

*République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*

*Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la nature et de la vie
Département de Microbiologie*

Mémoire De Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme de Master
Option : Microbiologie Moléculaire et Médicale

*Etude de l'activité
antioxydant et
antibactérien de
Matricaria pubescens*

Réalisé par :

M^{elle} LALAOUI Rym

Membres du jury

Président : *D^r Touati A.*

Promoteur : *M^r Amir N.*

Co-promotrice: *M^{me} Amir H.*

Co-promoteur: *M^r Bakour S.*

Examineurs : *M^{elle} Yanat B.*

M^{elle} Tafoukt R.

Promotion : 2012-2013



Dédicaces



Je dédie ce travail en premier lieu aux personnes qui ont tant sacrifié pour moi, Papa et Maman je vous aime.

A ma grande sœur « TINA » qui n'a pas cessé de m'encourager.

Sans oublier les personnes qui ont partagé avec moi de grands efforts et qui ont pris sur leur temps, mes très chères sœurs « FATEN et SARAH » merci de m'avoir beaucoup soutenu.

A mon tonton et ma tata chérie sans oublier leurs petite princesse « CHEYMA ».

A mes meilleurs amis « ABDOU et KAMILA ».

A mes amis, MINA, TAOUS, MERIEM et HICHEME ; merci pour tous les fous rire passés ensemble.

A tous mes enseignants et à toute la promotion 2012-2013 option « Microbiologie Moléculaire et Médicale » ; bonne continuation a tous.

Remerciement

Je remercie le bon dieu tout puissant de m'avoir donné la force nécessaire et la patience qui ma permis de mener à bien ce modeste travail.

Je tiens à remercier mon promoteur Mr AMIR Nadir ainsi que ma Co-promotrice Mme AMIR Hassiba pour avoir accepté de m'encadrer, pour leur soutien, leurs conseils ainsi que leur dévouement.

Mes vifs et sincères remerciements vont également à mon Co-promoteur Mr Bakour Sofiane, qui en m'encadrant m'a permis de bénéficier de ses conseils, son aide et ses encouragements, je lui témoigne ma respectueuse gratitude.

Je remercie chaleureusement les membres de jury pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Je tiens à exprimer mes remerciements ainsi que ma gratitude à Mr Touati qui m'a accepté dans son laboratoire ainsi que pour sa confiance et son grand soutien et à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Sommaire

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des photographies	
Introduction.....	1
I. Matériel et méthodes.....	5
I.1. Milieux et réactifs utilisés.....	5
I.1.1. Milieux utilisés.....	5
I.1.2. Réactifs utilisés.....	5
I.2. Souches bactériennes utilisées.....	5
I.3. Préparation du matériel végétal.....	6
I.4. Préparation des extraits	7
I.5. Détermination du rendement d'extraction des composés phénoliques.....	7
I.6. Dosage des antioxydants.....	8
I.4.1. Composés phénoliques totaux.....	8
I.4.2. Flavonoïdes	8
I.4.3. Tannins	8
I.4.3.1. Tannins condensés	8
I.4.3.2. Tannins hydrolysables	9
I.7. Evaluation de l'activité antiradicalaire.....	9
I.8. Détermination de l'activité antibactérienne	9
I.6.1. Les souches bactériennes utilisées.....	9
I.6.2. Préparation de la suspension bactérienne.....	9
I.6.3. Aromatogramme.....	10
I.6.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	10
I.6.5. Détermination de l'activité bactéricide ou bactériostatique.....	10
I.6.6. Etude de la synergie entre les extraits et un antibiotique.....	11
I.7. Etude statistique	11
II. Résultats et discussion.....	12
II.1. Rendement en composés phénoliques.....	12

II.2. Les antioxydants de <i>Matricaria pubescens</i>	13
II.2.1. Composés phénoliques.....	13
II.2.2. Flavonoïdes.....	14
II.2.3.Tannins.....	15
II.2.3.1. Tannins condensés.....	15
II.2.3.2. Tannins hydrolysables.....	17
II.3. Pouvoir antiradicalaire	18
II.4. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	21
II.4.1. Aromatogramme.....	21
II.4.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI).....	24
II.4.3. Activité bactéricide ou bactériostatique.....	26
II.4.4 Synergie entre les extraits et un antibiotique.....	28
Conclusion.....	29
Références bibliographiques.....	31
Annexes	

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
1	Effet du solvant sur le rendement en composés phénoliques de <i>Matricaria pubescens</i>	12
2	Effet du solvant d'extraction sur la teneur en composés phénoliques des extraits de <i>Matricaria pubescens</i>	13
3	Effet du solvant d'extraction sur la teneur en flavonoïdes des extraits de <i>Matricaria pubescens</i>	15
4	Effet du solvant d'extraction sur la teneur en tannins condensés des extraits de <i>Matricaria pubescens</i>	16
5	Effet du solvant d'extraction sur la teneur en tannins hydrolysables des extraits de <i>Matricaria pubescens</i>	17
6	Effet du solvant d'extraction sur l'activité antiradicalaire des extraits de <i>matricaria pubescens</i>	18
7	Corrélation entre la teneur en composés phénoliques (A), flavonoïdes (B), les tannins condensés (C) et les tannins hydrolysables (D), et le pouvoir antiradicalaire des extraits de <i>Matricaria pubescens</i>	20

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
I	Profils de résistance aux antibiotiques des souches étudiées	6
II	Résultats de l'activité des extraits de <i>Matricaria pubescens</i> sur les souches testées (mm)	21
III	Comparaison entre les résultats d'aromatogramme obtenus et ceux de Makhloufi et al, 2012 (mm)	23
IV	Résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) mg/ml	25
V	Résultats de l'activité bactéricide ou bactériostatique des extraits de <i>Matricaria pubescens</i>	26
VI	Résultats des synergies entre les extraits et un antibiotique sur <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	28

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

photo	Titre	page
1	Photographie de la plante <i>Matricaria pubescens</i> (Benhouhou et Saadoun, 1986)	7
2	Activité antibactérienne sur <i>Acinetobacter baumannii</i> 610	22
3	Activité antibactérienne sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	22
4	Activité antibactérienne sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	22
5	CMI de l'extrait méthanolique de <i>Matricaria pubescens</i> sur <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	26
6	Activité bactéricide/ bactériostatique des extraits sur SARM	27
7	Synergie entre les extraits de <i>Matricaria pubescens</i> et CAZ sur <i>E. coli</i> ATCC 25922	28

Introduction

Introduction

Le pouvoir thérapeutique des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité et leurs propriétés biologiques trouvent leurs applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et agriculture.

L'évaluation des propriétés biologiques comme antioxydante et antibactérienne demeure une tâche intéressante et utile, en particulier pour les plantes (végétaux supérieurs) moins fréquentes, ou non connu dans la médecine et les traditions médicinales folkloriques. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs qui reste encore sous exploitées (Bahorun, 1997).

En effet, les végétaux supérieurs ont développé au cours de leur évolution des mécanismes de défense contre l'infection. Ils opposent des barrières mécaniques (dépôts de cutine, paroi cellulaire rigide....etc), et des barrières chimiques principalement par synthèse de métabolites secondaires (alcaloïdes, terpénoïdes et composés phénoliques) (Levin, 1976).

Singleton (1980) décrit trois classes de composés phénoliques en termes de structures chimiques qui vont du relativement simple au plus complexe : les non-flavonoïdes, les flavonoïdes et les tannins. Ces composés phénoliques constituent la classe de métabolites secondaires la plus impliquée dans les mécanismes de défense aussi bien inductibles (phytoalexines) que constitutifs (phytoanticipines) chez les plantes.

L'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances à caractère antioxydant, si l'on considère que ces plantes peuvent contenir des centaines, voire des milliers de métabolites secondaires. Ces derniers représentés actuellement par 100 000 substances identifiées, pourraient être utilisés dans la prévention de certaines maladies liées à l'homme ou pour une meilleure conservation des aliments (Cowan, 1999).

Le domaine de la médecine préventive et les nouvelles approches thérapeutiques, sont une base pour compenser les dommages causés par des espèces réactives oxygénés (radicaux libres). Ces derniers ont été associés à des maladies cardiovasculaires, inflammatoires, cancéreuses et même dans le vieillissement.

Un radical libre est une espèce chimique contenant un ou plusieurs électrons non appariés sur l'orbite électronique la plus externe (Berger, 2006). Leur hyperréactivité les engagent dans des réactions de dénaturation des constituants cellulaires de type peroxydation,

avec les glucides, les lipides, les protéines et l'ADN, formant des produits très instable (Curtay et Robin, 2000) causant ainsi un déséquilibre appelé stress oxydant. Ce déséquilibre a pour conséquences l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour les cellules (Aravodis, 2005).

Les composés phénoliques reconnus pour leurs propriétés redox, leur permettant d'agir comme agents réducteur, sont considérés comme une importante source de défenses antioxydantes (Pietta, 2000).

En plus des problèmes causés par les radicaux libres, l'émergence de microorganismes pathogènes multirésistants, due à l'usage abusif et inapproprié des antibiotiques, pose actuellement un problème de santé publique particulièrement préoccupant. En effet, la résistance des bactéries aux antibiotiques rend quelque fois le traitement thérapeutique inefficace (Chebaibi et *al.*, 2007).

Le potentiel antimicrobien des végétaux supérieurs a été mis à profit par l'industrie pharmaceutique ; en 1976, 12% des antibiotiques sont extraits des végétaux supérieurs (Martini et Eloff, 1998).

Les composés phénoliques peuvent affecter la croissance et le métabolisme des bactéries. Ils pourraient avoir un effet activateur ou un effet inhibiteur sur la croissance microbienne en fonction de leur constitution et de leur concentration (Alberto et *al.*, 2001; Reguant et *al.*, 2000).

L'Algérie abrite plus de 3000 espèces de plante dont 15% sont endémiques (Gausson et Leroy, 1982).

La flore du Sahara Algérien est restée jusqu'en 1928 seulement connue par des récoltes d'explorateurs, de militaires et par des Touaregs. L'étude de la flore et de la végétation montre l'existence d'espèces propres au Sahara tel que les palmiers qui appartient à la famille des Asteraceae.

La famille d'Asteraceae, est la plus grande et la plus vaste famille de la classe des dicotylédons, elle comprend environ 900 genres et entre 15 000 et 20 000 espèces, distribuées principalement dans les zones tempérées du globe. Elles sont largement utilisées en médecine populaire pour guérir un bon nombre de maladies (Bellakhdar, 1997).

Appartenant à la famille des Asteracea, le nom scientifique du *matricaria pubescens* provient du latin : *Matricaria* à partir de la matrice latine utérus et le mot *pubescens* qui veut dire poilue. Le nom arabe donné à cette plante est Ouazouza ou Guertoufa (Benhouhou ,1986).

Matricaria pubescens est une petite plante annuelle, de 10 à 20 cm de hauteur, elle atteints rarement les 40 cm. Elle se caractérise par :

- Ses nombreuses tiges couchées, minces et très peu ramifiées de couleur vert foncé.
- Ses feuilles de 10 et 20 mm de long sont légèrement charnues, profondément découpées, présentant des lobes qui se terminent avec une pointe blanche.
- Ses fleurs sont tubulaires jaunes regroupées dans des têtes discoïdes hémisphériques.
- Ses capitules de 5 à 8 mm de diamètre sont fixés à l'extrémité des tiges.
- Ses fruits sont des akènes équipés de Pappus qui leurs permettent une dispersion optimal par le vent.

La floraison a lieu au printemps dans le nord du Sahara algérien, et au centre après la pluie (Benhouhou, 1986).

Matricaria pubescens est une herbe médicinale traditionnelle très appréciée par les gens de la région, elle est utilisée contre les rhumatismes, les courbatures, la toux, les allergies, les affections oculaires, la dysménorrhée, la piqûre de scorpion, la déshydratation et la dentition. Chez les enfants contre la rougeole, les maux de dents, la fièvre et les maladies de la peau (dermatoses) (Hammiche V, Maiza K, 2006)

Une préparation par décoction de *Matricaria pubescens* versée dans l'oreille est recommandée pour les otites. Un massage avec l'oléum aide pour les rhumatismes, les névralgies et les sciatiques (Benhouhou, 1986).

