

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université ABDE RAHMANE MIRA- Béjaïa
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme de

Master

Filière : Sciences Biologiques Spécialité : Pharmaco-toxicologie

Thème:

Étude comparative des profils de résistance des isolats bactériens vis-à-vis l'extrait brute de *Centaurea calcitrapa* L.

Présenté par:

Melle MADI Kenza.

Melle ZENNACHE Zina.

Soutenu le 30/09/2023

Devant le jury composé de :

Mme Moulaoui Kenza	MCB	présidente
Mme Bourebaba Yasmina	MCA	Examinatrice
Mme Ayouni Karima	MCB	Encadrante
Mme Kara Salima	MCB	Co-Encadrante

Année Universitaire :2022/2023

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu le Tout-Puissant pour sa grâce qui nous a accordé, la volonté, le succès et la patience pour terminer notre mémoire de fin de cycle Master.

Merci Dieu de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

À notre encadrante

Ce travail a été réalisé sous l'intelligente direction de notre chère encadrante, Dr AYOUNI Karima. On tient à lui exprimer notre profonde gratitude pour nous avoir aidé et donné la possibilité de réaliser notre mémoire et pour ses précieux conseils, son suivi et ses encouragements à mener à bon terme notre travail.

À Mme KARA Salima de nous avoir Co-encadré durant notre parcours, Merci pour votre disponibilité et vos encouragements.

Aux membres du jury

Un grand merci aux membres de jury. Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce que nous avons réalisé.

À Mme Moulaoui Kenza pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant la présidence du jury.

À Mme Bourebaba Yasmina d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous remercions également le personnel du laboratoire BPC de nous avoir offert l'opportunité de travailler efficacement.

Un grand MERCI À Mme Saheb-Aouane Meriem, notre ingénieur de laboratoire pour son aide, sa gentillesse, sa bienveillance, ses informations en or et sa disponibilité dans notre parcours durant notre stage pratique.

À Mme Benyahia-Bouaoud Lydia et à toute l'équipe du laboratoire avec qui nous avons partagé le travail expérimental.

Un grand merci à nos parents pour leur soutien aussi bien moral que financier.

On remercie tous nos enseignants du département de la Biologie Physico-Chimique pour leurs connaissances transmises et leur soutien au cours de notre carrière universitaire, sans qui, nous en serions pas arrivées là aujourd'hui.

À la fin, nous remercions ceux qui nous ont encouragées de près et de loin.

Sans oublier les étudiants de notre promotion de Pharmaco-Toxicologie 2022-2023.

Kenza et Lina.

Dédicaces

آخِرُ دَعْوَاهُمْ أَنِ الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ

Je dédie ce travail à toutes les personnes qui me sont chères.

A Abdel Madjid et Samra

PAPA mon support, ma source de vie. MAMAN la prunelle de mes yeux, la source de ma joie et de mon bonheur. MERCI pour votre présence à mes côtés, de me soutenir durant tous mon parcours, merci pour vos sacrifices le long de ces années. C'est en grande partie grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui, j'espère avoir été à la hauteur de vos espérances. Que Dieu vous protège, avec tout mon amour et ma reconnaissance.

A Khaled, et Omar

Khaled, mon frerot, mon jumeau merci énormément pour ton amour et ta gentillesse sans toi ça aurait été beaucoup plus difficile. Je te souhaite tout le bonheur du monde. Je t'aime.

Cher petit frère que j'aime tant, je te souhaite tous le succès du monde. Je te souhaite d'exceller durant le bac qui t'attend prochainement.

A Emily

Mon petit cœur, ma petite sœur, ma petite confidente. Je suis fière de la magnifique jeune femme que tu es devenue .

A Walid

Merci mon amour pour ton soutien sans faille et pour tout le bonheur que tu m'apportes au quotidien. J'espère te le rendre aussi bien. Je t'aime.

A Anissa et Imane

Merci mes meilleures pour ces années, tous ces bons moments passés à vos côtés, votre présence et votre amitié sans faille .

A Zina

Merci pour ce magnifique parcours, pour ton soutien moral, ta patience et ta compréhension.

Une dédicace spéciale à mon oncle Hamza et à mon beau-père Moussa.

À l'âme de mon oncle paternel Fatah.

À toute ma famille, Mes grands-parents, Mouhamed, Baya et Malika. Oncles, et tantes.

Zenza, Alias Vanessa.

Je dédie ce travail pour chaque personne que porte mon cœur. Merci pour votre précieux soutien.

Aux magnifiques parents que dieu m'ait accordée la chance d'avoir,

Farid et Nassima

A ma maman chérie, le nombril de mon monde, et à mon papa, mon pilier, je m'émeus en vous dédiant ces modestes lignes. Je vous remercie d'avoir su répondre présents durant mon parcours, de m'avoir encouragée, rassurée et de croire en moi. Merci pour cet amour, patience et bienveillance. Les mots seront toujours faibles pour vous exprimer mon amour et admiration. J'espère que vous êtes fiers de moi, que j'aurais l'occasion de vous rendre ne serait-ce que le quart de ce que vous m'avez apportés. Vous avez mon éternelle gratitude. Je vous aime infiniment.

A Adel et Imane

Petit frère, mon ami, mon confident. Merci d'avoir su être à l'écoute quand j'avais besoin de me confier. Merci pour chaque fou rire, pour cette maturité et sagesse dont tu as su faire preuve, je suis fière du jeune homme que tu es devenu. Imane, petite sœur, tu grandis trop vite, tu es la benjamine et pourtant tu as cette assurance, cette intelligence, et cette fierté qui me réchauffent le cœur. Merci pour votre tendresse, je serais toujours là pour vous, je vous aime.

A mon oncle préféré ; Nabil

Tu as su être le grand frère que je n'ai pas eu, je demeure admirative devant ce grand homme que tu es, devant ton caractère et ton côté protecteur. Merci d'avoir été là à chaque instant.

A Imene

Chère amie et confidente, tu as beau être loin, tu m'as poussée à réaliser ce qui me tient à cœur, à progresser encore plus chaque jour que dieu ait donné. J'ai toujours su compter sur toi, tes conseils me sont précieux. Merci pour ces ondes positives que tu as su me transmettre.

A Kamélia, Betty, Fairouz, Meriem et Lylia.

Mes amies de longue date avec qui j'ai appris à grandir et évoluer. Vous êtes une partie de moi, ma famille de cœur. Merci pour ces années d'amitié, de qualité, de partage, et de beaux souvenirs.

A mon amie et collègue ; Vanessa

Vanille, ton surnom précède ta belle personne. Merci pour ta collaboration, ta gentillesse. Tu es adorable .

A ma magnifique famille

Merci pour cet amour, votre présence, ces innombrables sourires que vous avez su dessiner aux coins de mes lèvres. Je vous aime fort.

A ces belles rencontres enrichissantes faites durant mon parcours.

Lina.

Remerciements.

Dédicaces.

Sommaire.

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Liste des annexes.

Liste des abréviations.

Introduction 01

Chapitre I: Revue Bibliographique.

I.1 Centaurea calcitrapa L

I.1.1 Description du genre *Centaurea* 04

I.1.2 Description de *Centaurea calcitrapa L.*..... 05

➤ Taxonomie de *Centaurea calcitrapa L.*..... 06

➤ Distribution géographique..... 06

➤ Utilisation en médecine..... 06

I.2 Les métabolites d'origine végétale...... 07

I.2.1 Métabolites secondaires du genre *Centaurea calcitrapa L* 07

I.2.1.1 Composés phénoliques..... 07

a) Acides phénoliques..... 07

b) Flavonoïdes..... 08

I.2.1.2 Triterpènes..... 10

I.2.1.3 Sesquiterpènes lactone..... 11

I.2.1.4 Huiles essentielles..... 12

I.2.1.5 Alcaloïdes..... 12

I.3 Pathologies infectieuses, Résistance aux antibiotiques et Activités biologiques des métabolites secondaires des Centaurées...... 13

I.3.1 Activités biologiques des métabolites secondaires des Centaurées..... 13

I.3.2 Maladies infectieuses et les infections bactériennes..... 14

I.3.3 Facteurs de pathogénicité microbienne..... 15

I.3.4 Antibiotiques 16

I.3.5 Résistance bactérienne..... 17

I.3.5.1 Mécanismes de résistance bactérienne..... 17

Chapitre II: Matériel et Méthodes

II.1 Matériel

II.1.1 Matériel biologique.....	19
II.1.1.1 Choix de la plante <i>Centaurea calcitrapa L</i>	19
II.1.1.2 Choix des souches bactériennes.....	19
II.1.2 Produits chimiques et équipements.	19

II.2 Méthodes

II.2.1 Préparation des poudres sèches	20
II.2.2 Méthodes d'extraction	21
II.3 Préparation des solutions d'extrait de <i>C. calcitrapa L</i>	22
II.3.1 Dosage des polyphénols totaux.....	22
II.4 Méthodes microbiologiques	23
II.4.1 Effet antibactérien de l'extrait de feuilles de <i>C. calcitrapa L</i>	23
II.4.1.1 Préparation de l'inoculum bactérien.....	23
II.4.1.2 Méthode de diffusion en milieu solide (sur disque).....	24
II.4.1.3 Test de caractérisation du type de l'effet antibactérien	25
II.4.1.4 Détermination des CMI sur milieu liquide.....	25

Chapitre III: Résultats et Discussion

III.1 Rendement de l'extraction et du dosage des polyphénols totaux	27
III.2 Tests antibactériens.....	28
III.2.1 Test de diffusion sur milieu solide (Disques).....	29
III.2.2 Test des caractérisation du type de l'effet antibactérien	32
III.2.3 Test de l'antibiorésistance des différentes souches vis a vis des acides gallique et tannique.....	34
III.2.4 Tests de détermination des CMI sur milieu liquide	34
III.3 Antibiogramme des souches bactériennes testées comparé à l'extrait des feuilles de <i>C. calcitrapa L</i>	37

<i>Conclusion</i>	40
-------------------------	----

<i>Références Bibliographiques</i>	41
--	----

Annexes.

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
01	Quelques photographies des fleurs des espèces du genre <i>Centaurea</i> .	04
02	Photographies de: A: La sommité fleurie. B: La plante entière de <i>Centaurea calcitrapa</i> L. C: La feuille.	05
03	La structure de base des flavonoïdes.	08
04	Structures des principales classes des flavonoïdes.	09
05	Les feuilles séchées de <i>Centaurea calcitrapa</i> L.	20
06	Poudre des feuilles obtenue à partir des feuille de <i>Centaurea calcitrapa</i> L.	20
07	Extraction par macération éthanolique de la poudre des feuilles de <i>C. calcitrapa</i> L. (A: Les suspensions sous agitation B: Les suspensions après la décantation).	21
08	Courbe d'étalonnage pour le dosage des phénols totaux réalisée par différentes concentrations d'acide gallique.	28
09	Photographies illustratives de la diffusion en milieu solide des diamètres des zones d'inhibition (mm) de la croissance bactérienne avec une diffusion au réfrigérateur en fonction de des concentrations en extraits des feuilles de <i>Centaurea calcitrapa</i> L sur les différentes souches.	30
10	Photographie illustrative des zones d'inhibition des acides tannique et gallique sur milieu solide.	34

Liste des tableaux

<i>N°</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
Tableau I	La classification de <i>Centaurea calcitrapa</i> L.	06
Tableau II	Les structures de quelques flavonoïdes dans le genre <i>Centaurea</i> .	10
Tableau III	Les flavonoïdes isolés de <i>Centaurea calcitrapa</i> L.	10
Tableau IV	Quelques lactones sesquiterpéniques isolés des centaureés.	11
Tableau V	Principaux constituants et rendements des huiles essentielles de quelques Centaurées.	12
Tableau VI	Les activités biologiques de quelques lactones sesquiterpéniques des centaureés.	13
Tableau VII	Les activités biologiques de quelques flavonoïdes des centaureés.	14
Tableau VIII	Tableau comparatif des diamètres des zones d'inhibition (mm) de la croissance bactérienne sans/avec diffusion au réfrigérateur en fonction des différentes concentrations en extraits des feuilles de <i>Centaurea calcitrapa</i> L sur différentes souches.	29
Tableau IX	Type d'effet antibactérien des différentes souches testées.	33
Tableau X	Concentrations minimales inhibitrices (mg/ml) de la croissance bactérienne de l'extrait de <i>C. calcitrapa</i> L. en comparaison à l'acide tannique sur les différentes souches bactériennes.	35
Tableau XI	Antibiogramme des souches bactériennes testées comparé à l'effet de l'extrait des feuilles de <i>C. calcitrapa</i> L.	37

Liste des annexes

● *Annexe 1:*

Préparation des solutions et les milieux de cultures

- Préparation de l'Eau physiologique.
- Préparation du standard McFarland.
- Bouillon nutritif.
- Bouillon Mueller-Hinton.
- Gélose nutritive.
- Gélose Mueller-Hinton.
- Gélose Chapman.
- Gélose Hektoen.

● *Annexe 2 :*

Abréviations, et des références des molécules d'antibiotiques.

Liste des abréviations

- ***B. cereus*** : *Bacillus Cereus*.
- **BN** : Bouillon Nutritif.
- **BMH** : Bouillon Mueller-Hinton.
- ***C. Calcitrapa L*** : *Centaurea calcitrapa L.*
- **DMSO**: Diméthyl sulfoxyde.
- ***E. coli*** : *Escherichia Coli*.
- **GN** : Gélose Nutritive.
- **GMH** : Gélose Mueller-Hinton.
- **CMI** : Concentration Minimal Inhibitrice
- **R** : Radical.
- ***S. aureus*** : *Staphylococcus Aureus*.

Introduction

Introduction

La médecine dépend beaucoup des remèdes d'origine végétale, en raison de la forte résistance de certaines infections d'origine bactérienne face aux antibiotiques synthétiques. Les chercheurs se dirigent vers un remède naturel, ils effectuent des études sur l'exploration des ressources naturelles, notamment les plantes médicinales qui apparaissent comme une piste prometteuse, car elles constituent une grande réserve de substances actives, facilement accessibles et largement utilisées dans la médecine traditionnelle contre différentes pathologies difficiles à traiter par les médicaments disponibles sur le marché (**Hajji, 2016**). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), elles ont toujours joué un rôle important dans l'arsenal thérapeutique de l'humain, issu de plantes entières ou de parties de plantes (feuilles, pédoncules, bourgeons, fleurs, racines, tubercules).

En Algérie, il en existe 3000 espèces appartenant à différentes familles botaniques dont 15% endémiques (**Quezel et Santa, 1963**) qui occupent une place importante en matière de plantes médicinales dont la famille des Astéracées (composées), l'une des plus grandes familles les plus étudiées. Cette flore végétale algérienne riche et diversifiée dont fait partie les espèces de genre *Centaurea* a fait l'objet de nombreuses recherches phytochimiques et pharmacologiques durant plusieurs années (**Quezel et Santa, 1963 ; Nacer et al., 2012**). Diverses espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle et ont montré plusieurs activités biologiques, tels que, anti-inflammatoire, diurétique (**Monya et Racz 1974**), antipyrétique, cytotoxique (**Medjroubi et al., 2005**), antidiabétique (**Baytop, 1999 ; Kaij et al., 1992**) et antimicrobiennes (**Kumarasamy et al., 2003 ; Panagouleas et al., 2003**). Ces diverses activités pourraient être dues aux nombreux composés d'intérêt biologique qu'elles contiennent, tels que les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques (**Arif et al., 2004 ; Toribio et al., 2004**).

