical properties, it's the case of *Borago officinalis*, *Symphytum officinale*, *Pulmonaria officinalis* and *Echium vulgare* [8].

In Algeria, *Borago officinalis* is traditionally used for its anti infectious properties, taken as herb tea or eaten in dishes.

This herb native from Syria was naturalized throughout the Mediterranean region, as well as Minor Asia, Europe, North Africa, and South America. Traditionally borage was cultivated for culinary and medicinal uses [9]. According to some authors, this plant is used for regulating metabolism and hormonal system, and is considered to be a good remedy for menopause symptoms such as the hot flash and sometimes indicated to alleviate and heal colds, bronchitis and respiratory infections.

However, no reported studies were interested by the Algerian borage. One study was accomplished in Tunisia and was interested by the chemical composition of the essential oil of this species [10], another one performed in Italy was interested by the antioxidant activity of phenols [11].

The purpose of this study is to highlight the antimicrobial effect of this plant on both reference strains and strains isolated from patients with respiratory infections and also, to study the antioxidant properties of flavonoids extract and essential oil of *Borago officinalis* L.

## Materials and methods



## Studied plant

The harvest of the aerial part of *B. officinalis* was accomplished at the end of the winter and spring from the area of Tizi Ouzou, in the northeast of Algeria, about 80 km of Algiers, the capital, between 36° 43' 00" North and 4° 03' 00" East. To extract flavonoids, collected parts were dried in the open air and sheltered from light, then transformed into powder using an electrical crusher with helix, this powder was maintained in tightly closed glass flasks.

## Tested Bacterial strains

The tested strains was either reference strains or isolated from patients diagnosed with respiratory infections and hospitalized in the department of infectious diseases in the hospital university of Tizi Ouzou, the identification was effected using biochemical galleries Api 20E, Api 20NE, or specific tests.

## Phytochemical Screening

It means a set of colorimetric methods that allow detecting the presence or lack of secondary metabolites and realized on plant powder or infusion. We searched mainly anthocyanins, leucoanthocyanins, total tannins, irridoids, gallic tannins, catechin tannins, alkaloids, flavonoids, saponosids, senosids, quinons, coumarins and mucilages [12-13].

## Extraction of essential oil

The extraction of essential oil was effected by hydro distillation, for that, 100g of fresh matter was soaked in a recipient of 1l then filled with 600 ml of distilled water, the hole system was boiled during 3 hours. Massed vapors of essential oils were condensed by crossing a refrigerator and collected. Organic state was recovered by adding few milliliters of diethyl ether and the obtained oil was kept in a temperature between 0 C and 4 C.

## GC-MS of essential oils

The analysis of chemical composition of the obtained essential oil was accomplished by GC-MS. The used device was GC Perkin Elmer 600, SM Perkin Elmer 600C, using also a Rtx-VMS column (60m length, 250µm diameter). The carrier gas was Helium (1ml/min). 0.2µl of the oil to analyze was injected using a syringe.

## Extraction of flavonoids

The extraction of flavonoids was realized according to Bruneton protocol [14]. This extraction is based on the solubility degree of flavonoids in organic solvents. This protocol includes two main steps: the first one is accomplished using methanol to solubilize flavonoids and the second one includes washings using petroleum ether, diethyl ether, ethyl acetate and butanol. The extract obtained after washing using butanol contains the most polar flavonoids.

## Dosage of flavonoids using spectrophotometry method

To realize the dosage of flavonoids, we used the method of aluminum chloride colorimetric method [15]. Absorbance was read by a spectrophotometer (Optizen 2120 UV) at 430 nm. To calculate the concentration of flavonoids in the extract, a calibration range was established using quercetin (1-25µg/ml). The results of dosage are expressed in equivalent micrograms of quercetin for a gram of the extract.

## High performance liquid chromatography (HPLC)

Qualitative analysis of the extract of flavonoids was realized using HPLC. Stationary phase was made with a column of silica (C18 reverse phase), dimensions were 125 mm by 4.6 mm. Mobile phase was a mixture of water/methanol /acetic acid (50:47:2.5), in isocratic system with a flow of 1 ml/min [16]. Extracts and standards were analyzed with concentrations of 0.5 mg/ml. The injected volume was 20 µl. Detection was realized using a UV-Visible detector in a wave length of 254 nm.

## Antimicrobial activity

The antimicrobial activity of essential oil was studied using a device of multiple seeding, Steers machine, according to the recommendation of the French society of microbiology that allowed determining the inhibitory activity of the extract on the growth of bacteria. Essential oil was directly diluted in mediums: Mueller Hinton for bacteria or Sabouraud for fungi then let to solidify. Bacterial suspensions with concentrations of 0.5 Mc Farland was placed using spots. For flavonoids, plates of Mueller Hinton agar for bacteria and Sabouraud agar for fungi were inoculated by swabbing of standardized microbial suspension (0.5 Mc Farland), according to NCCLS recommendations [17]. Then, discs of 6 mm of diameter, impregnated with 10 µL of extract at different concentrations were placed on the surface of agar. In addition, discs of antibiotics were placed on the center of plate and served as positive controls for bacterial and fungal strains respectively. After incubation at 37 C for 24 h for bacteria or at 28 C for 48 h for fungi, antimicrobial activity of both extracts was determined by measuring the minimal inhibitory concentration. All tests were performed in triplicate.

## Antioxidant activity

### Study of antioxidant properties using the DPPH test

To asses qualitatively the antioxidant activity of both flavonoid extract and the essential oil, we used thin layer chromatography, Huang *et al.* in 2005 [18]. This method is generally based on the inhibition of accumulation of oxidized products. In this case, free radicals are inhibited by adding antioxidant molecules. In this test, both extracts and standard (ascorbic acid) were diluted in pure ethanol with different concentrations: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1 mg/ml. A volume of 10 µL from each concentration and from the



standard was deposited on the silica block, after drying, the block was entirely soaked during 10 seconds in a tray containing a DPPH solution, yellow stains appeared revealing antioxidant activity.

To determine quantitatively the antioxidant effect of extracts, we used the method proposed by Sanchez Moreno *et al.* [19]. This determination consists to prepare concentrations of 0.00125, 0.0025, 0.005, 0.01, 0.031, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75 and 1 mg/ml from a stock solution of both extracts obtained by dissolution in methanol. For the essential oil, 1ml from each concentration was mixed with 4ml of DPPH solution with concentration was 0.0024g/ml. For flavonoids, we realized a mixture of 25  $\mu$ l of each concentration with 975  $\mu$ l of the same solution of DPPH. Ascorbic acid was also prepared using the same method. The measure of the variation of absorbance was done 30 minutes after introducing tanks in UV-Visible spectrophotometer (Optizen 2120 UV), drove by an informatics system in the wavelength of 517 nm. The obtained values were transformed to percentages of inhibition using the following formula:  $I\% = 100 \times \frac{A_{reference} - A_{test}}{A_{reference}}$

A reference represents the absorbance of the control (containing reactive without the extract to be tested)

$A_{Test}$  is the absorbance of the extract.

## Statistical analysis

Results of the antioxidant activity were expressed as mean  $\pm$  SD. For the antimicrobial activity, the statistical comparison among the group was performed with one way ANOVA using statistical presentation system, Statistica version 6.

## Results

### Phytochemical screening

Results show that *B. officinalis* is wealthy in tannins, leuco-antocyanins, alkaloids, saponosids, glucosids and mucilage (table 1).

**Table 1: Presence or absence of secondary metabolites in Borago**

Tests	Abundance
Total tannins	++
Catechin tannins	-
Gallic tannins	+
Flavonoids	++
Anthocyanins	+
Leuco- anthocyanins	-
Alkaloids	++
Senosids	-
Amidon	-
Saponins	++
Irridoids	-
Glucosids	++
Mucilages	++
Coumarins	-
Quinons	-

++: abundance    +: Presence    -: Absence

### Extraction of essential oil

For 100 g of dried matter, we obtained a yield of 0.054% of essential oil. The obtained oil is lightly viscous, with a pale coloration (nearly transparent) and a specific odor.

