

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



Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département des Sciences Biologiques

Mémoire

De fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master

en

Sciences de la Nature et de la Vie

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

**Etude de l'activité antibactérienne d'extraits
de quatre plantes médicinales de Kabylie :
Arbutus unedo L., *Phlomis bovei* de Noé., *Rosa
sempervirens* L. et *Verbascum sinuatum* L.**

Réalisé par :

M^{elle} HAOUCHINE Lamia & M^{elle} KHENNACHE Ouardia

Soutenu le 05 /10 /2017 devant le jury composé de :

M ^{me} MEGUENNI N.	Maitre de conférences à l'UMMTO	Président
M ^{me} IRATNI AICHE G.	Maitre de conférences à l'UMMTO	Promotrice
M ^{me} HELLAL Z.	Maitre Assistant classe A à l'UMMTO	Examinatrice
Mr MOUALEK I.	Maitre Assistant classe A à l'UMMTO	Examineur

Année universitaire : 2016 -2017

Remerciements

Nous tenons à remercier tout d'abord le Dieu tout puissant de nous avoir donné la force et le courage pour accomplir ce travail.

Nous tenons à remercier monsieur HOUALI.K professeur à l'U.M.M.T.O.de nous avoir accueillis dans son Laboratoire de Biochimie Analytique et de Biotechnologie (LABAB) de la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques.

Une grande part de notre reconnaissance s'adresse à madame IRATNI-AICHE G. Maitre de Conférences à l'U.M.M.T.O. pour son encadrement très précieux, sa disponibilité, ses conseils, sa gentillesse, qu'elle trouve ici toute notre reconnaissance et notre respect.

Nos vifs remerciements vont aussi à madame MEGUENNI N. Maitre de Conférences à l'U.M.M.T.O.et monsieur TITOUCHE Y. Maitre Assistant A à l'U.M.M.T.O.de nous avoir fournis les souches de références utilisées dans notre travail.

Encore un grand merci à madame MEGUENNI N. de nous avoir honoré en acceptant de présider le jury.

Un immense merci à monsieur MOUALEK I. Maitre Assistant A à l'U.M.M.T.O., qui nous a toujours aidé et répondu à nos questions avec toute la générosité et la sympathie qui réside en sa personne, et d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Un profond merci à madame HELLAL Z. Maitre Assistant A à l'U.M.M.T.O., d'avoir accepter d'examiner notre manuscrit et de siéger dans le jury.

On adresse également un grand merci aux techniciens du laboratoire LABAB et du laboratoire commun de Microbiologie en particulier M^{elle} GUENDOZI Sonia pour son aide et sa générosité.

Nous remercions toute personne ayant participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Je dédie ce modeste travail :

A mon très cher père, pour son soutien le long de mon parcours, ses précieux conseils, son assistance et présence dans ma vie.

A ma chère mère, frères et sœurs qui m'ont soutenu de loin ou de près et leur soutien permanent.

A mes chères amies, camarades, ma binôme Lamia.

YOurdia.

Je dédie ce modeste travail à :

*A mes très chers parents qui m'ont toujours soutenu durant toutes ces
années*

A ma sœur Sabrina qui est toujours présente à mes côtés

A mes frères

A mes amis, mes camarades, ma binôme Doudouche.