En gastronomie, elle est ajoutée à la soupe traditionnelle. Les tiges et les feuilles écrasées sont utilisées comme un filtre pour le beurre de chèvre, donnant un arôme agréable au beurre et à la nourriture en générale.

Ce qui rend nôtre étude particulièrement intéressante, c'est le nombre limité de recherches effectuées sur *Matricaria pubescens*. En effet, seul deux chercheurs se sont penchés sur ce sujet. On site :

- Gherboudj et *al*, 2012,(Algérie) a précisé la composition chimique de cette dernière ;
- Makhloufi et *al*, 2012 (Algérie) a étudié l'activité antibactérienne des huiles essentielles et d'extraits bruts de *Matricaria pubescens*.

Les objectifs assignés à cette étude sont :

- L'extraction des composés phénoliques totaux, en utilisant plusieurs solvants (Méthanol, éthanol, eau) à différentes polarités ;
- Le dosage de quelques substances antioxydantes dont les polyphénols, les flavonoïdes et les tannins condensés et hydrolysables ;
- La détermination de l'activité antioxydante des extraits de la matricaire, par l'évaluation de leur activité antiradicalaire (méthode du DPPH) ;
- La détermination de l'activité antibactérienne par méthode des puits ;
- L'évaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) ainsi que l'activité bactéricide et bactériostatique ;
- La détermination de la synergie entre nos extraits et les antibiotiques.

Pour ce faire, nous avons d'abord présenté le matériel et les méthodes utilisés pour réaliser l'extraction, le dosage des composés phénoliques et leur classe individuelle ainsi que l'évaluation des activités antioxydantes et antibactériennes. Ensuite, nous avons analysé et discuté les résultats obtenus dans notre étude.

Matériel
Matériel

et

Méthodes
Méthodes

I. Matériel et méthodes

I.1. Milieux et réactifs utilisés :

I.1.1 Milieux utilisés :

- Mueller Hinton (MH)
- Trypticase Soja Agar (TSA)

I.1.2. Réactifs utilisés :

- | | |
|--|---------------------------------------|
| - Methanol (BIOCHEM) | - Ethanol (SIGMA-ALDRICH) |
| - Acetone (BIOCHEM) | - Dimethyl Sulfoxyde (DMSO) (PROLABO) |
| - Folin Ciocalteu | - Carbonate de Sodium (7,5%) |
| - Chlorure d'Aluminium (2%) | - Vanilline |
| - Chlorure Ferrique (FeCl ₃) | -Diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) |

I.2. Souches bactériennes utilisées

L'activité antibactérienne des sept extraits (méthanol 100% et 50%, éthanol 100% et 50%, acétone 100% et 50%, et eau) de *Matricaria pubescens* est testée sur des bactéries identifiées et caractérisées par le Laboratoire d'Ecologie Microbienne (LEM) de l'université de Bejaia. Le tableau suivant présente les profils de résistance aux antibiotiques de ces dernières :

Tableau I : Profils de résistance aux antibiotiques des souches étudiées

Caractéristiques		ANTIBIOGRAMME										
Espèce	Code	FOX	FEP	ATM	AMC	CTX	CAZ	GM	TOB	AMK	Cip	IMP
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	KB 349	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SARM	43300	R	-	-	R	-	-	S	S	S	-	-
<i>Acinetobacter Baumannii</i>	897	-	S	S	-	S	S	-	S	R	S	S
<i>Acinetobacter Baumannii</i>	610	R	R	R	-	R	R	R	S	S	R	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	R	S	S	R	R	S	S	S	S	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CC 02	R	S	S	R	R	R	-	S	S	S	I

FOX : Céfoxitime ; **FEP** : Céfépime ; **ATM** : Aztreonem ; **AMC** : Ampicilline + Acide clavulanique ; **CTX** : Céfotaxime ; **CAZ** : Ceftazidime ; **GM** : Gentamicine **TOB** : Tobramicine ; **AMK** : Amikacine ; **CIP** : Ciprofloxacine ; **IMP** : Imipinème

(-) : non testés.

I.3. Préparation du matériel végétal

La plante *Matricaria pubescens* a été récoltée dans la région de Hassi Massaoud (wilaya de Ouargla) durant le mois d'avril 2012, l'échantillon est ensuite séché à température ambiante dans un endroit aéré à l'abri de la lumière. La matière sèche obtenue est réduite en poudre, puis tamisée en utilisant deux tamiseurs de granulométries différentes (500µm et 250 µm) ; les fractions dont le diamètre est inférieur à 250 µm sont retenues pour l'extraction.



Photo 1 : Photographie de la plante *Matricaria pubescens* (Benhouhou et Saadoun, 1986)

I.4. Préparation des extraits

Les composés phénoliques de *Matricaria pubescens* sont extraits en utilisant des solvants purs : méthanol 100%, éthanol 100%, acétone 100% ; des solvants mélangés à l'eau distillée (v/v) : méthanol 50%, éthanol 50%, acétone 50% ; ainsi que l'eau distillée.

05g de la poudre sont mélangés avec 250ml de solvant d'extraction. Après trois heures et demie de macération, les mélanges sont filtrés, puis évaporés à 40°C. Les extraits secs obtenus sont récupérés avec le diméthyl-sulfoxyde (DMSO) et conservés à 4°C pour une utilisation ultérieure.

I.5. Détermination du rendement d'extraction des composés phénoliques

Le rendement en extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du bécher plein et celui du même bécher vide. Le pourcentage d'extraction est calculé par la formule suivante :

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

P₀: poids du bécher vide (g).

P₁: poids du même bécher après évaporation du solvant (g).

E : poids de l'échantillon initial (g).

I.6. Dosage des antioxydants

I.6.1. Composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques des extraits est évaluée par la méthode de Goli et *al.* (2005). 1 ml du réactif de folin-Ciocalteu est ajouté à 200µl d'extrait de la matricaire. Après 3 minutes, 0,8 ml de la solution de carbonate de sodium (7,5%) sont ajoutés. Au bout d'une heure d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance est mesurée à 740nm. La concentration en composés phénoliques des extraits, exprimée en gramme par 100 gramme de matière sèche, est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique (Annexe I).

I.6.2. Flavonoïdes

Le contenu en flavonoïdes des différents extraits est déterminé par la méthode de Bahorun et *al.* (2004). Une partie aliquote de chaque extrait est ajoutée à un volume égal de chlorure d'aluminium (AlCl₃) (2%). L'absorbance est lue à 410 nm après 15 minutes. Les résultats sont exprimés en gramme équivalent quercétine par 100 g de matière sèche à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe II).

I.6.3. Tannins

I.6.3.1. Tannins condensés

Cette méthode de dosage des tannins condensés est proposée par Swain et Hillis (1959) ; 2 ml du réactif de la vanilline (Annexe I) sont mélangés avec 1 ml d'extrait. Après incubation à 50° C pendant 20 min, l'absorbance est mesurée à 500 nm. Les résultats sont

exprimés en gramme équivalent catéchine par 100g de matière sèche à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe II).

I.6.3.2. Tannins hydrolysables

Le taux des tannins hydrolysables est déterminé par la méthode de Mole et Waterman (1987) ; 1 ml de l'extrait est mélangé avec 3,5 ml de la solution de $FeCl_3$ (Annexe I). L'absorbance est lue à 660 nm après 15 secondes. Les résultats sont exprimés en gramme équivalent acide gallique par 100g de matière sèche à partir de la courbe d'étalonnage.

I.7. Evaluation de l'activité antiradicalaire

L'effet scavenger du diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) est déterminé par la méthode de Kroyer et Hegedus, (2001) ; 300 μ l d'extrait sont ajoutés à 2700 μ l de DPPH (60 μ M). L'absorbance est lue à 517nm après 1heure d'incubation (Kroyer et Hegedus, 2001). Le pourcentage de l'activité scavenger du radical DPPH est exprimé par la formule suivante :

$$\% \text{ scavenger de radical DPPH} = [(A_{\text{témoin}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{témoin}}] \times 100$$

$A_{\text{témoin}}$: absorbance du témoin (300 μ l de solvant+ 2700 μ l DPPH).

$A_{\text{échantillon}}$: absorbance de l'échantillon (300 μ l extrait+2700 μ l DPPH).

I.8. Détermination de l'activité antibactérienne

I.8.1. Préparation de la suspension bactérienne

Les souches sont préalablement réisolées sur milieux TSA (Trypticase Soja Agar). Après 18 à 24 heures d'incubation, trois à cinq colonies de la culture sont dissociées dans 3ml d'eau physiologique ce qui correspond approximativement à 10^8 UFC (Unité Formant Colonie) (Hayouni EA, 2007)

I.8.2. Aromatogramme

L'aromatogramme est basé sur la technique de diffusion sur milieu gélosé (Mueller Hinton). La méthode appliquée est celle des puits décrite par Abu-Shanab *et al.*, 2004.

Des puits de 6mm de diamètres sont réalisés dans des boites contenant le milieu Mueller Hintonensemencé préalablement de suspension bactérienne à l'aide d'écouvillons. Ces puits sont par la suite remplis de 50µl de chaque extrait et mis à diffuser à 4°C. Après deux heures de diffusion, les boites sont incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. Le DMSO et La gentamicine (10mg) sont également testés.

Tous les essais sont effectués trois fois, et le résultat est exprimé par la moyenne de ces trois mesures.

I.8.3. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la plus petite concentration de la substance antibactérienne pour laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée (Martini et Eloff, 1998). La CMI est déterminée en utilisant la méthode de dilution en milieu gélosé (Mueller Hinton). Pour chaque souche, seul l'extrait ayant la meilleure activité sur elle est testé. La solution mère subit une série de dilution allant de 1/2 à 1/64, donnant des concentrations de 25 mg/ml, 12,5 mg/ml, 6,25 mg/ml, 3,125 mg/ml, 1,562 mg/ml et 0,781 mg/ml.

Après ensemencement des boites à l'aide d'écouvillons, des puits de 6mm de diamètre sont remplis avec 50µl de chaque dilution des extraits précédents. Les boites sont par la suite incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures après une diffusion de 2 heures à 4°C.

I.8.4. Activité bactéricide ou bactériostatique

Selon Lewus *et al.* (1992), l'activité bactéricide ou bactériostatique est déterminée en prélevant (découpant) un carré de la gélose à partir des zones d'inhibitions obtenues avec les extraits qu'on suspend dans 5ml de bouillon nutritif.

La lecture des tubes est faite chaque jour, et au bout d'une semaine d'incubation, les bouillons restant clairs sont ensemencés en stries sur milieu TSA (Trypticase Soja Agar). La lecture est faite après une incubation de 18 à 24 heures à 37°C.

Un témoin négatif (tube contenant du bouillon nutritif seul) et un autre positif (tube contenant du bouillon nutritif et un carré de la gélose présentant des bactéries) sont pris comme contrôle pour interpréter les résultats.

I.8.5. Etude de la synergie entre les extraits et un antibiotique :

Pour étudier l'effet synergique des extraits de *Matricaria pubescens*, 50µl de chaque extrait de concentration de 50mg/ml sont ajoutés au disque d'antibiotique. Dans notre travail la ceftazidime (CAZ) (30 mg) est choisie pour le test. La souche faisant objet de cette étude est *E. coli* ATCC 25922.

I.9. Etude statistique

Toutes les données représentent la moyenne de trois essais. L'analyse statistique des résultats est effectuée avec l'application ANOVA (STATISTICA 5.5) et la comparaison des données est prise à la probabilité $P < 0,05$.

Résultats
Résultats

et

Discussion
Discussion

II. Résultats et discussion

II.1. Rendement en composés phénoliques

La période de récolte de la plante, la procédure de séchage, la granulométrie des particules, le temps de macération, le volume ainsi que la nature du solvant, constituent les paramètres susceptibles d'influencer le taux d'extraction et affecter ainsi les activités antioxydante et antibactérienne des extraits (Mallika et Dhar, 1980 ; Eloff, 1998 ; Pinelo *et al.*, 2005 ; Eloff et McGaw, 2006 ; Sipigno *et al.*, 2007; Hayouni *et al.*, 2007).