### Extraction of flavonoids

The obtained aqueous extract presents a gelatinous aspect, with a brown color. The yields of different extracts (diethyl ether, ethyl acetate, butanolic and aqueous) vary between 2.066% and 37.6% (table2).

**Table 2: Yields in % of flavonoids extracts**

Extract	%
Diethyl ether extract	2,066%
Ethyl acetat extract	16,1%
Butanolic extract	18,16%
Flavonoid extract	37,6%

### Dosage of flavonoids

The content in flavonoids is reported in equivalent  $\mu$ g of quercetin/ml of the extract of the plant. The concentration of the flavonoid in the extract is 81.12  $\mu$ g/ml. Results are compiled in table 3.

**Table 3: Values of dilution factors and concentrations of different extracts**

Plant	Factor of dilution	Concentration expressed in $\mu$ g Equivalent of Quercetin /ml
<i>Borago officinalis</i>	4,081	81,12 $\mu$ g/ml

### High performance liquid chromatography

The HPLC analysis showed the presence of the Gallic acid, the Caffeic acid, the *p*-coumaric acid, the Rutin, the Quercetin and the Rosmarinic acid in the flavonoid extract of *B. officinalis* (figure.1, table 4)

**Table 4: Compounds revealed by the HPLC analysis**

Retention time (min)	Standard
1	Gallic acid
2	Caffeic acid
3	<i>p</i> -coumaric acid
4	Rutin
5	Rosmarinic acid
6	Quercetin



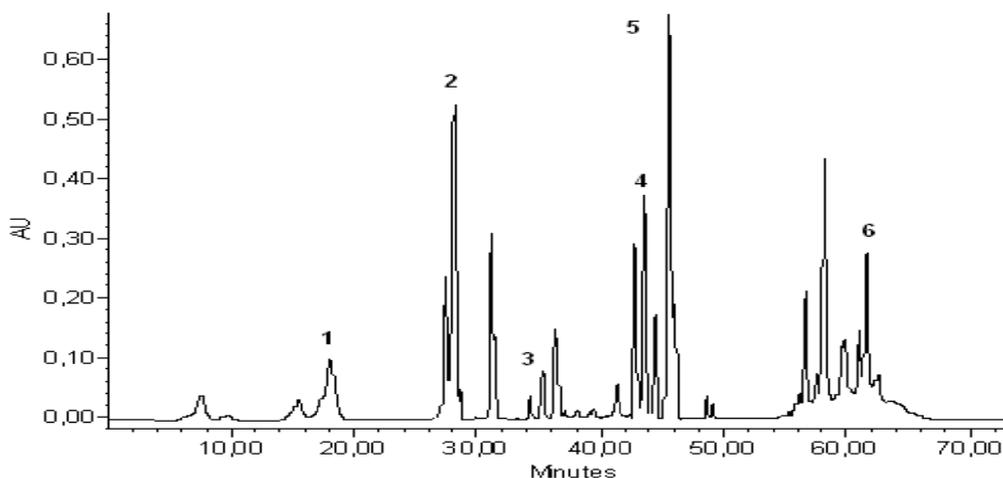


Figure.1 Chromatogram of the flavonoid extract registered at 254 nm

### GC-MS of Essential Oil of *B. officinalis*

The GC-MS analysis of the essential oil of borage allowed identifying 7 molecules (figure. 2). The Spathulenol constitute the major component (38.24%) (Table 5).

Table 5: Main chemical components analyzed by GC-MS

N	R <sub>t</sub>	Name of the compound	%
1	42.55	Trifluoromethyl	
2	45.22	Thymol	
3	48.31	Verrucarol	06.93
4	55.87	Spathulenol	38.24
5	56.19	Globulol	10.02
6	57.60	Gamma-Himachalène	07.84
7	59.07	Guaiol	12.87
Total			91.70

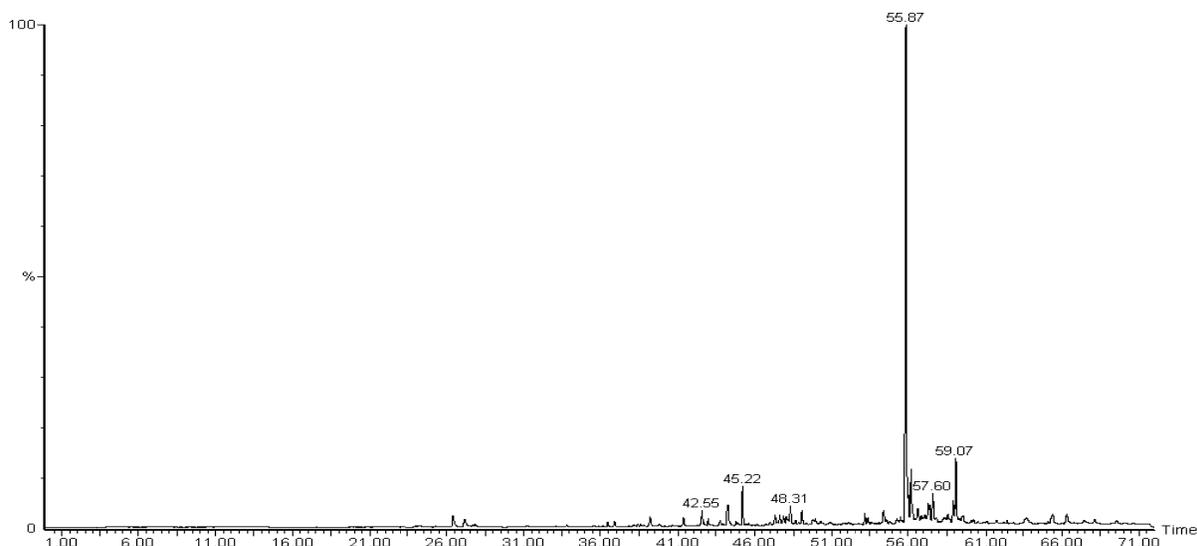


Figure.2 Chromatographic profile of the analysis of essential oil by GC-MS

### Antimicrobial activity

The results of the antimicrobial activity of both extracts against

reference strains showed an important effect on bacteria of respiratory flora (Table 6).



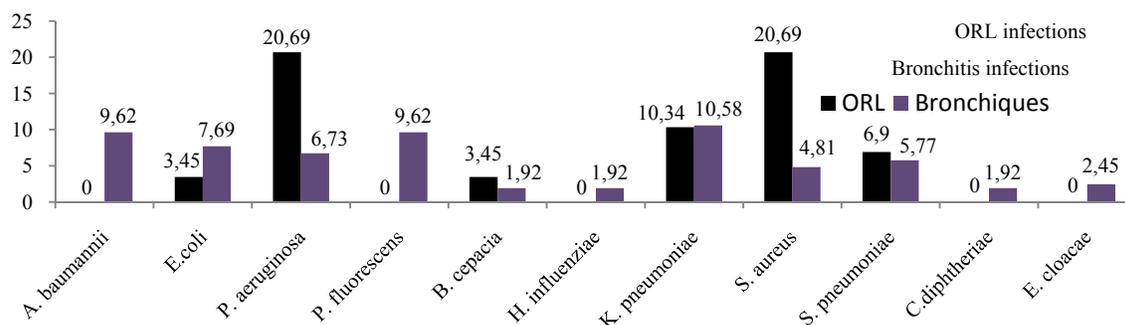
**Table 6: Antimicrobial activity of *B. officinalis* against reference strains**

Strain	Reference	MIC <sub>s</sub>	
		E.O (mg/ml)	Flavonoïds (µg/ml)
<i>E. coli</i>	ATCC 11229	0.5	40.56
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	0.5	40.56
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	R	20.28
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 10211	0.125	20.28
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 10015	R	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	0.0625	10.14
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	0.0625	20.28
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	0.125	40.56

Extracts were tested on isolated bacteria from respiratory infections. Clinical bacterial strains are isolated from 250 samples of patients with respiratory infections, 70 of samples are ORL infections samples when 180 are bronchitis infections.

Figure 3 shows the frequency of every bacterial strain in the hole of isolated strains.