SLamia

Liste des figures

Figure 1 : Arbre de <i>Arbutus unedo</i>	5
Figure 2 : Parties aériennes de <i>Phlomis bovei</i>	6
Figure 3 : Parties aériennes de <i>R.sempervirens</i>	8
Figure 4 : Partie aériennes de <i>Verbascum sinuatum</i>	9
Figure 5 : Rotavapeur utilisé.....	18
Figure 6 : Lyophilisateur utilisé.....	18
Figure 7 : Lecteur ELISA utilisé.....	19
Figure 8 : Les différentes étapes de l'extraction réalisée.....	21
Figure 9 : Schéma simplifié du principe de la méthode de diffusion sur gélose.....	22
Figure 10 : Schéma de la détermination des CMB.....	26
Figure 11 : Démarche de l'étude de l'association extrait-antibiotique.....	28
Figure 12 : Aspect des colonies de <i>B.cereus</i> sur gélose nutritive.....	29
Figure 13 : Aspect des colonies de <i>S.aureus</i> sur gélose Chapman.....	29
Figure 14 : Aspect des colonies de <i>P.aeruginosa</i> sur gélose King B.....	29
Figure 15 : Aspect des colonies de <i>E.coli</i> BLSE sur gélose Hecktoen.....	29
Figure 16 : <i>B.cereus</i> observée au microscope photonique.....	29
Figure 17 : <i>S.aureus</i> observée au microscope photonique.....	29
Figure 18 : <i>P.aeruginosa</i> observée au microscope photonique.....	30
Figure 19 : <i>E.coli</i> observée au microscope photonique.....	30
Figure 20 : Résultats du test de l'activité antibactérienne des extraits sur <i>B.cereus</i>	31
Figure 21 : Résultats du test de l'activité antibactérienne des extraits sur <i>S.aureus</i>	32
Figure 22 : Résultats CMB de <i>Arbutus unedo</i> sur <i>B.cereus</i>	35
Figure 23 : Résultats CMB de <i>Rosa sempervirens</i> sur <i>B.cereus</i>	35
Figure 24 : Résultats CMB de <i>Phlomis bovei</i> sur <i>B.cereus</i>	35
Figure 25 : Résultats CMB de <i>Verbascum</i> aqueux sur <i>B.cereus</i>	35

Figure 26 : Résultats CMB de l'amoxiciline sur <i>B.cereus</i>	35
Figure 27 : Résultats CMB de <i>Arbutus unedo</i> sur <i>S.aureus</i>	36
Figure 28 : Résultats CMB de <i>Rosa sempervirens</i> sur <i>S.aureus</i>	36
Figure 29 : Résultats CMB de verbascum éthanolique sur <i>S.aureus</i>	36
Figure 30 : Résultats CMB de l'amoxiciline sur <i>S.aureus</i>	36

Liste des tableaux

Tableau I : Principaux caractères biochimiques de <i>Bacillus cereus</i>	10
Tableau II : Les principaux caractères biochimiques de <i>S.aureus</i>	12
Tableau III : Les principaux caractères biochimiques de <i>P.aeruginosa</i>	14
Tableau IV : Principaux caractères biochimiques d' <i>E.coli</i>	16
Tableau V : Plantes étudiées.....	17
Tableau VI : Concentrations des extraits testés.....	24
Tableau VII : Les concentrations minimales et maximales des gammes de dilutions des extraits ainsi que les souches pour lesquelles les CMB sont déterminées.....	25
Tableau VIII : Les concentrations minimales et maximales des gammes de dilutions des antibiotiques ainsi que les souches pour lesquelles les CMB sont déterminée.....	25
Tableau IX : Les combinaisons testées.....	28
Tableau X : Caractères morphologiques considérés pour la confirmation de la pureté des souches.....	30
Tableau XI : Diamètres d'inhibition de la croissance des souches bactériennes testées....	33
Tableau XII : Résultats des CMB des extraits et des antibiotiques.....	36
Tableau XIII : Résultats des CMB des extraits et des antibiotiques.....	37
Tableau XIV : Valeurs des DO de l'association <i>Verbascum sinuatum</i> (extrait aqueux)-acide nalidixique vis-à-vis de <i>B.cereus</i>	38
Tableau XV : Interprétation des valeurs de DO de l'échiquier.....	39
Tableau XVI : Valeurs des DO de l'association <i>Phlomis bovei</i> -acide nalidixique vis-à-vis de <i>B.cereus</i>	40
Tableau XVII : Interprétation des valeurs de l'échiquier.....	40
Tableau XVIII : Valeurs des DO de l'association <i>Arbutus unedo</i> -amoxiciline vis-à-vis de <i>S.aureus</i>	41
Tableau XIX : Interprétation des valeurs de DO de l'échiquier.....	41
Tableau XX : Valeurs des DO de l'association <i>Rosa sempervirens</i> -amoxiciline vis-à-vis de <i>S.aureus</i>	42
Tableau XXI : Interprétation des valeurs de DO de l'échiquier.....	42