Dans le présent travail, il est procédé à l'optimisation du solvant d'extraction ainsi qu'à la détermination des activités antioxydantes et antibactériennes des extraits obtenus. Pour étudier l'effet du solvant sur le taux d'extraction, sept solvants à différentes polarités ont été utilisés : l'eau, l'acétone 50%, l'acétone 100%, le méthanol 50%, le méthanol 100%, l'éthanol 50% et l'éthanol 100%.

Les résultats montrent que les taux d'extraction obtenus présentent des différences selon le solvant utilisés (figure 1) ; l'éthanol 50% présente le meilleur rendement avec un taux de 34,68%, alors que le plus faible rendement 5,02% est obtenu avec l'acétone pure.

D'après ces résultats il est à noter que les teneurs obtenues avec les solvants purs sont faibles par rapport à celles obtenues avec les solvants dilués, ce qui pourrait s'expliquer par la faible solubilité des constituants de la matricaire dans les solvants purs.

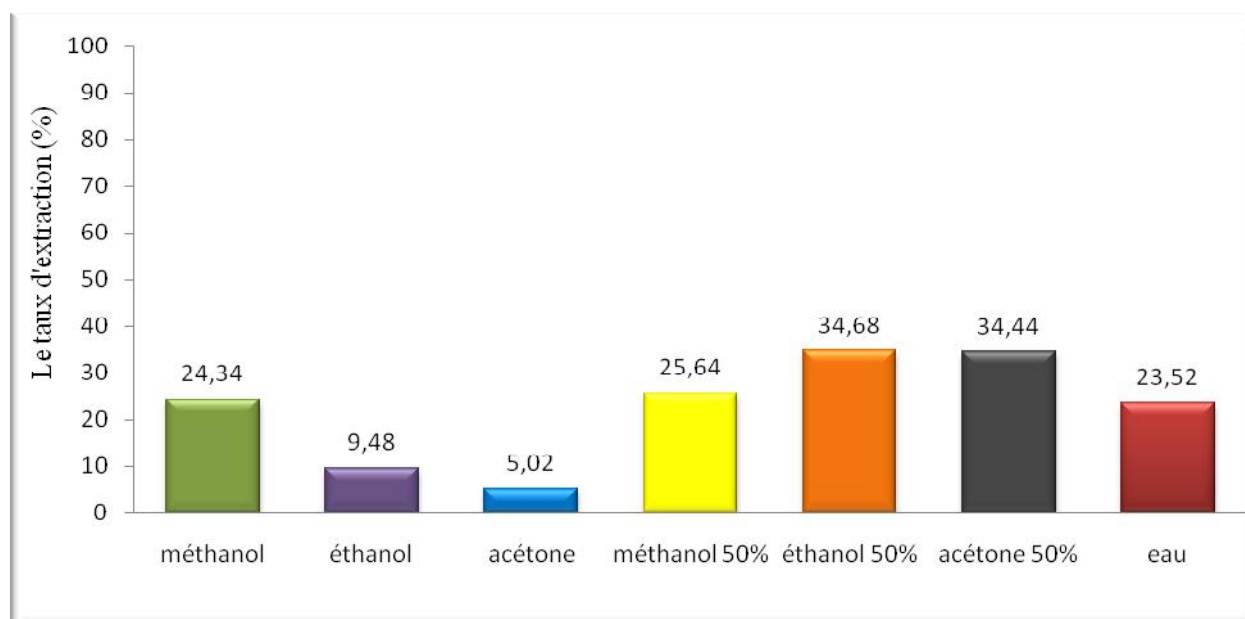


Figure 1: Effet du solvant d'extraction sur le rendement en composés phénoliques de *Matricaria Pubescens*.

II.2. Les antioxydants de *Matricaria Pubescens*

II.2.1. Composés phénoliques

L'extraction quantitative des composés phénoliques d'un tissu végétal pose plusieurs problèmes, notamment la présence dans les cellules végétales de différents types d'enzymes, susceptibles de modifier les composés phénoliques, en particulier les polyphénols oxydases et les glycosidases. Le séchage du végétal est une bonne méthode pour éliminer les activités enzymatiques mais, la température de séchage peut être un facteur destructeur des polyphénols (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Toor et Savage, 2006). D'autres paramètres peuvent influencer significativement le taux et la nature des composés phénoliques à savoir le type de solvant, la taille des particules et le temps d'extraction (Goli *et al.*, 2005 ; Naczki et Shahidi, 2006 ; Spigno et De Faveri, 2007).

Les résultats du dosage des composés phénoliques des extraits de la matricaire montrent des différences significatives selon le solvant utilisé (figure 2). La teneur la plus élevée (8,22 g/100g) est obtenue avec l'éthanol 100%, suivie par le méthanol 100%, l'acétone 50%, le méthanol 50%, l'éthanol 50% et l'acétone 100%, dont les teneurs en composés phénoliques sont égales à 7,17, 6,87, 6,57, 6,44 et 6,08 g/100g, respectivement. Alors que la teneur la plus faible (5,04 g/100g) est celle de l'extrait aqueux.

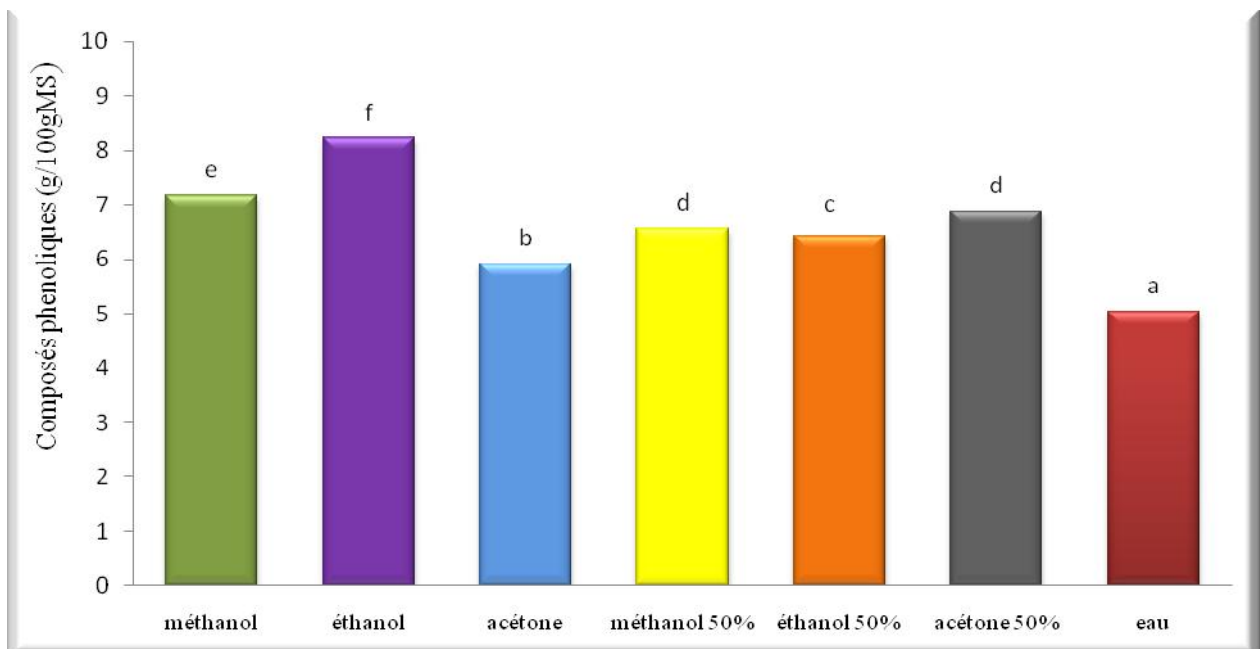


Figure 2: Effet du solvant d'extraction sur la teneur en composés phénoliques des extraits de *Matricaria Pubescens*.

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents.

D'après cette étude, les teneurs en composés phénoliques allant de 5,04 à 8,22 g/100g, trouvées chez *Matricaria pubesens* sont plus importantes que celles de certaines plantes de la même famille (*Achillea millefolium*, *Matricaria chamomilla*, *Taraxacum officinale*, *Calendula officinalis* et *Cichorimin iritybus*), qui ont des teneurs comprises entre 1,821 et 5,728 g/100g, (Kratchanova *et al.*, 2010). **(voire si il y'a des modifications dans les methodes)**

La plus faible teneur en composés phénoliques dans l'extrait aqueux de la matricaire pourrait être expliquée par la présence d'impuretés (acide organiques, glucides, protéines solubles) qui peuvent interférer dans le dosage des composés phénoliques. Chirinos *et al.*, (2007) ont démontré que l'utilisation de l'eau pure comme solvant d'extraction mène à un extrait avec une teneur élevée en impuretés.

Selon Sripad *et al.* (1982), la faible solubilité des polyphénols de la matricaire dans l'acétone 100%, pourrait être due à la force des liaisons hydrogènes entre les polyphénols et les protéines. De plus, l'acétone 100% ne permet pas l'extraction des composés phénoliques glycosylés insolubles dans les solvants organiques purs (Kouri *et al.*, 2007). D'autre part les combinaisons de solvants tels que le méthanol, l'éthanol et l'acétone avec l'eau font améliorer l'extraction des composés phénoliques glycosylés (Chirinos *et al.*, 2007).

La solubilité des composés phénoliques est influencée par le type de solvant utilisé et le degré de leur polymérisation (Nacz et Shahidi, 2004). Cependant, ces derniers sont le plus souvent combinés à d'autres substances (protéines, polysaccharides, terpènes, chlorophylle, lipides, composés inorganiques, ...) (Mompon *et al.*, 1996).

Les acides phénoliques très polaires (acides benzoïques et cinnamiques) ne peuvent pas être extraits complètement avec des solvants organiques purs ; les mélanges alcool-eau sont recommandés, et les substances moins polaires (dérivés d'acides phénoliques) ne sont pas isolées quantitativement en utilisant l'eau pure comme solvant d'extraction (Cazes, 2005).

II.2.2. Flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes des extraits de la matricaire varient selon le solvant d'extraction d'une manière significative ($p < 0,05$) (figure3).

L'éthanol 100% présente la plus grande teneur en flavonoïdes (4,784g/100g), alors que la plus faible teneur (1,55 g/100g) est trouvé dans l'extrait aqueux. En utilisant l'acétone 100%, le méthanol 50%, l'acétone 50%, l'éthanol 50% et le méthanol 100%, des teneurs en flavonoïdes allant de 4,354 à 2,87 g/100g, sont obtenues.

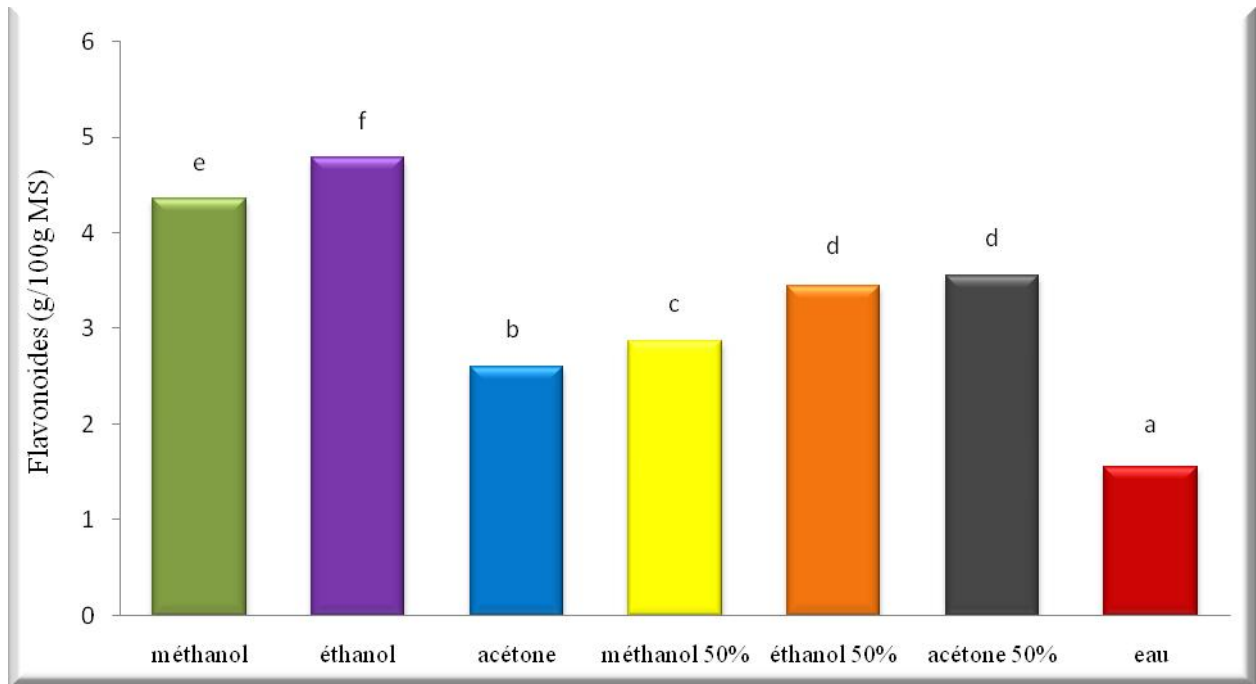


Figure 3: Effet du solvant d'extraction sur la teneur en flavonoïdes des extraits de *Matricaria pubescens*

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents.