Les pathologies infectieuses sont principalement causées par des bactéries dont la manifestation dépend de l'organe atteint (**Coulibaly, 2007**). Certaines de ces bactéries ont des effets bénéfiques sur l'organisme, comme celles qui vivent dans l'intestin et facilitent la digestion, et celles qui vivent en permanence sur la peau et empêchent la colonisation par des bactéries pathogènes. D'autres sont pathogènes et provoquent de nombreuses maladies. L'activité antibactérienne *in vitro* de substances ou d'extraits peut être démontrée dans des milieux solides et liquides par un certain nombre de techniques standards (**Ayad, 2013**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail ayant comme objectif d'une étude bibliographique bien ficelée sur l'espèce *Centaurea calcitrapa L* du point de vue phytochimique et activités biologiques. La valorisation des plantes médicinales de la flore

Introduction

algérienne nous a conduits à s'intéresser à l'activité anti-microbienne de *Centaurea calcitrapa* L.

Ce manuscrit est reparti en trois parties essentielles:

Le premier chapitre, consacré à l'étude bibliographique, comportant une petite présentation de la famille des Asteraceae du genre *Centaurea*, plus spécifiquement sur la plante *Centaurea calcitrapa* L, ainsi que les utilisations thérapeutiques de cette famille, ses différentes classes de métabolites secondaires les plus connus, suivi d'un aperçu sur les infections bactériennes ainsi que les mécanismes de résistances des bactéries aux antibiotiques.

Le deuxième chapitre concerne la partie expérimentale relative à nos travaux. Nous avons procédé à l'extraction éthanolique à partir de *Centaurea calcitrapa* L (feuilles), à déterminer le rendement d'extraction et les teneurs en polyphénols totaux. Par ailleurs, nous avons réalisé des tests d'antibiogrammes (sur gélose) et de détermination des CMI's sur milieu liquide (Microplaque 96 puits) de cet extrait à différentes concentrations sur des souches bactériennes pathogènes afin d'évaluer leurs effets.

Le troisième et dernier chapitre illustre les discussions des résultats obtenus concernant le rendement d'extraction, la teneur de polyphénols et l'effet de *Centaurea calcitrapa* L sur la croissance bactérienne, avec une caractérisation de cette activité par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI's).



Chapitre I

Revue bibliographique



I.1 *Centaurea calcitrapa* L

I.1.1. Description du genre *Centaurea*

Les centaurées font partie de la famille botanique des Astéracées et sont des plantes qui se rapprochent des chardons et des cirses, mais se différencient de ces derniers par leurs feuilles non épineuses (Dupont et Guignard, 2007). Le nom vernaculaire "Centaurées" regroupe environ 450 espèces, selon Hoffmann (1897), 250 espèces selon Susanna et Garcia Jacas (2007). En Algérie, le genre des centaurées compte 45 espèces, dont 7 localisées dans le Sahara (Quezel et Santa, 1963; Ozenda, 1977).

Les centaurées sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces, avec des feuilles alternes. Comme pour toutes les plantes de la famille des Composées, leurs fleurs, appelées "fleurons", sont toutes tubulées et disposées en capitule multiflores homomorphes ou dimorphes. Les fleurs de la périphérie, souvent stériles, s'ouvrent largement en 5 lobes, à la manière des artichauts. Le plus souvent, elles présentent des couleurs allant du rose au violet, bien que certaines espèces aient des fleurs jaunes entourées d'un involucre ovoïde ou globuleux à bractées imbriquées sur plusieurs rangs (Figure 01). Les fleurs marginales sont généralement neutres et souvent rayonnantes, tandis que celles du disque sont hermaphrodites avec des anthères sagittées à la base et un style à branches courtes. Les bractées peuvent être homomorphes, dimorphes ou polymorphes, plus fréquent ciliées ou bien épineuses, et leur observation est essentielle pour déterminer les espèces. Le réceptacle est plan ou sur plan garni de soies abondantes. Les fruits sont des akènes longs ou ovoïdes, lisses, avec un hile latéral, profond, barbu ou non, et l'aigrette est soit absente soit présente, portant une aigrette assez courte, simple ou double, persistante ou caduque (Quezel et Santa, 1963). Les centaurées sont des plantes à résine ou à essence sans latex, qui se multiplient par touffes ou par semis, généralement au printemps. Elles se rencontrent sur différents types d'habitats tels que, les déserts et les semi-déserts, les pentes raides, les hautes montagnes, les terres arables, les zones à inondations périodiques, les zones sèches et partiellement exposées au soleil (Hellwig, 2004).

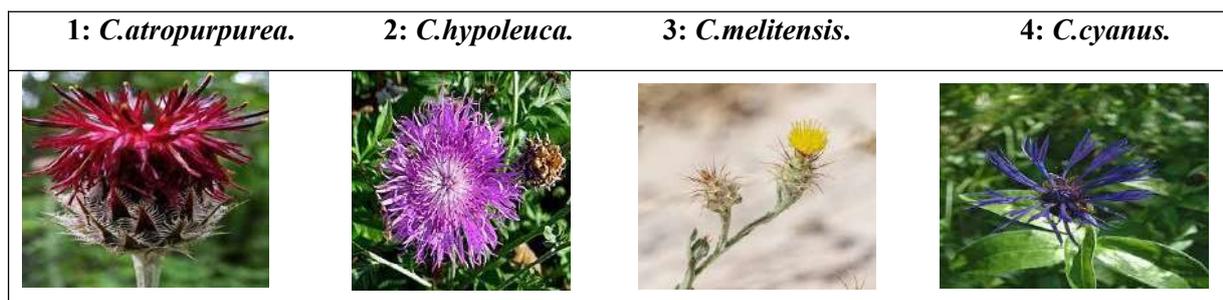


Figure 01: Quelques photographies des fleurs des espèces du genre *Centaurea* (Quezel et Santa, 1963).

I.1.2. Description de *Centaurea calcitrapa* L

Parmi les centaurees, il existe une espèce appelée *Centaurea calcitrapa* L, également connue sous le nom de chardon étoilé ou centauree chausse-trape, dit en kabyle 'Avounakar'. Le genre *Centaurea* tire son nom du terme grec "Kentaurion", en référence à Chiron, le centaure de la mythologie grecque qui utilisait cette plante pour ses propriétés curatives. En outre, le nom "*Calcitrapa*" est dérivé du latin et signifie littéralement "piégeur" ou "accrocheur de chaussures".

Cette plante peut atteindre une hauteur de 20 à 60 centimètres. Elle possède une tige dressée très ramifiée avec des rameaux divergents. Les feuilles radicales sont pennatipartites et glabrescentes, tandis que les feuilles caulinaires sont rugueuses, ponctuées et pennatiséquées, constituées de segments presque linéaires se terminant en pointe subulée. Les capitules sont solitaires, de taille moyenne et entourés de feuilles florales, formant une large panicule. L'involucre est de forme ovoïde, rappelant la forme ovale des feuilles de buis, avec des folioles terminées par une épine robuste, canaliculée vers l'intérieur à la base, très étalées et accompagnées de courtes spinules basilaires. Les akènes sont blanchâtres, marbrés de linéoles noires et ne possèdent pas d'aigrette, tandis que toutes les fleurs sont égales et de couleur pourpre (**Figure 02**).

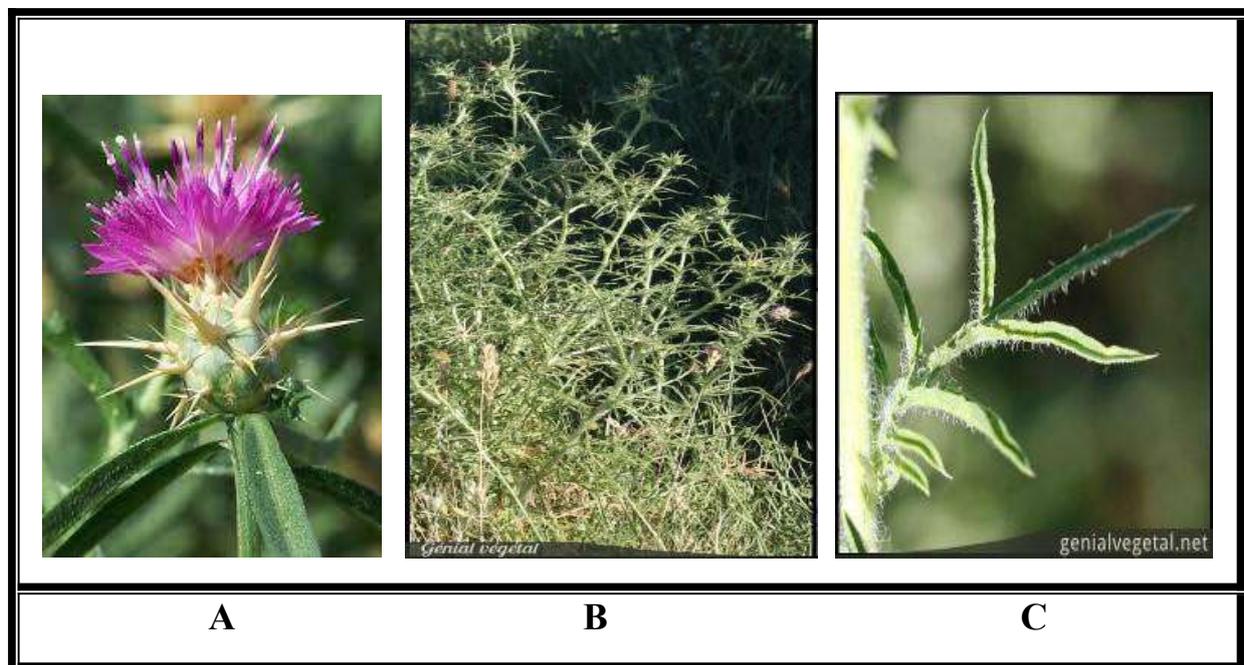


Figure 02 : Photographies de:

A: La sommité fleurie . **B:** La plante entière de *Centaurea calcitrapa* L. **C:** La feuille.

➤ **La taxonomie de *Centaurea calcitrapa* L**

Le tableau ci-dessous récapitule la classification de *Centaurea calcitrapa* L, selon l'inventaire national du patrimoine naturel (INPN,2003).

Tableau I : La classification de *Centaurea calcitrapa* L (INPN, 2003).

Domaine	Botanique
Règne	Plantae
Sous règne	Tracheobionta
Classe	Dicotylédones
Ordre	Astrales
Famille	Astéracées
Genre	Centaure L.
Espèce	<i>Centaurea calcitrapa</i> L

➤ **La distribution géographique**

Le genre *Centaurea* présente une large distribution géographique dans le monde. *Centaurea calcitrapa* L est largement répandue en Europe, notamment en Hongrie, en Suisse, en Tchécoslovaquie, en Ukraine, en Albanie, en Grèce, en Italie, en Roumanie, en France, au Portugal et en Espagne. On la retrouve également en Asie, notamment à Chypre, au Liban, en Syrie et en Turquie, ainsi qu'en Afrique du Nord (Dimkić *et al.*, 2020), notamment en Algérie (Gifa, 2012), en Égypte, au Maroc et en Tunisie (Kaya *et al.*, 2010). *Centaurea calcitrapa* L se abondante dans la région méditerranéenne, elle est connue pour se développer sur une large gamme de types de sols, mais elle préfère particulièrement les sols lourds et humides. Elle peut être trouvée dans les pâturages pauvres, le long des routes et dans les zones négligées (Reis *et al.*,2000).

➤ **Utilisation en médecine traditionnelle**

Dans la littérature certaines espèces de la famille des Astéracées sont référencées pour leur large utilisation en médecine traditionnelle à travers le monde, un large éventail d'effets thérapeutiques ont également été attribués aux espèces *Centaurea* (Kamanzi *et al.*, 1983; Yesilada, 2002). À cause de sa richesse en composés actifs bien distincts. Des variétés d'espèces de ce genre sont utilisées pour soulager la douleur et l'inflammation, les symptômes de la polyarthrite rhumatoïde, la fièvre et les maux de tête (Esra, 2009). Plus spécifiquement le genre *Centaurea calcitrapa* L est utilisé comme un antipyrétique (Mishio *et al.*, 2006).

I.2 Les métabolites d'origine végétale.

Les plantes contiennent des métabolites primaires qui peuvent être définis comme des molécules qui alimentent les grandes voies du métabolisme central (Ayad, 2013) et des métabolites secondaires qui sont des substances qui dérivent de ces derniers (Aharoni et Galili, 2011), et qui ne participent pas directement au développement de la plante (Kliebenstein et Osbourn, 2012). Contrairement aux métabolites primaires, les produits du métabolisme secondaire ne sont pas indispensables à la survie de l'individu mais à la survie de la population végétale dans son ensemble au sein de son biotope (Hartmann, 2007). Ils sont classés en trois grandes classes (Bruneton, 2009): les composés phénoliques, les composés terpéniques et les alcaloïdes.

I.2.1 Métabolites secondaires du genre *Centaurea*

I.2.1.1 Les composés phénoliques

Les polyphénols, qui sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, constituent l'un des groupes de substances les plus répandues et connues dans le règne végétal. Plus de 8000 structures phénoliques différentes ont été recensées, elles proviennent principalement de deux voies de synthèse: la voie du shikimate et la voie de l'acétate (Lugasi *et al.*, 2003). Ils sont classés en fonction du nombre de noyaux aromatiques et des substitutions qui les relient (Manallah, 2012). Tous ces composés partagent la caractéristique d'avoir au moins un ou plusieurs cycles benzéniques (C6) portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (OH) (Bruneton, 1993).

Chez les centaurees, on trouve une présence importante de polyphénols, notamment les flavonoïdes, des acides phénoliques et des phénols simples dans certaines espèces.

a) Les acides phénoliques

Les acides phénoliques appartiennent à une classe majeure de composés phénoliques chez les plantes et sont présents sous des formes libres et liées (Akkal, 2019). Les acides phénoliques identifiés dans *Centaurea calcitrapa L* sont : Acide gallique, Dihydroxybenzoyl hexoside, Acide caféo-hexarique, Acide ferulo-hexarique, Hexoside feruloylique (Dimkić *et al.*, 2020) .

b) Les flavonoïdes

Les flavonoïdes, qui tirent leur nom du mot latin "*flavus*" signifiant "jaune", constituent le plus vaste groupe de substances et appartiennent à la famille des polyphénols, plus de 6000 composés naturels ont été décrit et le chiffre n'arrête pas d'augmenter selon **Boukerreche et Zelligui (2019)**. Ils sont largement considérés comme des pigments végétaux presque universels (**Hodek et al., 2002**) et sont responsables des teintes jaunes, oranges et rouges observées dans différents organes végétaux (**Havasteen, 2002**). Ces composés peuvent exister sous forme libre (aglycone) ou sous forme de glycosides. On les trouve généralement dans toutes les plantes vasculaires, répartis dans divers organes, tels que les racines, les tiges, le bois, les feuilles, les fleurs et les fruits, où ils jouent un rôle important dans la protection des plantes (**Bruneton, 1993 ; Erlund, 2004**).