Isolated strains that showed resistance to some antibiotics were sensitive to flavonoid extract and sometimes also to essential oil, it is interesting to note that *E.coli* (resistant), *Streptococcus pneumoniae* (sensitive to amoxicilline ) and *Klebsiella pneumoniae* (sensitive to Imipeneme) are sssensitives to flavonoids with MIC<sub>s</sub> of 40.56 µg/ml (Table 7).



**Figure.3 Frequency of microbial strains isolated from patients with respiratory infections.**

**Table 7: Activity of *B. officinalis* extracts against respiratory pathogens**

Strains	Antibiotics								Essential oils(CIM <sub>s</sub> )	Flavonoids(CIM <sub>s</sub> )µg/ml
	Cip	Amo	Ceph	Tic	Trim	Cefo	Cefu	Ceft		
<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	40.56
	R	R	R	R	R	R	R	R		
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	Fost	Imi	Levo	Amik	Cet	Cip	/	/	0.5	20.28
	R	R	S	S	S	S	/	/		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Azith	Cipr	Levo	Tic	Trim	Gent	Imi	Cef	R	20.28
	R	R	R	R	R	S	S	S		
<i>Burkholderia Cepacia</i>	Amox	Imi	Gent	Cefo	Col	Cefa	/	/	0.25	10.14
	S	S	S	S	S	R	/	/		
<i>Haemophilus Influenziae</i>	Cot	Amo	Ofi	Tet	Cefo	/	/	/	0.25	10.14
	R	S	S	R	S	/	/	/		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Amo	Cef	Gent	Amp	Ami	Col	Imi	Cot	R	40.56
	R	R	R	R	R	R	S	R		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Tic	Pop	Cef	Imi	Ofi	Cip	Col	Tic +Ac	C.E.	20.28
	R	R	R	R	R	R	S	R		
<i>Streptococcus Pneumoniae</i>	Azith	Cefac	Ceft	Cefur	Eryt	Peni	Tetr	Amo	C.E	81.12
	R	R	R	R	R	R	R	S		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Vanc	Oxa	Gent	Amp	/	/	/	/	C.E	R
	S	S	S	R						
<i>Enterobacter Cloacae</i>	Azith	Oxa	Gent	Amp	Amo	Imi	Tetr		R	20.28
	R	R	R	R	R	R	S			
<i>Candida albicans</i>	Azith	Oxa	Gent	Amp	Amo	Imi	Tetr		R	20.28
	R	R	R	R	R	R	R			

R : Resistant / S : Sensitive

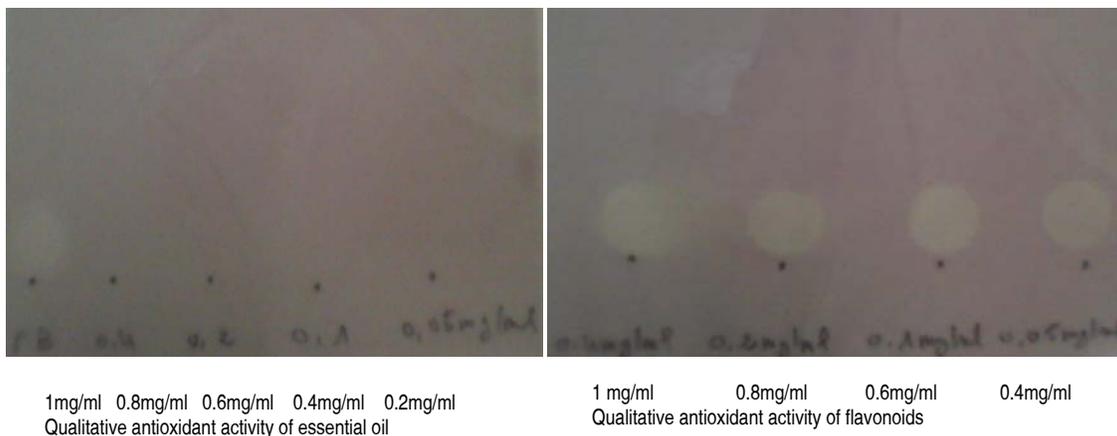


## Antioxidant activity

### Qualitative study

Observation of blocks revealed the presence of a light yellowish stain only for the untreated extract. For flavonoids, the oxidation

produced a yellowish stains for all dilutions which makes evidence that flavonoids of borage have a superior antioxidant effect than essential oils (Figure.4).



### Quantitative study

The free radical scavenging assayed by DPPH discoloration revealed a high activity of flavonoids extract of *B. officinalis* and a very weak activity for her essential oil. Values of EC<sub>50</sub> of obtained

flavonoids ( $=4.02 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$ ), are closer to the ascorbic acid taken as standard ( $\text{EC}_{50} = 1,21 \mu\text{g/ml}$ ), in opposition of essential oils with an  $\text{EC}_{50} = 10.39 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$  (Figure. 5).

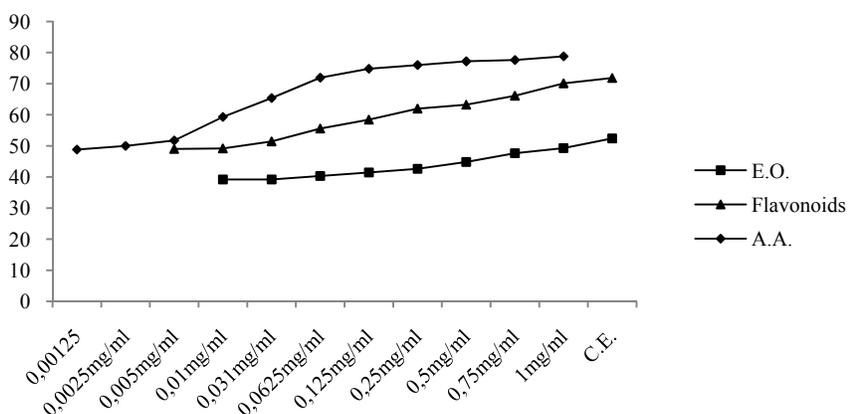


Figure.5 Graphic of inhibition percentages

### Statistical analysis

Statistical analysis of the antimicrobial activity gave a value of  $p < 0.05$  ( $p = 0.049$ ), that means that the extract acted significantly against bacterial strains which was resistant to antibiotics.

### Discussion

The phytochemical screening of *Borago officinalis* showed an important wealth in tannins, alkaloids, flavonoids, saponosids, glucosids and mucilage. However, these metabolites were found with a low abundance by Sorooshzadeh *et al.* in 2008 in Iran [21]. Hydrodistillation allowed a yield of  $0.37 \pm 0.01\%$  of essential oil. This value is lower than the one found by selem *et al.* in the area of Korba (Tunisia) ( $0.95 \pm 0.03\%$ ), and lightly higher than the one obtained by the same authors in Beja, Tunisia ( $0.29 \pm 0.03\%$ ) [22].



Concerning flavonoids, the yield was 37.6%. Because of lack of studies, we compared our results with those obtained by Javad Aliakbarlu *et al.* in 2012 on polyphenols of borage in Iran; these authors reported a yield of 64.1 mg/g of polyphenols [23].

These differences may be explained by many factors mainly by the biotope of the plant and the season of harvest.

Biochemical characterization of both extracts used in this study shows the presence of Rutin and Quercetin for flavonoids and Spathulenol for essential oil as a major component.

There are no preceding studies that showed presence of Rutin in flavonoids of borage, concerning the chemical composition of essential oil, Baya Mhamedi *et al.*, has shown the presence of  $\beta$ -Caryophyllene as the most abundant component with a rate of 26% [10].

A study of anti microbial activity showed that both methanolic and ethanolic extracts of borage have a very low antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* (inhibition zone = 10.32mm) [23].

The antimicrobial activity of flavonoids issued from borage is more important than the one of essential oil and that can be attributed to the wealth of both extracts in antimicrobial components. Essential oil contains seven molecules and the major component is the spathulenol witch belongs to sesquiterpens oxidized family which is known as having a weak antibacterial activity, this component is more considered as anti fungal agent. Concerning flavonoids, they are wealthy in Rutin and Quercetin which are known as antimicrobial agents.