Plusieurs études ont rapporté que les solvants méthanol, éthanol et acétone combinés à l'eau sont les plus utilisés pour l'extraction des flavonoïdes des plantes (Antolovich, M et *al.*, 2002). Dans l'étude rapportée par Khennouf et *al.* (2013), le plus faible taux en flavonoïdes de *Matricaria chamomilla* est obtenu avec l'extrait aqueux ce qui concorde avec nos résultats.

La faible teneur de l'extrait préparé par l'acétone 100%, pourrait être expliquée par la faible polarité de ce solvant, étant donné les caractères polaires des flavonoïdes. De plus, la solubilité dépend du nombre, du type et de la position de la liaison des glucides avec les flavonoïdes (Lapornik et *al.*, 2005).

II.2.3. Tannins

II.2.3.1. Tannins condensés

L'étude statistique montre que les teneurs en tannins condensés des extraits de *Matricaria pubescens* présentent des différences significatives selon le solvant utilisé ($p < 0,05$) (figure 4).

L'acétone 100% se révèle être le meilleur solvant d'extraction des tannins condensés (3,63g/100g), suivie du méthanol 100% (3,01g/100g) puis du méthanol 50% (2,67g/100g). Il n'y a pas de différence significative entre les teneurs obtenues par l'acétone 50% (2,41 g/100g) et l'éthanol (2,38 g/100g). L'extrait préparé par l'éthanol 50% présente la teneur la plus faible (1,94 g/100g).

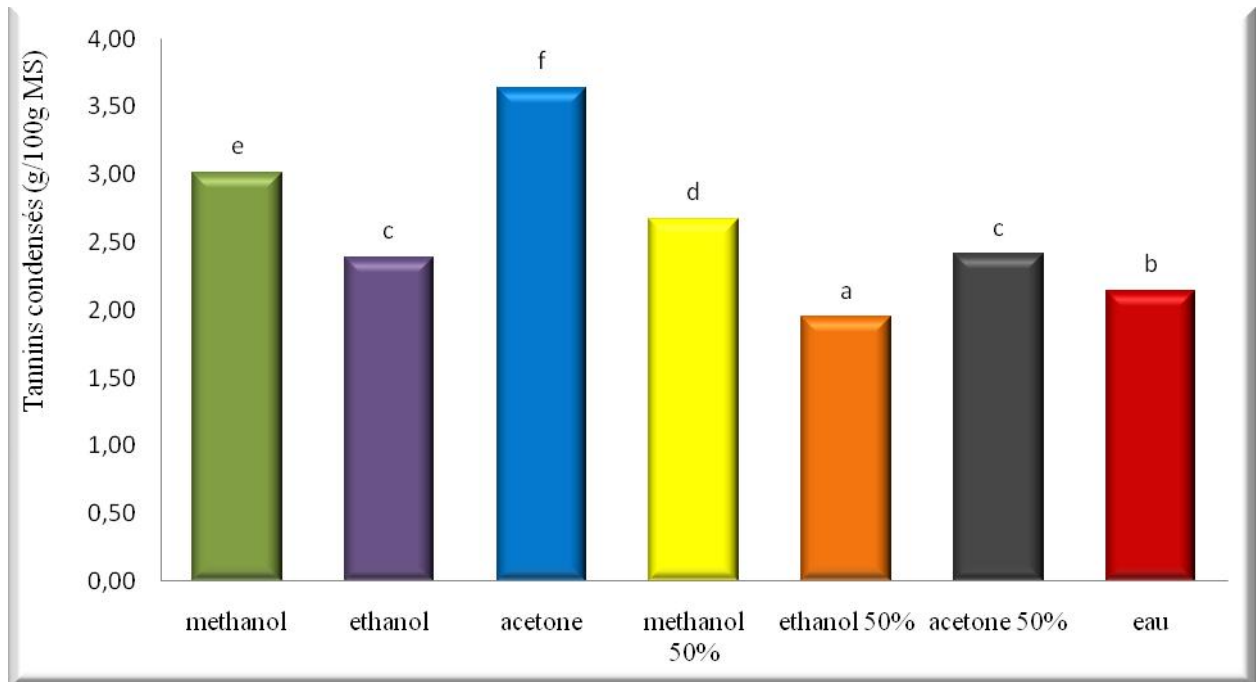


Figure 4: Effet du solvant d'extraction sur la teneur en tannins condensés des extraits de *Matricaria pubescens*.

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents.

La teneur élevée en tannins condensés des extraits à l'acétone 100% pourrait être due à leurs poids moléculaire élevé. Par conséquent, ils sont très solubles dans les solvants moins polaires tels que l'acétone 100%. Liu et Yao (2007), ont montré que la teneur en proanthocyanidines d'extraits acétoniques d'orge est supérieure à celle des extraits éthanoliques.

Les faibles teneurs obtenues avec les extraits aqueux peuvent être expliquées par le fait que les tannins à poids moléculaire élevé diffusent plus faiblement que les oligomères dans l'eau (Bennick, 2002 ; Cheynier *et al.*, 2005).

II.2.3.2. Tannins hydrolysables

Les concentrations en tannins hydrolysables trouvées dans les extraits de la matricaire sont différentes significativement ($p < 0,05$) (figure 5).

La teneur la plus importante en tannins hydrolysables est obtenue par le méthanol 100% avec un taux de 2,62 g/100g, cependant la plus faible (0,92 g/100g) est celle de l'extrait préparé par le méthanol 50%. Les teneurs obtenues avec le reste des solvants varient de 1.06 à 1.33 g/100g.

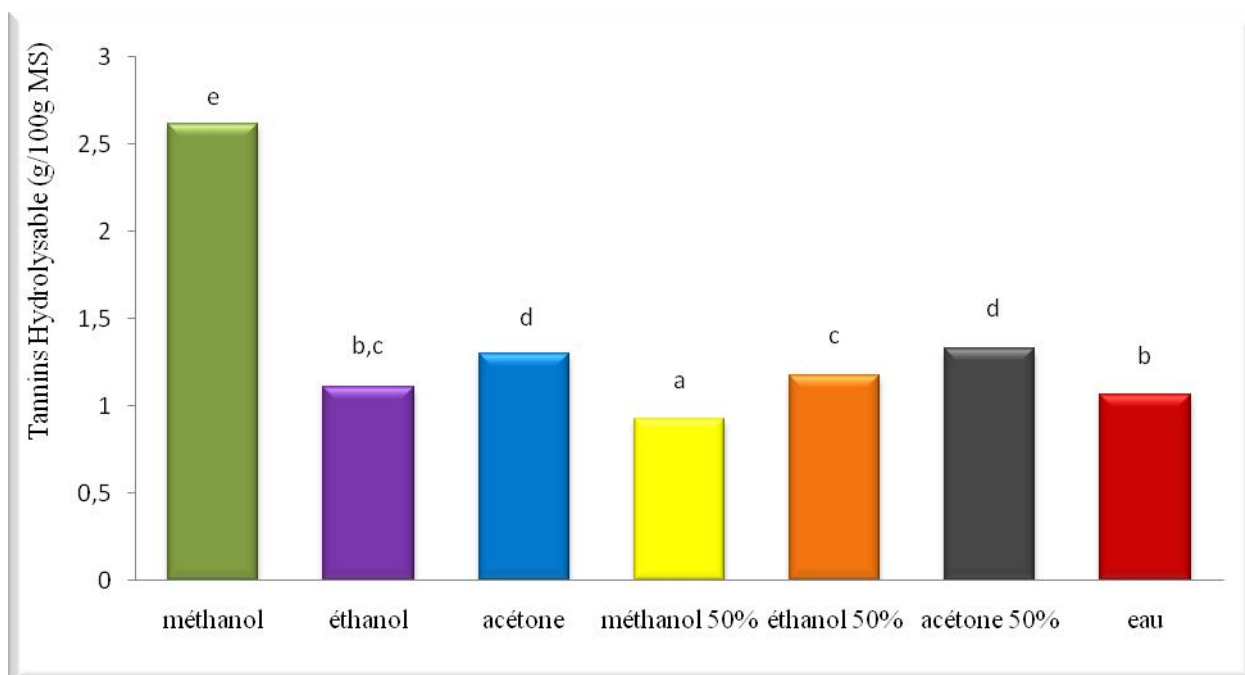


Figure 5: Effet du solvant d'extraction sur la teneur en tannins hydrolysables des extraits de *Matricaria pubescens*

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents.

Dans l'étude effectuée sur *Matricaria chamomilla L.* par Khenouf et al. (2013), les extraits méthanoliques et aqueux avaient donné les taux les plus faibles en tannins. Bouzid et al. (2010) ont rapporté que la meilleure teneur en tannins de *Aubepine monogyne* est obtenue avec l'extrait méthanolique, ce qui concorde avec nos résultats.

II.3. Pouvoir antiradicalaire

Les résultats montrent que tous les extraits ont une bonne activité antiradicalaire et sont différents de manière significative selon le solvant utilisé ($p < 0,05$) (figure 6).

L'extrait acétonique 50% présente le meilleur pouvoir antiradicalaire, suivie de l'éthanol, le méthanol, le méthanol 50%, éthanol, puis l'acétone dont les pourcentages sont respectivement de 98,65%, 98,51%, 98,26%, 98,15%, 98,11%, et 97,90%. La plus faible activité antiradicalaire est obtenue dans l'extrait aqueux avec un pourcentage de 97,13%.

Les études menées par Gulçin et al. (2003) et Tepe et al. (2005) indiquent que le solvant d'extraction a une influence sur l'activité antioxydante des extraits.

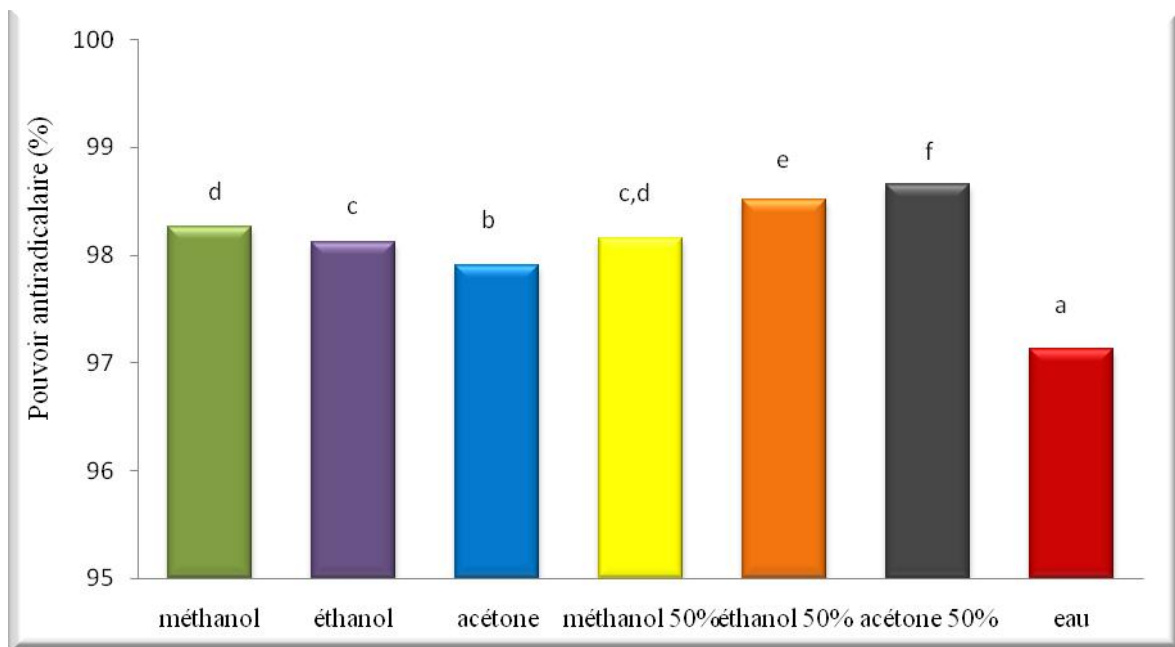


Figure 6: Effet du solvant d'extraction sur l'activité antiradicalaire des extraits de *Matricaria pubescens*

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents.