Les flavonoïdes sont synthétisés par la voie du polypropanoïde. Ils sont structurés par un squelette de base à 15 atomes de carbone constitués de deux cycles phényles, les cycles aromatique **A** et **B**, reliés par une chaîne à trois carbones (structure en C6-C3- C6). La chaîne en C3 entre les cycles **A** et **B** est communément cyclisée pour former le cyclehétérocyclique C4 (**Figure 03**) (**Azzouzi et Mekkiou, 2017**). Les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes (**Figure 04**) (**Edenharder et Grünhage, 2003**).

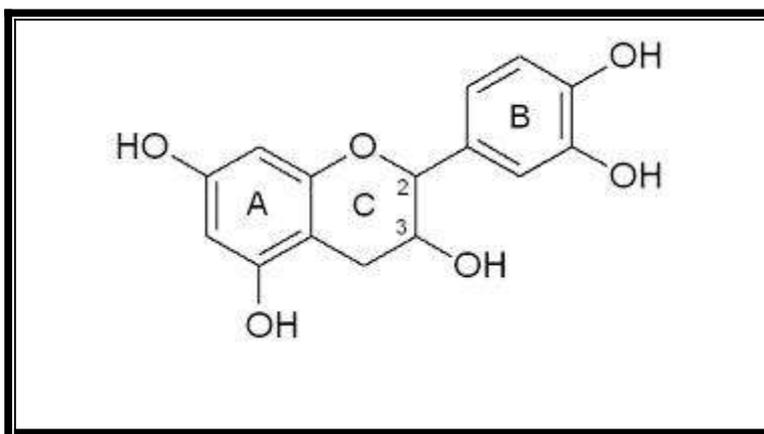


Figure 03 : La structure de base des flavonoïdes (**Azzouzi et Mekkiou, 2017**).

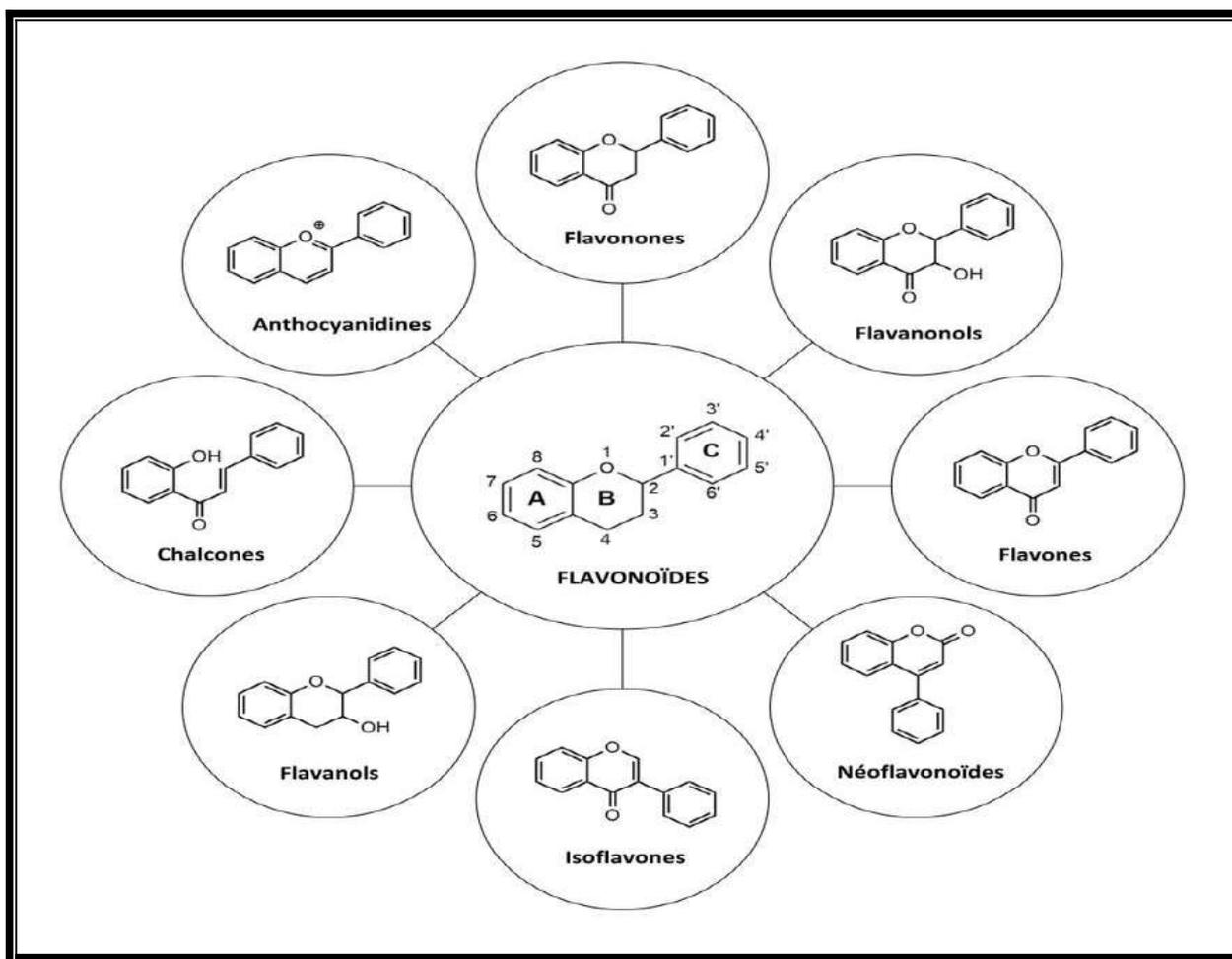


Figure 04 : Structure des principales classes des flavonoïdes (Edenharder et Grünhage, 2003)

Des études phytochimiques effectuées sur le genre *Centaurea* ont montré la richesse de ce dernier en flavonoïdes (Akkal *et al.*, 2007). Parmi ces flavonoïdes on cite des flavones, des flavanols, une seule flavanone, des O-glycosides de flavone, des glycosides de flavanol, deux glycosides de flavanone et des C-glycosides de flavone. Le tableau II regroupe quelques structures de flavonoïdes prédominants du genre *Centaurea*, et le tableau III capitule les flavonoïdes isolés de *Centaurea calcitrapa* L.

Tableau II : Les structures de quelques flavonoïdes dans le genre *Centaurea*.

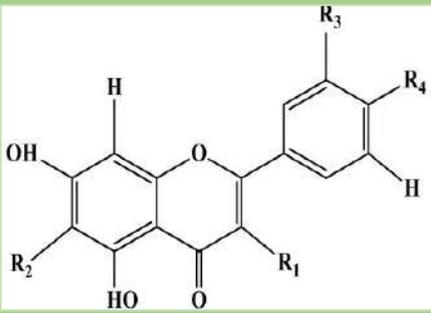
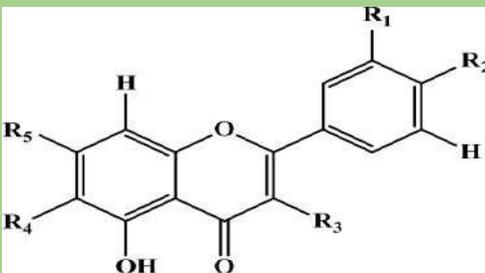
Structure de base des flavonoïdes							
							
Composé	R1	R2	R3	R4	Plante	Type de composé	Référence
Apigénine	H	H	H	OH	<i>C. furfuracea</i>	Flavone glycoside	(Akkal <i>et al.</i> , 2003)
Hispiduline	H	OME	H	OH	<i>D. fragilis</i>	Flavanone glycoside	(Azzouzi <i>et al.</i> , 2016)
Quercétine	OH	H	OH	OH	<i>C. napifolia</i>	flavonol	(Akkal <i>et al.</i> , 2003)
Kaempférol	OH	H	H	OH	<i>C. microcarpa</i>	Flavonol glycoside	(Louaar <i>et al.</i> , 2011)

Tableau III : Les flavonoïdes isolés de *Centaurea calcitrapa L* (Bencherait, 1989 ; Kitouni, 2007).

Structure de base des flavonoïdes					
					
Composé isolé	R1	R2	R3	R4	R5
Hispiduline	H	OH	H	OMe	OH
3-O-rutinosylkaempférol	H	OH	O-rutin	H	OH
3-O-glucosylquercétine	OH	OH	O-glu	H	OH

I.2.1.2 Les triterpènes

Les triterpènes sont des terpénoïdes qui se trouvent dans une vaste gamme d'organismes, y compris l'Homme, les plantes, les champignons, les bactéries, et les amphibiens. Parmi eux, on trouve des molécules d'une grande importance, telles que les stéroïdes (par exemple; la

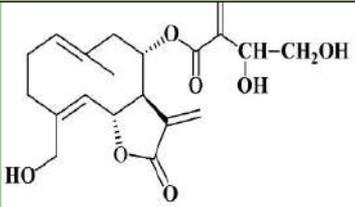
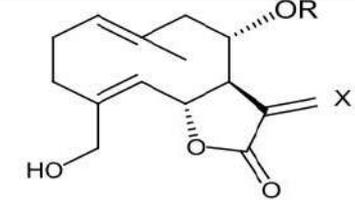
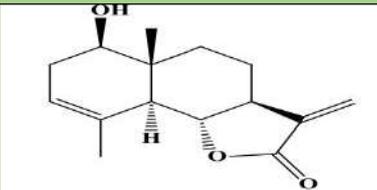
testostérone). D'autres types qui comprennent les stérols (par exemple; β -sitostérol), qui sont des stéroïdiens tétra cycliques courants (Barnes, 2018). La β -sitostérol et 3-amyrin font partie des constituants du genre *Centaurea calcitrapa* L. de la famille des astéracées (Al-easa et Rizk, 1992).

I.2.1.3 Les sesquiterpènes lactone

Une molécule de sesquiterpène est composée de 15 atomes de carbone. Les sesquiterpènes se divisent en plusieurs catégories structurales, à savoir acyclique, monocyclique, bicyclique, tricyclique et polycyclique. On les retrouve notamment dans les huiles essentielles. Une grande variété de sesquiterpènes comprend un cycle γ -lactone et sont connus sous le nom de sesquiterpènes lactones (Barnes et al., 2007).

Le genre *Centaurea* est caractérisé par la présence des lactones sesquiterpéniques dont la majorité est de type guaianolide et germacranolide, tableau IV (Marco et al., 2005; Çelik et al., 2006), cependant des élémanolides, des eudesmanolides ainsi que des héliangolides y ont été isolés de plusieurs espèces de ce genre (Karamenderes et al., 2007; Nacer et al., 2012). Le tableau ci-dessus rapporte quelques exemples de lactones sesquiterpéniques isolées du genre *Centaurea*.

Tableau IV : Quelques lactones sesquiterpéniques isolés des centaureés.

Espèce	Nom de composé	Structure	Référence
<i>Centaurea parviflora</i>	La cnicine		(Belkacem et al., 2014)
<i>Centaurea lippii</i>	La cnicine R= (1', 2' -OH-Et) Acr X= CH ₂		(Mezache, 2002)
<i>Centaurea acaulis</i> L.	santamarine		(Bentamene et al., 2005)

I.2.1.4 Les huiles essentielles

La teneur en huile essentielle des espèces de *Centaurea* est caractérisée par la présence de squelettes sesquiterpéniques (caryophyllène, eudesmol et germacrène); d'hydrocarbures (docosane, penta et heptane); d'acides gras (acides hexadécanoïque, tétradécanoïque et dodécanoïque) et monoterpènes (aspène, terpinène et carvacrol). Certains composés volatils chez les centaures algériennes ont été enregistrés, comme constituants de l'huile essentielle de *C. calcitrapa*, *C. choulettiana*, *C. pullata*, obtenus par distillation à la vapeur (Akal et Ayad, 2019).

Tableau V: Principaux constituants et rendements des huiles essentielles de quelques Centaurées.

Espèce	Rendement	Principaux constituants	Référence
<i>C. calcitrapa</i>	0,01%	β -Caryophyllene (5,3%) 6,10,14 Trimethylpentadecan-2-one (4,7%) (Z) - β -Farnesene (4,2%).	(Dob et al., 2009)
<i>C. pullata</i>	0,03%	Caryophyllene oxide (27,0%) Phytol isomer (16,5%) 6,10,14-Trimethyl 2-pentadecanone (14,9%)	
<i>C. pullata</i>	0,03%	Caryophyllene oxide (38,5%) Aldehydes (16,3%) Heneicosane (8,6%)	(Djeddi et al., 2011)
<i>C. choulettiana</i>	0,02%	β -Eudesmol (6,8%) 1,5-Epoxysalvia-4(14)-ene (6,6%) Caryophyllene oxide (4,28%)	(Azzouzi et al., 2016)

I.2.1.5 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe diversifié de bases organiques (Akkal et Ayad, 2019), contenant des amines secondaires, tertiaires ou cycliques, comprenant généralement les substances basiques ayant un ou plusieurs atomes d'azote, assemblées principalement dans le cadre d'un système cyclique (Harinder et al., 2007).

Ce sont des produits naturels présents dans diverses sources, telles que les plantes, les champignons, les bactéries, les amphibiens, les insectes, les animaux marins et les humains, qui contribuent aux préparations pharmaceutiques, offrant un large éventail d'activités biologiques, utilisés par l'Homme primitif pour soulager la douleur comme stimulants récréatifs (Douglas et

Mark, 2018). Beaucoup d'entre eux ont des activités physiologiques et neurologiques dramatiques (Harinder *et al.*, 2007).

I.3 Pathologies infectieuses, Résistance aux antibiotiques et Activités biologiques des métabolites secondaires des Centaurées

I.3.1 Les activités biologiques des métabolites secondaires des Centaurées

Au cours de ces dernières décennies, l'investigation biologique des extraits et des constituants chimiques des espèces du genre *Centaurea*, a montré que ces derniers possèdent diverses activités biologiques.

On a les lactones sesquiterpéniques, sont très intéressantes dans le domaine biologique et pharmacologique. Ces substances présentent plusieurs propriétés **Tableau VI**. L'activité des lactones sesquiterpéniques est liée à la présence du groupement α méthylène- γ -lactone (Hladoń *et al.*, 1975),

Tableau VI : Les activités biologiques de quelques lactones sesquiterpéniques des centaurées.

