

# *République Algérienne Démocratique et Populaire*

*Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*

Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physico-chimique



## **Mémoire de Fin de Cycle**

**En vue de l'obtention du diplôme de MASTER**

**En Pharmacologie moléculaire**

### **Thème**

**Evaluation des activités antiradicalaire et  
antimicrobienne de l'extrait méthanolique de  
*Ajuga iva***

**Présenté par :**

**M<sup>elle</sup> : OUCHENE NOURA**

**M<sup>me</sup> : ZEBBOUDJI LILA**

**Soutenu le : 14Juin 2015**

**Devant le jury composé de :**

**M<sup>elle</sup> Ayouni**

**Mr Belkacem .N**

**Mr Bribi**

**M<sup>elle</sup> Tatou.S**

**M.A.A**

**M.A.B**

**M.A.A**

**Président**

**Encadreur**

**Examineur**

**Co-promotrice**

**Année universitaire : 2014 / 2015**

# Remerciements

*Nous remercions Dieu, le tous puissant de nous avoir accordé santé et courage et la volonté pour accomplir ce modeste travail.*

*Au terme de ce modeste travail, nous tenons à présenter nos remerciements les plus sincères à notre :*

*Promoteur M<sub>r</sub> Belkacem .N d'avoir accepté de nous encadrer, et nous orienter afin de permettre le bon déroulement de notre travail*

*Président du jury M<sup>elle</sup> Ayouni, qui nous a fait l'honneur de juger notre travail*

*Examineur M<sub>r</sub> Bribi d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Dr AZZAM, M<sup>elle</sup> Tatou Samia, et toute l'équipe du service de Microbiologie et de parasitologie du CHU DE TIZI –OUZOU pour leur précieuse aide*

*A toutes les personnes qui nous ont aidées de près ou de loin a la réalisation de ce modeste mémoire*



*Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail a la mémoire de mon père et mon frère Boubekeur  
Qui ont laissé un grand vide dans notre vie  
Que Dieu les accueille dans son vaste paradis*

*A ma mère*

*Pour vos yeux qui furent parfois mouillés*

*A mon mari Mr AZEBOUDJ Ali*

*Pour ses encouragements, son dévouement*

*Pour votre cœur qui m'a tant donné*

*Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé*

*A mes chères sœurs Dalila, Ouahiba, Baya*

*A mes frères Mahfout, Kamal*

*A la mère et au père de mon mari Zohra, Mohamed*

*Aux sœurs et aux frères de mon mari Shannez, Souad, Zebida, Luiza, Zineb, Dilia*

*Nounou, Belkecem, Louhab, Samir*

*A mes amies. Mima, Saida, Akila*

*A mes camarades de promotion pharmacologie*

*A tous ceux qui me connaisse de près ou de loin.*

*Sans oublier ma binôme: Noura et sa famille*

*LILA.Z*





*Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail en témoignage de mon profond amour*

*A la mémoire de mes parents*

*Mon père qui nous a laissés ces derniers jours*

*Qui ont laissé un grand vide dans notre vie*

*Que Dieu les accueille dans son vaste paradis.*

*A ma sœur Malika*

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites*

*pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis*

*naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte*

*Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et*

*t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

*A Tous mes sœurs et leurs maris*

*Saida et son mari Madjid, Nadira et son mari Marsak, Arbiha et son mari Mezien,*

*Hakima et son mari Mahmoud, Fahima et son mari Salim*

*A ma petite sœur Siham, Tinehinane, Fouad*

*A mes amies. Samira, Mima, Rosa, Marina*

*A mes camarades de promotion pharmacologie*

*A tous ceux qui me connaissent de près ou de loin.*

*Sans oublier ma binôme: Lila et sa famille*

*Noura.Ou*

## *Sommaire*

### **Liste des abréviations**

### **Liste des figures**

### **Liste de tableaux**

Introduction .....	1
--------------------	---

## *Chapitre I*

### *SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE*

#### **I.1. Généralité sur *Ajuga iva***

I.1.1. Description de <i>Ajuga iva</i> .....	2
I.1.2. Classification botanique de <i>Ajuga iva</i> .....	3
I.1.3. La répartition géographique .....	3
I.1.4. Composition chimique de la plante.....	4
I.1.5. Utilisations traditionnelles et propriétés pharmaceutiques .....	5

#### *I.2. L'activité antioxydante*

I.2.1. Radicaux libres.....	6
I.2.2. Stress oxydatif.....	6
I.2.3. Antioxydants .....	7
I.2.3.1. Défenses enzymatiques .....	7
I.2.3.2. Défenses non enzymatiques .....	8
I.2.4. Notion de balance pro/antioxydant .....	9
I.2.5. Mécanismes d'action d'un antioxydant .....	9
I.2.6. Evaluation de la capacité antioxydante par des tests <i>in vitro</i> .....	10

### *I.3.L'activité antimicrobienne*

I.3.1. Infections bactériennes et antibiothérapies .....	12
I.3.2. Modes d'action des antibiotiques.....	12
I.3.3. Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques .....	12
I.3.4. Activités antimicrobiennes des polyphénols.....	13
I.3.5. Technique d'étude de l'activité antimicrobienne.....	14
I.3.5.1. Antibiogramme .....	14
I.3.5.2. Méthode de dilution .....	15

## *Chapitre II*

### *Partie expérimental*

#### *II.1. Matériel et méthode*

II.1.1. Matériel.....	16
II.1.1.1. Matériel biologique.....	16
II.1.1.2. Les souches microbiennes .....	16
II.1.1.2.1. Les souches bactériennes .....	16
II.1.1.2.2. Les levures .....	17
II.1.2. Méthodes d'extractions.....	17
II.1.2.1. Extraction des composés phénoliques .....	17
II.1.2.2. Analyse phytochimique .....	18
II.1.2.2.1. Dosage des poly phénols totaux .....	18
II.1.2.2.2. Dosage des flavonoïdes .....	19
II.1.2.3. Evaluation, <i>in vitro</i> , de l'activité antioxydant .....	19
II.1.2.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne .....	20
II.1.2.4.1. Tests microbiologiques .....	20
II.1.2.4.2. Tests biochimiques .....	21
II.1.2.4.3. Activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique .....	22

II.1.2.4.3.1. Préparation du milieu de culture.....	22
II.1.2.4.3.2. Stérilisation de matériel .....	22
II.1.2.4.3.3. Préparation des dilutions de l'extrait de <i>Ajuga iva</i> .....	22
II.1.2.4.3.4.Préparation de l'inoculum .....	23
II.1.2.4.3.5.Ensemencement et dépôt des disques .....	23
II.1.2.4.3.6.Lecture des antibiogrammes .....	23
II.1.2.4.3.7.Détermination des CMI .....	23
II.1.2.4.3.8.Activité antifongique .....	24

## II.2. *Résultats et discussions*

II.2.1.Rendements des extractions.....	25
II.2.2.Dosage des composés phénoliques.....	25
II.2.2.1.Dosage des phénols totaux .....	25
II.2.2.2.Dosage des flavonoïdes .....	26
II.2.3.Activité antioxydant de <i>Ajuga iva</i> .....	26
II.2.4.Activité antibactérienne de <i>A.iva</i> .....	26
II.2.4.1.Tests microbiologiques.....	28
II.2.4.2.Tests biochimiques .....	28
II.2.4.3.Résultats des antifongigrammes .....	28
II.2.4.3.1. <i>Candida albicans</i> .....	28
II.2.4.3.2. <i>Candida sp</i> .....	29
II.2.4.4.Pouvoir antimicrobien de l'extrait de <i>A.iva</i> sur les champignons .....	29
II.2.4.5.Détermination de la concentration minimale nitrique .....	32
II.2.4.6.Résultats des antibiogrammes .....	32
II.2.4.6.1. <i>Streptococcus sp</i> .....	32
II.2.4.6.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	33
II.2.4.6.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	33

II.2.4.6.4. <i>E. coli</i> .....	34
II.2.4.7. Pouvoir antimicrobien de l'extrait de <i>A.iva</i> .....	35
<b>Conclusion</b> .....	<b>37</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>38</b>

**Annexe**



## *Liste des abréviations*

*A.iva* : *Ajuga iva*

ATCC: American Type Culture Collection

DPPH: 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl

GPx : Glutathion peroxydase

SOD: Superoxyde dismutase

CAT: Catalase

GSH: Glutathion réduit

GSH-PX: Glutathion peroxydase

CMI: Concentration minimale inhibitrice.

IC50: Concentration inhibitrice à 50%.

DMSO: Diméthyl sulfoxyde

Mg EQ/g E: Milligramme d'équivalent quercétine par gramme d'extrait

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène.

O<sub>2</sub>\*- : Radical superoxide.

ABTS: 2, 2 azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid.

ROS: Réactive oxygen species

LDL: Low density lipoprotein

ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity

MeOH: methanol

GSSH-Red: Glutathion reductase

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: carbonate de sodium

COX : Cyclooxygénase

DO: Densité optique

MH: Mueller Hinton agar

mgEAG/g E : Milligramme d'équivalent acide gallique par gramme d'extrait

NaOH : Hydroxyde de sodium

NaNO<sub>2</sub> : Nitrite de sodium

AlCl<sub>3</sub> : Chlorure d'Aluminium

## *Liste des figures*

<b>N° de Figure</b>	<b>Titre de la Figure</b>	<b>N° de la page</b>
<b>1</b>	les différentes parties d' <i>Ajuga iva</i>	<b>2</b>
<b>2</b>	Structure de DPPH• et mécanisme de sa réduction par un antioxydant	<b>11</b>
<b>3</b>	Mécanismes de résistances bactériennes aux antibiotiques	<b>13</b>
<b>4</b>	Photographie de la partie aérienne sèche d' <i>Ajuga iva</i>	<b>17</b>
<b>5</b>	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	<b>28</b>
<b>6</b>	Courbe d'étalonnage de la quercétine	<b>29</b>
<b>7</b>	Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait et l'acide ascorbique	<b>30</b>
<b>8</b>	Effet des antifongiques sur <i>candida albicans</i>	<b>32</b>
<b>9</b>	Effet des antifongiques sur <i>candida sp</i>	<b>33</b>
<b>10</b>	Effet d'extrait <i>A. Iva</i> sur <i>candida albicans</i>	<b>34</b>
<b>11</b>	Effet d'extrait <i>A. Iva</i> sur <i>candida sp</i>	<b>34</b>
<b>12</b>	Effet des antibiotiques sur <i>Streptococcus sp</i> (CHU).	<b>36</b>
<b>13</b>	Effet des antibiotiques sur <i>Staphylococcus aureus</i> (CHU).	<b>36</b>
<b>14</b>	Effet des antibiotiques sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATTCC27853	<b>37</b>
<b>15</b>	Effet des antibiotiques sur <i>E .coli</i> ATTCC25922	<b>38</b>
<b>16</b>	Effet de l'extrait sur les bactéries étudiées	<b>39</b>

### *Liste de tableaux*

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Systematique de la plante	<b>3</b>
<b>II</b>	Le nom vernaculaire	<b>3</b>
<b>III</b>	Liste des principaux radicaux libres	<b>7</b>
<b>IV</b>	Les caractères biologiques des différentes souches utilisées	<b>14</b>
<b>V</b>	Caractères morphologiques étudiés pour l'identification bactérienne	<b>31</b>
<b>VI</b>	Caractères biochimique recherchés	<b>32</b>
<b>VII</b>	Diamètre des zones d'inhibitions de l'extrait de <i>Ajuga iva</i> sur les levures	<b>33</b>
<b>VIII</b>	Les différentes concentrations minimales inhibitrices	<b>35</b>

# *INTRODUCTION*

## Introduction

Au travers des âges, l'Homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base: nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'Homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité (**Gurib-Fakim, 2006**).

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes (**Bahorun et al., 1996**).

*Ajuga iva* est une plante utilisée dans la médecine traditionnelle algérienne contre le diabète, elle est connue pour ses propriétés anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antirhumatismales, hypoglycémiantes, antispasmodiques, antifongiques (**Bondm et al., 2000**), c'est une plante astringente qui assèche les écoulements et qui facilite la cicatrisation. Elle est recommandée aussi pour guérir les ulcères, les plaies et les blessures (**Baba Aissa, 2000**).

Des recherches actuelles portent sur l'étude des activités antiradicalaire et antimicrobienne de substances d'origine végétale comme les polyphénols et les huiles essentielles de *Ajuga iva*, aboutissant à des résultats variables selon la localisation géographique où la plante a été récoltée.

Le but de cette étude est d'évaluer l'activité antiradicalaire et l'activité antimicrobienne de *Ajuga iva* récoltée dans la région de Bejaia. Pour cela ce travail a porté sur :

- ✓ L'extraction des composés phénoliques par macération.
- ✓ Dosage des polyphénols totaux et de flavonoïdes totaux de l'extrait méthanolique de *Ajuga iva*.
- ✓ L'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de la plante par la méthode de piégeage du radical libre DPPH.
- ✓ L'évaluation de l'activité antimicrobienne d'extrait méthanolique de *Ajuga iva* sur quatre souche bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *E. coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* CHU, *Streptococcus sp* CHU) et deux souches fongiques (*Candida sp*, *Candida albicans*).

*Chapitre I*  
*SYNTHÈSE*  
*BIBLIOGRAPHIQUE*

## *I.1. Généralité sur $A_{juga\ iva}$*



### I.1.1. Description de *Ajuga iva*

*Ajuga iva* L.Schreber, appartient à la famille des Lamiacées et au genre botanique *Ajuga* avec plus de 300 espèces différentes. Cette plante est largement distribuée dans les régions arides d'Europe, d'Asie, d'Afrique et d'Australie (**Israili et al., 2009**). Elle est localement connue sous le nom de «Chendgoura» en Algérie, elle est très employée dans la médecine traditionnelle autour du monde pour une variété des maladies (**Taleb-Senouci et al., 2009**).

C'est une petite plante vivace de goût amer de 5 à 10 cm, à tiges vertes rampantes et velues, à feuilles vertes de 14-25 mm de longueur, linéaires, denses et couvertes de duvets. (**Gordon et al., 1997; Batanouny et al., 1999**). Les fleurs sont violettes, roses, ou jaunes, de 20mm de longueur. La lèvre supérieure de la corolle est réduite ou absente et la lèvre inférieure est divisée en trois lobes velus. Les lobes latéraux sont petits, tandis que le lobe central est relativement plus large, décoré dans sa base par un axe central jaunâtre avec des spots de la même couleur de la fleur, généralement en violet. A l'intérieur de la fleur il y'a quatre étamines liées à quatre carpelles noir. Les graines sont marrons et ont la taille des graines de *Nigella sativa* (Figure1). Cette plante se développe durant la période allant du printemps jusqu'à la fin de l'été. La période de floraison est entre mai et juin (**Halimi, 2004**).