Furthermore, essential oils of this species seems to be more active against gram negative bacteria than gram positive bacteria unlike flavonoids, they have activity against both Gram positive and Gram negative bacteria.

Many studies established the correlation between the chemical composition and the antimicrobial activity, these works ordered the exercised effect by major components of essential oil as follow: phenols, alcohols, aldehyds, cetons, ether and hydrocarbons [24].

These results of antimicrobial activity of flavonoids are promising and could be a starting point to develop new antimicrobial drugs.

Our study was limited on bacterial strains isolated from respiratory infections, results showed that some resistant strains to standard antibiotics was sensitive to flavonoids extract, these results are promising and could lead to discover new antimicrobial molecules.

Concerning the antioxidant activity, in this work, this property seems to be high for flavonoids, with an  $EC_{50}$  of  $4.02 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$ , this activity is lower for essential oil of the same plant. This result is the same for DPPH method practiced on the same plant but on a different extract: the hydroalcoholic extract that showed a higher antioxidant activity with an  $EC_{50}$  of  $58 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$  [11].

The evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of two extracts obtained from Algerian *Borago officinalis* tested in this work showed that this plant, especially her flavonoïds extract, had a remarkable inhibitory effect on resistant respiratory pathogens.

Further studies are needed to develop formulations for pharmaceutical use based on these extracts to fight these pathogens.

## Conclusion

The evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of two extracts obtained from Algerian *Borago officinalis* tested in this work showed that this plant, especially her flavonoïds extract, had a remarkable inhibitory effect on resistant respiratory pathogens.

Further studies are needed to develop formulations for pharmaceutical use based on these extracts to fight these pathogens.

## List of abbreviations

*B. officinalis*: *Borago officinalis* L.

GC-MS: Gas Chromatography- Mass Spectrophotometry

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

MIC: Minimal Inhibitory Concentration

$EC_{50}$ : Efficient Concentration 50

$R_t$ : Retention time

C.E.: Crude extract

AMP: Ampicilin

IMI: Imipenem

GENT: Gentamicin

AZITH: Azithromicin

CIP: Ciproflaxin

VAN: Vancomycin

OXA: Oxacilin

TET: Tetracilin

ERYT: Erythromicin

PENI: Penicilin

AMO: Amoxicilin

CEF: Cefazolin

LEV: Levoflaxin

## Authors' contributions

This work is a part of preparation of a PHD thesis and was achieved by AFIF CHAOUHE Thanina, with ARAB Karim and BENDAHOU Mourad as advisers. Advisers contributed by counseling and writing of this manuscript.

## Acknowledgements

The authors are grateful for the assistance of Dr. Iheden Zaher, from the Polytechnic Military School, in the GC-MS analysis and results interpretation.



## References

- [1]. Newman DJ, Cragg G M, Snader K M. The influence of natural products on drug discovery. *Natural Prod. Rep.* 2000; 17:175-285.
- [2]. Kirby GC. Medicinal plants and the control of protozoan diseases, with particular reference to malaria. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1996; 90: 605-609.
- [3]. Clark AM. Natural products as a source for new drugs. *Pharmacol. Res.* 1996; 13
- [4]. Cowan MM. Plants products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12: 564-582.
- [5]. Hostettmann K, Marston A. Twenty years of research into medicinal plants. *Phytochem. Rev.* 2002; 1: 275-285.
- [6]. Eisenberg DM, Kessler R C, Foster C, Nortlock FE, Calkins D R, Delbanco T L. Results and perspectives unconventional medicine in the united states: prevalence, cost and pattern of use of medicine. *Nat. Engl. J. of Med.* 1993; 328: 246-252.
- [7]. Evans WC. Trease and Evans. *Pharmacognosy.* Saunders, London; 2009. p. 603.
- [8]. OKUSA NDJOLO P: Etude phytochimique et activité antimicrobienne directe et indirecte de *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae), Université Libre de Bruxelles, Faculté de Pharmacie ; 2012
- [9]. Mayank Gupta, Swati Singh. *Borago officinalis* Linn. An important medicinal plant of mediterranean region: a review. *International Journal of Pharmaceutical sciences.* 2010; 005 (5): 27-31.
- [10]. Mhamdi B, Aidi Wannes W, Bourgou S, Marzouk B. Biochemical characterization of borage (*Borago officinalis* L.) seeds. *Journal of Food Biochemistry.* 2009; 33 (3): 331–341.
- [11]. Filomena Conforti, Silvio Sosa, Mariangela Marrelli, Federica Menichini, Giancarlo A S, Dimitar Uzunov, Aurelia Tubaro, Francesco Menichini, Roberto Della Loggia. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of Ethnopharmacology.* 2008 ; 116: 144–151.
- [12]. Harborne AJ. *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis.* 3rd ed. London: Chapman & Hall; 1998. p. 320.
- [13]. Raaman N. *Phytochemical techniques.* New Delhi, New India: Publishing Agency; 2006. p. 306.
- [14]. Bruneton J. *Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales.* 3ème Édition. Paris : Tec & Doc ; 1999. p575.
- [15]. Bajorun T, Grinier B, Trotin F, Brunet G, Pin T, Luncky M, Vasseur J, Cazin M , Cazin C, Pinkas M. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung.* 1996; 46(11): 1086-1089.
- [16]. Amarowicz R, Troszynska A, Shahidi F. Antioxydant activity of almond seed extract and its fractions. *Journal of Food Lipids.* 2005; 12: 344-358.
- [17]. NCCLS. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically.* 7th edition. Wayne, Pennsylvania: Approved Standard M7-A7; 2006
- [18]. Huang D J, Chen H J, Lin C D, Lin Y H. Antioxidant and antiproliferative activities of water spinach (*Ipomoea aquatica* Forssk.) constituents. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 2005; 46: 99-106.
- [19]. Sanchez Moreno C, Larrauri J A, Saura Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agri.* 1998;79:270-276.
- [20]. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction prepared from glucoseamine. *Jpn J. Nutr.* 1986; 44: 307 – 314.
- [21]. Sorooshzadeh A, Naghdi Badi H, Rezazadeh S, Sharifi M, Ghalavand A, Rezai A. Evaluation of Phytochemical and Production Potential of Borage (*Borago officinalis* L.) During the Growth Cycle. *Journal of Medicinal Plants.* 2008; 7: 37-43
- [22]. Salem N, Msaada K, Hammami M, Limam F, Vasapollo G, Marzouk B. Variation in anthocyanin and essential oil composition and their antioxidant potentialities during flower development of Borage (*Borago officinalis* L.). *An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology.* 2013
- [23]. Aliakbarlu J, Tajik H. Antioxidant and antibacterial activities of various extracts of *Borago officinalis* flowers. *Journal of Food Processing and Preservation.* 2012; 36: 539-544
- [24]. Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry.* 2003; 10: 813-829.



## Full Length Research Paper

# Antibacterial activity of two extracts from *Rubus fruticosus* L. against resistant pathogens and their antioxidant potential

AFIF CHAUCHE Thanina<sup>1\*</sup>, BENDAHOU Mourad<sup>1</sup> and ARAB Karim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Applied Microbiology in Food, Biomedical and Environment (LAMAABE), Department of Biology, Faculty of Nature and Life, Earth and Universe Sciences, Aboubekr Belkaid University of Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria.

<sup>2</sup>Laboratory of Valorization and Conservation of Biological Resources (VALCOR), Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Boumerdes, 35000 Boumerdes, Algeria.

Received 18 February, 2015; Accepted 27 April, 2015

One of the most serious threats to public health across the world is the spread of antibiotics resistant pathogens. This situation obliges researchers from all over the world to focus on how they can overcome this obstacle mainly by searching or synthesizing new molecules to neutralize microbes and to overcome the phenomenon of resistance. One of the main reservoirs of potentially active molecules is the plantae kingdom. In this work, we focused on *Rubus fruticosus* L., a medicinal species which is used traditionally in Algeria to heal respiratory infections. Both of chemical composition and biological activities of essential oils and flavonoids extract were explored. GC-MS analysis of essential oil reveals the Linceol as the most abundant component (20.22%). HPLC applied on flavonoids extract shows the presence of the gallic acid, galocatechin, protocatechuic acid, catechin, caffeic acid, rutin, ellagic acid and myricetin. Tests of antioxidant capacity using the DPPH reveals an inhibiting effect which is more important with the flavonoid extract. Otherwise, resistant strains to conventional antibiotics seem to be sensitive to the flavonoids of this species with MICs varying from 2.36 to 75.54 mg/ml. This study indicates that *R. fruticosus* L. has an important antimicrobial effect, which justifies its potential use in infectious diseases. For many reasons, this species remains poorly studied, further refined studies on its pure secondary metabolites are needed in the perspective of identifying new antimicrobial molecules from this plant.