Lactones sesquiterpènes	Activités biologiques	Référence
Melitensine	Antibactériennes et antifongique.	(Djeddi <i>et al.</i> , 2008)
Cnicine	Cytotoxique.	(Mezache, 2002)
Onopordopicrine	Cytotoxique, Antifongique, Antibactérienne.	(Lonergan <i>et al.</i> , 1992)
Salonitenolide	Cytotoxique.	(Shoeb <i>et al.</i> , 2007)
Costunolide	Antioxydante, anti-inflammatoire, anti-microbien, antiallergique, remodelage osseux, neuroprotecteur, stimulant la pousse des cheveux, anticancéreux et antidiabétique.	(Kim et Choi, 2019)
Santamarine	Anticancéreux, antibactérien, anti-inflammatoire.	(Jalal <i>et al.</i> , 2020)

De plus, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît plusieurs activités (**Tableau VII**); tel que des activités antioxydante (Kubacey, 2012; Labed, 2012), antiulcéreux, antiallergique, anti-inflammatoire (Hope, 1983; Middleton, 1994; Kubacey, 2012), antitumorale, antivirale (Aliouche, 2019), antispasmodique, cytotoxique, anticarcinogène (Bulut, 2019), et antidépressive (Butterweck, 2000).

Tableau VII : Les activités biologiques de quelques flavonoïdes des centaures.

Flavonoïdes	Activités biologique	Références
Quercétune	Anti-inflammatoires, antispasmodique, anti-ulcère, analgésique, antidiabétique, anticancer, antithérogénique.	(Van Hoof <i>et al.</i> , 1984) (Brasseur, 1989) (Emin <i>et al.</i> , 1994)
Kaempférol	Anti-ulcère, antispasmodique, anticancer.	
Apigénine	Anti-inflammatoires, antispasmodique.	
Hypolaëtin-8- β -D-glucoside	Anti-inflammatoires	
Flavone	Anti-ulcère, antispasmodique.	

Les espèces de *Centaurea* sont anti-microbiennes et antifongiques (Aras-Perk *et al.*, 2011). *Centaurea calcitrapa* L présente une action antibactérienne potentielle contre les agents pathogènes bactériens multi résistants. Plus précisément, elle présente un effet antibiotique remarquable, comme un témoignent les zones d'inhibition observées lors des tests contre certaine bactérie telle que *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* et plus efficacement sur *Staphylococcus aureus* qui montre une Concentration Minimale Inhibitrice efficace, tandis qu'*Escherichia coli* est résistante. Le cnicin et les sesquiterpènes lactones sont les agents responsables de cette activité (Oriani *et al.*, 2004). *Centaurea calcitrapa* L, c'est une plante qui peut être considérée comme plus efficace que la plupart des antibiotiques commerciaux (El-Sherbiny *et al.*, 2016).

I.3.2 Les maladies infectieuses d'origine bactériennes

On appelle maladies infectieuses, une maladie qui résulte de la présence et du développement des micro-organismes. Ce développement est suivi par l'apparition de signes cliniques. Les maladies infectieuses sont les maladies les plus fréquentes, plus d'un tiers des malades hospitalisés reçoivent au moins un antibiotique. On distingue les maladies bactériennes dues aux bactéries et les maladies virales dues aux virus. Les infections peuvent être également d'origine fongique ou parasitaire (Labayle, 2000). Tous les micro-organismes n'ont pas les mêmes capacités à provoquer des infections, certains étant pratiquement toujours associés à des manifestations cliniques, alors que d'autres provoquent rarement des maladies (pathogènes opportunistes) (Petignat *et al.*, 2006).

Les infections bactériennes, sont définies comme la colonisation de l'organisme infecté par une bactérie capable de lui causer une maladie et provoquer des troubles chez l'hôte. Les bactéries sont des micro-organismes remarquablement adaptables à l'origine de maladies graves ou de

simple colonisation de la peau. Elles sont capables de survivre et se multiplier dans l'environnement et certaines forment des spores qui survivent pendant des décennies. D'autres ne peuvent survivre qu'au contact intime de leur hôte. Alors que la plupart des bactéries se répliquent en quelques heures ou jours. D'autres ont une croissance beaucoup plus lente, entraînant des infections chroniques difficiles à traiter (**Hart et Shears, 1997**). Les bactéries sont généralement classées en deux groupes principales: les bactéries Gram-positives et les bactéries Gram-négatives, selon leur réaction à la coloration de Gram. Les bactéries ont un important potentiel d'adaptation génétique, elles contiennent souvent de l'ADN plasmidique, capable de transférer du matériel génétique au sein de l'espèce ou vers des espèces différentes. Cette adaptabilité génétique peut accroître à la fois leur pouvoir pathogène et leur résistance aux antibiotiques (**Hart et Shears, 1997**).

Le traitement des infections bactériennes repose généralement sur des antibiotiques ciblant spécifiquement les bactéries responsables de l'infection. Cependant, la résistance aux antibiotiques est devenue un problème croissant, rendant le traitement des infections bactériennes plus complexe.

I.3.3 Facteurs de pathogénicité microbienne

Les microbes pathogènes possèdent de nombreuses stratégies de virulence sophistiquées qui sont conçues pour surmonter les mécanismes de défense de l'hôte, généralement efficaces qui défendent contre l'exposition continue aux microbes. Ces mécanismes de virulence ciblent un ou plusieurs processus cellulaires normaux des hôtes, et c'est l'action collective de ces mécanismes qui aboutit finalement à la maladie (**Patrice et Emmanuel, 2005**). Les facteurs de pathogénicité microbienne sont des caractéristiques spécifiques des micro-organismes qui leur permettent de provoquer des maladies chez les hôtes. Ces facteurs sont essentiels pour que les microbes envahissent, colonisent, se multiplient et échappent aux défenses de l'organisme hôte. Les principaux facteurs de pathogénicité microbienne : la capsule, celle-ci empêche la phagocytose, ce qui les rend plus virulents. Les enzymes, des protéines bactériennes qui ont une activité enzymatique, désorganisent les tissus et aident à la diffusion locale des bactéries. Les toxines, des molécules protéiques qui peuvent déclencher une maladie ou l'aggraver, en se fixant sur des récepteurs spécifiques des cellules cibles. D'autres facteurs se trouvent capables de rendre le micro-organisme plus virulent, grâce à leurs capacités de perturber la production d'anticorps, la résistance à l'effet lytique du complément sérique et les étapes oxydatives de la phagocytose et enfin la production des super antigènes (**Bush et al., 2020**).

I.3.4 Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des agents dont la toxicité sélective résulte d'un mode d'action spécifique. Ils agissent à faible dose pour inhiber la croissance des micro-organismes ou pour les détruire (**Bowassa et al., 2022**). Ils peuvent être produits de manière naturelle par des champignons et des bactéries ou obtenus par synthèse et hémisynthèse (**Coulibaly, 2007**). Ils ont deux modalités d'action (**Veyssiere, 2019**):

- ✧ Un effet bactériostatique provoque une inhibition réversible de la croissance des germes dans un milieu donné.
- ✧ Un effet bactéricide entraîne la mort du germe.

Nous avons recours à leur utilisation de deux manières, selon leur spectre d'activité, c'est pour cela que l'on oppose les traitements documentés aux traitements dits probabilistes :

1/ Les traitements probabilistes sont administrés sans avoir une connaissance précise de la bactérie impliquée, ni même de sa sensibilité aux antibiotiques. On utilisera alors les antibiotiques dits à "large spectre", le choix de la molécule est basé sur les micro-organismes infectants les plus probables avec un risque minimum d'allergie ou de toxicité.

2/ Les traitements documentés sont administrés après avoir déterminé la sensibilité des bactéries à l'antibiotique, ce qui sous-entend d'avoir préalablement isolé la bactérie en cause. Ce traitement peut être de première intention ou faire suite au traitement probabiliste une fois les données nécessaires sont connues.

Leur classification est multiple, elle peut se faire selon :

1. La nature chimique car il existe souvent une structure de base sur laquelle il y a une hémisynthèse définissant ainsi une famille d'antibiotique (Ex : β -lactamines).
2. Le site d'action spécifique à chacun :
 - ✧ Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne (β -lactamines, glycopeptides, fosfomycine).
 - ✧ Inhibition de la synthèse protéique (aminosides, cyclines, phénicolés, acide fusidique, macrolides, oxazolidinones, mupirocine, synergistines).
 - ✧ Action sur la synthèse des acides nucléiques (quinolones, nitroimidazolés, rifamycines, sulfamides triméthoprime).
 - ✧ Action sur les membranes (polymyxines, daptomycine).

La création des antibiotiques a commencé en 1877, lorsque **Louis Pasteur** a découvert que la croissance de l'anthrax pathogène pourrait être inhibée par des bactéries saprophytes. Puis, en 1928, la plus importante contribution au monde des antibiotiques s'est produite lorsqu'**Alexander Flemming** a fait la découverte qui a conduit à la pénicilline. Depuis les années 1970, la plupart des nouveaux antibiotiques sont des modifications synthétiques d'antibiotiques naturelles. Le processus de création d'antibiotiques est la fermentation et elles sont principalement utilisées pour les infections bactériennes (**Hart et Shears, 1997**). La prescription d'une antibiothérapie adaptée est fondamentale dans la prise en charge précoce du choc septique. Lorsqu'elle est probabiliste inadaptée, elle peut-être définie comme l'absence d'antibiotique actif sur la bactérie responsable de l'infection, ou l'utilisation d'un antibiotique vis-à-vis duquel la bactérie responsable de l'infection est résistante. Ce traitement doit être actif contre les bactéries habituellement responsables de l'infection suspectée, mais la difficulté est donc de prescrire une antibiothérapie adaptée en l'absence de documentation bactériologique (**Leone et al., 2011**).

I.3.5 La résistance bactérienne

La résistance bactérienne est un phénomène naturel qui survient lorsque les bactéries développent la capacité de survivre et de se multiplier en présence d'agents anti-microbiens tels que les antibiotiques. Ceux-ci deviennent connus sous le nom de « Multi Drug Resistant » (MDR) ou plus communément « Super bugs ». Ce processus peut se produire de différentes manières et peut être favorisé par l'utilisation excessive ou inappropriée d'antibiotiques. Le plus connu de ces super bactéries est le MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*). Ces super bactéries doivent souvent être traitées avec une combinaison de puissants antibiotiques (**Jones, 2016**). Cette résistance peut être due à des mutations génétiques spontanées avec activation ou modification de déterminants chromosomiques déjà présents dans le génome bactérien ou la conséquence de l'acquisition de gènes situés sur des éléments génétiques mobiles (**Vincent, 2004**). Bien que cela puisse également être attribué à l'utilisation généralisée des antibiotiques. Nos corps sont devenus tellement habitués à les utiliser, qu'ils n'ont plus l'impact souhaité sur notre système immunitaire (**Jones, 2016**).

I.3.5.1 Mécanismes de résistance bactérienne

Les bactéries ont développé certains mécanismes courants de résistance, on cite:

La mutation génétique: les bactéries peuvent acquérir des mutations génétiques aléatoires qui leur confèrent une résistance aux antibiotiques. Ces mutations peuvent affecter les cibles des antibiotiques dans les cellules bactériennes, ce qui empêche les médicaments de les éliminer

efficacement. **Échange de gènes:** les bactéries peuvent transférer des gènes de résistance à d'autres bactéries, y compris à des espèces différentes, grâce à des mécanismes tels que la conjugaison, la transformation et la transduction. Cela permet une propagation rapide de la résistance entre différentes souches bactériennes. **Production d'enzymes inactivant:** certaines bactéries produisent des enzymes capables de désactiver les antibiotiques, les rendant inefficaces. Par exemple, les bêta-lactamases dégradent les bêta-lactamines, une classe d'antibiotiques qui comprend la pénicilline. **Réduction de perméabilité de la membrane:** les bactéries peuvent modifier leur membrane cellulaire pour limiter l'entrée des antibiotiques dans la cellule, les rendant moins sensibles à leur action. Les bactéries Gram-négatives ont une résistance élevée par rapport aux bactéries Gram-positives et cela est dû à la membrane externe hautement hydrophobe qui agit comme barrière de perméabilité principalement pour les composés hydrophiles (El-Sherbiny, 2016). **Efflux actif des antibiotiques:** les bactéries peuvent développer des mécanismes d'efflux actif, qui pompent activement les antibiotiques hors de la cellule avant qu'ils ne puissent agir (Akhtar *et al.*, 2015). **Formation de biofilms:** les bactéries résistantes peuvent former des biofilms, qui sont des agrégats de cellules adhérant à des surfaces, ce qui les rend plus difficiles à éliminer par les antibiotiques et le système immunitaire. **Altération de la cible:** certaines bactéries modifient les cibles des antibiotiques, telles que les récepteurs ou les protéines, rendant l'action des médicaments inefficace (Anne *et al.*, 2020).

La prise d'antibiotiques engendre quelques inconvénients, et va altérer notre microbiome et contribuer à augmenter ce réservoir de gènes de résistance que nous portons. Ceci en cas d'infection bactérienne, mais également lorsqu'ils sont inutiles par exemple dans le cas d'une infection virale, comme le rhume ou la grippe contre lesquelles les antibiotiques n'ont aucune action. Le microbiome nous protège contre les infections en empêchant la colonisation par des bactéries potentiellement pathogènes, c'est l'effet barrière. La prise inutile ou un sous-dosage d'un antibiotique a donc un double effet négatif pour un individu en altérant son microbiome et sa barrière protectrice et en sélectionnant des bactéries résistantes. Elle peut ainsi augmenter le risque d'une infection ultérieure difficile à traiter.

En vue des innombrables méfaits que présentent les antibiotiques d'origine chimique, la science opte pour une alternative pour soigner les patients d'une manière plus efficace, plus économiques et surtout sans causer de risques supplémentaires ou d'effets secondaires au patient. Les végétaux aux vertus curatives se sont avérés être un candidat de choix pour répondre à ces attentes, et le choix de notre étude s'est porté sur les centaurees, et plus exactement, *Centaurea calcitrapa* L, connue pour ses multiples composés ayant servi en médecine traditionnelle et moderne.



Chapitre II

Matériel et Méthodes



II.1 Matériel

II.1.1 Matériel biologique

II.1.1.1 Choix de la plante ‘ *Centaurea calcitrapa* L ‘

Nous avons opté pour la plante *Centaurea calcitrapa* L en raison de ses effets thérapeutiques bien documentés dans la littérature scientifique. Cette plante a été récoltée dans la région de Ziama Mansouriah, Wilaya de Jijel, Algérie, le 29 Avril 2023.

II.1.1.2 Choix des souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* des isolats fournis par Mme Kada Benachour Karima affiliée au Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'Université de Béjaïa.