La plante entière

Les feuilles et les fleurs

**Figure1** : Les différentes parties de *Ajuga iva* (**Halimi, 2004**).

### I.1.2. Classification botanique de *Ajuga iva*

**Tableau I :** Systématique de la plante (El. Hilaly, 2007)

Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
S /embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Ajuga</i>
Espèce	<i>Ajuga iva</i>

**Tableau II :** Les noms vernaculaires de *Ajuga iva* (Ait Youssef, 2006)

Français	Ivette bugle, ivette musquée
Arabe	Chendgoura
Berbère	Touf toulba

### I.1.3. La répartition géographique

La plante pousse à une altitude de 0 à 1600 m dans les régions arides où elle croit dans les champs. Elle est présente dans toute l'aire méditerranéenne: dans l'ensemble des pays du Maghreb, en Algérie, au Maroc où elle est très commune, en Tunisie et dans certains pays d'Europe du Sud –dont la France. Elle pousse surtout sur les pelouses sèches ou sur les vieux murs (Ait Youssef, 2006 ; El Hilaly, 2007).

### I.1.4. Composition chimique de *Ajuga iva*

L'ivette est riche en composés polyphénoliques, qui sont les meilleurs antioxydants, flavonoïdes et tanins (**Bondm M et al., 2002**). Elle contient aussi des anthocyanes, des acides phénoliques et d'autres substances en particulier l'ajugarine (**Bennaghmouch L et al., 2001**), comme elles ont isolé à partir de l'espèce *Ajuga iva* sept aglycones flavoniques (quercétine, lutéoline, chrysoériol, 5,5'- dihydroxy 7,4'-diméthoxyflavone, 5,7 dihydroxy 4',5'-diméthoxyflavone, apigénine, naringénine). Les études phytochimiques ont montré que l'ivette contient aussi des ecdystéroïdes, des diterpénoïdes, des iridoïdes et des saponosides acides (**Coll. J., (2007)**), ainsi il a isolé deux nouveaux composés : 24- Hydroxycyastérone et ajugastérone B, il a identifié par l'analyse spectrale RMN les structures des composés phytochimiques suivants : cyastérone, 20-hydroxyecdysone, makistérone A et le 24, 25 didehydroprécycastérone.

### I.1.5. Utilisations traditionnelles et propriétés pharmaceutiques

En médecine traditionnelle, *Ajuga iva* est utilisée pour traiter le diabète et l'hypertension, (**Meyre-Silva C et al., 2005**) ainsi que les troubles gastro-intestinaux et l'ulcère de l'estomac (**Sahpaz S et al., 2002**). L'ivette est efficace contre la fièvre, la diarrhée, les gaz, les maux de tête et les maux de dents. Elle est utilisée sous forme d'infusion pour les troubles gastro-intestinaux (faire infuser 5 grammes de la plante séchée dans une tasse à thé d'eau bouillante pendant 15 minutes, et filtrer ; prendre 3 tasses de tisane par jour) (**Stulzer H et al., 2006**). En usage externe, elle est souvent employée en applications locales contre les rhumatismes, comme antiseptique et cicatrisante sur les plaies. D'autre part, la macération ou l'infusion serait utile pour débarrasser le cuir chevelu des parasites (**Adjadj, 2009**).

Le screening pharmacologique réalisé *in vivo* et *in vitro* démontre que *Ajuga iva* est douée d'un large spectre d'activités pharmacologiques; elle est anti hypertensive; vasodilatatrice (**El-Hilaly et al., 2004**) diurétique et hypoglycémique (**Taleb-Senouci, 2008**). Elle possède également une activité anti-inflammatoire, antifongique, antimicrobienne, antifebrile, anthelminthique et contre les troubles intestinaux (**Chenni et al., 2007**). De plus elle est utilisée pour traiter la stérilité féminine, les hémorroïdes, pour calmer les douleurs (**Bennaghmouche et al., 2001**), pour guérir les affections oculaires et pour rétablir le rythme cardiaque. Elle est aussi utilisée contre les rhumatismes (**Sassi ,2005**).

L'activité hypoglycémique est expérimentalement démontrée et des études toxicologiques ont révélé que l'extrait est sans effet toxique à des doses hypoglycémiantes qui

est examiné pour son effet hypoglycémique sur des rats normaux et des rats diabétiques par la streptozotocine (**El Hilaly et Lyoussi, 2002**), comme il exerce une action contre la peroxydation lipidique des tissus chez les rats diabétiques (**Hamden et al., 2008**).

D'autre part, **Bouderbala et al., (2008)** ont testé l'effet des iridoïdes extraites de l'extrait aqueux de *Ajuga iva* sur la composition des lipoprotéines et sur l'activité de la lécithine cholestérol acyltransférase chez les rats rendus hypercholestérolémiques. Ces molécules agissent efficacement sur l'efflux du cholestérol des tissus périphériques vers le foie en augmentant l'activité de la LCAT et atténuent l'hypercholestérolémie causée par le régime enrichi en cholestérol alimentaire. L'extrait d'*Ajuga iva* a le pouvoir de réduire le stress oxydatif en évitant la peroxydation lipidique et cela grâce à la présence des flavonoïdes et des iridoïdes.

Les études de **Bondm et al., (2000)** ont prouvé une activité inhibitrice sur la croissance des larves *Spodoptera frugiperda* et *Spodoptera littoralis* dans l'extrait éthanolique d'ivette issue de la région d'Ain Mila. Son effet insecticide est aussi étudié par **Sosa et tonn, 2008** contre *Spodoptera frugiperda* Smith et *leptinotarsa decemlineata*. Tandis que, l'utilisation des antibiotiques mènerait certainement à la plus grande résistance des bactéries pathogènes. Les plantes médicinales telle qu'*Ajuga iva* est une source de nouvelles substances (acides phénoliques, flavonoïdes et les iridoïdes) ayant une activité antibactérienne (**Israili et Lyoussi, 2009**). En effet, l'extrait méthanolique brut de cette plante possède une activité anti *Paracoccus paratrophus* (**Zerroug et al., 2011**).

## *I.2.L'activité antioxydante*

### I.2.1.Radicaux libres :

L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies. Mais l'oxygène peut être également une source d'agression pour ces organismes. En effet, des dérivés hautement réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons U.V, des radiations ionisantes et de métaux de transition (**Ekoumou, 2003**).

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. Le métabolisme cellulaire produit à l'état physiologique une variété de radicaux libres dérivés de l'oxygène (RLO). Dans certaines conditions pathologiques, ces RLO ainsi que leurs dérivés sont produits de façon excessive (**Tableau III**). Comme ils possèdent ainsi une forte réactivité et une courte demi-vie (**Afonso et al., 2007**)

**Tableau III** : Liste des principaux radicaux libres.

Radical	Formule
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$
Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$
Hydroxyle	$OH^{\cdot}$
Peroxyle	$ROO^{\cdot}$
Hydroperoxydes	$ROOH$
Alcoxyles	$RO^{\cdot}$
Oxygène singulet	$1/2 O_2$
Oxyde nitrique	$NO^{\cdot}$

### I.2.2. Stress oxydatif :

Le stress oxydatif est une circonstance anormale que traversent parfois nos cellules ou un de nos tissus lorsqu'ils sont soumis à un déséquilibre entre la production des radicaux libres ou pro-oxydants et les systèmes de défenses antioxydantes, ce qui produit des dégâts tissulaires à travers les modifications oxydatives des biomolécules cellulaires (**Gammoudi et al., 2013**). Comme exemple, l'exposition chronique au stress oxydatif peut favoriser l'apparition de cancers et de maladies cardiovasculaires (**Favier, 2006 ; Nkhili, 2009**).

### I.2.3. Antioxydants

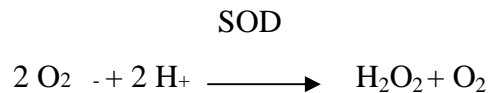
Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS. Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (**Favier, 2003**).

Les défenses antioxydantes reposent sur des systèmes enzymatiques : superoxyde dismutases (SOD), catalases (CAT) et glutathion peroxydases (GPX) ; et non enzymatiques comme les vitamines C et E, les Polyphénols,...etc (**Leverve, 2009**). Aussi, le maintien de ces systèmes enzymatiques nécessite la présence d'un certain nombre d'oligoéléments : cuivre, manganèse, zinc et sélénium en particulier (**Jacotot, 1994**).

#### I.2.3.1. Défenses enzymatiques

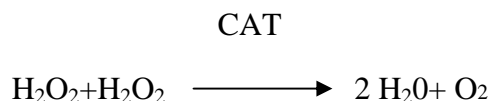
- **Les superoxydes dismutases (SOD)**

Ce sont des métallo-enzymes, se retrouvant dans l'ensemble du monde du vivant. Elles catalysent la dismutation de deux anions superoxydes en dioxygène et peroxyde d'hydrogène (**Arora et al., 2002**).



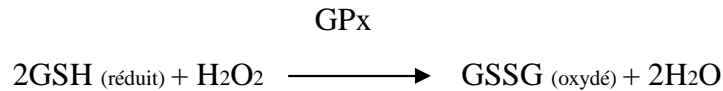
- **Catalases (CAT)**

La catalase est l'une des principales enzymes du système antioxydant biologique. Elle joue un rôle important dans les voies de défense antioxydantes. Le site actif de la catalase est l'hémoglobine, et il agit en tant que catalyseur dans la décomposition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et oxygène moléculaire (**Arockiaraj et al., 2012**)



- **Glutathion peroxydases (GPX)**

Les GSH Px réduisent le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et les Hydroperoxydes lipidiques. Pour leur fonctionnement, elles utilisent le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur sur lequel elles transfèrent l'oxygène, le transformant en glutathion oxydé (GSSG) (**Goudable Favier, 1997**).



### I.2.3.2. Défenses non enzymatiques

- **La vitamine C**

La vitamine C est impliquée dans un certain nombre de processus métaboliques dans le corps humain, y compris ceux qui peuvent être importantes pour le fonctionnement optimal du système d'énergie à l'oxygène. De plus, elle présente un pouvoir antioxydant élevé, aidant à prévenir des dommages cellulaires et des troubles du système immunitaire vis-à-vis des radicaux libres générés au cours d'un exercice intense (**Cholewa et al., 2008**).

- **La vitamine E**

Antioxydant puissant, la vitamine E circule dans le sang liée aux lipoprotéines LDL. Elle est donc vectorisée sur les sites d'oxydation des lipoprotéines et elle est particulièrement intéressante. De plus, l'administration régulière de la vitamine E ne comporte pas d'inconvénient et il n'y a pas de risque de surdosage (**Jacotot, 1994**).

- **Polyphénols**

Les polyphénols sont des antioxydants complexes avec une importance croissante de la santé publique, en particulier dans les domaines de la nutrition, et de l'épidémiologie. (**Bruneton, 1993**).

- **Cuivre**

Le cuivre est un oligo-élément indispensable, essentiel dans de nombreuses réactions enzymatiques et dans la synthèse de neurotransmetteurs. Son manque ou son excès a des conséquences sur de nombreux organes, en particulier sur le foie et le cerveau (**Trocello et al., 2010**).

- **Manganèse :**

Manganèse est un oligo-élément essentiel, et est nécessaire pour de nombreuses réactions enzymatiques ubiquitaires (**Dobson et al., 2004**)



- **Zinc:**

Le zinc intervient en tant que cofacteur enzymatique au niveau de la plupart des métabolismes. Antioxydant, il contribue à la stabilisation des membranes lipidiques, les tissus en formation étant particulièrement sensibles au stress oxydatif du fait de l'importance de leurs besoins en oxygène et de la fuite inévitable d'anions superoxydes lors de la production d'énergie par la chaîne respiratoire mitochondriale. (**Favier et Hininger-Favier., 2005**).

- **Sélénium**

Le sélénium joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire (**Neve et al., 1989**).

#### **I.2.4. Notion de balance pro /anti-oxydante**

Les ROS ont des rôles physiologiques très importants en agissant, à faibles concentrations, sur la régulation des réponses biologiques, la transduction du signal et autres voies de signalisation (**Favier, 2003**).

Dans la plupart de notre tissu sain, les défenses anti-oxydantes sont capables de faire face aux besoins et de détruire les radicaux produits en excès. On dit que la balance pro /anti – oxydante est en équilibre. Mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution) et /ou d'une diminution des capacités anti-oxydantes (insuffisance d'apports en micronutriments antioxydants, inactivation d'enzymes), un déséquilibre s'instaure entre la production des radicaux libres et les systèmes de défenses. On se trouve face à une altération de l'état redox cellulaire, appelée stress oxydatif (**Sohal, 2002**).

Pour enrayer le stress oxydant, il faut donc aider la cellule et l'organisme par l'apport d'antioxydants secondaires (vitamine C, E, caroténoïdes, polyphénols) (**Kohen, 2002**).

#### **I.2.5. Mécanisme d'action d'un antioxydant**

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneur d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés du phénol. En plus leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire.

Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur (**Berset et Cerveller, 1996**).

### **I.2.6. Evaluation de la capacité antioxydante par des tests *in vitro***

Les antioxydants peuvent réduire les radicaux primaires par deux mécanismes : par transfert d'électron singulet ou par transfert d'atome d'hydrogène.

➤ **Test TEAC (ou ABTS) :**

La méthode de radicale ABTS est l'un des tests les plus utilisés pour la détermination de la concentration des radicaux libres. Il est basé sur la neutralisation d'un radical – cation résultant de la mono électronique oxydation du chromophore synthétique 2,2'- azino-bis (3 - ethylbenzthiazoline -6- sulfonique acide) (ABTS•) :  $ABTS\bullet + e^-$ . Cette réaction est suivie par spectrophotométrie par la variation de spectre d'absorption (**Jiri et al., 2010**).

➤ **Test ORAC :**

La méthode est basée sur la décroissance de la fluorescence de la fluorescéine en présence d'un oxydant chimique l'AAPH (un radical peroxy libre stable). Le produit à tester peut être capable de protéger la fluorescéine et réduire la vitesse de dégradation de la fluorescence. Il possède alors un pouvoir antioxydant (**Ou et al., 2001**).

➤ **Test DPPH :**

Le DPPH (2,2 diphenyl-1-picryl hydrazyl) est un radical stable qui possède un électron célibataire sur l'atome d'azote, caractérisé par une couleur violette et un pic d'absorption spectral maximal à 517nm. En présence d'antioxydant l'électron célibataire devient apparié, ce qui conduit à la décoloration de DPPH du violet (forme radicalaire DPPH•) au jaune (forme réduite DPPH-H) (Figure 9). Cette décoloration représente donc la capacité d'échantillon de piéger ce radical (**Ramadan, 2010**).

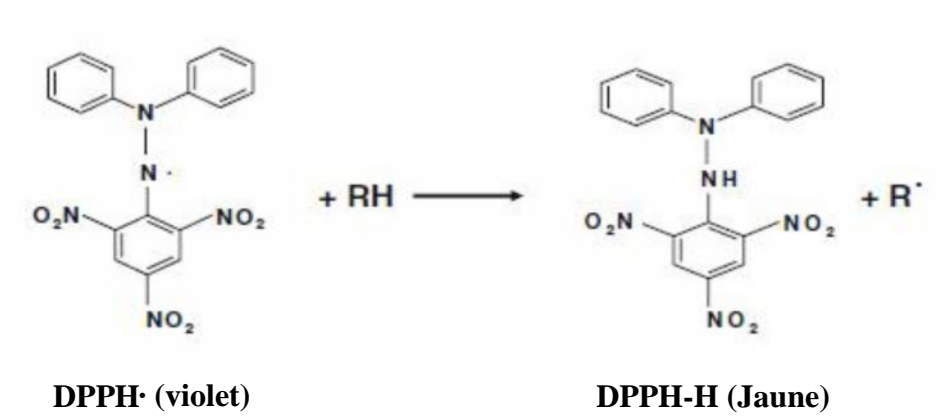


Figure 2: Structure de DPPH• et mécanisme de sa réduction par un antioxydant (**Ramadan, 2010**).