Nos résultats montrent que tous les extraits présentent une bonne activité antiradicalaire. Cette activité est probablement liée à la quantité des polyphénols présents (Jayaprakasha et al., 2007 ; Hodzic et al., 2009), mais elle varie également en fonction de la qualité des polyphénols, des flavonoïdes et des tannins.

Les résultats de la présente étude révèlent l'existence d'une bonne corrélation entre le pouvoir antiradicalaire et les teneurs en composés phénoliques ($r = 0,62$) et en flavonoïde

($r = 0,67$). Une moins bonne corrélation est constatée avec les tannins hydrolysable ($r = 0,22$). La corrélation entre le pouvoir antiradicalaire libre et la teneur en tannins condensés est négligeable ($r = 0,083$) (figure 7).

Il est difficile d'expliquer la relation existante entre les antioxydants et l'activité antioxydante d'un végétal en se basant sur la seule analyse quantitative, du fait qu'il existe une relation non seulement avec le taux d'antioxydants mais aussi de l'interaction entre eux et avec d'autres constituants (Yoo *et al.*, 2008).

Kähkönen *et al.* (1999), n'ont constaté aucune corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité antioxydante des plantes. Selon ces auteurs, la teneur en polyphénols ne prédit pas l'activité antioxydante du fait que différents composés phénoliques répondent différemment au dosage par la méthode de Folin-Ciocalteu, et que l'activité antioxydante d'un composé phénolique dépend de sa structure.

Puisque la composition chimique et les structures des composés actifs de l'extrait sont des facteurs importants modulant l'efficacité des antioxydants naturels, l'activité antioxydante ne doit pas être expliquée seulement en se basant sur leurs teneurs en composés phénoliques, en flavonoïdes ou en tannins, d'où l'importance de les caractériser.

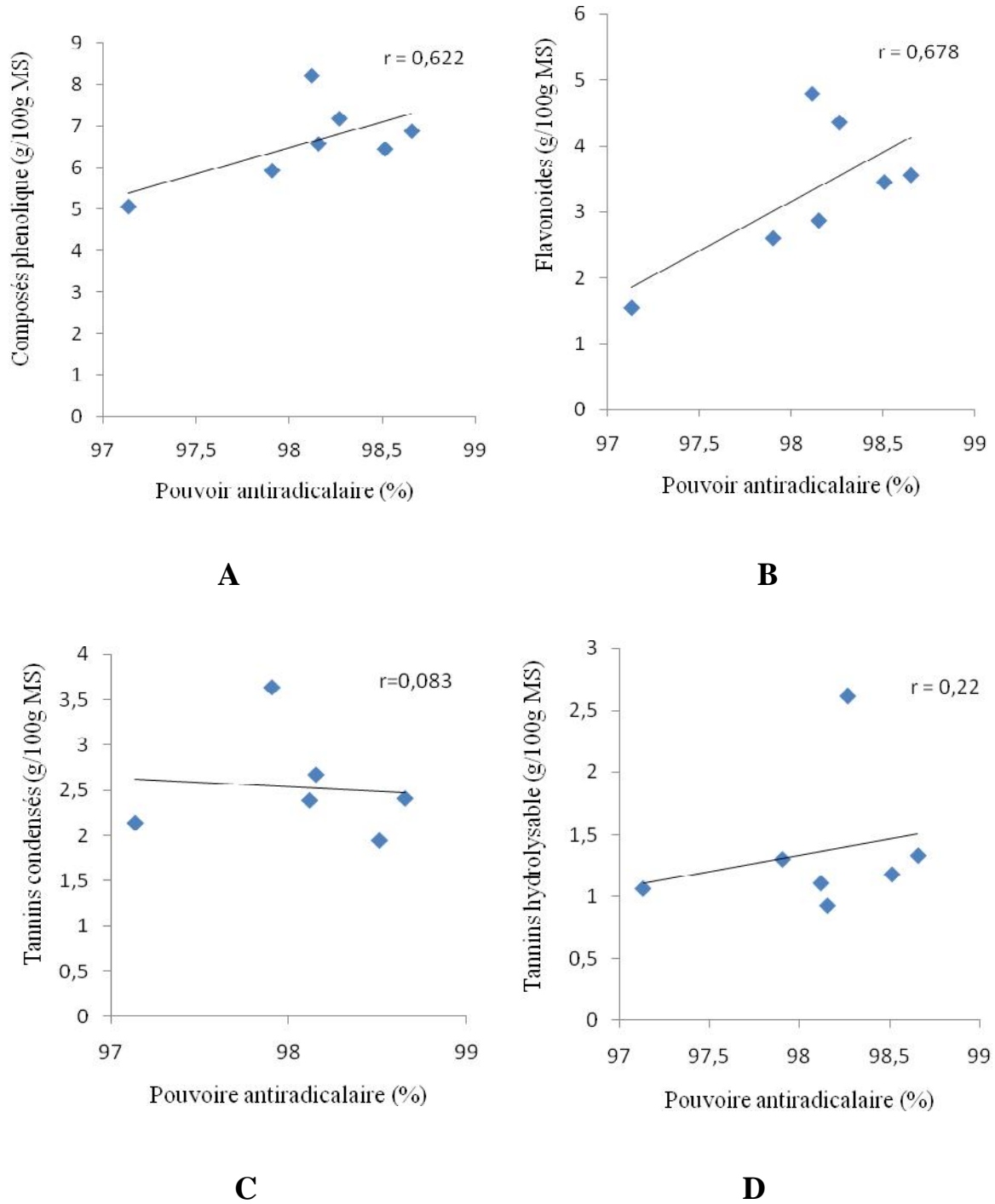


Figure 7 : Corrélation entre la teneur en composés phénolique (A), les flavonoïdes (B), les tannins condensés (C) et les tannins hydrolysables (D), et le pouvoir antiradicalaire des extraits de *Matricaria pubescens*.

II.4. Evaluation de l'activité antibactérienne

II.4.1. Aromatogramme

Cette partie vise à déterminer l'activité antibactérienne sur différentes souches, des extraits de *Matricaria pubescens*, obtenus par l'utilisation de plusieurs solvants de polarités différentes, rapportés sur le tableau II.

Les études statistiques révèlent l'existence d'une différence significative entre les diamètres des différentes zones d'inhibitions en fonction du solvant d'extraction ($p < 0,05$).

Tableau II : Résultats de l'activité des extraits de *Matricaria pubescens* sur les souches testées (mm).

SOUCHE EXTRAIT	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Escherichia coli</i> KB 349	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	SARM	<i>Acinetobacter baumannii</i> 897	<i>Acinetobacter baumannii</i> 610	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CC02
ATB (CN)	33	32	32	30	26	15	26	28
Methanol	-/-	-/-	14,6±0,6 ^{b,c}	16,6±1,2 ^b	-/-	18±0 ^d	17±1 ^c	12,6±0,6 ^d
Ethanol	-/-	9±1,7 ^c	17,6±1,5 ^d	20,3±2,1 ^c	-/-	16,6±0,6 ^{c,d}	18±0 ^d	10,3±0,6 ^{b,c}
Acetone	-/-	-/-	14±0 ^{b,c}	15,3±0,6 ^b	-/-	11,6±0,6 ^a	13±0 ^a	-/-
Methanol 50%	-/-	11±0 ^d	13,3±1,5 ^b	15,6±0,6 ^b	-/-	16±1 ^{c,d}	15,3±0,6 ^b	11,3±0,6 ^c
Ethanol 50%	-/-	9±1,5 ^c	15±1 ^c	16,6±1,5 ^b	-/-	14,6±1,5 ^{b,c}	15±0 ^b	10,3±0,6 ^{b,c}
Acetone 50%	-/-	10±0 ^{c,d}	13,3±0,6 ^b	14,6±1,5 ^b	-/-	12,6±2,5 ^{a,b}	15±0 ^b	10±1 ^b
Eau	-/-	7±0 ^b	7±0 ^a	11,6±1,5 ^a	-/-	15±2,6 ^{b,c}	15±0 ^b	10±1 ^b

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents.

- / - : pas de zone observée.

L'aromatogramme démontre que tous les extraits de *Matricaria pubescens* ne possèdent aucune activité sur les souches *E. coli* ATCC 25922 et *A. baumannii* 897, alors qu'une négligeable activité de ces extraits est observée sur *E. coli* KB349 dont la plus grande zone est obtenue avec le méthanol 50% (11mm).

Pour le reste des souches, tous les extraits de la matricaire se sont avérés actifs. Leur effet s'est remarqué principalement sur la souche *Staphylococcus aureus* résistante à la

méticilline (SARM) dont les zones d'inhibitions varient de 11,6 mm avec l'extrait aqueux à 20,3 mm avec l'extrait éthanolique.

Les résultats démontrent que l'extrait éthanolique révèle la meilleure activité antibactérienne sur la souche SARM avec une zone d'inhibition de 20,3mm, suivie par *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *S. aureus* ATCC 25923 dont les zones d'inhibitions sont de 18 et 17,6 mm, respectivement. Cette activité importante pourrait résulter des teneurs élevés en composés phénoliques (figure 3), et flavonoïdes (figure 4) obtenues dans les extraits éthanoliques.

Cependant, l'extrait méthanolique a exercé la plus grande activité sur les souches *A. baumannii* 610 (18mm) et *P. aeruginosa* CC02 (12,6 mm). Cette action pourrait être dû à la forte teneur en tannins hydrolysables des extraits méthanoliques (figure 6).



Photo 2 : Activité antibactérienne sur *Acinetobacter baumannii* 610



Photo 3 : Activité antibactérienne sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



Photo 4 : Activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Les plus faibles activités antibactériennes sont observées avec les extraits aqueux sur les souches *E. coli* KB 349, *S. aureus* ATCC 25923 et SARM dont les diamètres varient de 7 à 11,6 mm. Les extraits acétoniques ont exercé également, de faibles activités antibactériennes sur les souches *A. baumannii* 610 (11,6mm) et *P. aeruginosa* ATCC 27853 (13mm), alors qu'aucune zone d'inhibition n'est observée avec les souches *P. aeruginosa* CC02 et *E. coli* KB 349.

D'après les résultats du dosage des composés phénoliques et leurs classes individuelles de *Matricaria pubiscens*, les faibles activités antibactériennes observées pourraient être dues aux teneurs relativement faibles en polyphénols et en flavonoïdes des extraits aqueux et acétoniques bien que ces derniers sont les plus riches en tannins condensés.

Makhloufi et al. (2012), dans leurs travaux sur la même plante ont rapporté que la souche *S. aureus* ATCC 25923 est sensible aux extraits aqueux et éthanoliques, ce qui concorde avec nos résultats. La sensibilité de *S. aureus* ATCC 25923 obtenue avec l'extrait éthanolique (17,6 mm), dans notre étude, est supérieure à celle obtenue par Makhloufi et al., (2012). Cependant sa sensibilité à notre extrait aqueux semble être très inférieure à celle rapportée par les auteurs (tableau III).

La souche *E. coli* ATCC 25922 testée sensible par Makhloufi et al. (2012) est résistante aux extraits aqueux et éthanoliques dans la présente étude, alors que la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853 rapportée par ces auteurs résistante, s'avère leur être sensible dans notre travail.