Liste des abréviations

ADH : Arginine déshydrogénase
ATB : Antibiotique
ATCC : American Type Culture Collection
Aw : Activité de l'eau
BHIB : Brain Heart infusion Broth
BLSE : Béta lactamase à spectre étendu
BMH : Bouillon Mueller Hinton
CFI : Concentration fractionnelle inhibitrice
CMB : Concentration minimale bactéricide
CS : Citrate de Simons
DNase : Désoxyribonucléase
DO : Densité optique
E.A : Extrait aqueux
E.E : Extrait éthanolique
ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GEL : Gélatinase
GLU : Glucose
G : Gentamicine
H₂S : Hydrogène sulfuré
LAC : Lactose
LDC : Lysine décarboxylase
MRP: Méropénème
NIT : Nitrate
ODC: Ornithine décarboxylase
ONPG: Ortho-nitro-phényl- β-D-galactopyranoside
TIAC : Toxi-infection Alimentaire Collective
TRP : tryptophane
UFC : Unité formant colonie
URE : Uréase
UV : Ultra-violet
VP : Voges-Proskauer

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....1

Partie I : Synthèses bibliographiques

Chapitre I : Aperçu sur les plantes

1-Méthodes d'extractions.....	2
1-1-Méthodes d'extractions traditionnelles.....	2
1-1-1-Infusion.....	2
1-1-2-Décoction.....	2
1-1-3-Macération.....	2
2-Place des plantes dans la lutte antibactérienne.....	3
3-Plantes étudiées.....	4
3-1- <i>Arbutus unedo</i>	
3-1-1-Présentation de l' <i>Arbutus unedo</i>	4
3-1-2-Classification phylogénique.....	4
3-1-3-Description botanique.....	5
3-1-4-Usages traditionnels.....	5
3-2- <i>Phlomis bovei</i>	
3-2-1-Présentation de <i>Phlomis bovei</i>	6
3-2-2-Classification phylogénique.....	6
3-2-3-Description botanique.....	6
3-2-4-Usages traditionnels.....	7
3-3- <i>Rosa sempervirens</i>	
3-3-1-Présentation de <i>Rosa sempervirens</i>	7
3-3-2-Classification phylogénique.....	7
3-3-3-Description botanique.....	7
3-3-4-Usages traditionnels.....	8
3-4- <i>Verbascum sinuatum</i>	
3-4-1-Présentation de <i>Verbascum sinuatum</i>	8
3-4-2-Classification phylogénique.....	8
3-4-3-Description botanique.....	9
3-4-4-Usages traditionnels.....	9

Chapitre II : Aperçu sur les souches étudiées

1- <i>Bacillus cereus</i>	
1-1-Présentation et classification.....	10
1-2-Caractères cultureux.....	10
1-3-Caractères biochimiques.....	10
1-4-Réservoirs naturels.....	11
1-5-Risques infectieux.....	11
1-6-Sensibilité de <i>Bacillus cereus</i>	11
2- <i>Staphylococcus aureus</i>	

2-1-Présentation et classification.....	11
2-2-Caractères cultureux.....	12
2-3-Caractères biochimiques.....	12
2-4-Réservoirs naturels.....	12
2-5-Sources de contamination.....	12
2-6-Sensibilité de <i>S.aureus</i>	13
3- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
3-1-Présentation et classification.....	13
3-2-Caractères cultureux et pigments	13
3-3-Caractères biochimiques.....	14
3-4-Réservoirs naturels.....	14
3-5-Sources de contamination.....	14
3-6-Risque infectieux.....	14
3-7-Sensibilité de <i>P.aeruginosa</i>	15
4- <i>Escherichia coli</i>	
4-1-Présentation et classification.....	15
4-2-Caractères cultureux.....	16
4-3-Caractères biochimiques.....	16
4-4-Réservoirs naturels.....	16
4-5-Sources de contamination.....	16
4-6-Sensibilité de <i>Escherichia coli</i>	16

Partie II : Matériels et méthodes

1-Matériels

1-1- Matériel végétal	17
1-2- Les souches testées.....	17
1-3- Autres matériels.....	18

2-Méthodes

2-1- Extraction.....	20
2-2- Confirmation de la pureté des souches utilisées.....	22
2-3- Étude de l'activité antibactérienne des extraits de plantes.....	22
2-3-1- Préparation de l'inoculum bactérien.....	22
2-3-2-L'ensemencement	23
2-3-3-Préparation et dépôt des disques.....	23
2-4-Détermination de la concentration minimale bactéricide.....	24
2-5- Étude de l'effet antibactérien de l'association extrait-antibiotique.....	27