### *I.3. L'activité antimicrobienne*

### **I.3.1. Infections bactériennes et antibiothérapies**

Les infections bactériennes sont causées par différents micro-organismes et sont la cause des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues. De nombreux antibiotiques sont développés pour les traiter, cependant leur utilisation abusive est à l'origine de l'apparition de la multi résistance bactérienne.

Un antibiotique est une substance antibactérienne produite par des micro-organismes (champignons et bactéries) ou de synthèse chimique capable d'inhiber la multiplication ou détruire les micro-organismes. Les antibiotiques peuvent être classés selon l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action. La classification des antibiotiques selon leurs mécanismes d'action est cependant la plus répandue (**Yala et al., 2001**).

### **I.3.2. Modes d'action des antibiotiques**

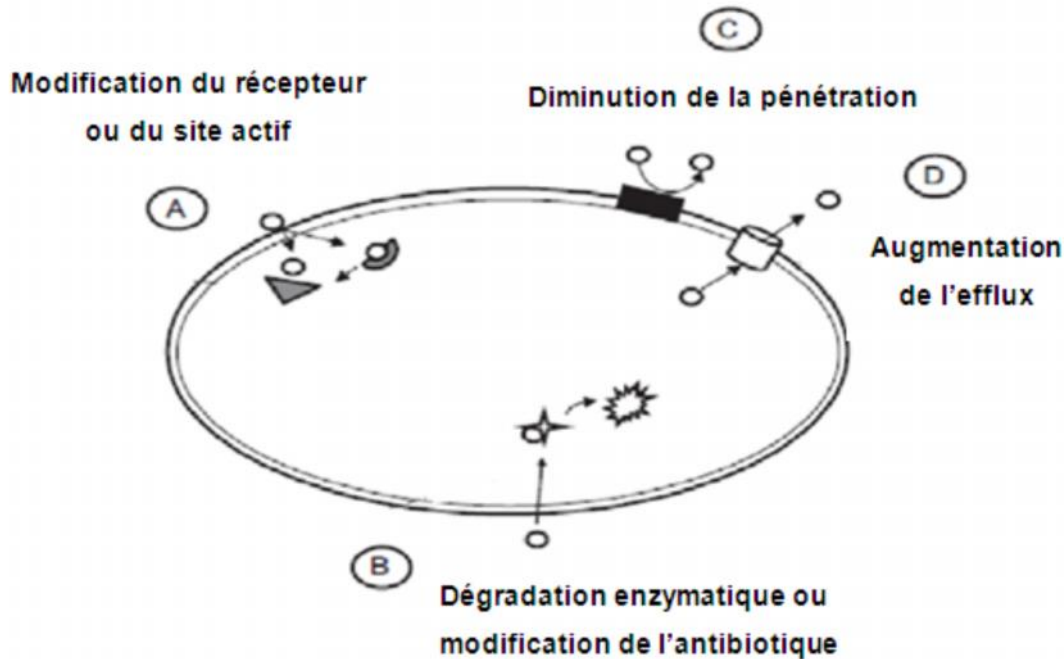
Les agents antimicrobiens détruisent les bactéries en s'attaquant directement à leurs structures essentielles (paroi cellulaire, ribosomes, membrane plasmique et ADN) ou en perturbant leurs métabolismes et par conséquent leurs fonctions (**Tortora et al., 2003**).

Les modes d'action majeurs des antibiotiques incluent l'interférence avec la synthèse de la paroi cellulaire (-lactames), l'inhibition de la synthèse protéique (macrolides et aminoglycosides), l'interférence avec la synthèse de l'acide nucléique (fluoroquinolones) et l'inhibition d'une voie métabolique (**Tenover, 2006**). L'action sur la membrane est aussi un mécanisme antibactérien très répandu. Les polymixines induisent l'augmentation de la perméabilité membranaire causant la perte du contenu de la cellule bactérienne (**Storm, 1997**).

### **I.3.3. Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques**

Les bactéries peuvent devenir résistantes aux antibiotiques via différents mécanismes (figure3). Elles peuvent acquérir des gènes codant des enzymes, telles que les -lactamases, qui détruisent l'agent antibactérien avant qu'il produise un effet. En plus, elles peuvent acquérir des pompes d'efflux qui extrudent l'agent antibactérien de la cellule avant qu'il n'atteigne le site de sa cible. Par ailleurs, les bactéries peuvent acquérir plusieurs gènes pour une voie métabolique qui aboutit à la production de parois cellulaires altérées ne contenant plus de sites de fixation des agents antimicrobiens, ou encore acquérir des mutations qui limitent l'accès des agents antimicrobiens aux sites intracellulaires des cibles via la régulation négative des gènes codant

les porines. Finalement, la résistance peut être acquise via l'échange génétique entre les bactéries, voire, la transformation (incorporation de segments d'ADN libérés dans le milieu extérieur par une autre bactérie après la lyse cellulaire), la conjugaison (échange des gènes de résistance entre deux bactéries via le contact physique) ou la transduction (transfert des gènes de résistance entre les bactéries via les bactériophages) (Tenover, 2006).



**Figure 3 :** Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques (Hemaiswarya et al., 2008).

### **I.3.4. Activités antimicrobiennes des polyphénols**

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement du à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité (Cowan, 1999). Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des microorganismes (Scalbert, 1991).

Les flavane-3-ols, les flavonols et les tannins ont reçu plus d'attention du à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols, à leur capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne telle que l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et la neutralisation des

toxines bactériennes ainsi qu'à leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques (Daglia, 2011).

### **I.3.5. Technique d'étude de l'activité antimicrobienne**

Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne *in vitro* sont nombreuses on mentionné :

#### **I.3.5.1. AntibioGramme**

C'est une méthode qui se réalise *in vitro*, basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibioGramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Elle permet de déterminer l'activité des antibiotiques sur la croissance des microorganismes par la mesure du diamètre des zones d'inhibition. Il existe trois types d'antibioGramme selon **Belaiche, (1979)**.

- L'antibioGramme sur milieux solide : comporte la méthode des disques qu'il s'agit d'une méthode par principe de diffusion reposant sur le pouvoir migrateur des extraits méthanoliques au sein d'un milieu nutritif solide comme la gélose.
- L'antibioGramme sur milieu liquide : qui consiste en l'ajout de concentrations croissantes d'extrait méthanolique dans le milieu nutritif type bouillon additionnées d'un émulsionnant (tensioactif) qui va améliorer la dispersion de la phase huileuse dans la phase aqueuse.
- l'antibioGramme sur milieu gazeux : La méthode appelée « technique des micro-atmosphères » va permettre de déterminer la fraction volatile d'extrait étudiées. Elle est beaucoup moins utilisée que les précédentes méthodes mais peut s'avérer utile pour évaluer les produits destinés à agir par vaporisation. Ce test considéré comme qualitatif aura le même principe d'application que la méthode des disques. La différence repose sur le fait que le papier filtre imprégné ne sera pas en contact direct avec le milieu gélosé ensemencé.

### **I.3.5.2. Méthode de dilution**

Les extraits méthanoliques à tester peuvent également être directement mélangés en concentration connue au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide sans oublier que les techniques de dilutions exigent une dispersion homogène. Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes et après incubation on note la présence ou l'absence de culture, la lecture peut être visuelle ou spectrophotométrique car le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (**Ferhat. 2004**).



*Chapitre II*

*Partie*

*Expérimentale*

## *II. 1. Matériels et Méthodes*

## II.1.1. Matériel

### II.1.1.1. Matériel biologique

Le matériel végétal utilisé dans cette étude expérimentale est une espèce appartenant à la famille des Lamiacées qui est *Ajuga iva* (Chendgoura).

La plante a été cueillie dans le village Aguemoune commune de Taourirt Ighil à 52 km de la wilaya de Bejaia. La récolte a été effectuée au mois d'avril 2015. Notre recherche phytochimique a été faite sur les parties aériennes sèches de la plante.

Après la récolte, la partie aérienne de la plante a été débarrassée de poussières et de mauvaises herbes, sèche à l'ombre dans un endroit aéré à température ambiante pendant 7 jours, puis transporté à l'étuve à 40°C pendant 03 jours dans le but de compléter le séchage.



**Figure 4:** Photographie de la partie aérienne sèche d'*Ajuga iva*

### II.1.1.2. Les souches microbiennes

#### II.1.1.2.1. Les souches bactériennes

Les germes qui ont été testés pour déceler l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanoliques d'*Ajuga iva*, sont les suivants :

- Deux souches de collection internationale ATCC (American type culture collection) : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC25922

- Deux souches isolées de patients au centre hospitalier universitaire de Tizi-Ouzou *Staphylococcus aureus* (CHU), *streptocoque sp.* (CHU).

Ces souches nous ont été fournies par le service de Microbiologie du centre hospitalo - universitaire de Tizi-Ouzou.

### **II.1.1.2.2. Les levures**

La levure *Candida sp, candida albicans* sont obtenues du laboratoire de parasitologie et mycologie du CHU de Tizi-Ouzou.

## **II.1.2.Méthodes d'extraction**

### **II.1.2.1.Extraction des composés phénoliques**

#### **➤ Préparation des extraits méthanoliques**

#### **A. Broyage**

Une fois le matériel végétal est complètement séché, *Ajuga iva* a été broyé à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre utiliser dans l'extraction des composés phénoliques

#### **B.Tamissage**

La poudre ainsi obtenue après broyage a été tamisée sur un tamis de diamètre de 125 µm pour avoir une poudre homogène qui a été conservée dans un récipient en verre.

#### **C. Macération**

L'extrait méthanoïque de la partie aérienne d'*Ajuga iva* a été préparé à partir de 20 g de poudre, qui ont été mis à macérer dans 200 ml de méthanol à un rapport de 1/10 (P/V), pendant 24 heures à la température ambiante et à l'abri de la lumière et sous agitation. Ensuite le mélange est filtré sur papier Wattman (n°3) et le filtrat récupéré (filtrat 1) est conservé. Une deuxième extraction a été effectuée sur le culot récupéré en le mélangeant avec 150 ml de méthanol. Le mélange a été laissé sous agitation, filtré dans les mêmes conditions puis on récupère le filtrat 2. A la fin les filtrats obtenus sont additionnés et conservés pour réaliser une délipidation (Belhattab, 2007).

## D. Délipidation

Après la filtration, on ajoute 150 ml d'éther de pétrole à l'extrait obtenu, on met le tout dans une ampoule à décanter. Après quelques minutes, on récupère la phase inférieure et on jette la phase supérieure. Cette opération est répétée plusieurs fois jusqu'à l'élimination de tous les lipides et avoir un extrait méthanolique. Cet extrait est évaporé à l'aide d'un Rotavapeur pendant 1 heure et 30 min. Après on va le laisser dans l'étuve jusqu'à le séchage complété. En fin, on gratte l'extrait sous forme de poudre et on le conserve dans un tube à 4°C.

- **Calcul du rendement**

Le pourcentage en extrait sec aqueux a été calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = M / M_0 \times 100$$

R (%) : Rendement exprimé en %.

M: Masse en gramme de l'extrait sec résultant

M<sub>0</sub> : Masse en gramme du matériel végétal à traiter

### II.1.2.2. Analyse phytochimique

#### II.1.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux est estimée par la méthode Folin-Ciocalteu (**Singleton et al., 1996 ; Heilerova et al., 2003**). Elle est basée sur la réaction d'oxydoréduction entre des phénols présents dans les extraits et le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier oxyde les phénols en ion phénolates et se transforme en un complexe molybdotungstique. Cette coloration est dosée par spectrophotométrie à une longueur d'onde = 765 nm. L'absorbance est proportionnelle à la quantité de phénols présents (**Ribereau –Gayon, 1968**).

En bref, 100 µl d'extraits (dissous dans le MeOH, à une concentration de 1mg/ml) ont été ajoutés à 500 µl de réactif de Folin-Ciocalteu dilué (1 / 10 dissout dans l'eau distillée). Le mélange est agité et laissé à l'obscurité pendant 5 minutes à température ambiante. Ensuite 1.5 ml d'une solution de carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2% dissout dans l'eau distillée) a été ajouté. Le mélange final a été agité, puis incubé pendant 1 heure dans l'obscurité à température ambiante. La lecture de l'absorbance a été effectuée au spectrophotomètre à 765nm.

La quantité de polyphénols totaux est exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg d'EAG/g E) à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y=ax+b$ ), préparé à l'aide d'acide gallique à des différentes concentrations (0.075-0.3mg/ml).

Le blanc est préparé par le méthanol additionné du Folin-Ciocalteu, et de carbonate de sodium.

#### **II.1.2.2.2. Dosage des flavonoïdes :**

L'analyse quantitative des flavonoïdes est réalisée par le dosage spectrophotométrique selon la méthode colorimétrique décrite par **(Kim et al ., 2003)**. Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons **(Ribereau-Gayon et al ., 1972)**.

500  $\mu$ l de l'extrait (dissout dans le MeOH, a une concentration de 1mg /ml) à été mélangé à un volume de 1500  $\mu$ l d' $H_2O$ , ensuite 150  $\mu$ l d'une solution de  $NaNO_2$  à 5%(dissout dans  $H_2O$ ) a été additionné, à  $t=5$ min 150 $\mu$ l d'une solution de  $AlCl_3$  à 10%(dissout dans  $H_2O$ ) a été ajouté.

Après 11min, 500  $\mu$ l de NaOH (1M) (dissout dans  $H_2O$ ) ont été ajouté .le mélange est agité au vortex. La lecture de l'absorbance est effectuée immédiatement au spectrophotomètre à 510nm.

Une gamme d'étalon est réalisée à partir d'une série de solution de quercétine ayant les concentrations suivantes :(0.025-0.2 mg /ml). La teneur en flavonoïdes est exprimée à partir de la courbe d'étalonnage, en milligrammes d'équivalents de quercétine par gramme de l'extrait (mg d'EQ /g de l'extrait).

Le blanc est préparé de la même façon en remplaçant l'extrait par le méthanol seul.

#### **II.1.2.3. Evaluation, *in vitro*, de l'activité antioxydant**

##### **➤ Réduction du radical libre DPPH**

Le test au 2,2-diphényl-2-picryl-hydrasyle (DPPH.) est réalisé par la méthode décrite par **(Ammar et al. 2009)** qui permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul de l'IC50 des

substances antioxydantes contenues dans un extrait. Le DPPH est un radical libre de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton H<sup>+</sup>.

Une solution méthanolique de 0,2 mM de DPPH est mélangée avec différentes concentrations des extraits d'*A. iva* (10, 15, 20, 25, 30, 50 µg/ml). Mettre 1 ml de chaque dilution de ces extraits dans un tube à essai, ajouter 1 ml de solution méthanolique de DPPH, puis laisser incuber 30 min à l'abri de la lumière à température ambiante. Lire l'absorbance à 517 nm contre un blanc qui contient de méthanol pur. Répéter les mêmes opérations, en remplaçant l'extrait d'*A. iva* par l'acide ascorbique (control positif) et méthanol pur (control négatif). Toutes les opérations sont réalisées en triplicate.