Tableau III : Comparaison entre les résultats d'aromatogramme obtenus et ceux de Makhloufi et al, (2012) (mm).

	<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	
	Eau	Ethanol	Eau	Ethanol	Eau	Ethanol
Résultats de l'auteur	17,5	15	31	14	-	-
Nos résultats	7	17,6	-	-	15	18

Les différences observées entre nos résultats et ceux de Makhloufi et al. (2012), peuvent être dues à la différence de la méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne. Natarajan et al. (2005), et Fezeli 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'*Euphobia fusiformi*, et hydro-éthanoliques de *Rhus coriaria* et *Zataria multiflora*, que la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Abu-shanab *et al.* (2004), ont rapporté que les extraits méthanoliques, éthanoliques et aqueux de *Salvia officinalis* n'ont aucune activité vis-à-vis de la souche *E. coli* ATCC 25922 ce qui est en accord avec nos résultats.

Les résultats de Erturk (2006), révèlent que l'extrait éthanolique du *cumin* est actif contre *P. aeruginosa* ATCC 27853 par rapport à l'extrait brut hydro-méthanolique. Le même résultat a été trouvé avec l'extrait éthanolique de *Matricaria pubescens*.

En plus de la probable implication de la méthodologie dans l'évaluation de l'activité antibactérienne, la structure de la membrane cellulaire des bactéries pourrait aussi y jouer un grand rôle. En effet le lipopolysaccharide, constituant principal de la membrane externe des bactéries des gram (-), empêche la diffusion des molécules hydrophobes et ce par la présence de charges négatives de surface. Contrairement aux gram (-), le peptidoglycane des bactéries gram (+) n'entrave que la diffusion des molécules de poids moléculaires supérieurs à 50000 Dalton (Hogan et Kolter, 2002). Ceci pourrait expliquer la sensibilité des souches gram (+) (*S. aureus* ATCC 25923 et SARM), ainsi que la résistance des gram (-) (*E. coli* ATCC 25922 et *A. baumannii* 897) aux extraits de *Matricaria pubescens*.

Cependant, certaines études ne révèlent aucune activité antibactérienne sélective des plantes vis-à-vis des bactéries gram(+) ou gram (-) (Athamena *et al.* 2010). La sensibilité des souches d'*A. baumannii* 610, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *P. aeruginosa* CC02 observée avec les extraits étudiés confirme cette hypothèse.

Ces résultats pourraient être dus à une différence d'affinité entre les composés contenus dans les extraits de la matricaire et les cibles bactériennes. Caturla et ses collaborateurs (2003), ont montré que l'affinité des catéchines pour les bicouches lipidiques varie en fonction des proportions des différents phospholipides.

II.4.2. La concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée par la méthode de dilution sur milieu solide pour les extraits ayant montré la meilleure activité antibactérienne vis-à-vis des souches testées à l'exception de *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* KB349 et *A. baumannii* 897 qui se sont révélées résistantes ou très peu sensible à tous nos extraits.

Les résultats sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau IV : Résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) mg/ml

Extraits Souches	METHANOL	ETHANOL
<i>Acinetobacter baumannii</i> 610	< 0,78	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCO2	25	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	12,5
SARM	-	12,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	3,125

(-) : non testé

La CMI de l'extrait méthanolique est déterminée pour les souches *A. baumannii* 610 et *P. aeruginosa* CCO2 et ce suite aux résultats de l'aromatogramme.

L'extrait méthanolique est plus actif sur *A. baumannii* 610 avec une CMI < 0,78 mg/ml par rapport au *P. aeruginosa* CCO2 dont la CMI est de 25 mg/ml.

L'extrait éthanolique a montré une efficacité sur *S. aureus* ATCC 25923, SARM et *P. aeruginosa* ATCC 27853 dont les CMI sont de 3,125, 12,5 et 12,5 mg/ml, respectivement.

Makhloufi et al. (2012), ont rapporté que la CMI des extraits éthanoliques sur *S.aureus* ATCC 25923 est de 8mg/ml. Cependant, lors de notre étude, la CMI obtenue avec le même extrait et vis-à-vis de la même souche est de 12,5mg/ml.

La plus petite concentration de l'extrait éthanolique inhibant *E. coli* ATCC 25922 est de 13mg/ml (Makhloufi et al., 2012), alors que cette souche c'est avérée résistante à tous nos extraits. La détermination de la CMI de l'extrait éthanolique sur *P. aeruginosa* ATCC 27853 n'a pas été effectuée dans l'étude de Makhloufi et al., 2012, du fait que cette souche lui était résistante. Contrairement à notre étude où l'on trouve une CMI de 3,125mg/ml.



Photo 5 : CMI de l'extrait méthanolique de *Matricaria pubescens* sur *P. aeruginosa* ATCC 27853

II.4.3. Activité bactéricide ou bactériostatique

Un seuil de 12,5 mm de la zone d'inhibition est fixé pour tester l'activité bactéricide ou bactériostatique des extraits de *Matricaria pubescens* sur les souches testées.

Les résultats sont illustrés dans le tableau V :

Tableau V : Résultats de l'activité bactéricide ou bactériostatique des extraits de *Matricaria pubescens*

	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	SARM	<i>Acinetobacter baumannii</i> 610	<i>pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Méthanol	(-)	(-)	(-)	(-)
Ethanol	(-)	(+)	(-)	(-)
Acétone	(-)	(-)	(-)	(-)
Méthanol 50%	(-)	(-)	(-)	(-)
Ethanol 50%	(-)	(-)	(-)	(-)
Acétone 50%	(-)	(-)	(+)	(-)
Eau	Non testé	Non testé	(+)	(-)

(-) bactériostatique

(+) bactéricide

D'après ces résultats, l'activité bactéricide ou bactériostatique des extraits varie selon la souche testée et le solvant d'extraction.

Tous les extraits ont un effet bactériostatique sur les souches de *S. aureus* ATCC 25922 et *P. aeruginosa* ATCC 27853 et cela au bout de 24 heures.

Pour la souche SARM, l'extrait éthanolique restant claire après une semaine d'incubation, s'est confirmé être bactéricide par ensemencement sur milieu TSA. Le reste des extraits sont bactériostatiques.

Des études attestent l'effet bactéricide de l'extrait éthanolique sur d'autres plantes, en effet, Abu-Shanab et ses collaborateurs (2004), ont testé l'effet de l'extrait éthanolique de *Mentha longifolia* et *Melissa officinalis* sur *S. aureus* ATCC 25923 résistant à la méticilline (SARM) qui s'est avéré bactéricide.

Après incubation de 24 à 48 heures, sur tous les bouillons restés claires, seul les extraits acétoniques 50% et aqueux ont un effet bactéricide sur *A. baumannii* 610 et ce après confirmation par le repiquage sur milieu TSA (pas de croissance bactérienne).

Voravuthikunchai et ses collaborateurs (2006), ont étudié l'activité des extraits éthanoliques de huit plantes sur *E. coli* ATCC 25922, dont *Quercus infectoria* qui a eu un effet bactéricide vis-à-vis de cette dernière. Dans notre étude, l'effet bactéricide ou bactériostatique sur *E. coli* ATCC 25922 n'a pas été testé vue sa résistance à tous les extraits.

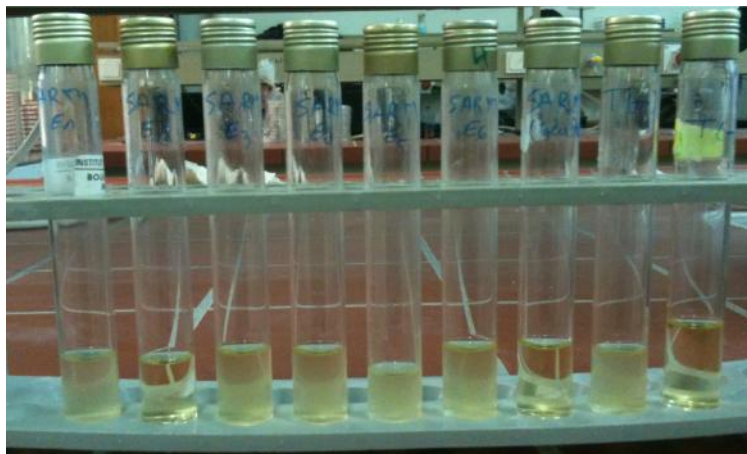


Photo 6 : Activité bactéricide/ bactériostatique des extraits sur SARM

II.4.4. La synergie entre les extraits et un antibiotique

Pour l'étude de la synergie, la ceftazidime (CAZ) est utilisé comme antibiotique dont les zones d'inhibitions sont de 33mm sur *E. coli* ATCC 25922. Les résultats sont illustrés dans le tableau VI :

Tableau VI : Synergie entre les extraits de *Matricaria pubescens* et CAZ sur *E. coli* ATCC 25922

<i>E. coli</i> ATCC 25922			
	Extrait	Extrait+CAZ	Difference
Methanol	0	38	5
Ethanol	0	36	3
Acetone	0	38	5
Methanol 50%	0	40	7
Ethanol 50%	0	36	3
Acetone 50%	0	33	0
Eau	0	34	1

Les résultats des synergies réalisés entre nos extraits et la ceftazidime sur la souche *E. coli* ATCC 25922 révèlent une légère amélioration de l'activité antibactérienne dont la plus grande est de 7mm de diamètre, obtenue avec l'extrait hydro-méthanolique.



Photo 7 : Synergie entre extraits de *Matricaria pubescens* et CAZ sur *E. coli* ATCC 25922

Conclusion

Conclusion

La présente étude est consacrée aux dosages de quelques antioxydants (polyphénols totaux, flavonoïdes, tannins condensés et hydrolysables) d'une plante médicinale de la flore du Sahara algérienne « *Matricaria pubescens* », après leur extraction en utilisant plusieurs solvants à différentes polarité, ainsi qu'à la détermination de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits obtenus.

L'étude statistique montre que le meilleur taux d'extraction (34,68%) est obtenu en utilisant l'éthanol 50% comme solvant d'extraction.

Les résultats du dosage des antioxydants des extraits de *Matricaria pubescens* montrent que l'éthanol est le solvant le plus efficace pour l'extraction des polyphénols (8,22 g/100g), et des flavonoïdes (4,78g/100g). La meilleure teneur en tannins condensés (3,63 g/100g) est trouvée dans l'extrait acétonique, concernant les tannins hydrolysables le méthanol 100% est le plus efficace (2,62 g/100g).

Tous les extraits de la matricaire présentent de fortes activités antiradicalaires, comprises entre 97,13 et 98,65%, et se diffèrent de manière significative selon le solvant utilisé.

Les résultats de la présente étude révèlent l'existence d'une corrélation positive entre le pouvoir antiradicalaire et les teneurs en composés phénoliques, flavonoïde et en tannins hydrolysable.

Les extraits de *Matricaria pubescens* possèdent un effet antibactérien sur toutes les souches testées excepté *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Acinetobacter baumannii* 897.

Les extraits méthanoliques et éthanoliques sont les plus actifs sur le reste de souches testées ; la plus grande zone d'inhibition (20mm) est obtenue avec l'extrait éthanolique sur *Staphylococcus aureus* résistant à la méticiline.

Les concentrations minimales inhibant l'activité bactérienne diffèrent selon l'extrait utilisé et les souches testées. La plus faible concentration minimale inhibitrice est obtenue avec l'extrait méthanolique vis-à-vis de *Acinetobacter baumannii* 610 (<0,78)

L'activité bactéricide ou bactériostatique des extraits de la matricaire diffère selon le solvant d'extraction et la souche testée. L'extrait éthanolique a un effet bactéricide sur SARM, de même que pour les extraits acétoniques 50% et aqueux sur la souche d'*Acinetobacter baumannii* 610.

Une amélioration de l'activité antibactérienne est constatée après la réalisation des synergies entre les différents extraits et la ceftazidime sur la souche *E. coli* ATCC 25922. Les meilleures récupérations obtenues sont avec l'extrait méthanolique 50% et acétonique.

L'étude réalisée ne permet pas la détermination des différents constituants des extraits ainsi que leur mode d'action, d'où la nécessité d'effectuer d'autres études plus approfondies et plus sélectives.