Partie III : Résultats et discussion

1-Confirmation de la pureté des souches bactériennes.....	29
2-Étude de l'activité antibactérienne des extraits de plantes.....	31
3-Détermination de la concentration minimale bactéricide.....	34
4-Étude de l'effet antibactérien de l'association extrait de plante-antibiotique.....	38
Conclusion et perspectives.....	44

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Les maladies infectieuses constituent un sérieux problème de santé publique aussi bien dans les pays en voie de développement où elles sont la principale cause des taux de mortalité élevés, que dans les pays industrialisés où la résistance aux antibiotiques existants se développe de façon alarmante (OMS, 2005).

Cette situation engendre un besoin sans cesse croissant de trouver de nouveaux composés antimicrobiens et inhibiteurs de mécanismes de résistances aux antibiotiques. Une des stratégies pour cette recherche consiste à explorer les plantes médicinales notamment celles utilisées en médecine traditionnelle qui constituent une source potentielle de ce type de composés (BOUHARB, 2014).

En effet, l'organisation mondiale de la santé estime que pour se soigner 80% de la population mondiale dans les pays en développement a eu recours à la médecine traditionnelle (OMS, 2005). C'est la raison pour laquelle la majeure partie des thérapies impliquent l'exploitation des principes actifs des plantes médicinales. Ces espèces végétales d'aussi grande importance pour la santé des populations méritent d'être étudiées scientifiquement pour une meilleure utilisation (AFIF-CHAUCHE, 2015).

C'est dans cet optique que s'inscrit ce travail dont l'objectif est l'évaluation *in vitro* d'éventuelles activités antibactériennes d'extraits de quatre plantes médicinales : *Arbutus unedo*, *Phlomis bovei*, *Rosa sempervirens* et *Verbascum sinuatum* sur quatre souches bactériennes deux Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) et deux Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* à Béta Lactamase à Spectre Etendu) ; ainsi que l'étude de l'effet antibactérien de différentes associations extraits de plantes et antibiotiques.

Le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives qui présentent des intérêts multiples mis à profil dans l'industrie, en médecine moderne et traditionnelle, en alimentation et en cosmétologie. Cependant, ces principes actifs nécessitent des moyens d'extraction aussi bien traditionnels que modernes qui permettent leur exploitation dans divers domaines (ABEDINI, 2014).

1- Méthodes d'extractions

L'extraction veut dire la séparation des parties actives de tissus végétaux ou animaux des composants inactifs ou inertes à l'aide de solvants sélectifs. Les produits ainsi obtenus sont relativement impurs sous forme de liquides, semi-solides ou poudres exclusivement destinés à un usage oral ou externe.

1-1-Méthodes d'extractions traditionnelles

Les méthodes d'extractions traditionnelles sont celles utilisant les procédés de base les plus simples pour extraire le « totum » ou l'extrait brut de la plante par l'intermédiaire de l'eau (pour les molécules hydrosolubles) ou de l'huile (pour les molécules liposolubles). La présence d'un composé ou d'un autre dépend de sa solubilité dans le solvant utilisé, la température et la durée d'extraction et la fragmentation de la plante (GOETZ, 2010 ; BENZEGGOUTA, 2005).

1-1-1-Infusion

C'est la forme de préparation la plus simple, elle se prépare en versant de l'eau bouillante sur les parties de plantes fraîches ou séchées et les bien tremper afin d'extraire leurs principes actifs. Elle convient pour l'extraction de parties délicates ou finement hachées des plantes: feuilles, fleurs, graines, ayant des constituants volatiles ou thermolabiles (BABA-AISSA, 2000 ; KRAFT et HOBBS, 2004).

1-1-2-Décoction

Elle convient pour l'extraction de matières végétales dures ou très dures : bois, écorce, racines, ou des plantes avec des constituants peu solubles (exemple : l'acide silicique). Elle consiste à faire bouillir les plantes fraîches ou séchées dans de l'eau pendant 10 à 30 minutes, pour bien extraire les principes actifs (BABA-AISSA, 2000 ; KRAFT et HOBBS, 2004).