Les pourcentages d'inhibition (%) du radical DPPH sont calculés à partir de la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

**A<sub>C</sub>** : Absorbance du contrôle

**A<sub>E</sub>** : Absorbance de l'échantillon

## **II.1.2.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne**

### **II.1.2.4.1. Tests microbiologiques**

#### **➤ Tests de confirmation des souches**

Les souches que nous avons utilisées ont été déjà au préalable confirmées par le service maladies infectieuses de CHU de Tizi-Ouzou. Nous avons tenu de vérifier leur pureté par les caractéristiques cellulaires par quelques tests biochimiques et culturels.

Après ensemencement des bactéries sur leurs milieux sélectifs, la coloration de Gram est réalisée après incubation à 37°C pendant 24 heures.

L'étude des caractères morphologiques sont recherchés par la coloration de Gram et par l'examen microscopique au grossissement 100. Ils permettent d'observer le mode de regroupement, la forme des cellules bactériennes, le type de Gram.

La coloration de Gram est réalisée selon la méthode décrite par **Derras, (2007)**.

- ✓ Préparer un frottis de la souche a test
- ✓ Recouvrir le frottis de violet de gentiane, laisser agir 1min puis rincer à l'eau distillée
- ✓ Verser du lugol et laisser agir pendant 1min, rincer à l'eau distillée
- ✓ Décolorer avec de l'alcool 30 secondes
- ✓ Recolorer avec de la fuchsine pendant 30 seconde, rincer à l'eau distillée
- ✓ Sécher au dessus de la flamme d'un bec bunsen
- ✓ Observation au microscope optique à l'objectif x100 à l'immersion. les bactéries colorées en violet sont des bactéries Gram positif et celle colorées en rose sont des bactéries à Gram négatif

#### **II.1.2.4.2. Tests biochimiques**

##### **➤ Tests de la catalase**

Sur une lame propre, une goutte d'eau oxygénée est déposée à l'aide d'une pipette Pasteur puis l'inoculum bactérien est ajouté. L'observation est immédiate. S'il y'a une apparition de bulles, dégagement gazeux de dioxygène, le test de catalase est positif (+) .s'il n'y a pas de bulles, le test de catalase est négatif (-).

##### **➤ Tests de l'oxydase**

Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram - qui permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl paraphénylène diamine. Disque pré-imprégné par le réactif est déposé à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée puis l'inoculum bactérien est ajouté

##### **➤ Tests de coagulase**

Dans un tube à hémolyse stérile, introduire 0,5 ml de plasma oxalate + culture de la souche à étudier, on place le mélange à 37°C. Des lectures effectuées toutes les heures au moins pendant les cinq premières heures.



### **II.1.2.4.3. Activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique**

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion de disque où les disques sont imbibés de 10 $\mu$ l de l'extrait (Lesueur et al., 2007)

#### **II.1.2.4.3.1. Préparation du milieu de culture**

Les milieux de culture approprié à cette étude est le milieu Muller-Hinton pour les bactéries et sabouraud chloramphénicol pour les levures sont préparés comme suit :

Les milieux MH et sabouraud sont commercialisés préparés dans des bouteilles et en tubes respectivement. Donc, ils doivent être bouillis dans un bain-marie jusqu'à dissolution complète puis, couler en boîtes de pétri sur épaisseur de 4mm.

#### **II.1.2.4.3.2. Stérilisation du matériel**

L'eau distillée, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des Solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium, ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 30 minutes

#### **II.1.2.4.3.3. Préparation des dilutions d'extraits d'*Ajuga iva***

Les extraits d'*A. iva* ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) à 100% pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives au demi, sachant que la concentration de la solution mère d'extrait est de 100mg/ml pour les champignons et 100, 200mg/ml et 800mg/ml pour les bactéries.

#### **II.1.2.4.3.4. Préparation de l'inoculum**

Les souches bactériennes sontensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. Décharger l'anse dans 10 ml d'eau distillée stérile, La suspension bactérienne est bien homogénéisée, Son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland ou à une DO de 0.08 à 0.10 à 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

### II.1.2.4.3.5. Ensemencement et dépôt des disques

- ✓ Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.
- ✓ L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- ✓ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface de gélosé sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- ✓ L'opération est répétée 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- ✓ L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de pétri avec la même souche.

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques de papier Wattman (5 disque/boîtes) imprégnés de 10µl d'extraits d'*Ajuga iva* sont déposés délicatement sur la surface de la gélose.

De même les antibiogrammes réalisés avec des disques contenant des antibiotiques (témoin positif) appropriés prêts à l'emploi ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés et les disques Wattman imprégnés de DMSO (témoin négatif). Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C. (**Rahal et al., 2011**).

### II.1.2.4.3.6. Lecture des antibiogrammes

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques à l'aide d'un pied de coulisse.

- Pour les bactéries testées sur le milieu Mueller-Hinton simple, les mesures ont été prises en procédant par transparence à travers le fond de boîte pétri fermée.
- Pour la bactérie testée sur le milieu Mueller-Hinton au sang cuit, nous avons pris les mesures de diamètre de zone d'inhibition, boîte de pétri ouverte et bien éclairée.

### II.1.2.4.3.7. Détermination des CMI

Pour les concentrations minimales inhibitrices (CMI), il s'agit de déterminer les plus petites concentrations auxquelles les extraits présentent encore une activité antibactérienne visible à l'œil nu. Des dilutions successives au demi ont permis de préparer une gamme de dilution, en

effet de chaque dilution on prélève 10 µl et on la met dans les disques qui sont déjà dans les boîtes de pétri.

#### **II.1.2.4.3.8. Activité antifongique**

Le même protocole est effectué avec la levure, mais dans ce cas le milieu de culture utilisé est le milieu Sabouraud chloramphénicol. L'inoculum de levure est préparé et l'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîte pétri coulés qui contient du Sabouraud chloramphénicol.

La lecture des zones d'inhibition est faite après 48 heures d'incubation à 28°C

## II.2. *Résultats et Discussion*

## II.2.1. Rendements des extractions

L'extraction par macération de la partie aérienne (tiges et feuilles) d'*A. iva* dans le méthanol a permis d'obtenir un résidu sec d'extrait brute avec un rendement de 9,6% (m/m) est légèrement supérieur à celui de **Bougandoura, (2011)** est de 6,43% et inférieur à celui cité par **Dif et Djouder (2007)** de 15%.

D'une manière générale, les teneurs en extraits secs varient en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide des Polyphénols : la température, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion de solvant et la localisation géographique (**Meyer, 2001**).

## II.2.2. Dosage des composés phénoliques

### II.2.2.1. Dosage des phénols totaux

La spectrophotométrie a permis d'estimer le taux des polyphénols dans l'extrait méthanolique de la plante. La coloration bleue produite indique la présence des teneurs en phénols mesurés à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu, ce qui permet de mesurer l'intensité de la couleur à longueur d'onde de 765 nm.

La teneur en composés phénoliques de l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Ajuga iva* est déterminée suivant la méthode colorimétrique. Les concentrations ont été calculées à partir de la courbe d'étalonnage en utilisant de l'acide gallique comme standard et exprimée en mg EAG/g d'extrait (Annexe 5). La teneur en polyphénols de l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva* est de 153mg EAG/g E.

Le taux des polyphénols qu'on a obtenus est supérieur à celle obtenues par **Bougandoura(2011)** de la région de Tlemcen qui est de l'ordre 1,323 mg EAG/g E en utilisant comme solvant d'extraction l'eau distillée et à celle obtenue par **Boudjelal (2013)** qui est de l'ordre de  $06,30 \pm 0,29$  mg EAG / ml d'extrait. Elle est aussi élevée par rapport à celle rapporté par **Saadaoui et al., (2006)** qui est réalisée sur trois échantillons de *Ajuga iva* de régions différentes de Tunisie, qui sont de l'ordre de 7,81.6,69 et 3,92 mgEAG/g d'extrait en utilisant comme solvant d'extraction l'éthanol.

D'autre part, **Saadaoui et al., (2007)** ont montré que la teneur phénolique de l'extrait méthanolique de quelques plantes appartenant à différentes familles tel que *Ajuga iva*, leurs teneurs varient entre 1,68 à 11,07 mg EAG/g de matière sèche. Cette différence dans les teneurs peut être expliquée par les conditions environnementales, climatiques et période de collecte ainsi que par les facteurs génétiques ou la méthode d'extraction utilisée qui ne donne pas une composition quantitative complète des extraits.

#### II.2.2.2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des substances naturelles issues des plantes, présentes dans tout le règne végétal. Ce sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles (**Galati et al., 2004 ; Peluso, 2006**).

La teneur en flavonoïdes déterminée par la méthode au trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) pour l'extrait a été rapportée en mg équivalent de quercétine /g d'extrait. Les résultats de la courbe d'étalonnage de la quercétine sont représentés dans la (Annexe 6).

La teneur en flavonoïdes de l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva* est de 70,4 mg E Q/g. On remarque que la teneur de la partie aérienne de cette plante est proche de celle obtenue par **Bouzidi et al., (2012)** qui est  $84,9 \pm 8,075$  mg EQ/g E en employant l'éthanol pour l'extraction. Elle est supérieure à celui obtenu par **Bougandoura (2011)** qui est de 1,050 en utilisant comme solvant d'extraction méthanol. Ainsi elle est élevée à celui cite par **Dif et Djouder (2008)** qui est de l'ordre de 4,48 mg EQ/g E. Cette référence est due peut être à la nature du solvant, à la méthode d'extraction ou le temps de macération.

#### II.2.3. Activités antioxydante d'*Ajuga iva*

##### ➤ Activité scavenger du radical DPPH

L'activité antiradicalaire de nos produits a été évaluée par la méthode de DPPH. Une solution méthanolique de DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) présente une coloration violette sombre, en présence d'un antioxydant, la forme réduite de DPPH-H confère à la solution une coloration jaune, et par conséquent une diminution de son absorbance (**Perez et al., 2007**).

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration de standards acide ascorbique et de l'extrait qui sont également exprimés en

utilisant le paramètre  $IC_{50}$ , qui est défini comme la concentration du substrat qui cause une perte de 50% de l'activité de DPPH (Markowicz Bastos *et al.*, 2007).

L'inhibition du DPPH radicalaire a été évaluée pour l'extrait de plante et les résultats sont présentés dans Annexe 7.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Ajuga iva* et de standard acide ascorbique a une activité antiradicalaire dépendante de la différente concentration. On note que l'effet scavenger augmente en augmentant la concentration. Le standard d'acide ascorbique est testé à des mêmes concentrations que l'extrait. Alors que l'activité antiradicalaire de standard varie de 80,15 à 88,28%, et celle de l'extrait varie de 27,87 à 88,3%.

A la concentration de 25 $\mu$ g/ml, le pourcentage d'inhibition moyenne est de l'ordre 73.57%, 87.98% pour l'extrait et l'acide ascorbique respectivement. Tandis que, la valeur  $IC_{50}$  de l'extrait *Ajuga iva* est de 19  $\mu$ g/ml, supérieure à celle de standard qui est 5,24 $\mu$ g/ml plus l'extrait testé s'avère moins actifs en comparaison avec l'acide ascorbique.

Cependant la valeur  $IC_{50} = 19 \mu$ g/ml de l'échantillon étudié montre une activité antioxydante faible à celle rapportée auparavant ( $IC_{50} = 15,04 \pm 1,02$ ) par Boudjelal, (2013), de celle présenté par Bougandoura, (2011) avec une  $IC_{50}$  de l'ordre de 6,36 $\mu$ g/ml et aussi de celle obtenu par Adjadj, (2009) qui est  $IC_{50} = 415,06 \pm 0,59$ ug/ml. Ceci est peut être du a la méthode de dosage des polyphénols totaux choisie.

Selon Boudjelal, (2013). L'activité anti-radicalaire d'un extrait est relativement dépendante de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes. Par exemple l'extrait méthanolique de l'*Ajuga iva* qui représente la fraction la plus faible en polyphénols, possède l'effet scavenger le plus bas par rapport aux autres extraits.

#### **II.2.4. Activité antibactérienne de *A. iva***

Cette activité est évaluée par la méthode d'antibiogramme. Le pouvoir antimicrobien de l'extrait *Ajuga iva* est obtenu par la mesure du diamètre de zone d'inhibition en mm et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilisation des souches (Ponce *et al.*, 2003).

- Extrêmement sensible (+++) : plus de 20mm
- Très sensibles (++) : de 15 à 19mm

- Sensibles (+) : de 8 à 14mm
- Non sensibles - : moins de 8mm

### II.2.4.1. Tests microbiologiques

#### ➤ Tests de confirmation des souches

**Tableaux V** : Caractères morphologiques étudiés pour l'identification bactérienne.

Espèce bactérienne	Milieu de culture	Gram	Aspect microscopique
<i>Staphylococcus aureus</i>	Chapman	Positif	Coccus en grappe de raisin
<i>E. coli</i>	Hektoen	Négatif	Coccobacille
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hektoen	Négatif	Bacilles
<i>Streptococcus. Sp</i>	Sang cuit	Positif	Cocci

### II.2.4.2. Tests biochimiques

**Tableaux VI** : caractères biochimique recherchés

Espèce bactérienne	Catalase	Coagulase	Oxydase
<i>Staphylococcus aureus</i>	NR	Positif	Positif
<i>E. coli</i>	NR	NR	NR
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR	NR	NR
<i>Streptococcus.sp</i>	Négatif	NR	NR

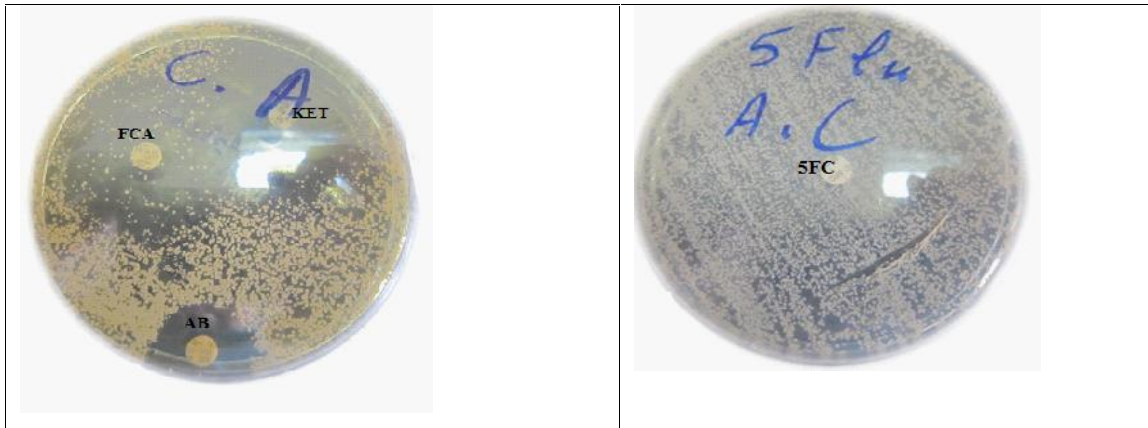
NR : non recherché

### II.2.4.3. Résultats des antifongigrammes

#### II.2.4.3.1. *Candida albicans*

Selon les résultats de l'antibiogramme présentés dans la (Figure7), les antifongique à savoir : le ketoconazole, Amphotericine B, Fluconazole possèdent des zones d'inhibitions les plus élevées avec des valeurs de 30, 20 et 35 mm respectivement donc *candida albicans* sensible à des antifongique précédente par contre elle est résistante à 5-Fluorocytocine.