**Key words:** *Rubus fruticosus* L., essential oil, flavonoids, antimicrobial activity, resistant respiratory pathogens, antioxidant activity.

## INTRODUCTION

Respiratory infections are considered as a major risk for human health, beside emerging respiratory infections

such as severe acute respiratory syndrome (SARS), avian influenza and Hantavirus pulmonary syndrome,

\*Corresponding author. E-mail: [afifchaouchethanina@yahoo.fr](mailto:afifchaouchethanina@yahoo.fr). Tel: 00 213 771 79 44 49.

Author(s) agree that this article remains permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

some respiratory infections are considered as eradicated or nearly, reappear with serious consequences: every year more than 8 million cases of severe respiratory infections are reported causing 3.9 million death (Sansone and Orth, 2006).

Despite the fact that researchers developed an important arsenal to face these infections and others, emerging resistances to antibiotics come to complicate the situation, this resistance implies various mechanisms such as modifying or synthesizing new targets, enzymatic modification, increasing efflux of antibiotics or others, the result is an under activity or non-activity of an important number of antibiotics used nowadays.

Many solutions were suggested to face this situation, and one of the most promising options is trying to extract from the plants new molecules that can be safe and effective in healing such diseases, the number of medicinal plants are estimated to be between 40000 and 70000 which are very diverse source of bioactive molecules and about 80% of world population is currently using these plants (Ramawat, 2009).

The interest in using these plants by population and also in research and academic world is increasing; new journals and reference books are published to enable researchers to find evidence based knowledge. *Rubus fruticosus* L. (Rosaceae) is a shrub well known for its fruit, called blackberries which are marketed all over the world for its delicious taste and high nutritive value. The shrub may be original from Armenia and is nowadays spreading in Europe, Asia, Oceania, northern and southern America and northern Africa (Hummer and Janick, 2007; Swanston-Flatt et al., 1990; Zia-Ul-Haq et al., 2014).

This plant is understory vegetation, can reach 3 m in length and have spiny stems. It flourishes at the end of spring and the fruit ripens in autumn (Hummer and Janick, 2007). According to some authors, this plant can be a good remedy for bronchitis and respiratory infections (Blumenthal et al., 1998).

However, no studies are reported on the Algerian *R. fruticosus* L. Two studies in Iran and Pakistan were reported by the antimicrobial activity of this species, two others were interested with the antioxidant activity.

The purpose of this study was to highlight the antimicrobial activity of this plant on both reference strains and strains isolated from patients with respiratory infections and in the same time, the study shows the antioxidant properties of its flavonoids extract and essential oil.

## MATERIALS AND METHODS

### Biological material

The harvest of the aerial part of *R. fruticosus* was accomplished in spring in the area of Tizi Ouzou, in the north east of Algeria, about 80 km of Algiers, the capital, between 36° 43' 00" North and 4° 03' 00" East. To extract flavonoids, collected parts were dried in open air and sheltered from light, then transformed into powder using an

electrical crusher; this powder was maintained in tightly closed glass flasks.

The tested strains was either reference strains or isolated from patients diagnosed with respiratory infections and hospitalized in the department of infectious diseases in the hospital university of Tizi Ouzou, the identification was effected using biochemical galleries Api 20E, Api 20NE, or specific tests.

### Phytochemical screening

Phytochemical screening represents a set of colorimetric methods that can lead to detect the presence or lack of secondary metabolites and should be realized on plant powder or infusion. We searched mainly alkaloids, anthocyanins, saponosids, leuco-anthocyanins, total tannins, gallic tannins, catechin tannins, alkaloids, flavonoids, saponosids, irridoids, quinones, coumarins and mucilage (Harborne, 1998; Raaman, 2006).

### Extractions

The extraction of essential oil was effected by hydro distillation, to accomplish this, 100 g of fresh matter was soaked in a recipient of 1l filled with 600 ml of distilled water, the whole system was boiled for 3 h. Collected vapors were condensed by transiting a refrigerator and collected. Organic state was recovered by adding few milliliters of diethyl ether and the obtained oil was kept in a temperature between 0 and 4°C.

The extraction of flavonoids was realized according to Bruneton (1999) protocol. This extraction is based on the difference of solubility degrees of flavonoids in various organic solvents. This protocol includes two main steps: first, methanol is used to solubilize flavonoids and then washings using petroleum ether, diethyl ether, ethyl acetate and butanol are realized. After using butanol, the extract contains the most polar flavonoids.

### Characterization of the extracts

#### GC-MS of essential oils

Analysis of the chemical composition of the essential oil was carried out by chromatography and gas chromatography coupled with mass spectrometry, the apparatus was a GC Perkin Elmer 600, MS Perkin Elmer 600C, a column Rtx-VMS menu (60m long with a diameter of 250 µm). The carrier gas was helium with a flow rate of 1ml/min. 0.2 µl oil was used to analyze injection using a special syringe.

The temperature was 70°C for 1 min, ramp 3to 160°C, 1 min ramp 2°C/min to 230°C for 5 min. The injector temperature was 230°C.

#### Dosage of flavonoids using a spectrophotometry method

To dose flavonoids, we used the aluminum chloride colorimetric method (Baharun et al., 1996). Absorbance was read by a spectrophotometer (Optizen 2120 UV) at 430 nm. To determine the concentration of flavonoids in the extract, a calibration range was established using quercetin (1-25 µg/ml). The results of dosage are expressed in equivalent micrograms of quercetin for each gram of the extract.

#### High performance liquid chromatography

HPLC was used to achieve the quantitative analysis of flavonoids.

Column of silica was used as stationary phase (C18 reverse phase), this column measures 125 by 4.6 mm. A mixture of water/methanol/acetic acid (50:47:2.5) was used as a mobile phase, in isocratic system with a flow of 1 ml/min (Amarowicz et al., 2005). Extracts and standards were both analyzed with concentration of 0.5 mg/ml. The used volume was 20  $\mu$ l. Detection was achieved by a UV-Visible detector at 254 nm.

## Biological activities

### Antimicrobial activity

A steers machine which is a multiple seeding instrument was used to facilitate the study of the antimicrobial activity of essential oil and this is according to the recommendations of the French Society of Microbiology. After diluting essential oil in mediums: Mueller Hinton for bacteria or Sabouraud for fungi, they were let to solidify. Bacterial suspensions of 0.5 Mc Farland was put using spots. For assessing the flavonoid extract activity, plates of Mueller Hinton agar for bacteria and Sabouraud agar for fungi were inoculated by swabbing of standardized microbial suspension (0.5 Mc Farland), according to NCCLS recommendations (NCCLS, 2006), after that, on the agar, we placed discs of 6 mm diameter containing 10  $\mu$ l of extract with different concentrations.

As positive control, discs containing antibiotics was used and placed in the center of the plate. After incubating for 24 h at 37°C for bacteria and 48 h for fungi, we determined the antimicrobial activity of both extracts by measuring the MICs. Every test was performed in triplicate.

### Antioxidant activity

#### The DPPH test

To quantify the antioxidant activity of both flavonoids extract and essential oil, we used the method of Sanchez Moreno et al. (1998). For that, we prepared various concentrations of 0.1; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 and 1 mg/ml using a stock solution of both extracts obtained by dissolution in methanol. 1 ml from each one of the concentrations was added to 4 ml of DPPH solution whose concentration was 0.024 mg/ml, this was the preparation for assessing the activity of essential oil. For flavonoids, we mixed 25  $\mu$ l of each concentration with 975  $\mu$ l of the same solution of DPPH. Ascorbic acid was prepared using the same protocol. After 30 min, we measured the variation of absorbance using UV-visible spectrophotometer (Optizen 2120 UV), driven by a computing system in the wavelength of 517 nm. To express results in percentage, we used

$$\text{this formula: } I\% = 100 \times \frac{A_{\text{reference}} - A_{\text{test}}}{A_{\text{reference}}}$$

$A_{\text{reference}}$  is the absorbance of the control which contains only reactive.  $A_{\text{test}}$  is the absorbance of the extract.