Pour cela il serait intéressant :

- ✓ D'étudier d'autres paramètres d'extraction à savoir la granulométrie de la poudre, le PH du solvant, la durée d'extraction et bien d'autres aspects
- ✓ D'identifier le principe actif responsable de l'activité antioxydante et antibactérienne, en utilisant plusieurs techniques dont la HPLC, la CCM....
- ✓ Déterminer les mécanismes d'action des composés phénoliques sur les cellules bactériennes
- ✓ D'évaluer l'activité antifongique et anti-enzymatique de ces composés phénoliques ;
- ✓ Déduire la toxicité des composés ainsi que la dose efficace en réalisant des tests *in vivo*.

Références
Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abu-shanab B, Adwan G, Abu-safiya D, Jarrar N, Adwan K. (2004). Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Utilized in Popular Medicine in Palestine. *Turk J Biol.* 28, 99-102 .

Alberto MR, Farias ME, Manca de Nadra MC. (2001). Effect of gallic acid and catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w growth and metabolism of organics compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 49, 4359–4363.

Antolovich M, Prenzler P, Patsalides E, McDonald S, Robards K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst.* 127, 183–198.

Aravodis E. (2005). Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology.* 4 (2), 128-133.

Athamena S, Chalghem I, Kassah-Laouar A, Laroui S, Khebri S. (2010). Activite antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Science Journal.* Vol 11, N°1, 69.

B

Bahorun T. (1997). Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Maurice. Food and Agricultural Research Council :83-91.

Bahorun T, Luximon-Ramma A, Crozier A, Aruoma O. (2004). Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidants activities of Mauritian vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 84, 1553-1561.

Bellakhdar J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires, Paris, edition, Ibis Press, 764 p.

Benhouhou S.S, Saadoun N. (1986). Contribution à l'étude de la flore de la région de Béni-Abbès. Thèse de premier cycles. Université d'Alger. 241 p.

Bennick A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary preteins. *Critical Reviews Oral Biologie and Medicine.* 13(2), 184-196.

Berger MM. (2006). Manipulation nutritionnelles du stress oxydant : état de connaissance. *Nutrition Clinique et Métabolisme.* 20, 48-53.

Bouزيد W, Yahia M, Abdeddaim M, Aberkane MC, Ayachi A. (2010). Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de *l'Aubepine monogyne*. *Lebanese Science Journal,* Vol. 12, N°1.

C

Caturla N, Vera-Samper E, Villalain J, Mateo CR, Micol V. (2003). The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of gallolylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radical Biology and Medicine*. 34 (6), 648–662.

Cazes D-J. (2005). Phenolic Acids in Naturel Plants: Analysis by HPLC. *Encyclopedia of Chromatography*. P1806.

Chebaibi A, Rhazi F, Filali I, Lahlou A, Chahlaoui A, L' Kassmi H. (2007). Etude de l'activité antimicrobienne des feuilles de l'olivier (*Olea europaea L.*). Laboratoire de microbiologie. Hôpital Militaire Moulay Ismail Meknès. Maroc.

Cheynier V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Clinical Nutrition*. 81, 223-229.

Chirinos R, Rogez H, Campos D, Pedreschi R, Larondelle Y. (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavon*) tubers. *Separation and Purification Technology*. 55, 217-225.

Cowan NM. (1999). Plant products as antimicrobial agent. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4), 564-582.

Curtay G, et Robin G. (2000). Intérêt des complexes antioxydants. *Nutrithérapie Info Centre*. 6p.

E

Eloff JN. (1998). Wich extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 60, 1-8.

Eloff JN, McGaw LJ. (2006). *Modern phytomedicine. Turning medicinal plants into drugs.* Edited by I. Ahmad, F. Aqil, and M. Owais. 97-121.

Ertürk Ö. (2006). Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia Bratislava*. 61, 275-278.

F

Fazeli MR, Amin G, Ahmadian-Attari MM, 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.

G

Gaussen H, JF Leroy, Ozenda P. (1982). *Precis de botanique 2. Végétaux supérieurs*. 2^{ème} ed (Masson). France.

Goli AH, Barzeger M, Sahari MA. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*. 92 : 521-525.

Gulçin I, Oktay M, Kireççi E, Kufreviöglu OI. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*. 83(3), 371-382.

H

Hammiche V, Maiza K. (2006). Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology*. 105, 358–367.

Hayouni E, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi H. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities invitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*. 105(3), 1126-1134.

Hodzic Z, Pasalic H, Memisevic A, Srabovic M, Saletovic M, Poljakovic M. (2009). The Influence of Total Phenols Content on Antioxidant Capacity in the Whole Grain Extracts. *Scientific Research*. 28(3), 471–7.

Hogan D, Kolter R, (2002). Why are bacteria referactory to antimicrobials. *Current Opinion in Microbiology*. 5, 472-477.

J

Jayaprakasha GK, Patil BS. (2007). In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chemistry*. 101, 410-418.

K

Kahkonen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha J-P, Pihlaja K, Kujala T.S, et Heinonen M. (1999). Antioxidant Activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 3954-3962.

Khenouf Seddik, Benchiekh Dalila, Djidel Saliha, Dahamna Saliha, Amira Smain, Charef Noureddine, Baghiani Abderahmane, Harzallah Daoud and Arrar Lekhmici, (2013). Polyphenols and antioxidant properties of extracts from *Mentha pulegium* L. and *Matricaria chamomilla* L. *Pharmacognosy Communications* Volume 3, Issue 2.

Kouri G, Tsimogiannis D, Bardouki H, et Oreopoulou V. (2007). Extraction and analysis of antioxidant compounds from *Origanum dictamnus*. Innovative Food Science and Emerging Technologies 8, 155-162.

Kratchanova M, Denev P, Ciz M, Lojek A, Mihailov A. (2010). Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. ACTA Biochimica Polonica. Vol 57; N° 2, 229-234.

ℒ

Lapornik B, Prosek M, et Wondra A.G. (2005). Comparaison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. Journal of Food Engineering. 71, 214-222.

Levin AD. (1976). The chemical defenses of plants to pathogen and herbivores. Annual Reviews Ecological System. 7, 121-59.

Lewus CB, Sun S, et Montville TJ. (1992). Production of an Amylase-Sensitive Bacteriocin by an Atypical *Leuconostoc paramesenteroides* Strain. New Jersey. Applied and Environmental Microbiology. 143-149.

Liu Q et Yao H. (2007). Antioxidant activities of barley seeds extracts. Food Chemistry. 102, 732-737.

ℳ

Makhloufi A, Moussaoui. A and Lazouni H.A. (2012). Antibacterial activities of essential oil and crude extracts from *Matricaria pubescens* (Desf.) growing wild in Bechar, South West of Algeria. Journal of Medicinal Plants Research. Vol. 6(16),pp. 3124-3128.

Mallika M, Dhar SC. (1980). Studies on the oxidation of tannins by *Aspergillus flavus*. Journal of Bioscience. 1(2), 43-48.

Martini N, Eloff, JN. (1998). The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). Journal of Ethnopharmacology. 62, 255–263.

Mole et Waterman PG. 1987. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. II. Techniques for biochemically defining tannins. Oecologia.72, 148-156.

Mompon B, Lemaire B, Mengal P, et Surbled M. (1996). Extraction des polyphénols du laboratoire à la production industrielle .Ed. INRA (Bordeaux, France). 267 p.

ℴ

Naczka M. et Shahidi F.2006. Phenolic in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 41:1523-1542.

Naczka et Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolic in food. *J. Chrom.*1054, 95-111.

Natarajan D, John Britto S, Srinivasan K, Nagamurugan N, Mohanasundari C, Perumal G. (2005). Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*-A rare medicinal herb. *J. Ethnopharmacol.* 102, 123-126.

P

Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035–1042.

Pinelo M, Del Fabbro P, Manzocco L, Jose´ Nunez, M., Nicoli, M.C., (2005). Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry*. 92, 109–117.

R

Reguant C, Bordons A, Arola L, Roze´s N. (2000). Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 1065–1071.

S

Singleton, V. L. (1980). Grape and wine phenolic; background and prospects. *Proc. of Grape and Wine Centennial Symposium*, ed. A. D. University of California, Davis. Webb, pp. 215–227.

Spigno G, Tarmelli L, De Faveri, DM. (2007). Effect of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*. 81(1), 200-208.

Sripad G, Prakash V, et Rao MSN. (1982). Extrability of polyphenols of sunflower seed in various solvents. *J. Biosci.* 4, 145-152.

Swain T et Hills WE. (1959). The phenolics constituents of *Prunus domestica*: the quantitative analysis of phenolics constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 10. P: 13.

T

Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, et Polissiou M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*. 90, 333-340.

Toor RK. et Savage GP. (2006). Effect of semi-drug on the antioxidant components of tomatoes. *Food Chemistry*. 94, 90-97.

V

Voravuthikunchai SP, Sririrak T, Limsuwan S, Supawita T, Lida T, Honda T. (2005). Inhibitory effects of active compounds from Puniva granatumpericarpe on verotoxine production by enterohemoragique *Escherichia coli* O157: H7. Journal of Health Science, 51(5), 590-596.

Y

Yoo KM, Lee CH, Lee H, Moon B, Lee CY. (2008). Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. Food Chemistry. 106, 929-936.

Annexes

Préparation des solutions et des réactifs

1. Réactif de la vanilline :

1 g de vanilline dissoudre dans 70 % d'acide sulfurique.

2. Solution de FeCl_3 :

1,62 g est dissout dans 0,01M de HCl.

3. Tampon phosphate :

- Dissoudre 2,72 g de KH_2PO_4 dans 100 ml d'eau distillée
- Dissoudre 7,16 g de Na_2HPO_4 dans 100 ml d'eau distillée
- Neutraliser la solution basique par la solution acide jusqu'à pH 6,6.