1-1-3- Macération

Elle consiste à mettre une plante ou une partie de la plante, dans de l'eau froide (macération aqueuse) ou une huile végétale (macération huileuse), pendant plusieurs heures, voire plusieurs jours, pour permettre aux constituants actifs de bien diffuser. Elle convient pour l'extraction de plantes contenant du mucilage, comme les graines de lin ou les graines du plantain des sables, leur forte concentration en amidon ou en pectine peut causer une

gélatinisation si elle se prépare dans de l'eau bouillante. Egalement utilisée pour empêcher l'extraction de constituants indésirables qui se dissolvent dans l'eau chaude (KRAFT et HOBBS, 2004). Elle concerne aussi les plantes dont les substances actives risquent de disparaître ou de se dégrader sous l'effet de la chaleur par ébullition (BABA-AISSA, 2000).

La plupart des techniques d'extractions des principes actifs des plantes médicinales employées à l'échelle de laboratoire ou industrielle font appel principalement à des solvants organiques. Cependant certains présentent des dangers pour les organismes vivants et l'environnement ce qui a incité les chercheurs à diminuer ou éliminer leur usage. Ainsi des techniques dites modernes utilisant des conditions alternatives sont mises en place comme la suppression des solvants telle que les micro-ondes, l'utilisation de solvants facilement séparables et sûrs comme les fluides supercritiques, l'utilisation de solvants non volatils comme les liquides ioniques ou encore l'utilisation de solvants n'ayant pas d'impact sur l'environnement comme l'eau (GERIN, 2002 ; SCHERRMANN *et al.*, 2008).

2- Place des plantes médicinales dans la lutte antibactérienne

L'étude des plantes médicinales est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement du fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives qui constituent une source potentielle de composés antimicrobiens et inhibiteurs des mécanismes de résistances aux antibiotiques.

En effet, de nombreux composés d'origine végétale ont déjà démontré des propriétés antimicrobiennes. Ils agissent selon plusieurs mécanismes à savoir :

- la formation de complexes avec des macromolécules telles que les protéines et les polysaccharides inhibant ainsi leurs fonctions (polyphénols) ;
- la rupture de membranes microbiennes (flavonoïdes lipophiles, terpénoïdes) ;
- l'inhibition de l'adhésion de protéines microbiennes aux récepteurs polysaccharidiques de l'hôte (polypeptides) (AFIF-CHAUCHE *et al.*, 2015).

Les plantes médicinales fournissent également des composés qui n'ont pas nécessairement un effet direct sur les microorganismes, mais qui augmentent ou restaurent l'activité des antibiotiques en inhibant les mécanismes de résistance. Ces composés appartiennent à diverses classes phytochimiques et agissent comme :

- inhibiteurs des pompes à efflux (flavonoïdes, terpénoïdes, alcaloïdes) ;
- inhibiteurs des β -lactamases (alkyls gallates) (ESCOBEDO *et al.*, 2010).

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

- La formation de biofilms par les agents infectieux rend ces derniers inaccessibles aux antibiotiques, leur conférant ainsi une résistance. Inhiber la formation des biofilms constitue donc une stratégie permettant aux antimicrobiens d'atteindre les agents infectieux. Les métabolites secondaires des plantes médicinales peuvent jouer ce rôle.

L'extrait aqueux d'un mélange de cinq drogues, présente une double action, d'une part il inhibe la formation des biofilms chez *Pseudomonas aeruginosa* et d'autre part il tue les microorganismes se trouvant dans la matrice (WANG *et al.*, 2011).

3-Plantes étudiées

3-1-*Arbutus unedo*

3-1-1-Présentation de l'*Arbutus unedo*

L'*Arbutus unedo* est un arbre qui appartient au genre *Arbutus* et à la famille des Ericaceae ; grande famille cosmopolite représentée par 120 genres et environ 4100 espèces.

En général, la plus grande densité ainsi que la plus grande diversité des Ericaceae se retrouve sous les climats méditerranéens (DIDI, 2009).

3-1-2- Classification phylogénique

La classification de *Arbutus unedo* selon GUIGNARD (2001).