### Statistical analysis of the data

Results of the antioxidant activity were expressed as mean  $\pm$  SD.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Phytochemical screening

The phytochemical screening of *R. fruticosus* L. reveals abundant amount of total tannins, catechin tannins, gallic

**Table 1.** Phytochemical screening of *R. fruticosus*.

Test	Abundance
Total tannins	++
Catechin tannins	++
Gallic tannins	++
Flavonoids	++
Anthocyanins	-
Leuco- anthocyanins	-
Alkaloids	-
Senosids	+
Amidon	-
Saponosids	++
Irridoids	-
Glucosids	-
Mucilages	-
Coumarins	++
Quinons	-

++: abundance; +: presence; -: absence.

**Table 2.** Yields in % of flavonoids extracts.

Extract	%
Diethyl ether extract	21.96
Ethyl acetat extract	12.29
Butanolic extract	35.15
Flavonoids	30.6

tannins, flavonoids, senosids, saponosids, coumarins (Table 1).

This plant seems to have a high potential but there is no sufficient studies on its chemical composition and biological activities.

A study on the same species shows that it contains alkaloids, flavonoids, tannins, saponins and glycosides (Rameshwar et al., 2014). We found similar results with no glycosides, but the presence of other compounds such as sénosides and coumarins.

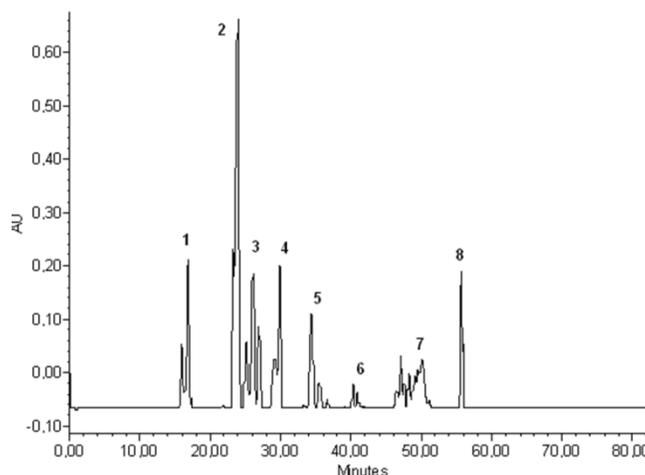
### Extractions

Using 100 g of dried matter, the yield was  $0.05 \pm 0.01\%$  of essential oil. We obtained lightly viscous oil, with a pale yellow coloration and a characteristic odor. The aqueous extract has a gelatinous aspect and brownish color. The yields of extraction using different solvents (diethyl ether, ethyl acetate, butanolic and aqueous) vary between 2.99 and 63.2% (Table 2).

Blackberry has about 30% of highly polar flavonoids (weak) against more than 60% butanol extract (the most abundant extract) in the plant of the present study. Total

**Table 3.** Retention time of the used standards.

Retention time (min)	Compound
17	Gallic acid
24.5	Gallocatechin
26.1	Protocatechic acid
30	Catechin
34.4	Caffeic acid
40.3	Rutin
50	Ellagic acid
55.6	Myricetin

**Figure 1.** Chromatogram of HPLC applied to flavonoids.

polyphenols of one Rosaceae plant contain a yield of about 140 mg/100 g of the material, although this performance is quite high, but we cannot show the percentage of each phenolic extract (Benvenuti et al., 2006).

### Characterization

#### Dosage of flavonoids

Content of flavonoids is expressed in equivalent mg of quercetin/ml of the extract of the whole plant. It was found to be 75.54 mg/ml. The content of *R. fruticosus* in flavonoids cannot be discussed because there is no published work on the chemical composition of this plant or another plant belonging to the same family, but by observing the averages of yields of extraction in many studies, 75.54% is a high yield and we it can be assumed that this extract is high in flavonoids.

#### High performance liquid chromatography

On the chromatogram of flavonoids of *R. fruticosus* L., we

found eight peaks corresponding to eight main compounds which are: gallic acid, gallocatechin, protocatechic acid, catechin, caffeic acid, rutin, ellagic acid and myricetin. Results are shown in Table 3 and Figure 1. An analysis by HPLC made in South America by Mertz et al. (2007) showed the presence of flavonol hexoside-malonates and hydroxycinnamic acids in *R. fruticosus* extracts.

A study which was realized by the same authors using HPLC with diode array reveals the presence of caffeic acid in two neighbors species which are *Rubus glaucus* Bent and *Rubus adenotrichus* Schlech, this two plants are not rich in this component, the same component was find using HPLC in a variety of *R. fruticosus* obtained from the region of Tizi Ouzou in Algeria, that shows the presence of caffeic acid in the botanical kind, *Rubus*.

Another study has revealed, using HPLC, the presence of ellagic acid and 3,4-dihydroxy-benzoic acid in the flavonoids issues from leaves of *R. fruticosus* gathered in Bulgaria. Ellagic acid was also detected in the aerial part of the studied plant. Other molecules were identified in this study and were never identified in previous studies,

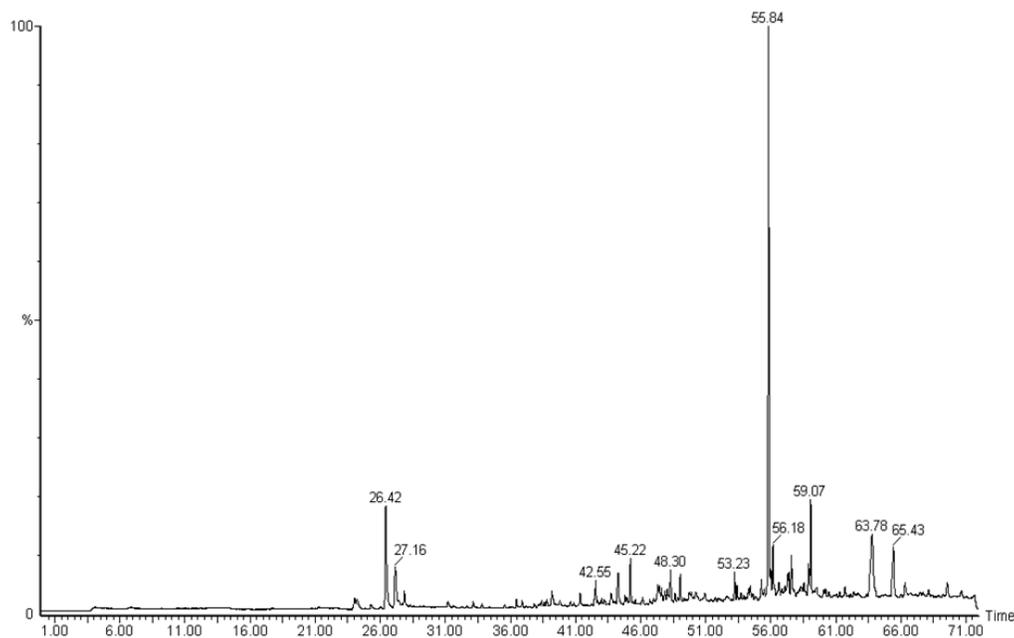


Figure 2. Chromatogram of GC-MS applied to essential oils.

Table 4. Retention time of essential oil compounds.

R <sub>t</sub>	Name of the compound	%
26.42	Limonene	13.09
27.16	Trans-3-carene-2-ol	4.21
42.55	Caryophyllene	3.13
45.22	Thymol	5.59
48.30	Veridiflorol	4.02
53.23	Epiglobulol	4.22
55.84	Lanceol	20.22
56.18	Globulol	5.15
59.07	Methyl steviol	14.12
63.78	Fenitrothion	12.85
65.43	Benzene, dodecyl	12.01
Total		98.61

this may be explained by the difference of the area of harvest (Milivojevic et al., 2011; Radovanović et al., 2013; Carlsen et al., 2003).