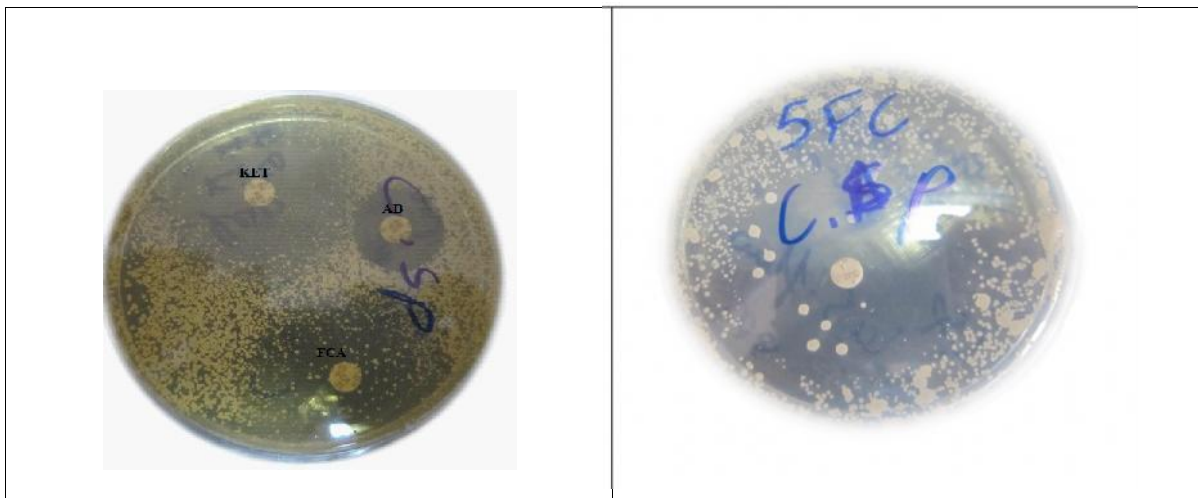




**Figure 7:** Effet des antifongiques sur *Candida albicans*

#### II.2.4.3.2. *Candida sp*

D'après la (figure 8), nous constatons que les zones d'inhibitions varient de 20, 25 et 37 mm pour Amphotéricine B, Ketoconazole, 5-Fluorocytocine respectivement donc elle est sensible.



**Figure 8:** Effet des antifongiques sur *Candida sp*

#### II.2.4.4. Pouvoir antimicrobien d'extraits *A.iva* sur les levures

Après 48 heures d'incubation à 37°C, les zones d'inhibitions des différentes concentrations ont été mesurées. Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau VII

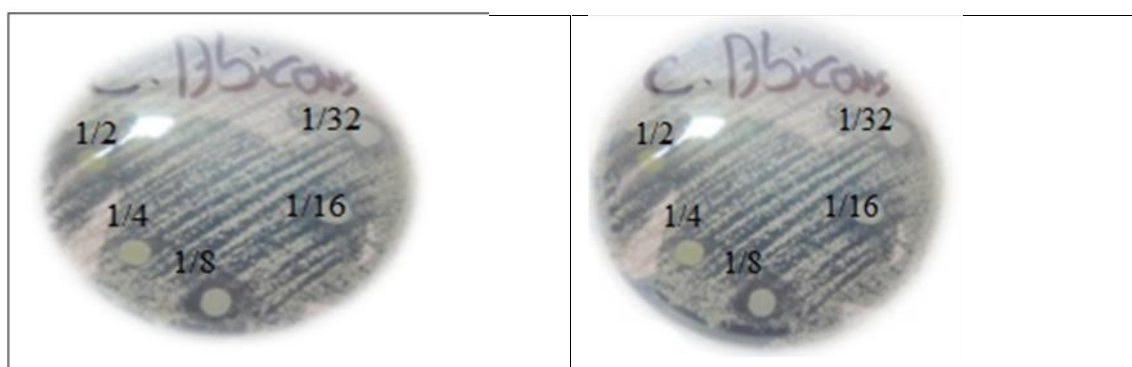
**Tableau VII** : Diamètre des zones d'inhibitions d'extrait *Ajuga iva* sur les levures

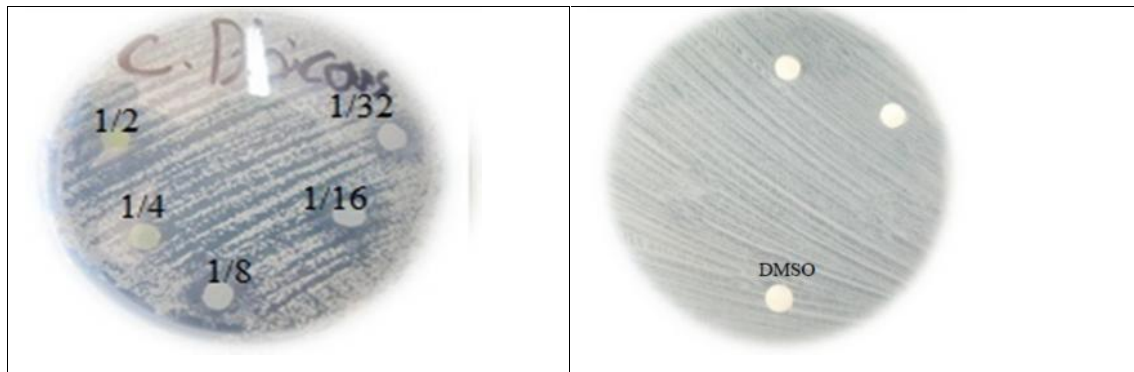
Leveur	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)					
	Les dilutions d'extrait méthanolique d' <i>Ajuga iva</i>					
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	T
<i>Candida albicans</i>	15,33±0,471	11±0,471	13±0	11,33±0,471	8,66±0,471	6
<i>Candida sp</i>	8,66±0,471	8±0	8±0	7±0	7±0	6

Malgré l'existence des zones d'inhibition moyennes et faible, nos résultats prouvent l'existence d'activité antimicrobienne contre les levures.

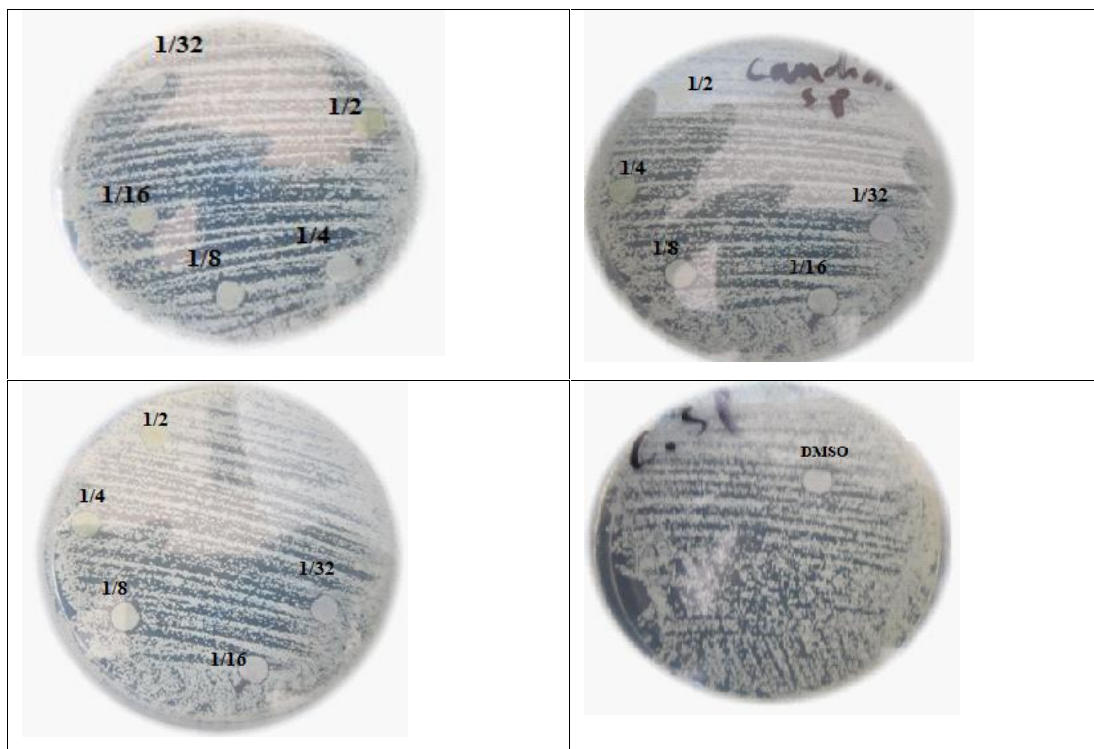
On peut considérer une activité antimicrobienne si le diamètre de la zone d'inhibition observé autour du disque de papier Wattman est supérieur ou égal à 9 mm. Généralement les diamètres des zones d'inhibition obtenues avec *candida sp* est inférieur à 9 mm donc elle est résistante.

L'activité la plus élevée de l'extrait *A. iva* a été remarqué chez *candida albicans* avec une zone d'inhibition maximum de 15 mm pour la dilution 1/2 et 11mm pour la dilution 1/4 et 13mm pour la dilution 1/8 (Tableau VII). Cette différence peut être due : les conditions de stockage, Concentration des substances peut être exagéré dans le disque, diffusion uniformément dans l'agar





**Figure 9:** Effet de l'extrait de *A. iva* sur *Candida albicans*



**Figure 10:** Effet de l'extrait *A. iva* sur *Candida sp*

D'après les Figures (7, 8, 9,10) nous constatons également que les zones étaient inférieures à celles des antifongiques, qui ont montré des zones d'inhibition large par rapport à celles obtenues en testant l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva*. Cette différence peut être due : Concentration des substances peut être exagérée dans le disque, à la capacité de l'agent antibactérien de diffuser uniformément dans l'agar, le degré de pureté

Les résultats de **Boudjelal (2013)** révèlent que la souche *candida albicans* est sensible avec une zone d'inhibition 10 mm

### II.2.4.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Tableau VIII : les différentes concentrations minimales inhibitrices

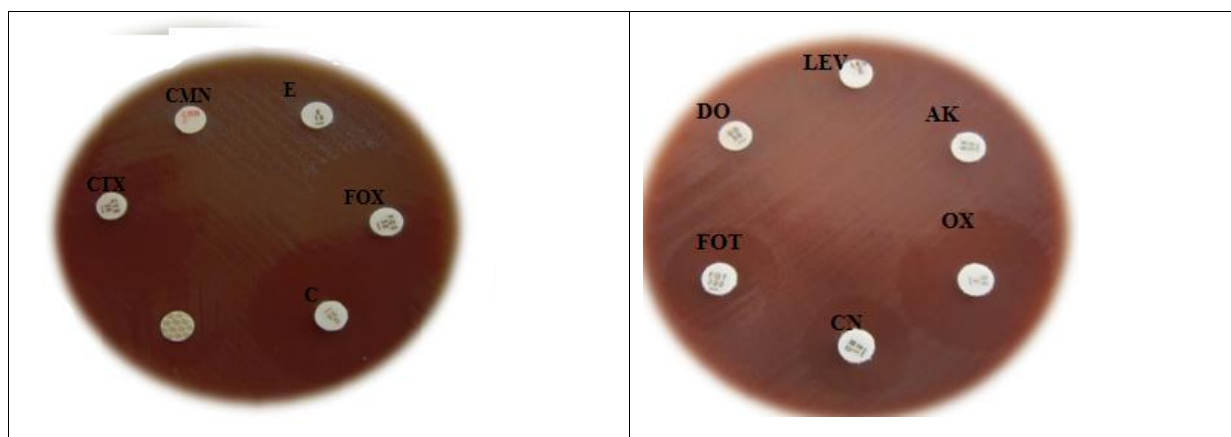
Levure	Les différentes concentrations d'extrait méthanolique de <i>Ajuga iva</i>					
	Les dilutions d'extrait de <i>Ajuga iva</i>					
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	CMI
<i>Candida albicans</i>	50mg/ml	25mg/ml	12.5mg/ml	6.25mg/ml	3.15mg/ml	>6.25mg/ml
<i>Candida sp</i>	50mg/ml	25mg/ml	12.5mg/ml	6.25mg/ml	3.15mg/ml	>50mg/ml

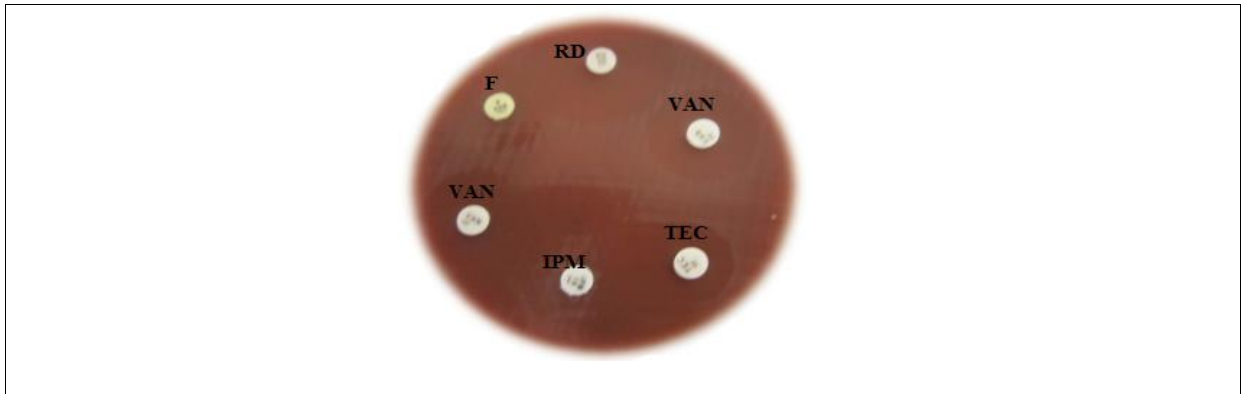
*Candida albicans* est sensible à des concentrations supérieures à des concentrations minimales inhibitrices qui est de 6.25mg/ml, alors que la CMI de *candida sp* est > 50mg/ml.

### II.2.4.6. Résultats des antibiogrammes

#### II.2.4.6.1. *Streptococcus sp*

Selon les résultats de l'antibiogramme présentés dans la (figure12) et dans le (tableau II) (Annexe 2), les antibiotiques à savoir : le céfotaxime (CTX), cefoxitine (FOX), imipénème (IMP), tandis que chloramphénicol (C) possèdent des zones d'inhibitions les plus élevées avec des valeurs de 35, 30, 30 et 28 mm respectivement par contre elle est résistante à érythromycine (E) et (CMN). Cette résistance peut être due à la modification de la cible de l'antibiotique, et à la résistance par efflux.