II.1.2 Produits chimiques et équipements

Milieus de culture (Annexe 2)	<ul style="list-style-type: none"> ● Bouillon nutritif ● Bouillon Muller Hinton ● Gélose Chapman 	<ul style="list-style-type: none"> ● Gélose nutritif ● Gélose Muller Hinton ● Gélose Hectoen
Solvants et réactifs	<ul style="list-style-type: none"> ● Acide sulfurique H₂SO₄. ● Eau distillée. ● Eau de Javel. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Eau physiologique. ● Ethanol 96%. ● Chlorure de baryum BaCl₂. ● Standard de Mc Farland (Annexe 2).
Appareillages	<ul style="list-style-type: none"> ● Autoclave. ● Balance. ● Bec benzene. ● Broyeur électrique. ● Bain-marie. ● Etuve. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Plaque chauffante ● Rota vapeur. ● Spectrophotometre. ● Tamiseur manuel 25um. ● Vortex.
Verrerie et autres	<ul style="list-style-type: none"> ● Bécher. ● Barreau magnétique. ● Boite de pétri. ● Cuve de spectrophotomètre ● Ecouvillons. ● Erlenmeyer. ● Entonnoir. ● Epruvette graduée. ● Eppendorf. ● Fioles. ● Flacons. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Parafilm. ● Microplaques. ● Micropipette. ● Papier film. ● Papier absorbant. ● Papier aluminium. ● Pipettes Pasteur. ● Anse de platine ● Pince. ● Spatule. ● Tubes à essai.

II.2 Méthodes

II.2.1 Préparation des poudres sèches

Après avoir soigneusement séparé toutes les parties; les feuilles (**Figure 05**) et les graines de la plante fraîche *C. Calcitrapa* L, nous les avons sélectionnées et séchées les feuilles dans une étuve à 40°C pendant 24 heures.



Figure 05 : Feuilles sèches de *Centaurea calcitrapa* L.

Après le séchage des feuilles nous les avons broyées à l'aide d'un broyeur électrique, ensuite tamisées manuellement (250 μ m) afin d'obtenir une poudre fine (**Figure 06**).



Figure 06 : Poudre des feuilles obtenue à partir des feuilles de *Centaurea calcitrapa* L.

La poudre résultante a été conservée dans un flacon en verre fumé hermétiquement fermé afin de la protéger de la lumière et de l'air.

II.2.2 Méthode d'extraction

L'extraction est une technique de séparation importante. Elle est généralement appliquée comme première étape dans la récupération de métabolites primaires et secondaires (Schügerl, 2005). Dans la littérature, il existe plusieurs méthodes d'extraction des métabolites secondaires, tels que les composés phénoliques, les terpéniques et les alcaloïdes. L'extraction adoptée dans cette étude est l'extraction par macération éthanolique, qui est un procédé utilisé pour extraire à froid les substances aromatiques et/ou colorantes de matières solides, tels que les végétaux (fruits, feuilles, graines, racines - frais ou secs), ceci en les mettant dans de l'alcool pendant une certaine durée.

Les poudres sèches de *C. Calcitrapa L* ont été extraites par macération à froid selon la méthode de Bohui *et al.* (2018). 75g de poudre de feuilles ont été mélangés avec 750ml de solvant éthanolique (96%). Les suspensions ont été agitées pendant 24 heures, puis décantées et centrifugées pendant 15 minutes (Figure 07). Une deuxième macération a été réalisée en ajoutant 250 ml d'éthanol à la poudre obtenue, afin d'assurer son épuisement. Les surnageants obtenus ont ensuite été séchés au rotavapeur à 40°.



A



B

Figure 07 : Extraction par macération éthanolique de la poudre des feuilles de *C.calcitrapa L*.

(**A**: Les suspensions sous agitation **B**: Les suspensions après la décantation).

Le rendement de cette extraction est exprimé en pourcentage et déterminé par le rapport entre le poids du matériel végétal et celui de l'extrait sec, selon **Bohui et al. (2018)**, avec la formule suivante :

$$(\%) = (P_1 - P_0) / E .100$$

P_0 = Poids des boîtes de pétri vides (g).

P_1 = Poids des boîtes de pétri contenant l'extrait après évaporation du solvant (g).

E = poids de la matière végétale initiale (g).

II.3 Préparation des solutions d'extrait de *Centaurea calcitrapa* L

Les solutions d'extrait sont préparées par l'ajout de 0,5ml de DMSO et 2 ml d'eau distillée, respectivement, à chaque 50 mg d'extrait de *C. calcitrapa* L, afin d'obtenir des concentrations de 5mg/ml sur chaque disque d'antibiogramme. Les solutions obtenues ont été mises au vortex afin d'assurer leurs solvations, puis filtrées par des seringues à filtre (0,45µm) dans des tubes Eppendorf stériles.

II.3.1 Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux d'extrait éthanolique de *C. calcitrapa* L a été mené par la méthode de Folin-Ciocalteu, selon **Ali-Rachedi et al. (2018)**, par le mélange de 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu à 1N, avec 800µl de carbonate de sodium (Na_2CO_3) et 200 µl des solutions d'extrait à différentes concentrations, les tests préparées ont été incubés à l'abri de la lumière pendant 30min, puis leurs absorbances ont été enregistrées par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760nm. Ce dosage a été réalisé à partir de dilutions de solutions d'extraits préparées par la dissolution de 20mg d'extrait sec (feuilles de *Centaurea calcitrapa* L) dans 2ml de l'éthanol (96%).

La courbe d'étalonnage est réalisée avec différentes concentrations de l'acide gallique (125; 62.5; 31; 15; 7 mg/ml) dissout dans de l'éthanol (96%). Les tests ont été menés en trois essais pour chaque concentration contre un blanc.

II.4 Méthodes microbiologiques

II.4.1 Effet antibactérien de l'extrait de feuilles de *C. calcitrapa* L

Le laboratoire de bactériologie clinique aide à la thérapeutique par l'évaluation de la sensibilité des agents pathogènes aux différents agents antibactériens par la réalisation des antibiogrammes (Durosoir *et al.*, 1979). C'est par la réalisation de cette procédure que nous avons évalué dans cette étude la sensibilité des différentes souches bactériennes aux différentes concentrations de l'extrait de feuilles de *Centaurea calcitrapa* L à travers les étapes suivantes:

II.4.1.1 Préparation de l'inoculum bactérien

L'inoculum standard pour chaque souche a été préparé par la méthode de Cattoen et Jehl (2019), comme suit:

- ◆ Après la désinfection et la stérilisation de la zone de travail, les souches bactériennes ont été repiquées dans un bouillon nutritif et incubées dans une étuve à 37°C pendant 18heures.
- ◆ Ces souches ont été ensuiteensemencées par stries à l'aide d'une pipette Pasteur sur des boites de pétri, pré-coulés de la gélose spécifique de chaque bactérie, puis incubées à 37°C pendant 24h, afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées, seront utilisées pour la préparation de l'inoculum.
- ◆ Utiliser une anse de platine, pour gratter quelques colonies bien séparées et identiques de la souche bactérienne à tester, décharger dans un tube à essai stérile contenant du sérum physiologique, puis homogénéiser à l'aide d'un vortex.
- ◆ La lecture de la densité optique de la suspension bactérienne (0,08 à 0,10) a été faite à la longueur d'onde 630 nm et qui doit être égale à la densité optique du standard McFarland 0.5 préalablement préparé.

II.4.1.2 Méthode de diffusion en milieu solide (sur disque)

L'activité anti-microbienne des extraits a été testée *in vitro* par la méthode de diffusion sur gélose ou méthode des disques, qui est l'une des plus anciennes approches de détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et demeure l'une des méthodes les plus utilisées en routine. Elle convient pour la majorité des bactéries pathogènes incluant les bactéries à croissance lente qui permet le choix parmi une variété d'antibiotiques.

La technique utilisée dans ce test est celle décrite par **Bouguetof *et al.* (2016)**:

Après la préparation des boîtes de pétri coulées avec la gélose semi solide (Mueller-Hinton), on a réalisé des tapis bactériens en ensemencant l'inoculum standard par écouvoinage.

- ◆ À l'aide d'une pince stérilisée au bec benzène, les disques de papier Whatman ont été déposés à la surface de la gélose inoculée.
- ◆ Différentes concentrations de la solution d'extrait ont été déposées sur les disques contre un blanc au centre de chaque boîte.
- ◆ Les boîtes ont été incubés à l'étuve directement pendant 24h à 37°C.
- ◆ La sensibilité a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques.

Les mêmes tests ont été repris avec une diffusion au réfrigérateur, avant l'incubation à l'étuve pendant 24h à 37°C, afin de permettre une meilleure diffusion de l'extrait.

Par ailleurs, l'activité antibactérienne de l'acide gallique et l'acide tannique a été menée par la même procédure, à défaut de remplacer l'extrait végétal par l'acide gallique puis par l'acide tannique à deux concentrations (2,5 mg/ml et 5 mg/ml).

II.4.1.3. Test de caractérisation du type de l'effet antibactérien

Les tests d'effet antibactérien sont des expérimentations menées en laboratoire pour évaluer l'efficacité d'un agent anti-microbien (comme un médicament ou un produit chimique) contre des bactéries spécifiques. Ces tests permettent de déterminer si un agent a un effet bactéricide ou bactériostatique sur les bactéries. Après avoir réalisé la diffusion sur milieu gélosé et obtenu les résultats, la procédure suivante a été mise en œuvre :

- ◆ Des échantillons provenant des zones d'inhibition ont été prélevés, puis placés dans un bouillon nutritif pendant 48 heures à l'étuve.
- ◆ Les résultats ont été observés après 24h et 48h afin de constater une présence ou absence d'une nouvelle croissance bactérienne en absence de l'inhibiteur (extrait de *C. calcitrapa* L, acide gallique, acide tannique).

II.4.1.4 Détermination des CMI sur milieu liquide (Microplaque 96 puits)

La méthode de micro-dilution a pour but de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des divers antibiotiques vis-à-vis d'une souche microbienne . Les tests ont été réalisés pour l'extrait des feuilles de *Centaurea calcitrapa* L sur des microplaques stériles de 96 puits, . Ce test a été mené selon la méthode de **Hilpert Kai et al. (2008)**.

Cette technique repose sur la mise en culture d'un inoculum bactérien standardisé en présence de séries de dilutions de l'extrait à partir d'une solution mère, il est réalisé selon les étapes suivantes :

- ◆ **Témoin négatif** : un volume de 200µl de bouillon MH a été déposé dans les puits.
- ◆ **Témoin positif** : Les puits contenaient 100µl de bouillon MH et 100µl de la suspension bactérienne.
- ◆ **Test blanc de l'extrait** : Un volume de 160µl de bouillon MH et 40µl d'extrait des feuilles de *Centaurea calcitrapa* L (ou bien d'acide tannique) ont été déposés.
- ◆ **Test de l'extrait** : Les tests de l'extrait des feuilles de *Centaurea calcitrapa* L ont été réalisés par une série des dilutions à moitiés à partir des premiers puits(contenant 160µl de bouillon MH et 40µl d'extrait) jusqu'au 6ème puits de chaque colonne, en prélevant 100µl

des puits précédents et l'ajouter au suivants de sorte d'obtenir une gamme de concentration d'extrait allant de 4mg/ml à 0,125mg/ml par puits, enfin 100µl de la suspension bactérienne (inoculum standard) ont été rajoutés dans chaque puits.

Les microplaques ont été recouvertes et incubées à 37°C pendant 24h. La lecture des résultats a été faite par une évaluation visuelle quant à l'absence de la croissance bactérienne.

Résultats



Et Discussion.

III.1 Résultats du rendement de l'extraction et du dosage des polyphénols totaux

Notre étude a été réalisée sur l'espèce *Centaurea calcitrapa* L (Feuilles) de la famille des Astéracées, dont on a effectué une extraction par macération réalisée en deux étapes, en utilisant l'éthanol (96%).

Le rendement obtenu de cette extraction est de 25,89%. En vue de ce pourcentage on constate que le choix du solvant d'extraction revêt une importance primordiale, car il engendre une augmentation significative de la teneur totale en métabolites extraits de feuilles de *Centaurea calcitrapa* L. Dans cette étude, le solvant d'extraction utilisé est de l'éthanol (96%), visant l'extraction d'une large gamme de métabolites, plus particulièrement phénoliques. L'étude de **Dimkić et al., (2020)** qui trouve que le rendement d'extraction augmente avec l'augmentation de la polarité du solvant d'extraction utilisé, par conséquent, ces résultats peuvent être modifiés si on change le solvant d'extraction.

Le dosage des polyphénols totaux dans cet extrait a été déterminé par spectrophotométrie, selon la méthode colorimétrique qui implique l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu. Ce test repose sur la mesure de la concentration totale des groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Il nous offre une estimation de la quantité de diverses classes de composés phénoliques présente dans l'extrait éthanolique des feuilles de *Centaurea calcitrapa* L. Les résultats de ce dosage sont exprimés en microgrammes équivalents à l'acide gallique par milligramme d'extrait, en utilisant l'équation de régression linéaire ($Y = 0,0098X + 0,0015$)(Y =Absorbances des extraits; X = Concentration en polyphénols totaux) déduite de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Figure 08**).

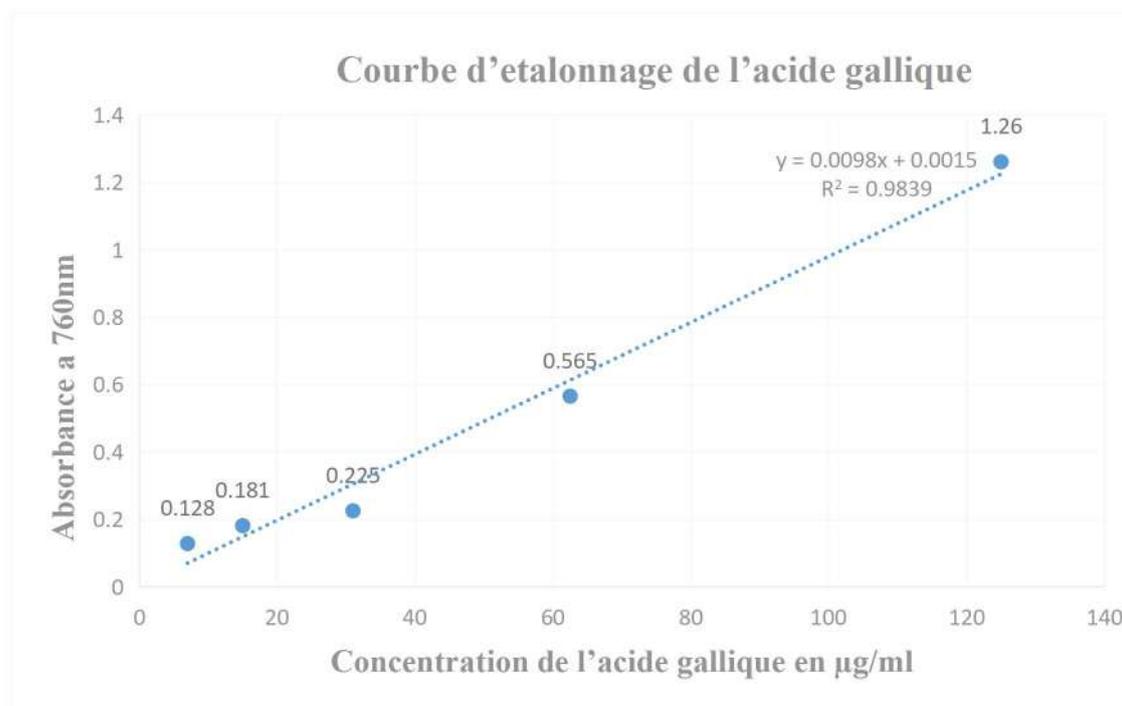


Figure 08 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des phénols totaux réalisée par différentes concentrations d'acide gallique.