#### GC-MS of essential oil of *R. fruticosus*

By analyzing the essential oil of *R. fruticosus* using GC-MS, we identified 11 molecules (Figure 2). The major component is the lanceol (20.22%) (Table 4). Concerning the essential oil of *R. fruticosus*, no studies were done on it or any essential oil of any species belonging to *Rubus* family.

#### Antimicrobial activity

Table 5, the antimicrobial activity of flavonoids extract and the essential oil on reference strains are represented, both substances have an effect on the respiratory flora. The activity of both extracts was evaluated on strains isolated from patients with respiratory infections; these patients were diagnosed with respiratory infections, ORL infections or bronchitis infections.

Clinical strains chosen to evaluate antimicrobial activity showed an important resistance to conventional antibiotics, Table 6 shows the results. By assessing the antimicrobial activity of this species against some respiratory pathogens, this plant seems to be promising but no many works was done on evaluating the effect of the extract of this species against microbes. A study evaluated the activity of the ethanolic extract of *R. fruticosus* against *Helicobacter pylori* which was resistant to nalidixic acid, this extract had a MIC of 400-450 µg/ml (Abachi et al., 2013).

Another study showed that the blackberry juice inhibits the growth of *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus marcescens* and *Escherichia coli* with percentages varying from 50 to 75% (Poyrazolu and Biyik, 2010).

Flan et al. (2011) found that the methanolic extract of aerial parts of *R. fruticosus* inhibits the growth of *Mycobacterium tuberculosis* with a MIC of 1 mg/ml. Another study by Riaz et al. (2011) on methanolic extracts from various parts of the plant against eight reference bacterial strains (*Salmonella typhi*, *E. coli*,

**Table 5.** Results of the antimicrobial activity against reference strains.

Strain	Reference	MIC <sub>s</sub>	
		E.O (mg/ml)	Flavonoids (mg/ml)
<i>E. coli</i>	ATCC 11229	R	R
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	0.5	2.36
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	R	4.72
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 10211	0.25	4.72
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 10015	R	4.72
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	0.25	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	C.E	37.77
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	R	37.77

R: Resistant.

**Table 6.** Activity of *R. fruticosus* extracts against respiratory pathogens.

Strains	Antibiotics									Essential oils (CIM <sub>s</sub> )	Flavonoids (MIC <sub>s</sub> ) (mg/ml)
<i>E. coli</i>	Cip	Amo	Ceph	Tic	Trim	Cefo	Cefu	Ceft			
1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	C.E.
2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	C.E.
<i>P. Aeruginosa</i>	Fost	Imi	Levo	Amik	Cet	Cip	/	/			
1	R	R	R	R	R	R	/	/	0.5	37.77	
2	R	R	R	R	R	R	/	/	0.5	18.88	
<i>P. fluorescens</i>	Azith	Cipr	Levo	Tic	Trim	Gent	Imi	Cef			
1	R	R	R	R	R	S	S	S	0.125	09.44	
2	S	R	R	R	S	R	R	R	0.125	18.88	
<i>B. Cepacia</i>	Amox	Imi	Gent	Cefo	Col	Cefa	/	/			
1	S	S	S	S	S	R	/	/	0.25	04.72	
2	S	S	S	S	S	S	/	/	0.125	04.72	
<i>H. Influenzae</i>	Cot	Amo	Ofi	Tet	Cefo	/	/	/			
1	R	S	S	R	S	/	/	/	0.25	02.36	
2	R	S	S	R	S	/	/	/	0.25	02.36	
<i>K. pneumoniae</i>	Amo	Cef	Gent	Amp	Ami	Col	Imi	Cot			
1	R	R	R	R	R	R	S	R	0.5	18.88	
2	R	R	R	R	R	R	R	R	0.25	18.88	
<i>A.baumannii</i>	Tic	Pop	Cef	Imi	Ofi	Cip	Col	Tic + Ac			
1	R	R	R	R	R	R	S	R	C.E	37.77	
2	R	R	R	R	R	R	S	R	R	75.54	
<i>E. cloacea</i>	Azith	Cefac	Ceft	Cefur	Eryt	Peni	Tetr	Amo			
1	R	R	R	R	R	R	R	S	0.5	37.77	
2	R	R	R	R	R	R	R	S	0.5	37.77	
<i>S. aureus</i>	Vanc	Oxa	Gent	Amp							
1	S	S	S	R	/	/	/	/	R	02.36	
2	S	S	S	R	/	/	/	/	R	02.36	
<i>S. Pneumoniae</i>	Azith	Oxa	Gent	Amp	Amo	Imi	Tetr				
1	R	R	R	R	R	R	S	R	R	18.88	
2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	18.88	
<i>C. albicans</i>	Azith	Oxa	Gent	Amp	Amo	Imi	Tetr				
1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	18.88	
2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	37.77	

R: Resistant; S: sensitive.

*Streptococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacteri sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*), revealed that all the extracts inhibit the growth of bacteria with different MICs.

All these studies showed that different extracts of *R. fruticosus*, especially phenols, have a big potential to inhibit the growth of bacteria or fungus.

## Antioxidant activity

### DPPH test

Free radical scavenging was appreciated using DPPH discoloration test that revealed a high antioxidant activity of the flavonoid extract of *R. fruticosus*. This test revealed a weak scavenging of free radical activity for the essential oil, the EC<sub>50</sub> was 9.24 ± 0.48 mg/ml. This value is 2.68 ± 0.88mg/ml for flavonoids. In Figure 3, these results are compared with ascorbic acid as a standard.

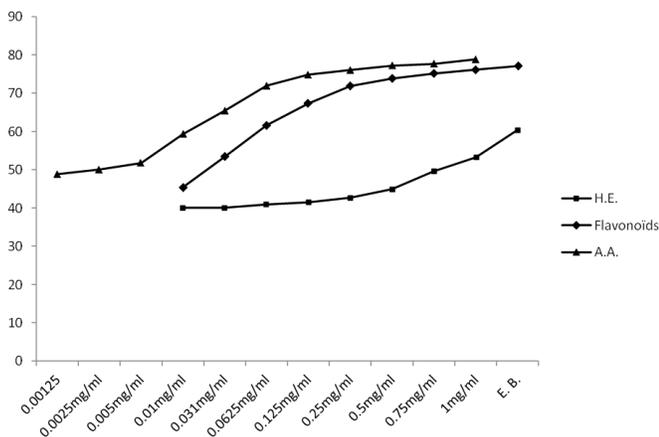


Figure 3. Antioxidant activity using the DPPH test.

The antioxidant activity of flavonoids of *R. fruticosus* is closer to the values of reference which is ascorbic acid (IC<sub>50</sub> was found 1.46 ± 0.01mg/ml).

A study showed that IC<sub>50</sub> varies from 15.2 to 76.5 µg/ml for different extracts including n-hexane, dichloromethane, chloroform, ethyl acetate, methanol. Blackberries are a rich source of natural antioxidants as they contain high levels of phenols and flavonols and are therefore well reputed scavengers and inhibitors of free radicals (Ivanovic et al., 2014).

The study of both biological activities: antimicrobial and antioxidant of the extract of flavonoids and essential oil of *R. fruticosus* reveals that the essential oil has a weak biological activity while flavonoids seem to have strong biological effects.

## Conclusion

By assessing the antimicrobial and antioxidant activities of the flavonoid extract and the essential oil of Algerian *R. fruticosus* L., we can assume that this species and particularly its flavonoid extract have a remarkable inhibitory action against resistant respiratory pathogens.

More advanced studies are needed to investigate the possibility of developing formulations for pharmaceutical products from this extracts.

## Conflict of interests

The authors did not declare any conflict of interest.