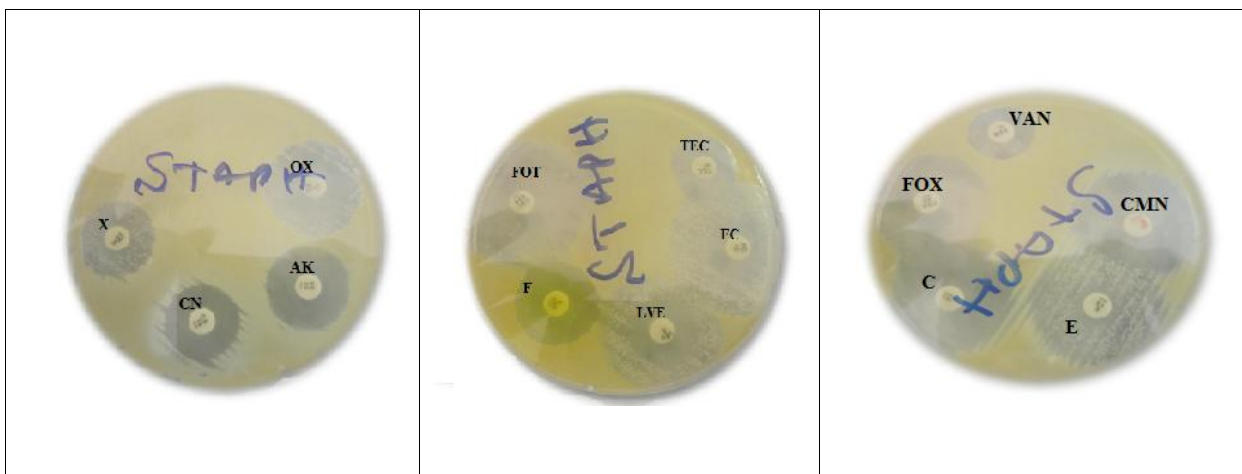




**Figure 12:** Effet des antibiotiques sur la *Streptococcus* sp (CHU).

#### II.2.4.6.2. *Staphylococcus aureus*

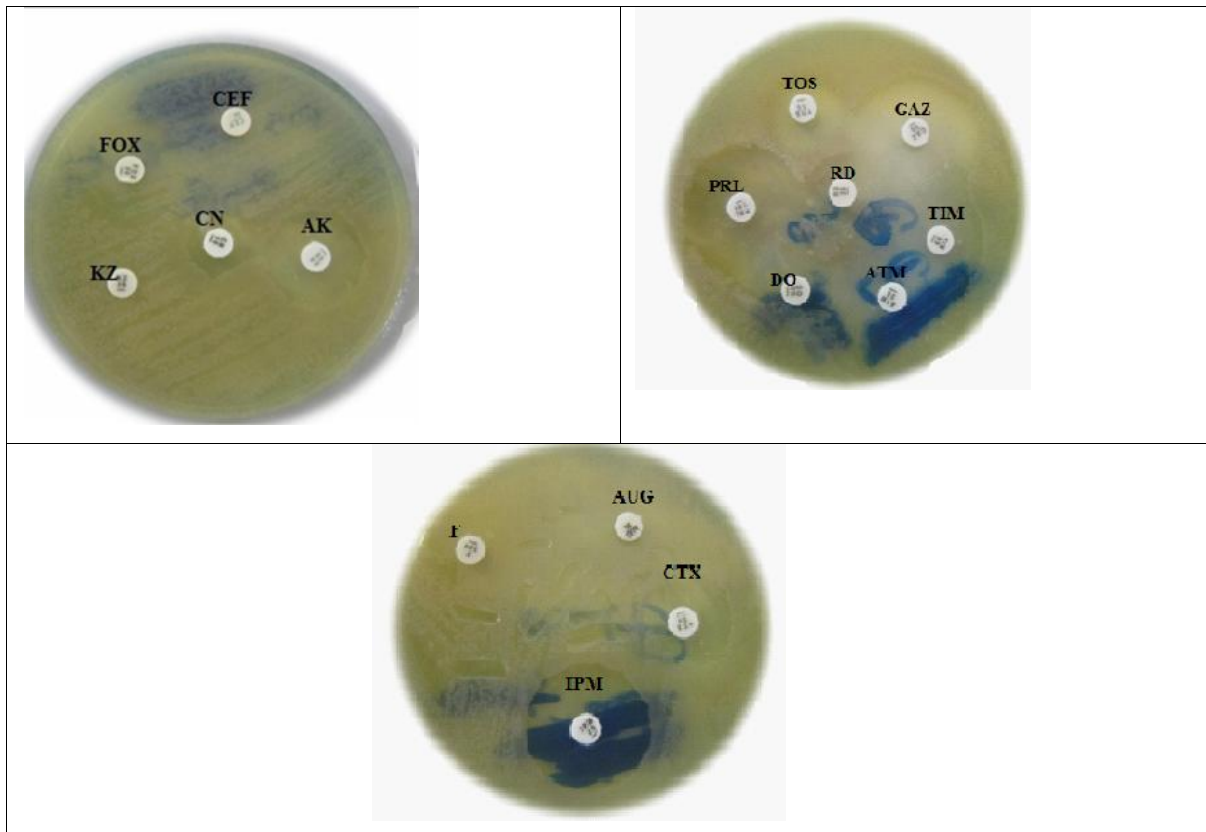
Nous constatons une sensibilité remarquable de la souche testée vis-à-vis à tous les antibiotiques testée :(CMN), érythromycine (E), chloramphénicol (E), amikacine (AK) (Figure 13) (Tableau II), (Annexes 2).



**Figure13:** Effet des antibiotiques sur la *Staphylococcus aureus*(CHU).

#### II.2.4.6.3. *Pseudomonas aeruginosa*

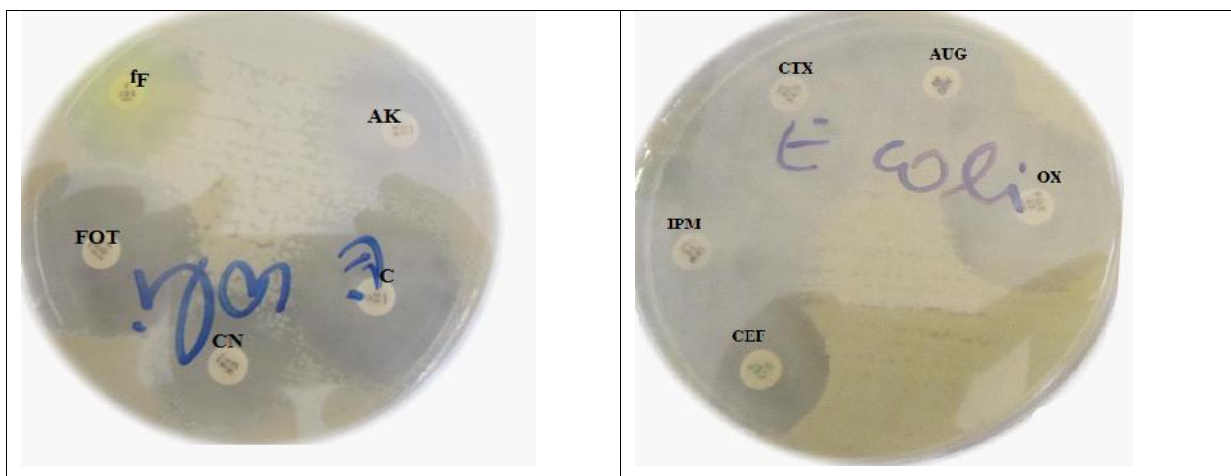
D'après la figure 11 et le tableau I (Annexes 1), Nous avons révélé une sensibilité différente aux antibiotiques testés : pépiracilline (PRL), ciflazidine (CAZ), imipénème (IPM), céfotaxine (CTX), alors qu'elle est résistante à (F), (AUG) avec un diamètre 06mm



**Figure14 :** Effet des antibiotiques sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853

#### II.2.4.6.4. *E. coli*

D'après la figure 15, Tableau I (Annexes 1) généralement *E. coli* est sensible à tous les antibiotique testé à savoir : céfotaxime (CTX), imipénème (IPM), chloramphénicol (C), amikacine (AK), ciflazidine (CAZ).



**Figure15:** Effet des antibiotiques sur *E. coli* ATCC25922

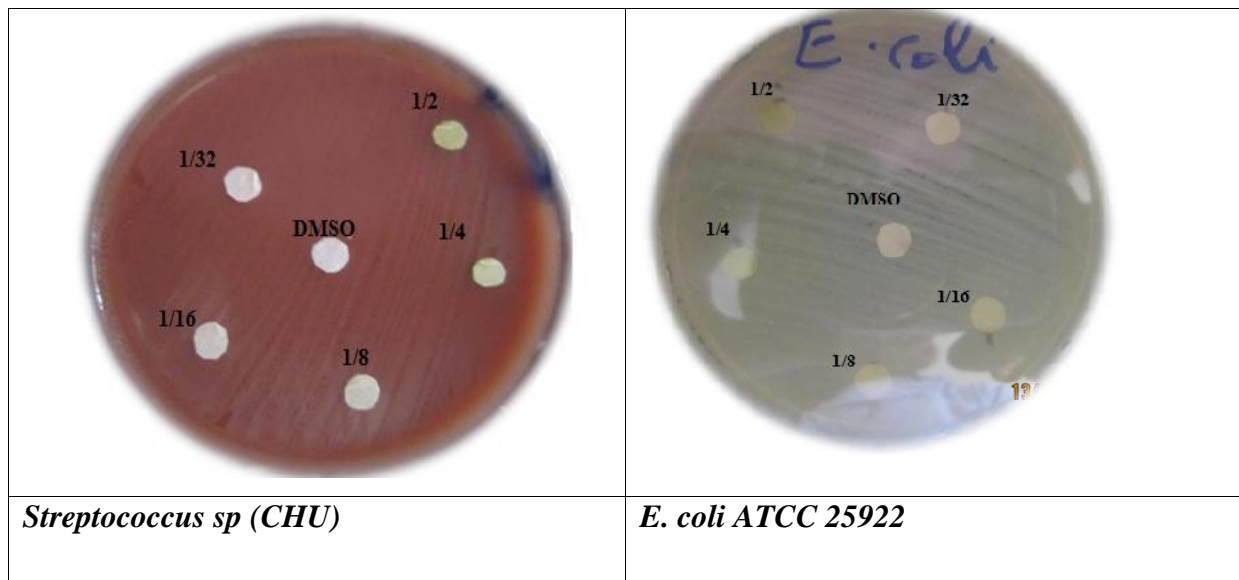
### II.2.4.7. Pouvoir antibactérien de l'extrait de *A.iva*

D'après (la figure 16), L'extrait d'*Ajuga iva* a présenté des résultats négatifs vis-à-vis de toutes les souches testées. Aucune zone d'inhibition n'a été observée pour les doses 100, 200, 800mg/ml. Cela peut être dû à la structure des bactéries et peut être attribuée à la capacité de l'agent antibactérien de diffuser uniformément dans l'agar.

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne influe aussi sur les résultats. (Natarajan *et al.*, 2005) et (Fazeli *et al.*, 2007) ont constaté que la méthode de diffusion à partir des puits sur gélose est plus adaptée pour étudier l'activité des extraits aqueux et organiques de l'*Euphorbia fusiformis* et hydro-éthanoliques de *Rhus coriaria* et *Zataria multiflora*, que la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Les études portées sur l'activité antimicrobiennes d'extrait méthanolique d'ivette musquée (*Ajuga iva*) reportée par Dif et Djouder (2008), a révélé que les résultats négatifs vis-à-vis des tous les souches testées.

- Pour le DMSO a été testé comme contrôle négatif, les résultats montre que le solvant ne présente aucun effet sur la croissance des souches microbiennes.



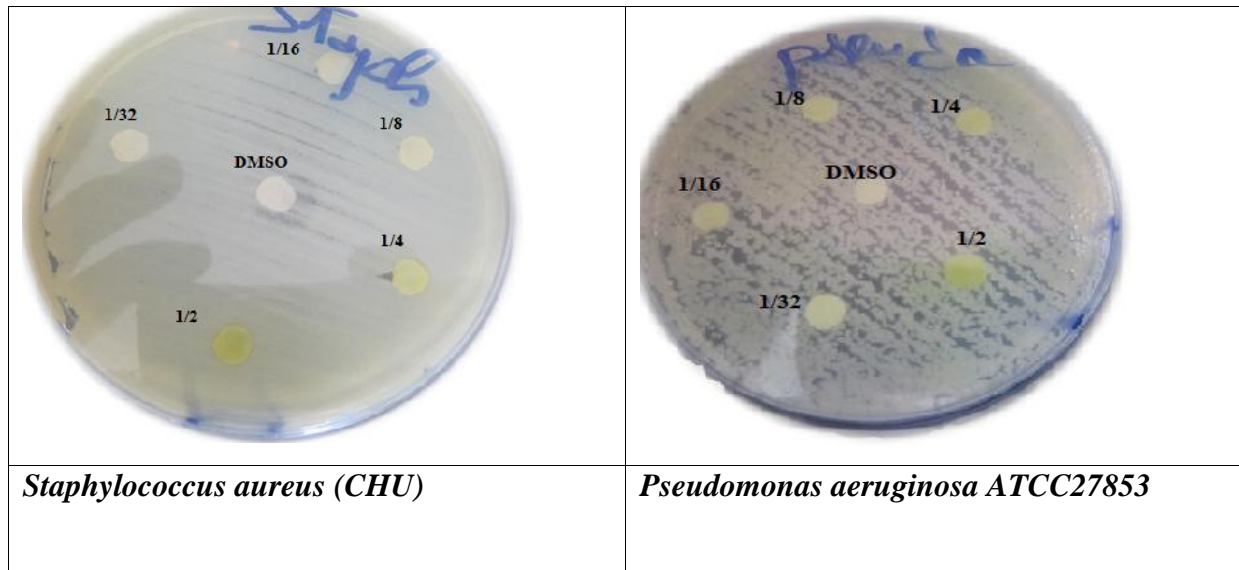


Figure 16: Effet de l'extrait de *A.iva* sur les bactéries étudiées



# *Conclusion et perspectives*

## Conclusion

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale ; une telle thérapie prévient l'apparition des effets secondaires observés lors de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique. Alors que dans le présent travail, on a intéressé aux effets antibactériens et antioxydants de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de la plante *Ajuga iva* de la région de Bejaia.

Dans ce travail, nous avons effectué l'extraction des composés phénoliques de la plante *Ajuga iva* par macération. Tandis que, l'extraction méthanolique de cette plante a permis d'obtenir un rendement qui est de l'ordre de 9,6%.

Le dosage des phénols totaux de l'extrait méthanolique a révélé un teneur considérable qui est égale à 153 mgEAG/g E. D'autre part, le dosage des flavonoïdes a montré que la plante *Ajuga iva* présente un teneur modéré de l'ordre de 70.4mgEQ/g E. Les résultats de test DPPH ont montré une activité antiradicalaire égale à 88.3% avec un  $IC_{50}=19 \mu\text{g/ml}$ . On peut noter que cette activité est inférieure à celle du l'acide ascorbique.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes et deux souches fongiques, selon la méthode de diffusion du disque. Les résultats indiquent que l'extraits *Ajuga iva* possèdent une activité antimicrobienne sur les souches fongiques candida albicans avec un diamètre d'inhibition maximal 15mm par contre aucune activité détectée sur les souches bactériennes. On déduit que l'extrait méthanolique de *Ajuga iva* a une activité antifongique.