Courbes d'étalonnage

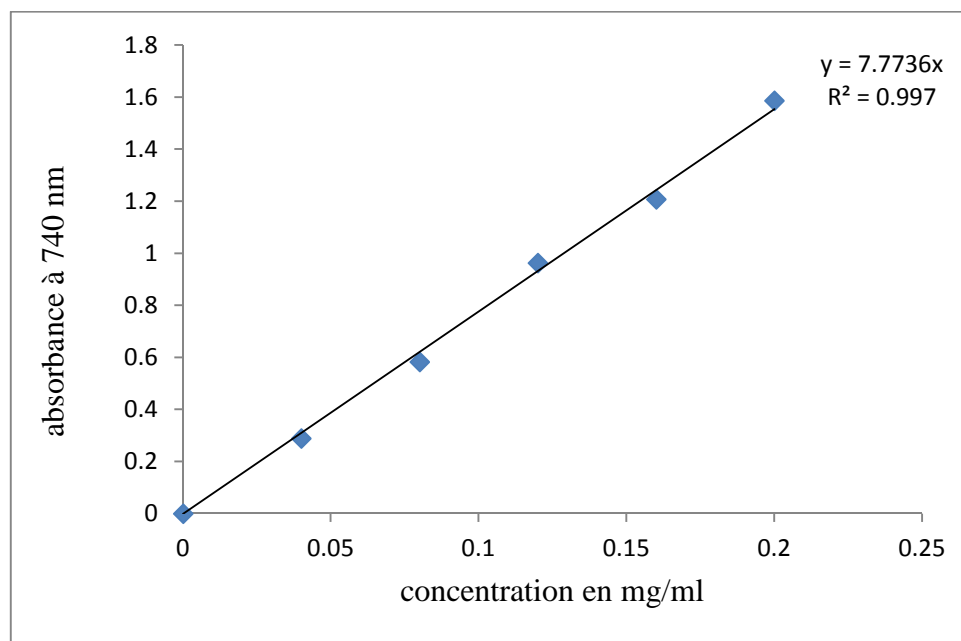


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

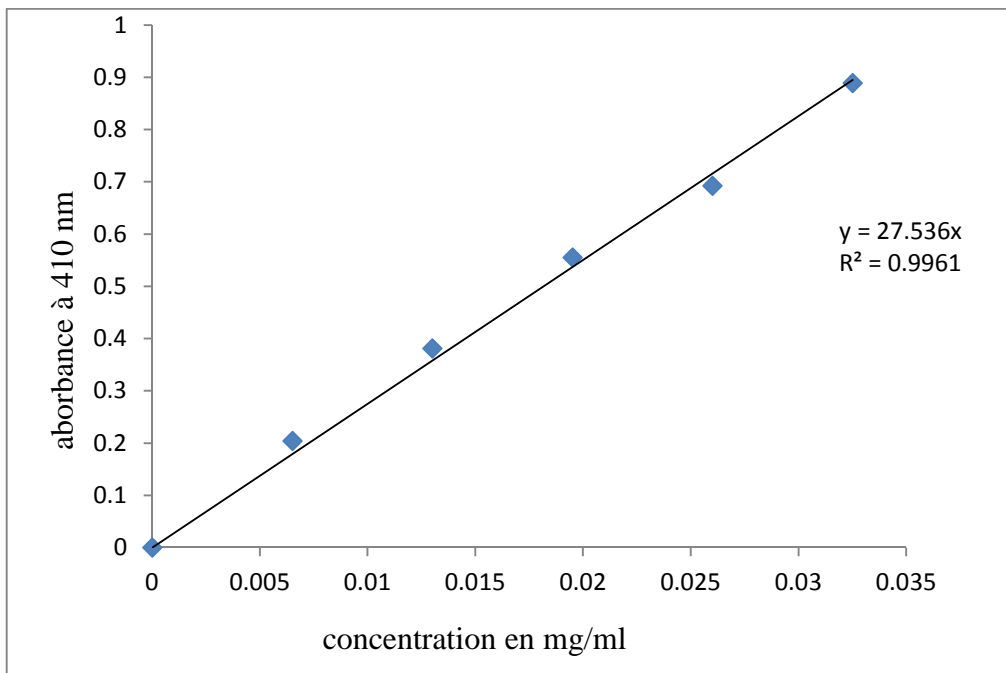


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes

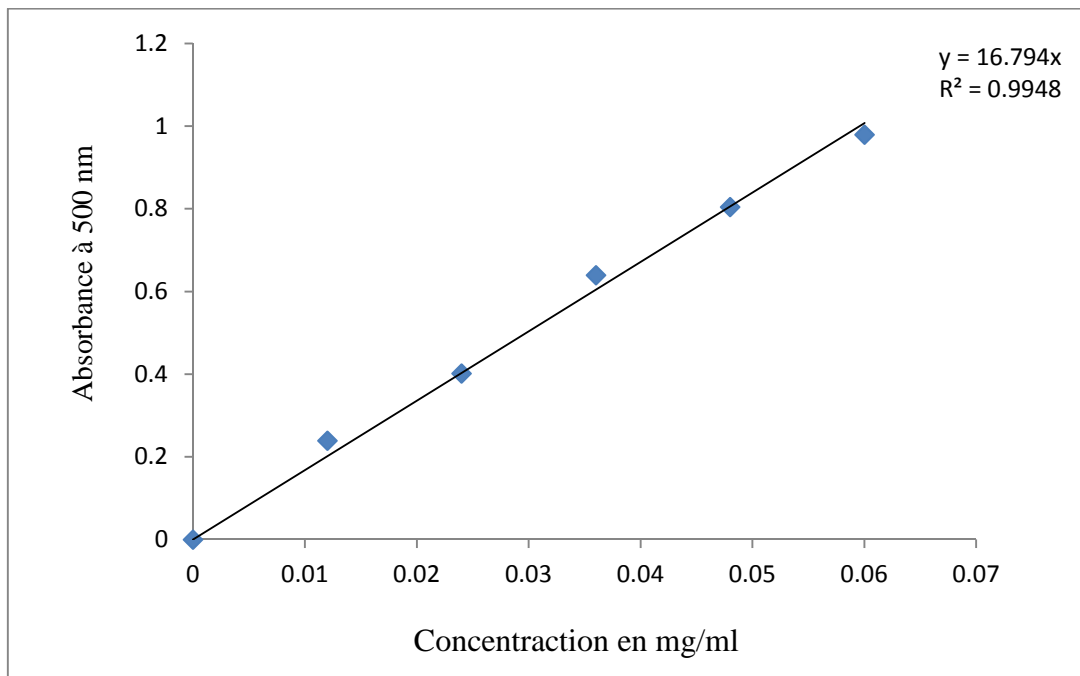


Figure 3 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tannins condensés.

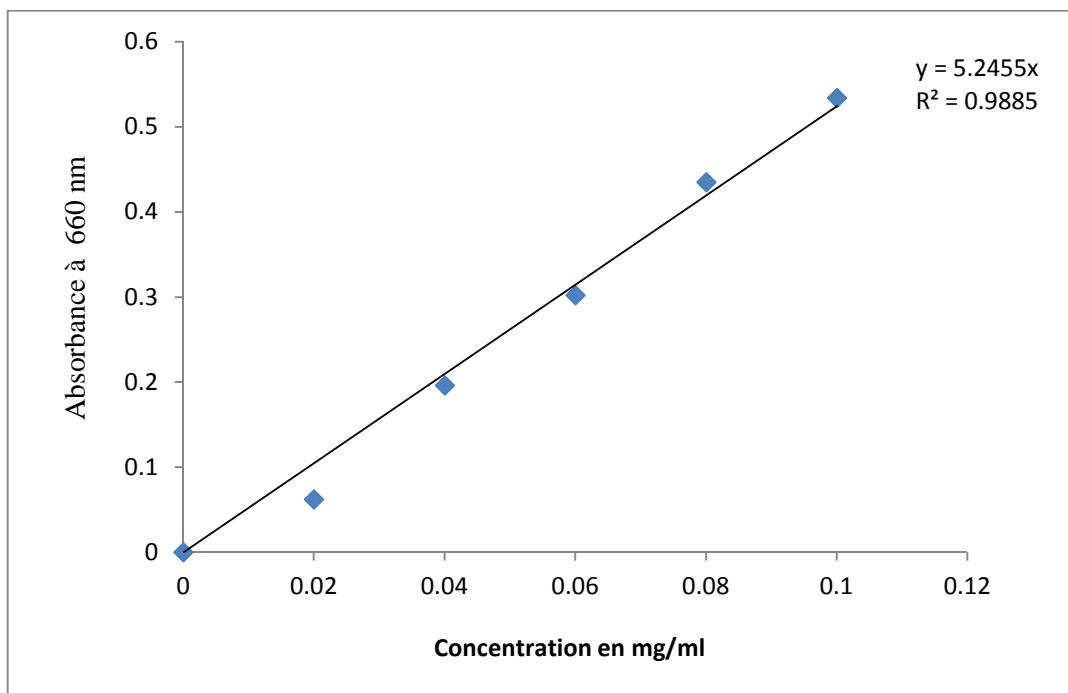


Figure 4 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des tannins hydrolysables.

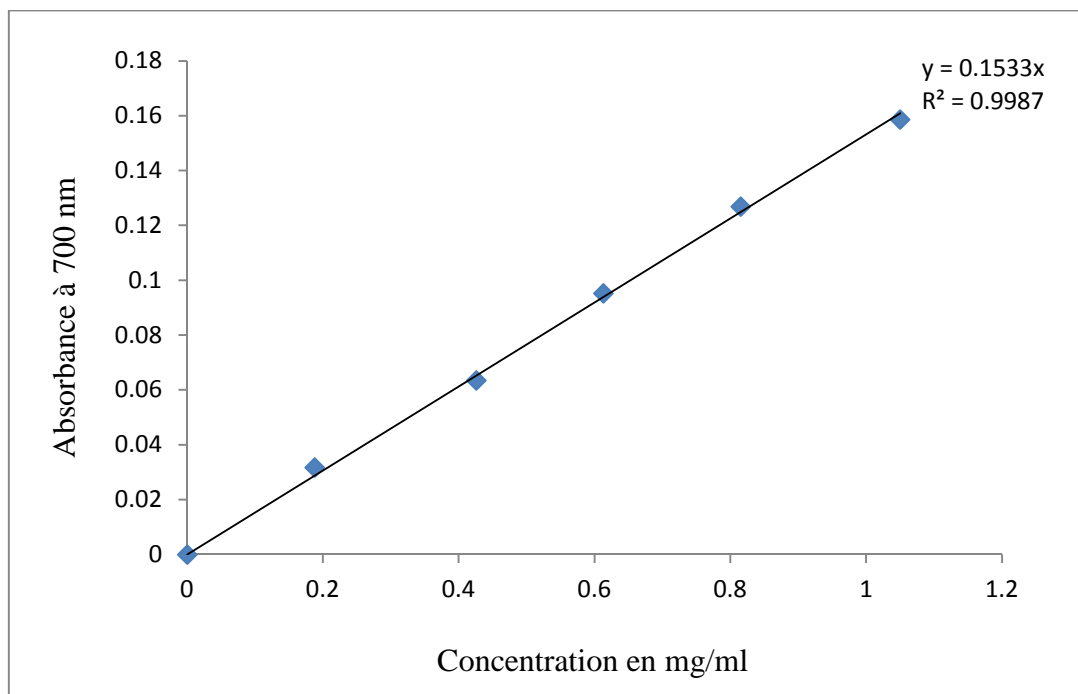


Figure 5 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour l'évaluation du pouvoir réducteur.

✓ **Composition des milieux :**

Bouillon nutritif (g/l)	Mueller-Hintone (MH) (g/l)
Macération de viande (ou extrait de viande + eau distillée).....1litre	Infusion de viande de bœuf.....300
Peptone trypsique 15	Hydrolysate de casienne 17,5
NaCl ou Kcl 5	Amidon 1,5
	Agar17
pH 7,2	pH 7,4

Trypticase Soja Agar (TSA) (g/l)
Peptone de caséine.....15
Peptone de soja5
Chlorure de sodium5
Gélose15
pH 7,3 +/- 0,2 à 25° C

Résumé

Le but de ce travail est de doser les antioxydants (polyphénols, flavonoïdes, les tannins condensés et les tannins hydrolysables), et d'évaluer leurs activités antioxydante et antibactérienne et ce après leur extraction en utilisant sept solvants de différentes polarités (méthanol 100%, méthanol 50%, éthanol 100%, éthanol 50%, acétone 100%, acétone 50% et l'eau). Les résultats obtenus indiquent que l'extrait éthanolique présente les plus grandes teneurs en polyphénols (8,22 g/100g) et en flavonoïdes (4,78 g/100g). L'acétone 100% et le méthanol 100% sont les solvants les plus efficaces pour l'extraction des tannins condensés (3,635 g/100g) et des tannins hydrolysables (2,62 g/100g), respectivement. L'étude révèle que l'extrait à l'acétone 50% est le plus efficace pour inhiber le radical DPPH avec un pourcentage de 98,65%. D'après les aromatoigrammes réalisés, tous les extraits de la matricaria présentent un pouvoir inhibiteur sur les souches testées sauf : *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Acinetobacter baumannii* 897. Sur toutes les souches étudiées, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline est la plus sensible aux extraits avec des zones d'inhibitions atteignant les 20mm.

Mots clés: *Matricaria pubescens*, polyphénols totaux, flavonoïdes, tannins, activités antioxydante, activités antibactérienne.

Summary :

The aim of this work is to dose antioxidants (polyphenols, flavonoids, condensed and hydrolysable tannins), and evaluate their antioxidant and antibacterial activity, after extraction using seven solvents with different polarities (100% methanol, 50% methanol, 100% ethanol, 50% ethanol, 100% acetone, 50% acetone and water). The results shows that the ethanol extract presents the greatest polyphenol contents (8,22 g/100g) and flavonoids (4,78 g/100g). The 100% acetone and 100% methanol are the most effective solvents for extraction of condensed tannins (3,635 g/100g) and hydrolysable tannins (2,62 g/100g) respectively. The study revealed that the acetone 50% extract is the most effective for inhibiting the DPPH radical with a rate of 98,65%. All samples of matricaria have an inhibitory power except for *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Acinetobacter baumannii* 897. On all the strains studied, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is more sensitive to extracts with zones of inhibition reaching 20mm.

Key words: *Matricaria pubescens*, total polyphenols, flavonoids, tannins, antioxidant activity, antibacterial activity