Pour *Centaurea calcitrapa* L on a dilué 10mg/ml d'extrait des feuilles de la plante à 1/10, et on a obtenu une absorbance d'une valeur de 0,610 équivalent à celles de l'acide gallique, les résultats ont montré que l'extrait éthanolique est dosé en polyphénols, avec une teneur moyenne de 62,24 ±0,565 mg EAG/ g d'extrait.

En se basant sur les résultats obtenus grâce à la méthode de dosage des polyphénols totaux avec le réactif Folin-Ciocalteu, il a été observé que l'extrait issu de *C. calcitrapa* L contient une quantité appréciable de polyphénols. *Centaurea calcitrapa* L est réputée pour contenir une quantité significativement plus élevée de flavonoïdes, notamment l'apigénine, selon l'étude phytochimique d'Akkal et Ayad (2019).

Selon l'étude de Cherbal et al. (2012), il est aussi important de tenir compte des caractéristiques structurales chimiques des composés polyphénoliques lors de l'application du réactif de Folin-Ciocalteu pour le dosage des polyphénols. C'est à dire, en plus de la quantité des polyphénols résultants grâce à cette méthode, la nature même de ces derniers est à prendre en considération car cela peut influencer la réaction du réactif et donc les résultats de l'analyse.

III.2 Résultats des tests antibactériens

III.2.1 Résultats du test de diffusion sur milieu solide (Disques) :

Les diamètres des zones d’inhibition obtenus autour des disques imbibés en extrait éthanolique, de *Centaurea calcitrapa* L (Feuilles) à différentes concentrations (0,5mg, 1mg, 1,5mg, 5mg par disque), pour les souches utilisées après 24h d’incubation à 37C° sont représentés dans le tableau VIII .

Tableau VIII: Tableau comparatif des diamètres des zones d’inhibition (mm) de la croissance bactérienne sans/ avec diffusion au réfrigérateur en fonction des différentes concentrations en extrait des feuilles de *Centaurea calcitrapa* L sur les différentes souches.

Souches bactériennes	Diamètre des zones d’inhibition (mm)							
	Sans diffusion au réfrigérateur				24H de diffusion au réfrigérateur			
	Concentration d’extrait par disque (mg /disque)							
	0,5	1	2,5	5	0,5	1	2,5	5
<i>Escherichia coli (E. coli) 1</i>	-	1,5	3	4	4	5	9	13
<i>E. coli 2</i>	-	1	2	3,5	7	3	11	13
<i>E.coli 3</i>	2,5	5	7	8	13	15	19	21
<i>Staphylococcus aureus (S. aureus) 1</i>	-	1,5	3	3	5	7	9	13
<i>S. aureus 2</i>	1	1,5	2	2,5	13	13	16	21
<i>S. aureus 3</i>	1	2,5	3	4	12	13	15	17
<i>Bacillus cereus (B. cereus) 1</i>	2	2	3	4	3	5	6	7
<i>Bacillus cereus 2</i>	1,5	2	3,5	4,5	10	11	13	14
<i>Bacillus cereus 3</i>	-	1	1,5	2	10	12	15	15

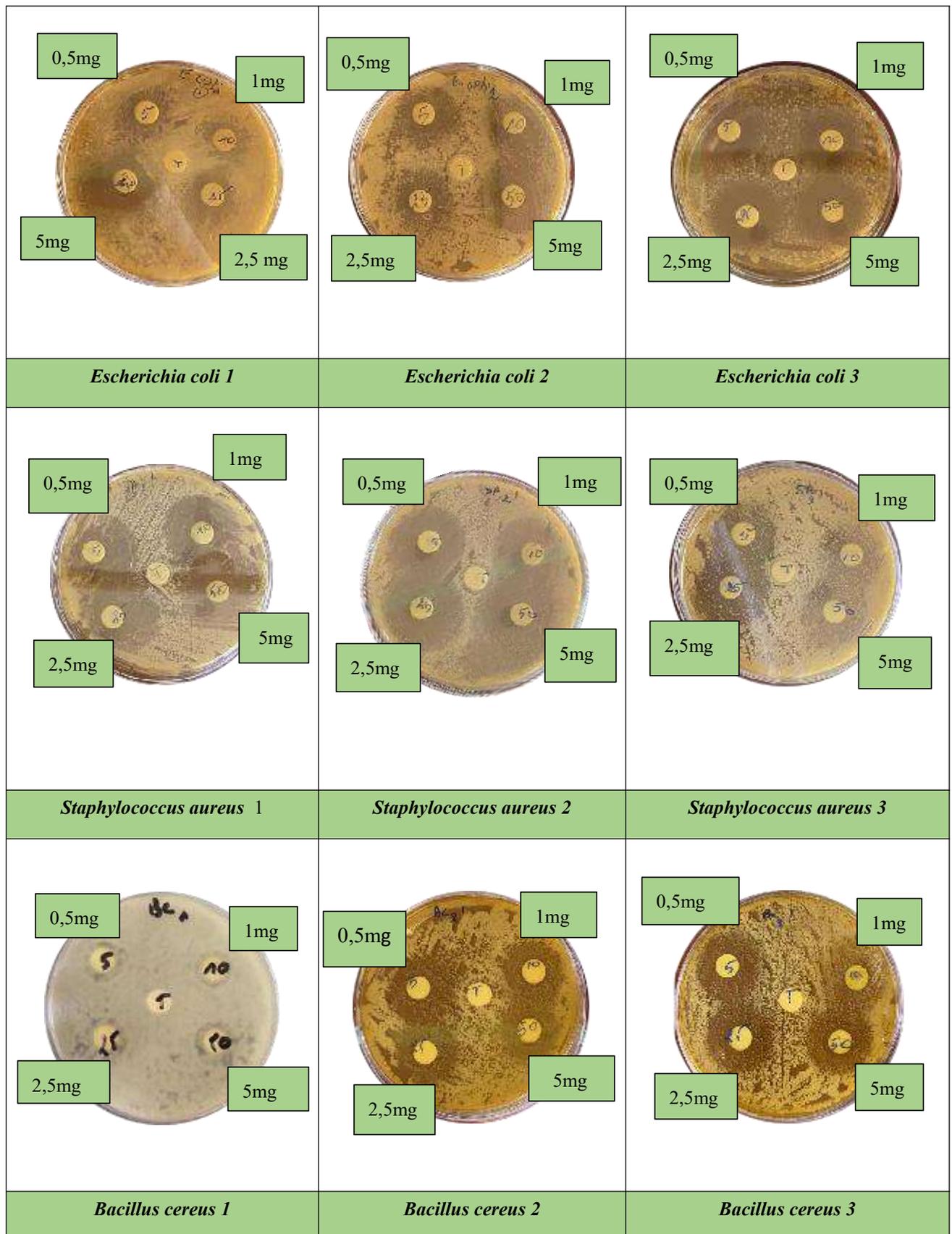


Figure 09 : Photographies illustratives de la diffusion en milieu solide des diamètres des zones d'inhibition (mm) de la croissance bactérienne avec une diffusion au réfrigérateur en fonction de des concentrations en extraits des feuilles de *Centaurea calcitrapa* L sur les différentes souches.

Selon les résultats du **tableau VIII**, on déduit la grande différence des diamètres des zones d'inhibition entre la diffusion sur milieu gélosé en incubant les boîtes directement à l'étuve à 37°C sans les réfrigérer préalablement et avec diffusion au réfrigérateur durant 24H avant leur incubation.

Sans diffusion au réfrigérateur : Les zones d'inhibition sont majoritairement petites. On observe qu'elles sont un peu plus importantes chez certaines souches, notamment *Escherichia coli* 3, avec des diamètres allant de 2,5 à 8 mm, *Bacillus cereus* 2 atteint 4,5 mm, et *Staphylococcus aureus* 3 variant entre 1 et 4 mm.

En revanche, d'autres souches bactériennes affichent des diamètres d'inhibition plus restreints, allant de 0 mm à 3,5 mm pour *E. coli* 2, de 0 mm à 2 mm à 5mg/disque pour *B. cereus* 3, et allant à 2,5 mm pour *S. aureus* 2.

Après diffusion au réfrigérateur: Par contre, après la diffusion au réfrigérateur, on observe clairement des zones d'inhibition allant jusqu'à 21mm de diamètre à 5mg/disque, obtenues chez certaines souches, telle que *E. coli*, ainsi que *S. aureus* 2 avec 21 mm à 5mg /disque, elles ont donc manifesté une sensibilité élevée à l'extrait de *C. calcitrapa* L à cette concentration. Alors que d'autres souches se sont montrées moins sensibles à l'extrait, même avec cette durée de diffusion précisément *B. cereus* 1 avec une zone d'inhibition de 7mm à 5mg/disque.

Les diamètres des zones d'inhibition qui indiquent l'efficacité de l'extrait contre les bactéries varient en fonction des conditions expérimentales et de sa concentration. Plus la zone d'inhibition est grande, plus l'extrait est efficace pour inhiber la croissance bactérienne. Comme le démontrent les résultats de ce test, la sensibilité de certaines souches, telles que *E. coli* 3 et *S. aureus* 2 marquant une zone d'inhibition de 21mm, et *B. cereus* 3 avec une zone d'inhibition de 17mm est déduite. D'après **Moreira et al. (2005)**, la sensibilité des souches bactériennes peut être évaluée en fonction du diamètre des zones d'inhibition observées. Lorsque ce dernier est inférieur à 8 mm, cela traduit une absence de sensibilité, une zone d'inhibition mesurant entre 9 et 14 mm indique une sensibilité de la souche, et ce n'est que si le diamètre se situe entre 15 et 19 mm, que la souche est dite très sensible, enfin, lorsque le diamètre dépasse 20 mm, la sensibilité est qualifiée d'extrêmement prononcée. Cette échelle de mesure permet de classer la réponse des souches bactériennes aux tests de manière plus précise.

D'après les tests effectués on a également constaté que le temps de diffusion, est un facteur favorisant une bonne diffusion de l'extrait de *C. calcitrapa* L, et s'est exprimé par de meilleurs résultats. D'autre part, on remarque que certaines bactéries sont plus résistantes que d'autres à cet extrait.

III.2.2 Résultats du test de caractérisation du type de l'effet antibactérien

D'après **Aras-Perk et al. (2011)**, les centaurees sont des espèces anti-microbiennes, cet effet antibactérien peut être caractérisé en termes de deux principaux mécanismes d'action: bactériostatique et bactéricide. Ces termes décrivent comment un agent anti-microbien affecte la croissance et la survie des bactéries.

Selon les résultats, l'activité antibactérienne de l'extrait de *C. calcitrapa* sur les souches choisies s'est montrée bactériostatique sur les bactéries à Gram positif et aussi Gram négatif en inhibant leur prolifération et la reproduction sans, pour autant qu'il soit létal, via une action réversible. Les bactéries exposées à ce dernier cessent de se multiplier, mais elles peuvent rester en vie et reprendre leur croissance une fois que l'agent est éliminé. Il agit généralement en perturbant des processus vitaux pour les bactéries, comme la synthèse des protéines ou la division cellulaire. Un agent bactéricide provoque la létalité des bactéries et donc agit de manière irréversible. Les bactéries exposées à ce dernier meurent et ne peuvent pas se régénérer même après élimination de l'agent, il tue les bactéries en ciblant directement leurs structures cellulaires ou leurs fonctions vitales. Les antibiotiques bactéricides, par exemple, peuvent endommager la paroi cellulaire, perturber la membrane plasmique ou inhiber la synthèse de l'ADN, ce qui conduit à la destruction des bactéries.

Le **tableau X** illustre la présence ou l'absence de la recroissance bactérienne ainsi que le type d'effet observé, qu'il s'agisse d'un effet bactériostatique (inhibition de la croissance) ou bactéricide (destruction des bactéries), pour les différentes souches bactériennes.

Tableau IX : Type d'effet antibactérien de l'extrait de *C. calcitrapa* sur les différentes souches testées. (+) Présence de la recroissance de la bactérie, et (-): Absence de la recroissance de la bactérie.

Souches bactériennes	Recroissance de la bactérie	Type d'effet antibactérien
<i>E. coli 1</i>	+	Bactériostatique.
<i>E. coli 2</i>	-	Bactéricide.
<i>E. coli 3</i>	-	Bactéricide.
<i>S. aureus 1</i>	+	Bactériostatique.
<i>S. aureus 2</i>	-	Bactéricide.
<i>S. aureus 3</i>	-	Bactéricide.
<i>B. cereus 1</i>	+	Bactériostatique.
<i>B. cereus 2</i>	+	Bactériostatique.
<i>B. cereus 3</i>	-	Bactéricide.

Quelques-unes des souches se sont proliférées de nouveau, telles que *E.coli 1*, *B. cereus 1*, *B. cereus 2* et *S. aureus 1*. On a constaté que l'extrait a eu un effet bactériostatique sur ces dernières, et que leur croissance n'a été inhibée momentanément. Tandis que d'autres d'entre elles comme *E. coli 3*, *B. cereus 3*, *S. aureus 2* et *S. aureus 3* n'ont manifesté aucune recroissance bactérienne, ce qui se traduit par l'action irréversible, donc bactéricide de cet extrait sur ces souches bactériennes. De même, chaque souche des bactéries Gram (+) et de Gram (-) a répondu de manière variable aux composés de l'extrait testé et aux antibiotiques.

III.2.3 Résultats du test de l'antibiorésistance des différentes souches vis à vis des acides gallique et tannique

D'après le contenu des résultats obtenus durant ce test (Figure 10), l'acide tannique a donné des zones d'inhibition plus grandes allant jusqu'à 14mm, alors que l'acide gallique présente des zones inhibitrices d'un maximum de 7mm. L'acide tannique a donc une action antibactérienne plus importante que l'acide gallique. On considère alors de ce fait que l'acide tannique est plus sensible et est un meilleur repère de comparaison avec notre extrait par rapport à l'acide gallique.

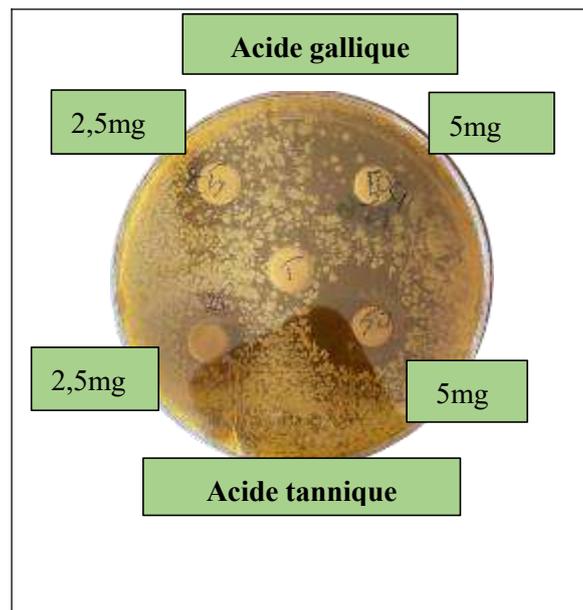


Figure 10: Photographie illustrative les zones d'inhibition obtenues par les acides tannique et gallique.