À la suite de ces résultats, il serait donc intéressant d'étendre l'éventail des tests antioxydants et antimicrobiens ainsi que l'isolement et la caractérisation des composés actifs dans les différents extraits en vue d'identifier les différentes molécules responsables des différentes activités biologiques de cette plante.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne représente qu'une première étape dans la recherche des substances biologiquement active, une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antioxydant et antimicrobienne de l'extrait de cette plante.

*RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES*

**-A-**

**Adjadj, M., (2009).** Propriétés antioxydantes et activité inhibitrice de la xanthine oxydase des extraits de la plante médicinale *Ajuga iva* (L) Schreber .Thèse de magister .Université Mentouri constantine, p : 39-41

**Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., Lomri, A., (2007).** Radicaux libres derives de l'oxygène et superoxydes dismutases: rôle dans les maladies rhumatismales, 637-638

**Ait Youssef, M., (2006).** Les plantes médicinales de Kabylie ; Edition Ibis press PP 17-19.

**Arockiaraj, J., Easwvaran, S., Vanaraja, P., Singh, A., Goudable, J., Favier, A., (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Métabol*; 115-20

**Arora, A., Sairam, R., Srivastava, G., (2002).** Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, **82**, 1227-1238.

**-B-**

**Baba Aissa, F., (2000).** Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique d'Orient et d'Occident. Ed. Librairie moderne Rouïba, 46

**Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, J., Pinkas, M., (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei. Forschung.*, 46: 1086-1089.

**Batanouny, K., Abou Tabl, S., Shabana, M., Soliman, F., (1999).** Wild medicinal plants in Egypt. Academy of Scientific Research and Technology. International Union for Conservation (IUCN). Egypt.

**Belaiche, P., (1979).** Traité de phytothérapie et d'aromatogramme. Ed Maloine. Paris

**Belhattab, R., (2007).** Composition chimique et activité antioxydante, antifongique et antiaflatoxinogène d'extraits de *Origanum glandulosum* Desf et *Marrubium vulgare* L (Famille des Lamiaceae). Thèse de Doctorat d'état, UFA-Sétif, Algérie.

**Bennaghmouch, L., Hajjaji, N., Zellou, A., Cherrah, Y., (2001).** Étude pharmacologique d'*Ajuga iva*. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, **59(4)**, juillet, 284.

**Barteles, A., (1998).** plantes de basin mediteraneen Ed: Eugen Ulmer .40-45

**Berset, c., cervelier, M., (1996).** Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power .*Sciences des Aliments*, 16, 219-245

**Bondm, M., Al-Hillo, Y., Lamara, K., Ladjel, S., Bruno, M., Piozzi, F., Simmonds, M., (2000).** Occurrence of the antifeedant 14, 15-dihydroajugapitin in the aerial parts of *Ajuga iva* from Algeria. *Biochemical Systematic and Ecology*, 28, 1023-1025

**Bouderbala, S., Bouchenak, M., Lamri-Senhadji, M., Prost, J., Lacaille-Dubois, M., (2008).** Les iridoïdes d'*Ajuga iva* atténuent la cholestérolémie et améliorent le transport inverse du cholestérol, chez le rat rendu hypercholestérolémiques. *Nutrition Clinique Métabolisme*, 22,63.

**Bougandoura, N., (2011).** Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Satureja calaminthassnepta* (nabta) et *Ajuga iva* L. (Chendgoura) de l'ouest d'Algérie.

**Bouzidi, S., Adjedjou, K., (2012).** Activités antioxydantes et anti-enzymatiques de l'extrait éthanolique d'*Ajuga iva*. En vue de l'obtention du diplôme d'étude supérieure en biologie Moléculaire et cellulaire. Université A/MIRA de Bejaia, p.37.

**Bruneton, J., (1993).** Pharmacognosie et Phytochimie. *Plantes médicinales*, Tec et Doc ; 278-279.

-C-

**Chenni, A., Yahia, D., BourKott, F., Prost J., Lacaille – Dubois M., BouchaK, M., (2007).** Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet .*journal of Ethnopharmacology* **109**:207-213.

**Cholewa, J., Poprz ecki, S., Zajac, A., Waskiewicz, Z., (2008).** Impact de la supplémentation en vitamine C sur les paramètres du stress oxydatif dans le sang des basketteurs d'élite lors d'un effort maximal, *Science & Sports* 23, 2008 ; 176–182.

**Çito lu, G., Aksit, F., (2002).** Occurrence of marrubiin and ladanein in *Marrubium trachyticum* Boiss. From Turkey. *Biochem Syst Ecol* 30:885–6.

**22- Cohen, Y., Jacquot, C., (2001).** Pharmacologie. 5<sup>ème</sup> Ed. Masson. Paris.p 350

**Coll, J., (2007).** New minor ecdysteroids from *Ajuga iva* (Labiatae) and complete <sup>1</sup>H-NMR assignment of cyasterone. *Asociacion de Quimicos de l'Institut Quimico de Sarria, Barcelona, Espagne*, 64(528), 24

**-D-**

**Delarras, C., (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et Documentation .Lavoisier, Paris.

**Delorme, J., Robert, A., (1997).** Mycologie médicale. Ed. Centre collégial de développement de matériel didactique, [Mont-Royal Québec], p. 184.

**Dhaouadi, K., Raboudi, F., Estevan, C., Barrajo, E., Vilanova, E., Hamdaoui, M., Fattouch, S., (2010).** Cell Viability Effects and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tunisian Date Syrup (Rub El Tamer) Polyphenolics Extracts. *J. Agric. Food Chem*; 59: 402-406.

**Dif, N., Jouer, A., (2008).** Les activités biologique d'un extrait méthanolique d'une plante médicinale locale ; Ivette musquée (*Ajuga Iva*). *Mémoire de fin de cycle*.

**Dobson, A., Erikson, K., Aschner, M., (2012).** Manganese Neurotoxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2004; 115-129

**Dworkin, M., Falkow, S., (2006).** Proteobacteria: Gamma subclass. Ed. Springer, New York, NY, p.1248

**-E-**

**Ekoumou, C., (2003).** Etude phytochimique et pharmacologique de cinq recettes traditionnelle utilisés dans le traitement des infections Urinaire et la Cystite. *Thèse Pharmacie, Bamako* ; 145.

**Elghozi, J., Duval, D., (1992).** Pharmacologie 2ème Ed : Médecine Flammarion. Paris. P.289

**El-hilaly, J., Tahraoui, T., Israili, Z., Lyoussi, B., (2006).** Hypolipidemic effects of acute and sub-chronic administration of an aqueous extract of *Ajuga iva* L. whole plant in normal and diabetic rats. *J Ethnopharmacol* **105**: 441–448.

**Erdogan Orhan, I., Belhattab, R., enol, F., Gülpinar, A., Ho ba , S., (2010).** Kartal M. Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species. *Ind Crops Prod* 32:566–71.

**-F-**

**Fazeli, M., Amin, G., Ahmadian-Attari, M., Ashtiani, H., Jamalifar, H., Samadi, N.,** (2007). Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control*, 18: 646-649.

**Ferhat, M., (2009).** Recherche de substances bioactives de *Centaura microcarpa* coss et dur.  
Diplôme étude supérieur de biochimie Université de M'sila.

**Favier, A., (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr.* 64: 390- 396

**-G-**

**Galati, G., Brien, P., (2004).** Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolic: significance for their chemo preventive and anticancer properties .*Free Radical Biology Medicine* .Vol .37, p: 287-303.

**Gammoudia, A., Dandanaa, H., Chaheda, S., Ferchichia, S., Ernezb, A., Mileda., (2013).** Évaluation des paramètres du stress oxydant chez des patients coronariens. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* : 28,39–42

**Goudable, J., Favier, A., (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Mdtabol*; 11:115-20.

**Gordon, C., (1997).** Botanica : encyclopédie de botanique et d'horticulture : plus de 10 000 plantes du monde entier, [Nouv. éd.?], [Cologne], Könemann; Milsons Point (NSW Australie), Random House Australia, c2003, 1020 p.

**Gurib-Fakim, A., (2006).** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Médecine*, 27: 1-93.

**-H-**

**Halimi, A., (2004).** Les plantes médicinales en Algérie. 1ère édition. *BERTI Editions*, Alger. pp: 156-157.

**Hamden, K., Carreau, S., Jamoussi, K., Ayadi, F., Garmazi, F., Mezgenni, N., Elfeki, A., (2008).** Inhibitory effects of 1alpha, 25dihydroxyvitamin D3 and *Ajuga iva* extract on oxidative stress, toxicity and hypo-fertility in diabetic rat testes. *J. Physiol. Biochem.*, 64(3), 231-239.

**Heilerova, L., Buckova, M., Tarapcik, P., Silhar, S., Labuda, J., (2003).** Comparaison of antioxidative activity data for aqueous extracts of lemon blam (*Melissa officinalis* L.), Oregano (*Origanum Vulgare* L.), Thyme (*Thymus vulgaris* L.) and Agrimony (*Agrimonia eupatoria* L.), obtained by conventional methode and the DNA-based biosenor. *Czech .J.Food Sci.*, 21(2), 78-84.

**Herrera-Arellano, A., Aguilar-Santamaría, L., Garcia Hernandez, B., Nicasio-Torresa, P., Tortoriello, J., (2004).** Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine*; 11:561–6. **47-**

**Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A., Doble, M., (2008).** Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15, 639-65

**-I-**

**Israili, Z., Lyoussi, B., (2009).** Ethnopharmacology of the plants of genus *Ajuga*. *Pak J Pharm Sci*, 22: 425-462.

**-J**

**Jacotot, B., (1997).** Vitamine E et athérosclérose. *Rev Méd Interne* 15; 627-629.

**Jiri, S., Marketa, R., Olga, K., Petr, S., Vojtech, J., Libuse, T., Ladislav, H., Miroslava, B., Josef, Z., Ivo, P., Rene, K., 2010.** Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. *Molecules*. (15): 8618-8640.

**-K-**

**Kim, D., Chun, O., Kim, Y., Moon, H., Lee, C., (2003).** Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:6509-6515.



**Kowalski, J., (1998).** Bacterial and mycotic infections, in Equine internal medicine, S.M.

Reed, Editor, W.B. *Saunders Compagny*. p. 61-74.

**-L-**

**Lesueur, D., Serra, D., Bighelli, A., Hoi, T., Ban, N., Thai, T., Casanova, J., (2007).** Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Michelia faveolata*. *Flavour and Fragrance Journal*, (22): 317-321.

**Leverve, X., (2009).** Stress oxydant et antioxydants. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* Volume 44, Issue 5, 219–224.

**-M-**

**MarKowiczBastos, D., Saldanha, L., Catharino, R., Sawaya, A., Cunha, I., Carvlho, P., Eberlin, M., (2007).** Phenolic Antioxidant Identified by ESI-MS from Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis* Extracts .*Molecules* .12:423-432.M-Culvier et al, sage and rosmmary phenolic antioxidant, *JAOCS*, 1996, VOL(73).

**Meyre-Silva, C., Yunes, R., Schlemper, V., Campos-Buzzi, F., Cechinel-Filho, V., (2005).** Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* (Lamiaceae). *Il Farmaco*; 60:321–6.

**Moulinier, (2003).** Parasitologie et mycologie médicales éléments de morphologie et de biologie. EM inters (Ed) 796P.

**-N-**

**Nakanishi, K., (2006).** Studies in microbial and insect natural product chemistry *Nat Med*; 60:2–20

**Nkhili, Z., (2009)** .Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interaction avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant, thèse Doctorat.

**Neve, J., Vermongen, F., Carpentier, Y., (1989).** Valeurs usuelles du sélénium et de la glutathion peroxydase dans une population belge, *Ann Biol Clin*, 47;

**-P-**

**Perez, M., Calderón, N., Croci, C., (2007).** Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of Rosmary (*Rosmarinus officinalis L.*) *Food chemistry*. 104: 585-592.

**Percival, S., (2004).** Microbiology of waterborne diseases. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, p. 480

**Perumal, G., (2005).** Anti-bacterial activity of Euphorbia fusiformis-A rare medicinal herb. *J.Ethnopharmacol.*, 102: 123-

**Polunin, O., Huxley, A., (1971).** Fleurs du Bissin méditerranéen. Fernand Nathaned., Paris.

**Ponce, A., Fritz, R., del Valle, C., Roura, S., (2003).** Antimicrobial activity of essential oil on the native microflora of organic wiss chard .*lebensm.-Wiss.u.-Technol.*36, pp679-684.*J.Soc.Alger.Chim.*, 2011,21(1) ,25-33.*Journal de la société Algérienne de Chimie*25.

**-Q-**

**Quezel, P., santa, S., (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales .CNRS, ed, Paris.

**Ou, B., HAMPSCH-WOODILL, M., PRIOR, L., 2001.** Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (49): 4619-4626.

**-R-**

**Rahal, K., Benslimani, A., Tali-Maamar, H., Missoum, M., Kechih-Boumar, S., Ammari, H., (2011).** Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire). 6ème édition

**Ribereau-Gayon, P., (1968).** Les composés phénoliques des végétaux.Dunod, Ed., Paris .p.254.

**Ribereau-Gayon, J., Peynaud, M., Ribereau-Gayon, P., Sudraud, P., (1972).** Sciences et techniques du vin. Tome 1, analyse et contrôle des vins. Ed. Dunod, Paris, p. 671.

**Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G., (1997).** Antioxidant properties of Phenolic Compounds. *Plant Sci*, 2: 152-159.

**Ramadan, M., (2010).** Rapid antiradical method for screening deep fried oils. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*; 5: 47-50

## -S-

**Saadaoui, B., BeKir, J., Ammar, S., Mahjoub, A., Mars, M., (2006).** Etude de la composition et du pouvoir antioxydant des composés phénoliques de quelques espèces végétales de l'aride tunisien, *Revue des régions arides* ,1: PP 87-92.

**Sahpaz, S., Garbacki, N., Tits, M., Bailleul, F., (2002).** Isolation and pharmacological activity of phénylpropanoïdes esters from *Marrubium vulgare*. *J Ethnopharmacol*; 79:389–92.

**Sassi, M., (2005).** Les plantes médicinales .Ed : Der El FiKer Tunis .Fiche 2.

**Singleton, V., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R., (1999).** Analysis of total phenol, and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin –ciocalton reagent .*Methods in Enzymology*, 299:152-178

**Sohal, R., Mockett, R., Orr, W., (2002).** Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis, *Free Rad. Biol. Med.* **33** (5): 575.

**Sosa, M., Tonn, C., (2008).** Plant secondary metabolites from Argentinean semiarid lands: bioactivity against Insects' .*Phytochem Rev.*7:3-24.

**Storm, D., Rosenthal, K., Swanson, P., (1977).** Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annual Review of Biochemistry*, 46, 723-763.

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

## -T-

**Tahraoui, A., El –Hilaly, J., Israili, Z., Lyoussi, B., (2007).** Ethno pharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province).*Journal of Ethnopharmacology* .110:105-117.

**Taleb-Senouci, D., Krouf, H., Ghomari, M., Lacaille-Dubois, M., Bouchenak, M., (2008).** Effect of an aqueous extract of *Ajuga iva* on glycaemia, reverse cholesterol transport and atherogenic ratios in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proceedings of the Nutrition Society*, **67(OCE4)**, E194.