Règne :	Végétal
Embranchement :	Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Sous-classe :	Gamopétales
Ordre :	Ericales
Famille :	Ericaceae
Genre :	<i>Arbutus</i>
Espèce :	<i>Arbutus unedo</i>

3-1-3- Description *botanique*

Arbutus unedo communément appelé arbousier, est une espèce commune rencontrée en méditerranée, elle s'adapte à une large gamme de sols et d'expositions (MORRIS, 2007). La hauteur de cet arbre peut atteindre 10m et 0.8m de largeur, il est doté d'une écorce brun-rouge caractéristique marquée de fines gerçures. Ses feuilles sont lancéolées et luisantes de forme ovale aux bordures dentées persistantes durant toute l'année. Le fruit, l'arbose, de forme ovale aux bordures dentées persistantes durant toute l'année. Le fruit, l'arbose, de forme d'une baie sphérique de 1 à 2 cm de diamètre à peau rugueuse couverte de petites pointes coniques, rouge orangé ; à maturité sa chaire est molle, acidulée et sucrée (BOULLARD, 2001 ; ISERIN, 2001 ; BROSSE, 2005 ; AIT-YOUSSEF, 2006 ; POLESE, 2010 ; VIDRIH *et al.*, 2013).

Les parties aériennes (feuilles, fruits) de *Arbutus unedo* sont illustrées dans la figure 1.



Figure 1 : Arbre de *Arbutus unedo* (anonyme)

3-1-4- Usages traditionnels

En médecine traditionnelle le fruit est reconnu pour avoir des propriétés astringentes, diurétiques, antiseptiques et anti-inflammatoires (DOUKANI *et al.*, 2014 ; MOUALEK *et al.*, 2016). Au Maroc occidental, la plante est utilisée comme remède naturel pour l'hypertension et aussi contre le diabète (BNOUHAM *et al* ; EL HOUARI, 2007).

3-2-*Phlomis bovei*

3-2-1- Présentation de *Phlomis bovei*

Le genre *Phlomis* appartenant à la famille des Lamiaceae qui constitue une importante famille des herbacées répartie sur tout le globe. Elle est représentée par 28 genres et 146 espèces (GRAYNER *et al.*, 2003 ; HEYWOOD *et al.*, 2007). *Phlomis bovei* fait partie de l'une des 9 plantes endémiques enregistrées dans le rapport national sur la diversité biologique en Algérie (QUEZEL ; 1963).

3-2-2- Classification Phylogénique

La classification phylogénique de *Phlomis bovei* selon GUIGNARD (2001) et SPICHIGER *et al* (2004).

Règne :	Végétal
Embranchement :	Spermaphytes
Sous- embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Sous-classe :	Gamopétales
Ordre :	Lamiales
Famille :	Lamiaceae
Genre :	<i>Phlomis</i>
Espèce :	<i>Phlomis bovei</i>

3-2-3-Description botanique

Phlomis bovei est une plante herbacée vivace mesurant jusqu'à 80cm de hauteur, ses feuilles sont opposées simples et ridées, ses fleurs sont blanches, rosâtres ou violacées (AIT YOUSSEF, 2006).

Les parties aériennes (feuilles, fleurs) de *Phlomis bovei* sont illustrées dans la figure 2.



Figure 2 : Parties aériennes de *Phlomis bovei* (Anonyme)

3-2-4- Usages traditionnels

De nombreux chercheurs ont souligné l'utilisation du genre *Phlomis* en médecine traditionnelle. Selon KABOUCHE *et al* (2004) en Algérie, le genre *Phlomis*, est utilisé pour soigner les inflammations et les rhumatismes.

En Turquie, elle est utilisée pour ses propriétés diurétiques, toniques et stimulantes ainsi pour le traitement des hémorroïdes (LAZREG *et al.*, 2011). Tandis qu'en Tunisie, elle est employée pour la cicatrisation des plaies et dans le traitement des brûlures (AIT YOUSSEF, 2006).

3-3-Rosa sempervirens

3-3-1- Présentation de *Rosa sempervirens*

Rosa sempervirens appartient à la famille des Rosaceae. Cette espèce est retrouvée en Afrique du nord et en Europe du Sud (GHAZGHAZI, 2012).

3-3-2-Classification Phylogénique

La classification de *Rosa sempervirens* selon GUINGNARD (2001).