III.2.4 Résultats des tests de détermination des CMI sur milieu liquide

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait de *Centaurea calcitrapa* L a été menée également sur milieu liquide. Cette dernière visait à surmonter les limitations de la méthode de diffusion sur milieu solide et à déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI). Cette dernière est définie comme la concentration la plus faible d'un agent anti-microbien qui inhibe totalement la croissance bactérienne. L'objectif de ce protocole est de fournir une méthode rapide pour dépister les agents antibactériens potentiels. Dans cette méthode, tout puits qui présente un aspect clair similaire au puits témoin (contenant du bouillon sans culture) est considéré comme indiquant l'absence de croissance bactérienne, ce qui est interprété comme un

résultat positif. En revanche, tout puits qui présente une turbidité comparable à celle des puits témoins de croissance bactérienne est considéré comme un résultat négatif, indiquant qu'il n'y a pas eu d'inhibition de la croissance bactérienne.

Tableau X : Concentrations minimales inhibitrices (mg/ml) de la croissance bactérienne de l'extrait de *C. calcitrapa* L. en comparaison à l'acide tannique sur les différentes souches bactériennes.

	Feuilles de <i>C. calcitrapa</i> L	Acide tannique
Souches bactériennes	Concentration minimale inhibitrice (CMI) en mg /ml	
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) 1	0,125	0,031
<i>E. coli</i> 2	0,062	0,031
<i>E.coli</i> 3	0,062	0,031
<i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>) 1	0,25	0,125
<i>S. aureus</i> 2	0,125	0,25
<i>S. aureus</i> 3	0,25	0,125
<i>Bacillus cereus</i> (<i>Bacillus cereus</i>) 1	0,5	0,25
<i>Bacillus cereus</i> 2	0,25	0,25
<i>Bacillus cereus</i> 3	0,125	0,125

Les résultats obtenus pour les CMI sont en cohérence avec ceux observés lors de l'application de la méthode de diffusion en milieu gélosé. Dans l'ensemble, toutes les souches testées dans cette expérience ont montré une sensibilité envers l'extrait de *C. calcitrapa* L. En effet, cela confirme la capacité inhibitrice de la croissance bactérienne de ce dernier vis-à-vis de toutes les souches testées. Les valeurs élevées des CMI s'expliquent probablement par le fait que l'extrait est brut, ce qui signifie que la substance à activité antibactérienne n'a pas été purifiée et se trouve dans l'extrait à des concentrations relativement faibles.

L'extrait s'est montré plus efficace sur certaines souches, telles que *E. coli* 2 et 3, en exhibant une valeur de CMI de 0,062 mg/ml. Nos constatations révèlent que l'extrait issu de *Centaurea*

calcitrapa L est un puissant inhibiteur contre diverses souches bactériennes, en démontrant une présence d'une activité antibactérienne prometteuse. Vue l'étude de **Oriani et al. (2004)** qui confirme que les sesquiterpènes lactones sont les agents responsables de l'activité antibactérienne, donc on suggère que ces activités pourraient être dues à ce type de composés contenus dans l'extrait de *C. calcitrapa* L, par ailleurs les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques ont été rapportés pour leurs effets antibactériens (**Arif et al., 2004 ; Toribio et al., 2004**).

D'une autre part, on conclue que ces résultats acquis durant ce test mettent en lumière de nouvelles sensibilités des souches face aux extraits des feuilles de *C. calcitrapa* L, qui diffèrent des observations réalisées avec la méthode de diffusion sur disque. Il est donc clair que le choix de la technique utilisée pour évaluer la sensibilité antimicrobienne a une influence sur les conclusions concernant la sensibilité ou la résistance des souches.

L'acide tannique a révélé des valeurs de CMI's encore plus réduites que celles de notre extrait avec 0,031mg/ml pour *E. coli*. En effet, d'après **Akiyama et al. (2001)** durant une étude sur l'action antibactérienne de plusieurs tannins contre *Staphylococcus aureus*, les mécanismes antimicrobiens des tannins peuvent induire un complexe avec des enzymes ou des substrats, et de ce fait, plusieurs actions enzymatiques de la part des bactéries peuvent être inhibées, ou encore, ces tannins vont inhiber l'utilisation des substrats en s'associant à eux. De plus, que les tannins peuvent être utilisés comme des agents adjuvants associés aux antibiotiques .

III.3 Antibiogramme des souches bactériennes testées comparé à l'extrait des feuilles de *C. calcitrapa* L

Les tableaux ci-dessous représentent les antibiogrammes des profils de résistance bactérienne de trois souches différentes, fournis par le Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) et utilisé dans cette étude pour un objectif comparatif des résultats obtenus par l'extrait de *Centaurea calcitrapa* L.

Tableau XI : Antibiogramme des souches bactériennes testées comparé à l'effet de l'extrait de feuilles de *C. calcitrapa* L.

➤ <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).						
Souche	AUG	IMI	CS	ETP	MRP	Extrait des feuilles de <i>C. calcitrapa</i> L
<i>E. coli</i> ATCC 25922	R	R	R	15	15	13
<i>E.coli</i> 02	R	R	R	14	18	13
<i>E.coli</i> 03	R	R	R	16	17	21
➤ <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>).						
Souche	AUG	FOX	CAZ	RD	ATM	Extrait des feuilles de <i>C. calcitrapa</i> L
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	12	R	15	0	13	13
<i>S.aureus</i> (2)	14	R	10	R	R	21
<i>S.aureus</i> (3)	19	21	12	31	R	17
➤ <i>Bacillus cereus</i> (<i>B. cereus</i>).						
Souche	AUG	FOX	CAZ	RD	ATM	Extrait des feuilles de <i>C. calcitrapa</i> L
<i>Bacillus cereus</i> (1)	11	10	8	9	13	7
<i>Bacillus cereus</i> (2)	7	12	10	R	R	14
<i>Bacillus cereus</i> (3)	19	21	12	31	R	15

*R: Résistante.

* Abréviation des antibiotiques en Annexe 2.

*Les diamètres des zones d'inhibition sont exprimés en mm.

Pour *Escherichia coli* (*E. coli*): Les souches *E. coli* 1, 2 et 3 sont résistantes à trois différents antibiotiques: l'amoxicilline-acide clavulanique, la colistine sulfate et l'imipenem, elles montrent des zones d'inhibition relativement faibles (entre 14 mm et 16 mm) en réponse à l'ertapenem. Cependant, elles présentent des zones d'inhibition plus grandes (entre 15mm et 17mm) en réponse au méropénème.

Par contre *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*): La souche *S. aureus* 2 est résistante à trois antibiotiques différents : FOX, RD et ATM. La souche *S. aureus* 1 développe une résistance à FOX. La souche *S. aureus* 3 développe une résistance à ATM. Cependant, on observe des zones d'inhibition importantes pour d'autres antibiotiques.

De plus *Bacillus cereus* (*B. cereus*): Cette souche présente de larges zones d'inhibition en général. La souche *B. cereus* 2 a développé une résistance face à deux antibiotiques : RD et ATM. La souche *B. cereus* 3 a développé une résistance à ATM.

On remarque en parallèle des zones d'inhibition de l'extrait vis à vis de toutes les souches bactériennes, mais notamment plus petites comparativement à celles des antibiotiques préalablement cités, ceci s'explique en premier lieu par la pureté des antibiotiques et celle des métabolites antibactériens contenus dans l'extrait de *C. calcitrapa* L

En résumé, ces données indiquent que les souches bactériennes étudiées ont des profils de résistance variés aux différents antibiotiques testés. Certaines souches sont multirésistantes, tandis que d'autres présentent une sensibilité plus élevée à certains antibiotiques. Ceci peut expliquer la différence de sensibilité de ces souches aux différentes concentrations de l'extrait et celles de l'acide tannique.

Selon les résultats obtenus concernant les zones d'inhibition de l'extrait des feuilles de *Centaurea calcitrapa* L contre ces souches et ceux des profils de l'antibiorésistance de ces mêmes souches, on note que certains antibiotiques, tels que MRP et ETP face à *E. coli*, ou bien AUG et CAZ face à *S. aureus*, et *B. cereus*, montrent des zones d'inhibition similaires à celles observées pour l'extrait de *Centaurea calcitrapa* L. En parallèle, cet extrait a eu une action antibactérienne contre toutes les souches testées. D'après **El-Sherbiny et al. (2016)**, cette plante réagit comme un agent antibactérien de choix, et est perçue comme étant plus efficace qu'un antibiotique produit par une industrie pharmaceutique.

A l'issue des observations, on suggère que ces antibiotiques et l'extrait des feuilles de *Centaurea calcitrapa* L auraient exercé leurs effets antibactériens par des mécanismes d'action similaires.

Conclusion



Conclusion

Dans cette étude, *Centaurea calcitrapa* L a été sélectionnée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait de ses feuilles. Appuyée par ses composés phénoliques, notamment, les flavonoïdes et les acides phénoliques. L'évaluation de l'extrait de *Centaurea calcitrapa* L a démontré une capacité d'inhibition bactérienne pouvant être réversible ou bien bactéricide qui s'est avérée effective sur l'ensemble des souches testées, toutefois pas de la même intensité. Cette conclusion est renforcée par les résultats obtenus grâce aux deux méthodes employées, à la fois sur milieu solide avec des zones d'inhibitions atteignant les 21mm notamment chez *E. coli* 1 et *S. aureus* 2, et sur milieu liquide, avec les valeurs de CMI de l'extrait des feuilles de *C. calcitrapa* L toutes inférieures à 0,125mg/ml, en particulier *E. coli* 2 et *E. coli* 3 avec 0,062mg/ml, en comparaison avec les CMI de l'acide tannique testé sur les souches également inférieures à 0,125mg/ml, dont *E. coli* s'est avérée être plus sensible avec 0,031 mg/ml. En tenant compte que l'extrait des feuilles de la substance étudiée est similaire à l'effet antibactérien des antibiotiques classiques. Par conséquent, il serait pertinent d'élargir cette étude en incluant d'autres souches bactériennes et en explorant d'autres techniques d'extraction. De plus, il pourrait être bénéfique de procéder à une purification des composés actifs responsables de cette activité. Ainsi, cet extrait pourrait représenter une opportunité intéressante pour la découverte de nouvelles sources de composés bioactifs, avec des applications potentielles dans le traitement des infections.

Références bibliographiques

A

- Ayad R. (2013). Etude photochimique et activité antioxydante de la plante *Centaurea melitensis*. Thèse de doctorat : Chimie organique. Université Constantine 1,; 231.
- Ayad R., & Akkal S. (2019). Phytochemistry and biological activities of algerian *Centaurea* and related genera. In *Studies in Natural Products Chemistry* (p357-414).
- Aras-Perk A.c, Arda N.b, Bona M.c, Erol-Dayi Öa et Pekmez M.b.(2011). Total Phenolic Contents, Antioxidant Activities and Cytotoxicity of Three *Centaurea* Species: *C. calcitrapa* subsp. *calcitrapa*, *C. ptosimopappa* and *C. spicata*. *Free Radicals and Antioxidants*1:31-36.

B

- Barnes J., Anderson L.A., & Phillipson J.D. (2007). Herbal Medicine. 3ème Edition, Pharmaceutical Press, London,102-194.
- Benaissa O., (2011). Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. Activité Biologique, Thèse Doctorat, université Mentouri Constantine.
- Bremer K.,(1994). *Asteraceae, Cladistics & classification*. Portland. OR: Timber Press.
- Bruneton J.,(2009) *Pharmacognosie phytochimie: plantes médicinales. Tec et Doc* (4ème édition). paris : France, : 146-290.
- Bruneton., (1993) *Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, Technique et documentation, Lavoisier*.
- Bruneton J., (1999). *Plantes toxiques. Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. 2ème Édition ; EDITIONS TEC & DOC Paris. (2) :153.*

C

- Cherbal A., El-adawi H., Kebieche M et Madani K., (2012) Extraction and valorization of phenolic compounds of leaves of Algerian *Pistacia lentiscus*. *Asian journal of plant sciences*; 11(3):131-136.

D

- Daniel H., (2016), *Guide pratique pour une distillation traditionnelle ou moderne - Tome 2*, Mulhouse, JdM Editions, 596 p. (ISBN 978-2-36702-071-6), p. 72.

Références bibliographiques

- Decloitre F., (1993). Impact des facteurs alimentaires sur les mécanismes de la cancérogénèse, bases d'une prévention des cancers par l'alimentation, Cahiers de Nutrition et de diététique, p85-95.
- Dob T et Dahmane D., (2009). Essential Oil Composition of *Centaurea calcitrapa* L. From Algeria. *Journal of Essential Oil Research*; 21:216-219.
- Dimkić I., Petrović M., Gavrilović M., Gašić U., Ristivojević P., Stanković S., & Janačković P., (2020). New perspectives of purple starthistle (*Centaurea calcitrapa*) leaf extracts: phytochemical analysis, cytotoxicity and antimicrobial activity. *AMB Express*, 10(1), 1-21.
- Dittrich M., (1977). Cynareae -systematic review, In: Heywood VH. Harborne JB, Turner BL, (eds) *The biology and chemistry of the Compositae*. vol, 2, London: Academic Press pp: 999–1015.

E

- Esra K.A., Reyhan A., Fatma E., Erdem Y., (2009), Sesquiterpene lactones with antinociceptive and antipyretic activity from two *Centaurea* species, *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 210–215.
- El-Sherbiny GM., Moghannem AM. et Sharaf MH., (2016) Antibacterial activity of medicinal plant (*centauraea calcitrapa*) against multi-drug resistant bacteria (mdrb). *The Asia Journal of Applied Microbiology*; 3:12-25.
- Edenharder R., & Grünhage D., (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as electrophoretic–electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups Review. *Journal of Chromatography A*, 967, 85–113.

G

- Ghasemzadeh A., & Ghasemzadeh N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(31) : 6697- 6703.
- González-G J., Sánchez C.S., & Tuñón M.J., (2007). Anti-inflammatory Properties of Dietary Flavonoids. *Nutrición Hospitalaria*, 22 (3), P287-293.
- Gonzalez-Burgos E., & Gomez-Serranillos M.P., (2012). Terpene Compounds in Nature : A Review of Their Potential Antioxidant Activity. *Current Medicinal Chemistry*, 19(31), 5319–5341.

H

- Herbert R.B., (2003). The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites. *NPR*. 20: 494–508.