**Tenover, F., (2006).** Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119 (6), 3-10.

**Tortora, G., Funke, B., Case, C., (2003).** Introduction à la Microbiologie. Editions du nouveau Pédagogique. France

-U-

**Ulanowska, K., Majchrzyk, A., Moskot, M., Jak\_bkiewicz-Banecka, J., W\_Âgrzyn, G., (2007).** Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia* 62: 132-135.

-V-

**Van Delden, C., Iglewski, B., (1998).** Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections; *Emerg. Infect. Dis.* 4: 551-560

**Valsaraj, R., Pushpangadan, P., Smitt, U., et al., (1997).** New anti-HIV-1, Antimalarial, And antifungal compounds from *Terminalia bellerica*. *J. Nat. Prod.* 60: 739-742

-W-

**Wächter, G., Hoffmann, J., Furbacher, T., Blake, M., Timmermann, B., (1999)** Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochem.* 52: 1469-1471

**Wessner, M., Champion, B., Girault, J., Kaouadji, N., Saidi, B., Laffont, R., (1992).** Ecdysteroids from *Ajuga iva*. *Photochemistry*, 31: 3785-3788.

-Y-

**Yala, D., Merad, S., Mohamedi, D., Ouar Korich, N., (2001).** Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, n° 91.

-Z-

**Zerroug, M., Zouaghi, M., Boumerfeg, S., Baghiani, A., Nicklin, J., Arrar, L., (2011).** Antibacterial Activity of Extract of *Ajuga iva*, and *Teucrium Polium*, *Environmental Biolog*, 5(2):491-495.

# *ANNEXES*

## Annexes 1 :

Tableau N°1 : Antibiogramme

antibiotiques souches	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853 (mm)	<i>E. coli</i> ATCC25922 (mm)
<b>TOB</b>	12	NT
<b>CN</b>	9	NT
<b>PRL</b>	30	NT
<b>CAZ</b>	28	NT
<b>TIM</b>	25	NT
<b>DO</b>	17	NT
<b>CTX</b>	20	NT
<b>FOX</b>	10	30
<b>AUG</b>	6	27
<b>CTX</b>	12	33
<b>IPM</b>	15	29
<b>CEF</b>	NT	19
<b>F</b>	6	25
<b>FOT</b>	NT	29
<b>CM</b>	NT	19
<b>C</b>	NT	26
<b>AK</b>	12	23

## Annexes 2

Tableau II : Antibiogramme

<b>Antibiotiques souches</b>	<b>Staphylococcus aureus (CHU) (mm)</b>	<b>Streptococcus sp (CHU) (mm)</b>
<b>FOT</b>	35	22
<b>F</b>	23	20
<b>LVE</b>	17	21
<b>FC</b>	9	NT
<b>TEC</b>	18	19
<b>OX</b>	26	26
<b>AK</b>	21	19
<b>CN</b>	17	19
<b>K</b>	21	NT
<b>E</b>	30	6
<b>CMN</b>	30	6
<b>VAN</b>	17	23
<b>C</b>	26	28
<b>FOX</b>	27	30
<b>DO</b>	NT	11
<b>RD</b>	NT	22
<b>IPM</b>	NT	30
<b>CTX</b>	NT	35

NT : non testées

## Annexes 3

Tableau III : les caractères biologique de différentes couches utilisées

Souche microbienne	Familles	Propriétés et pouvoir pathogène
Escherichia coli ATTCC25922	Entérobactériacea	E .coli commensal le tube digestif de l'homme et de l'animal, généralement mobile grâce aux flagelles et bactérie la plus impliquée dans l'infection aigue d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, diarrhée infantile et les intoxications alimentaires ( <b>Percival, 2004</b> )
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853	Pseudomonacea	Pseudomonas aeruginosa est responsable de 16% des cas de pneumonie nosocomiale, 12% des infections urinaires, 8% des infections suites aux blessures chirurgicales. Il s'agit de bactérie résistante pour plusieurs antibiotique ( <b>Van Delden et Iglewski. 1989</b> )
Staphylococcus Aureus	Micrococcacea	Staphylococcus aureus représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures endocardite aigue, intoxication alimentaire ( <b>Dworkin et Falkow.2006</b> )
Streptococcus sp	Streptococcaceae	Les streptocoques sont des coques gram + anaérobies facultatifs se retrouvent au niveau de la peau, des voies respiratoires supérieures et du tractus génital chez des porteurs sains. La transmission peut donc se faire par voie respiratoire, génitale ou par des aliments ( <b>Kowalski, J. 1998</b> )
Candidas sp	Sacchromycetacées	Levure non pigmentée, non capsulée, à bourgeonnement multiple et formant un pseudo-mycélium et du mycélium vrai. Saprophyte endogène de la lumière intestinale humain et des cavités génitales par contigüité (femme). Elle provoque des affections cosmopolites atteignant la peau, les ongles, les cavités naturelles et les divers viscères par hémодissémination ( <b>Moulinier ,2003</b> )



Candida albicans	Sacchromycetacées	Candida albicans est la plus souvent à l'origine de la plupart des manifestations pathologiques chez l'homme. On la rencontre habituellement, à l'état saprophytique, dans le tube digestif de l'homme (Delorme et Robert, 1997).
------------------	-------------------	---

#### **Annexes 4**

#### **Appareillage et produit chimiques**

##### **Appareillage**

- Balance de précision.
- Rotavapeur.
- Spectrophotomètre.
- Broyeur électrique
- Tamis
- Etuve
- Agitateur magnétique
- Autoclave
- Bec benzène
- Une ampoule a décanter
- spectrophotomètre

##### **Réactifs**

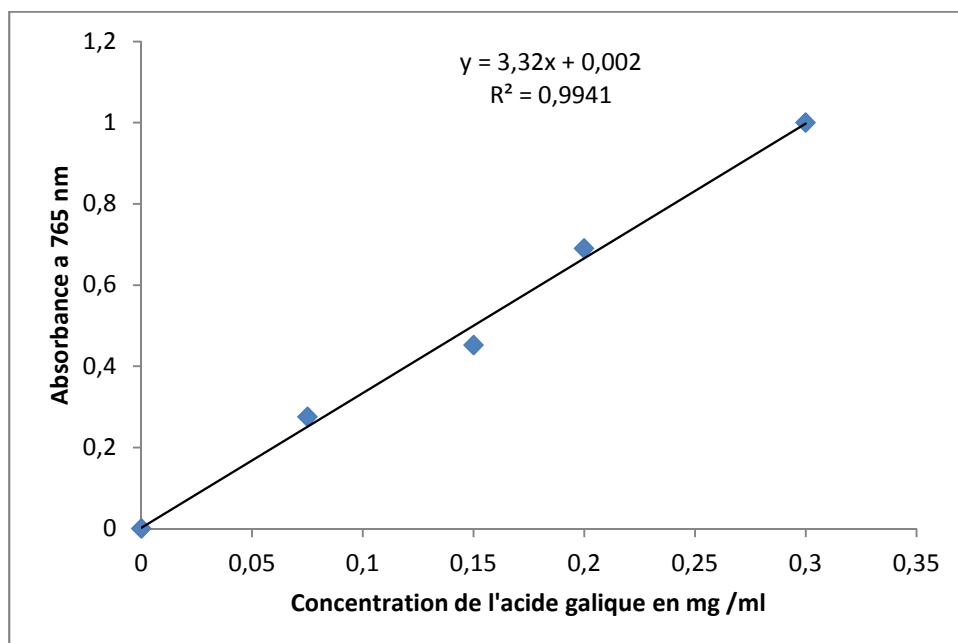
- Acide gallique
- Réactif de Folin-Ciocalteu
- l'eau distillée et l'eau physiologique
- DPPH (2,2-diphenyl-2-picryl-hydrazyle)
- Méthanol
- Chlorure d'aluminium( $\text{AlCl}_3$ )
- Quercétine

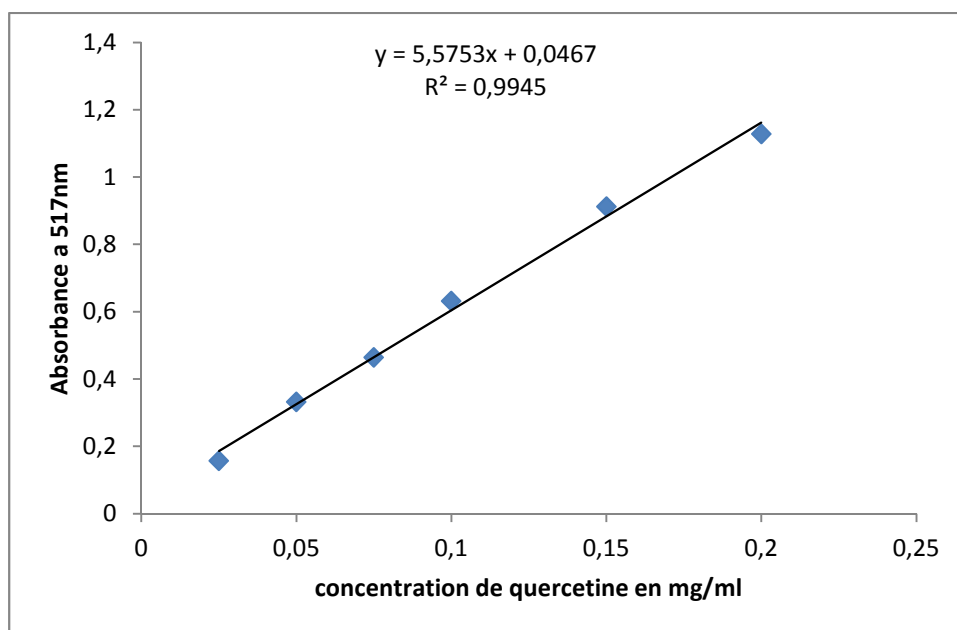
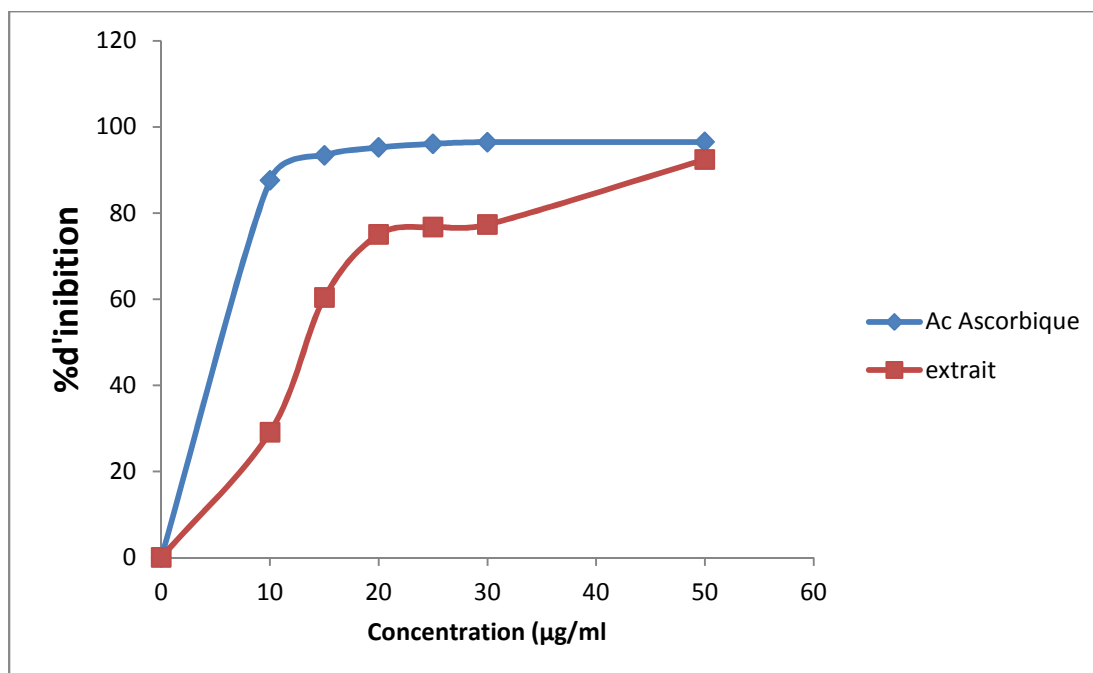
- carbonate de sodium( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
- Diméthyle sulfoxyde (DMSO) Violet de gentiane, lugol, alcool et la fushine.
- Nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ )
- Trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ )
- Hydroxyde de sodium ( $\text{NaOH}$ )

### Milieu utilisé

- Gélose nutritive
- Gélose Muller-Hinton
- Gélose sabouraud chloramphénicol
- Milieux sélectifs : gélose Chapman, gélose Hektoen, gélose sang cuit
- Gélose Muller-Hinton sang cuit

### Annexes 5 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



**Annexes 6** : Courbe d'étalonnage de la quercétine**Annexes07** : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait et acide ascorbique

## Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Ajuga iva*, une plante médicinale de la pharmacopée traditionnelle de l'Algérie, appartenant à la famille des lamiacées, qui est connue sous le nom de « chendgoura ».

L'extrait méthanolique a été obtenu par macération en utilisant un seul solvant méthanol. Le rendement est de l'ordre 9,6%. La teneur totale en composés phénolique a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, qui est de 153 mgEAG/g E, ensuite Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode  $AlCl_3$ , leur teneur est de 70.4 mg EQ/g E.

L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant le test de DPPH. Les résultats obtenues ont montré que l'extrait *Ajuga* a un pourcentage d'inhibition égal à 88.3% avec un  $IC_{50}=19 \mu\text{g/ml}$ , qui est inférieur à celui de l'acide ascorbique ( $IC_{50}= 5.24\mu\text{g/ml}$ ).

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes et deux souches fongiques, selon la méthode de diffusion de disque. Les résultats révèlent que l'extrait méthanolique de la plante a exercé un effet antifongique considérable seulement sur *Candida albicans* avec une zone d'inhibition de 15 mm.

**Mots clés :** *Ajuga iva*, extrait méthanolique, activité antioxydante et activité antimicrobienne.

## Abstract

The aim of this study was to evaluate antioxidant and antibacterial activities of methanolic extract of *Ajuga iva*, a medicinal plant from traditional pharmacopoeia of Algeria, belonging to the Asteraceae family, which is known as « chendgoura ».

The methanolic extract was obtained by maceration with one solvent methanol. the yield was about 9.6% and the total phenolic contents was determined using Folin-Ciocalteu reagent, which was about 153 mgEAG / g E, then the flavono d content was determined using a method  $AlCl_3$ , it was about 70.4 mg E Q/g.

The antioxidant activity was evaluated using the DPPH. Results showed that the extract of *Ajuga* has a percentage of 88.3% equating an inhibition with  $IC_{50} = 19\mu\text{g} / \text{ml}$ , which is lower than that of ascorbic acid ( $IC_{50} = 5.24\mu\text{g} / \text{ml}$ ).

The antimicrobial activity was determined using four bacterial strains and two fungal strains, according to the disk diffusion assay. The results revealed that methanolic extract of the plant showed significant antifungal effect only on *Candida albicans* with an inhibition zone of 15 mm.

**Key words:** *Ajuga iva*, methanolic extract, antioxidant activity and antimicrobial activity