**Abbreviations:** C.E, Crude extract; EC<sub>50</sub>, efficient concentration 50; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; MIC, minimal inhibitory concentration; R<sub>t</sub>, retention time; HPLC, high performance liquid chromatography; GC-MS, gas chromatography-mass spectrophotometry; AMP, ampicilin; IMI, imipenem; GENT, gentamicin; AZITH, azithromicin; CIP, ciproflaxin; VAN, vancomycin; OXA, oxacilin; TET, tetracilin; ERYT, erythromicin; PENI, penicilin; AMO, amoxicilin; CEF, cefazolin; LEV, levoflaxin.

## REFERENCES

- Abachi S, Khademi F, Fatemi H, Malekzadeh F (2013). Study of antibacterial activity of selected Iranian plant extracts on *Helicobacter pylori*. *J. Dent. Med. Sci.* 5: 55-59.
- Amarowicz R, Troszynska A, Shahidi F (2005). Antioxidant activity of almond seed extract and its fractions. *J. Food Lipids* 12: 344-358.
- Bahoron T, Grinier B, Trotin F, Brunet G, Pin T, Luncky M, Vasseur J, Cazin M, Cazin C, Pinkas M (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung* 46: 1086-1089.
- Benvenuti S, Pellati F, Melegari M, Bertelli D (2004). Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *J. Food Sci.* 69:FCT164-FCT169.
- Blumenthal M (1998). *The Complete German Commission Monographs*. American Botanical Council, Austin, USA.
- Bruneton J (1999). *Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales*. 3rd edition. Paris. Tec & Doc. p. 575.
- Carlsen H, Myhrstad MCW, Thoresen M, Moskaug JO, Blomhoff R (2003). Berry intake increases the activity of the gamma-glutamylcysteine synthetase promoter in transgenic reporter mice. *J. Nutr.* 133:2137-2140.
- Harborne AJ (1998). *Phytochemical methods, a guide to modern techniques of plant analysis*. 3rd ed. London: Chapman & Hall. p. 320.
- Hummer KE, Janick J (2007). *Rubus iconography: Antiquity to the renaissance*. *Acta Hort.* 759:89-105.
- Ivanovic J, Tadic V, Dimitrijevic S, Stamenic M, Petrovic S, Zizovic I (2014). Antioxidant properties of the anthocyanin-containing ultrasonic extract from blackberry cultivar "Cacanska Bestrna". *Ind. Crops Prod.* 53:274-281.
- Mertz C, Cheyner V, Günata Z, Brat P (2007). Analysis of Phenolic Compounds in two Blackberry Species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 55: 8616-8624.

- Milivojevic J, Maksimovic V, Nikolic M, Bogdanovic J, Maletic R, Milatovic D (2001). Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild *fragaria* and *rubus* berries. *J. Food Qual.* 34:1-9.
- NCCLS (2006). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. 7th edition. Wayne, Pennsylvania: Approved Standard M7-A7.
- Poyrazolu Çoban E, Biyik H (2010). Antimicrobial activity of the ethanol extracts of some plants natural growing in Aydin, Turkey. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4:2318-2323.
- Raaman N (2006). Phytochemical techniques. New Delhi, New India. Publishing Agency. p. 306.
- Radovanović BC, Anđelković ASM, Anđelković MZ (2013). Antioxidant and antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits grown in southeast Serbia. *Trop. J. Pharm. Res.* 12 : 813–819.
- Ramawat KG (2009). Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine. M.L. Sukhadia University, Botany Dept India. 5: 402.
- Rameshwar V, Tushar G, Rakesh P, Chetan G (2014). *Rubus fruticosus* (blackberry) use as an herbal medicine. *Pharmacogn. Rev.* 8(16): 101–104.
- Riaz M, Mansoor A, Najmur R (2011). Antimicrobial screening of fruit, leaves, root and stem of *Rubus fruticosus*. *J. Med. Plants Res.* 5(24): 5920-5924.
- Sanchez Moreno C, Larrauri J A, Saura Calixto F (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 79: 270-276.
- Sansonetti P, Orth G (2006). La maîtrise des maladies infectieuses: un défi de santé publique, une ambition médico-scientifique. EDP sciences edn. Academy of Sciences, Les Ulis, 26-47.
- Swanston-Flatt SK, Day C, Bailey CJ, Flatt PR (1990). Traditional plant treatment for diabetes: Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetologia* 33:462-464.
- Zia-Ul-Haq M, Riaz M, Vincenzo De Feo, Hawa ZE (2014). *Rubus fruticosus* L.: constituents, biological activities and health related uses. *Molecules* 19:10998-11029.

## ملخص:

ان مقاومة الجراثيم ذات الطبيعة البكتيرية الفيروسية او الفطرية هي ظاهرة تؤثر بشكل محسوس على نظم الصحة العمومية. هذا العمل هو خطوة تهدف لدراسة النشاط ضد الجرثومي و المضاد للاكسدة للانواع النباتية *Borago officinalis*, *Rubus fruticosus* و *Urtica dioica* المتحصل عليها من منطقة تيزي وزو. تم عزل 105 نسائل بكتيرية و 4 خمائر لانتانات تنفسية لدى المرضى على مستوى مصلحتي الانعاش و الامراض المعدية بالمستشفى الجامعي لتيزي وزو. الجراثيم المعزولة هي :

*Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* et *Candida albicans*.  
المخلصات الفلافونويدية لكل من *Borago officinalis* و *Rubus fruticosus* اظهرت فعالية كبيرة على الجراثيم مقارنة بالزيوت الطيارة. تم أيضا دراسة التآزر بين المستخلصات الفلافونويدية لنبتتين *Borago officinalis* و *Rubus fruticosus* و اظهرت فعالية أكثر في تثبيط البكتيريا حتى باستعمال تراكيز ضعيفة جدا.  
تمت كذلك دراسة النشاط المضاد للاكسدة التي أعطت نتائج مماثلة لتي حصلنا عليها في دراسة النشاط المضاد للجراثيم.

**الكلمات المفتاحية:** الفلافونويدات و الزيوت الطيارة- الخواص المضادة للاكسدة- الفعالية ضد المكروبات

## RESUME :

La résistance des microorganismes qu'ils soient de nature bactérienne, virale ou fongique est un phénomène qui pèse lourdement sur les systèmes de santé. Ce travail est une démarche visant à évaluer les activités antimicrobiennes et antioxydantes des espèces de *Borago officinalis*, *Rubus fruticosus* et *Urtica dioica* récoltées de la région de Tizi Ouzou. 105 souches bactériennes ont été isolées à partir de malades atteints d'infections respiratoires au niveau du CHU de Tizi-ouzou. Il s'agit des espèces: *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae*, 4 *Candida albicans* ont également été isolées. Les extraits des flavonoïdes de *Borago officinalis* et de *Rubus fruticosus* ont été plus actifs sur les germes testés que les huiles essentielles. La combinaison des extraits flavonoïdiques de *Borago officinalis* et de *Rubus fruticosus* a montré un effet synergique plus marquant en inhibant la croissance bactérienne à des concentrations très faibles. L'activité antioxydante des extraits de ces espèces a donné les mêmes résultats que pour l'activité antimicrobienne.

**Mots clés:** Infections respiratoires, résistance, extrait flavonoïdique, huile essentielle, *Borago officinalis*, *Rubus fruticosus*, *Urtica dioica*.

## SUMMARY:

The resistance of microorganisms which can be bacterial, viral or fungal is a serious phenomenon with hard consequences on public health systems. This thesis is a step which aims to assess the antimicrobial and antioxidant activities of *Borago officinalis*, *Rubus fruticosus* and *Urtica dioica* harvested in the area of Tizi Ouzou. 105 bacterial strains were isolated from patients with respiratory infections in the hospital university of Tizi Ouzou, they are the following: *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*, 4 strains of *Candida albicans* were also isolated.

The flavonoid extracts of *Borago officinalis* and de *Rubus fruticosus* was found to be more active against tested microbes comparing to essential oils. The combination of flavonoid extracts of both *Borago officinalis* and *Rubus fruticosus* showed a high synergy which leads to a more remarkable effect inhibiting the bacterial growth even using very low concentrations. Antioxidant activity assessment gave similar results to those obtained in antibacterial tests.

**Key words:** respiratory infections, resistance, flavonoic extract, essential oil, *Borago officinalis*, *Rubus fruticosus*, *Urtica dioica*.