Références bibliographiques

- Hartmann T. (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*; 68 : 2831-2846.
- Havsteen B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 96, Issues 2–3), 67-202.
- Hellwig F.H. (2004). Centaureinae (Asteraceae) in the Mediterranean history of ecogeographical radiation. *PSE*. 246 ; p : 137-162.
- H. Akiyama, K. Fujii, O. Yamasaki, T. Oono, K. Iwatsuki (octobre 2001) *Journal of Antimicrobien Chemotherapy*, volume 48, numéro 4, , pages 487 à 491.

K

- Kaya Z., Orcan N., Binz.et R (2010).MorphologicaL Anatomical and palynological study of *Centaurea Calcitrapa* L. SSP. Cilicica (BOISS. & BAL.)Wagenitz and *Centaurea Solstitialis* L. SSP. Carneola (BOISS.) wagenitz endemic for turkey. *P.J. B.* 42:59-69.
- Kouamé TK, Siaka S, Kassi A et Soro Y., (2021). Détermination des teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins de jeunes feuilles non encore ouvertes de *Piliostigma thonningii* (Caesalpinaceae). 15: 97-105.
- Köse Y.B., İşcan G., Demirci B., Başer K.H. C., & Çelik S. (2007). Antimicrobial activity of the essential oil of *Centaurea aladagensis*. *Fitoterapia*, 78(3), 253-254.
- Kebièche M., Lakroun Z., Mraïhi Z., Soulimani R., (2011). Effet antidiabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de *Ranunculus repens* L, et de la quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique. *Phytothérapie*. 9: 274-282.

L

- Lugasi A., Hóvári J., Sági K.V., & Biról., (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases.47 : 119-125.

M

- Marca A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes, Étude de leur réactivité avec les radiaux issus des alcools, formation de depsines, Université de Limoges.
- Manallah A., (2012). Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Pour obtenir le Diplôme de magister, Option : Biochimie Appliquée. Université Ferhat Abbas- sétif, 87p.
- Malecky M., (2005). Métabolisme des terpenoïdes chez les caprins, thèse Pour obtenir le grade de docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro Paris Tech. p 9, 13-19, 20, 27.
- Mishio T., Houma T., & Iwashina T., (2006). Yellow flavonoids in *Centaurea ruthencia* as flower pigments. *Biochemical systematics and ecology*.34, 180-184.

Références bibliographiques

- Moreiraa M.R., Ponceb A.G., Vallea C.E et Rourab S.I., (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT*; 38:565–570

O

- Ozenda P., (1991). Flore et végétation du Sahara, 3rd ed. CNRS. Paris Edition.
- Oriani DS, Skliar MI et Toribio MS., (2004). Actividad antimicrobiana de *centaurea solstitialis*, *centaurea calcitrapa* .Antimicrobial activity of *centaurea solstitialis* and *centaurea calcitrapa*. *Ars Pharm* ; ; 4 : 281-291.
- Quezel P., Santa S., (1963). Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol. 2. Ed. CNRS, Paris France.

P

- Patrice B., Emmanuel L., (2005). Bacterial Virulence Factors and Rho GTPases. Paris: Compans R.W, Atlanta M.D, Birmingham A, Honjo J, Kyoto H ,Koprowski P, Melchers F, Basel · M.B.A, Olsnes S, Potter M, Bethesda M .Vogt L et Wagner H; :1.

R

- ROUY G., (1889) - Un hybride des *Centaurea calcitrapa* L. et *C. pullata* L. (X *C. Mirabilis*), p. 425- 428 - Départ./Région : , Bulletin de la Société Botanique de France, 2, Tome 36 - Fascicule 1
- Reis P.M., Lourenco P.L., Domingos A., Clemente A.F., Pais M.S ,Malcata F.X. (2000). Applicability of extracts from *Centaurea calcitrapa* in ripening of bovine cheese. *International Dairy of journal*.10: 775-780.

S

- Susanna A, Garcia-Jacas N. (2007). The families and genera of vascular plants, vol 8, Flowering plants, Eudicots, In: Kadereit JW, Jeffrey C, editors, Asterales, Berlin: Springer pp: 123–146.
- Satyajit, D.S., (2005), Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkinii*, *Tetrahedron*, 61(38), 9001–9006.

T

- Tapas A.R., Sakarkar D.M., & Kakde R.B. (2008). Flavonoids as Nutraceuticals. *Topical Journal of Pharmaceutical Research.*, 7 (3), p1089-1099.

Références bibliographiques

W

- Wagenitz G., Hellwig FH., (1996). Evolution of characters and phylogeny of the Centaureinae. In: Hind DJN, Beentje HG, (eds.) *Compositae: Systematics, Proceedings of the International Compositae Conference. Royal Botanical Gardens. Kew* pp 491-510.

● *Annexe 1* : Préparation des solutions et les milieux de cultures

1. Préparation de l'eau physiologique

C'est des diluants isotoniques qui peuvent être utilisés pour diluer les suspensions bactériennes afin d'ajuster la turbidité de la suspension bactérienne et aider à maintenir l'intégrité de la viabilité cellulaire. Cette eau peut servir à diluer une suspension bactérienne pour ajuster la turbidité des suspensions bactériennes et faciliter le maintien de l'intégrité de la viabilité cellulaire. Cette solution est constituée d'eau distillée et de chlorure de sodium (**NaCl**) diluée à 9 pour 1000; C'est à dire une solution à 0,9% de masse/volume de **NaCl**, soit 9g/l.

2. Préparation du standard McFarland

En microbiologie le standard McFarland sert de standard de turbidité pour préparer les suspensions de micro-organismes et d'inoculums bactériens pour les tests de sensibilité aux agents antimicrobiens. Au cours d'une expérimentation de résistance à un agent antimicrobien, si la suspension utilisée est trop concentrée ou trop diluée, un résultat erroné (soit faux résistant soit faux sensible) .

Les normes McFarland originelles ont été établies en mélangeant des quantités spécifiées de chlorure de baryum et d'acide sulfurique. La suspension de ces deux composés forme un précipité de sulfate de baryum, ce qui rend la solution trouble. Selon la méthode de **Christian et François (2019)**, un étalon de standard McFarland 0.5 est préparé en mélangeant 0,05 ml de chlorure de baryum à 1,175% dihydraté ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), avec 9,95 ml d'acide sulfurique à 1% (H_2SO_4).

Le McFarland 0,5 correspond approximativement à une suspension homogène d'*E. coli* de 1.5×10^8 cellules par ml^3 (**Becton et Dickinson, 2005**).

3. Bouillon nutritif: Le but de la préparation d'un bouillon nutritif est de cultiver des micro-organismes, des sous-cultures, etc. Peser 20 grammes de bouillon nutritif (milieu de culture déshydraté) et mélanger avec 1 litre d'eau distillée, sous agitation à l'aide d'un barreau magnétique sur une plaque chauffante pendant quelques minutes jusqu'à ébullition.

Cette solution sera ensuite répartie par volumes de 10ml dans des tubes à essais microbiologiques, pour ensuite passer à l'autoclavage (stérilisation).

- 4. Bouillon Mueller-Hinton:** Le bouillon Mueller-Hinton (ou milieu de bouillon Mueller-Hinton) est un milieu de culture utilisé en microbiologie pour la sensibilité des bactéries aux antibiotiques, notamment dans le cadre des tests de diffusion en gélose. ces composants typiques sont: Poudre de bouillon Mueller-Hinton qui est une préparation commerciale de poudre contenant les ingrédients nécessaires pour la préparation du milieu. Les composants de base de cette poudre comprennent la protéines hydrolysées, telles que la caséine et la gélatine, qui fournissent des nutriments pour la croissance bactérienne. L'amidon, qui peut être inclus pour stabiliser le pH du milieu. Dextrose (glucose), qui peut également être ajouté comme source de carbone. d. Sel (chlorure de sodium) pour l'équilibre osmotique. Le agar-agar : L'agar-agar est souvent ajouté au bouillon Mueller-Hinton pour solidifier le milieu lorsqu'il est utilisé sous forme de gélose. La gélose est particulièrement utile pour réaliser les tests de diffusion en gélose, où des antibiotiques sont diffusés sur la surface de la gélose. Le pH du bouillon Mueller-Hinton est ajusté à une valeur d'environ 7,2 à 7,4 pour favoriser la croissance bactérienne et la précision des tests de sensibilité aux antibiotiques.
- 5. Gélose nutritive:** La préparation de la Gélose nutritive est basée sur l'introduction de 28.0 g de la poudre (Nutrient Agar) dans un erlenmeyer auquel est ajoutée 1L d'eau distillée. Le mélange obtenu est mis sous agitation continue à l'aide d'un barreau magnétique, sur une plaque chauffante jusqu'à l'ébullition et la solubilisation totale du milieu, qui sera réparti dans des flacons en verre pour les autoclaver .
- 6. Gélose Mueller-Hinton:** La gélose Mueller-Hinton a été préparée dans le but de réaliser des antibiogrammes standards de souches microbiennes par l'ajout de 38g de de poudre à 1L d'eau distillée, sous agitation pendant quelques minutes, à l'aide d'un barreau magnétique, sur une plaque chauffante jusqu'à l'ébullition et solubilisation totale du milieu, qui sera réparti dans des flacons en verre pour l'autoclavage.
- 7. La gélose Chapman:** Est un milieu de culture sélectif utilisé pour la détection et la différenciation de *Staphylococcus aureus* en fonction de sa capacité à fermenter le mannitol

et à produire un changement de couleur dans le milieu. Elle est largement utilisée en microbiologie clinique pour identifier cette bactérie pathogène. Généralement composée de plusieurs ingrédients, dont le mannitol, le sel (généralement du chlorure de sodium), des indicateurs de pH (phénol rouge), et d'autres nutriments essentiels pour la croissance bactérienne. Lorsqu'une souche de *Staphylococcus aureus* est présente sur la gélose Chapman et qu'elle fermente le mannitol, une zone jaune (ou jaune doré) se forme autour des colonies bactériennes. Les autres staphylocoques qui ne fermentent pas le mannitol resteront rouges.

8. **La gélose Hektoen:** est un milieu de culture utilisé en microbiologie pour isoler et différencier les entérobactéries, en particulier *Salmonella* et *Shigella*, en se basant sur leur capacité à fermenter les sucres et à produire des composés spécifiques, ainsi que sur leur apparence coloniale caractéristique. Elle est couramment utilisée dans le diagnostic des infections gastro-intestinales d'origine bactérienne.

- ***Annexe 2*: Abréviation, et des référence des molécules d'antibiotiques**

Famille	Antibiotique	Abréviation	Charge en µg	Marque
β-lactamines	Aztréonam	ATM	30	Liofilchem, Italie
	Ceftazidime	CAZ	30	Liofilchem, Italie
	Céfoxitine	FOX	30	Liofilchem, Italie
	Amoxicilline- acide clavulanique	AUG	30	Liofilchem, Italie
	Imipenem	IMI	10	Liofilchem, Italie
	Méropénème	MRP	10	Liofilchem, Italie
Rifampicin	Rifampicine	RD	5	Liofilchem, Italie
Polymyxines E	Colistine sulfate	CS	0.75 30U I	Liofilchem, Italie
Carbapénèmes	Ertapenem	ETP	10	Liofilchem, Italie

Résumé

De nos jours, les plantes médicinales ont un rôle clé, en particulier les centaurees, en tant qu'alternative aux antibiotiques synthétiques dans le contexte de la résistance bactérienne. La flore dispose d'une riche disponibilité en végétaux aux pouvoirs guérisseurs, offre un vaste éventail d'activités biologiques grâce à ses composés actifs. L'extrait éthanolique des feuilles de *Centaurea calcitrapa L* a été étudié pour son efficacité antibactérienne, montrant une inhibition bactérienne sur toutes les souches testées et est aussi efficace qu'un xénobiotique chimique commercialisé. D'une part le dosage des polyphénols totaux a été réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu. D'autre part, l'effet antibactérien des échantillons était évalué par des tests d'antibiogrammes par diffusion sur gélose marquant des zones d'inhibition allant jusqu'à 21mm de diamètre (*E. coli*3 et *S. aureus*2) et en milieu liquide (CMI inférieurs à 0,125mg/ml) par micro-dilution. Les résultats obtenus suggèrent que cet extrait pourrait être une source prometteuse de composés bioactifs pour le traitement des infections bactériennes, avec des similitudes dans les zones d'inhibition par rapport à certains antibiotiques, ouvrant la voie à de nouvelles pistes de recherche médicale.

Mots clés: *Centaurea calcitrapa L*, antibiotique, antibactérienne.

Abstract

Nowaday, medicinal plants play a key role, particularly *Centaurea* species, as an alternative to synthetic antibiotics in the context of bacterial resistance. Algerian flora offers a rich availability of plants with healing properties, providing a wide range of biological activities through its active compounds. The ethanol extract of *Centaurea calcitrapa L* leaves has been studied for its antibacterial effectiveness, demonstrating bacterial inhibition against all tested strains and being as effective as a commercial chemical xenobiotics. On one hand, the total polyphenol content was determined using the Folin-Ciocalteu method. On the other hand, the antibacterial effect of the samples was evaluated through agar diffusion showing inhibition zones of up to 21mm in diameter (*E. coli*3 and *S. aureus*2) and liquid (MICs lower than 0.125 mg/ml) micro-dilution antibiogram tests. Obtained results suggest that this extract could be a promising source of bioactive compounds for the treatment of bacterial infections, showing similarities in inhibition zones compared to some antibiotics, opening new opportunities for medical research.

Key words: *Centaurea calcitrapa L*, antibiotics, antibacterial.

ملخص

في الوقت الحاضر، تلعب النباتات الطبية دورًا مهمًا، وخاصة الأمراء، كبديل للمضادات الحيوية الاصطناعية في سياق مقاومة النباتات تتميز بتوافر غني للنباتات ذات القدرات العلاجية، وتقدم مجموعة واسعة من الأنشطة البيولوجية بفضل البكتيريا لفاعليته المضادة للبكتيريا، حيث *Centaurea calcitrapa L* تم دراسة مستخلص الإيثانول من أوراق نبات مركباتها الفعالة تم. أظهر تثبيطًا للنمو البكتيري في جميع السلالات المختبرة وكان فعالًا مثل المركبات الكيميائية الاصطناعية التي تُباع تجاريًا وتم تقييم التأثير المضاد للبكتيريا للعينات من خلال، Folin-Ciocalteu قياس محتوى البوليفينول الكلي باستخدام طريقة و *E. coli*3) ملم في القطر 21 اختبارات حساسية البكتيريا في وسط الجيلاتين مما أدى إلى تكوين مناطق مثبطة تصل إلى بواسطة التخفيف الميكروي (مل/مغ 0.125 تركيزات حد أدنى تثبيط ميكروي أقل من) وفي الوسط السائل، (*S. aureus*2) تشير النتائج المحصل عليها إلى أن هذا المستخلص قد يكون مصدرًا واعدًا للمركبات النشطة بيولوجيًا لعلاج العدوى البكتيرية، مع وجود تشابه في مناطق التثبيط مقارنة ببعض المضادات الحيوية، مما يفتح الباب أمام آفاق بحث طبي جديدة

كلمة مفتاحية: *Centaurea calcitrapa L*، مقاومة البكتيريا، للمضادات الحيوية.