Règne :	Végétal
Embranchement :	Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Eudicotylédones
Sous-classe :	Gamopétales
Ordre :	Rosales
Famille :	Rosaceae
Genre :	<i>Rosa</i>
Espèce :	<i>Rosa sempervirens</i>

3-3-3-Description botanique

Rosa sempervirens est un arbre épineux de 5 à 10m de hauteur. Ses feuilles sont alternes, composées quant aux fleurs sont terminales de couleur blanche (GHAZGHAZI, 2012).

Les parties aériennes (feuilles, fleurs) de *Rosa sempervirens* sont illustrées dans la figure 3.



Figure 3 : Parties aériennes de *R.sempervirens* (anonyme).

3-3-4- Usages traditionnels

Le fruit de *Rosa sempervirens* possède une teneur élevée en acide ascorbique et flavonoïdes qui lui confèrent des propriétés anti-oxydantes, antimutagènes et anticancérogènes (ROMAN *et al.*, 2013). Il est également utilisé en médecine traditionnelle comme remède contre le diabète (FATTAHI *et al.*, 2017).

3-4-*Verbascum sinuatum*

3-4-1- Présentation de *Verbascum sinuatum*

L'espèce *Verbascum sinuatum*, fait partie de la grande famille cosmopolite des Scrophulariaceae. *Verbascum* est l'un des principaux genres comprenant environ 360 espèces dans le monde (SHARIFNIA, 2011 ; SOTOODEH *et al.*, 2015).

3-4-2-Classification Phylogénique

La classification de *V. sinuatum* selon GUIGNARD (2001).

Règne :	Végétal
Embranchement :	Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Sous-classe :	Gamopétales
Ordre :	Lamiales
Famille :	Scrophulariaceae
Genre :	<i>Verbascum</i>
Espèce :	<i>Verbascum sinuatum</i>

3-4-3- Description botanique

Appelé aussi molène à feuilles sinuées, herbe vivace annuelle, sa hauteur peut atteindre 0,5 à 3m. Sa tige est érigée, ses feuilles sont alternes et rarement opposées Les fleurs sont de couleur jaune, orange et parfois blanche (SOTOODEH, 2015).

Les parties aériennes de *verbascum sinuatum* sont représentées dans la figure 4.



Figure 4 : Parties aériennes de *Verbascum sinuatum* (anonyme)

3-4-4- Usages traditionnels

Verbascum sinuatum est utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement d'une large gamme de maladies, notamment la bronchite la tuberculose, l'asthme et différentes inflammations (MILENI *et al.*, 2011).

En Turquie, les feuilles et les fleurs sont utilisées afin de soigner et traiter les problèmes respiratoires, l'eczéma et d'autres types d'infections cutanées. En outre elles sont également utilisées pour produire un effet apaisant et anti-inflammatoire des voies urinaires (TATLI *et al.*, 2008).

1-Bacillus cereus

1-1-Présentation et classification

Bacillus cereus est une bactérie à Gram positif. C'est un micro-organisme mobile grâce à une ciliature péritriche. Il se présente sous forme de bâtonnet de grande taille (>0.14 µm) à bords réguliers (LOUAMI, 2012). Les bacilles peuvent être isolés ou associés en diplobacilles ou en chaînettes. Ils présentent un métabolisme respiratoire aéro-anaérobie facultatif et sont dotés d'une capacité à sporuler lors de l'établissement des conditions défavorables à leur croissance (LELAY, 2014).

La classification de *B.cereus* selon la seconde Edition de Bergey's Manuel of Systematic bacteriology (2004) est comme suite :

- Classe** : Bacilli
- Ordre** : Bacillales
- Famille** : Bacillaceae
- Genre** : *Bacillus*
- Espèce** : *Bacillus cereus*

1-2-Caractères cultureux

Etant des bactéries thermophiles, leur gamme de température de croissance s'étend de 5°C à 55°C avec un optimum compris entre 30°C et 37°C. Leur pH de croissance est compris entre 4,5 et 9,3.

La culture des *bacillus* s'effectue facilement sur des milieux de cultures classiques comme la gélose nutritive ordinaire. Il existe également des milieux sélectifs tels que le milieu Mossel.

1-3-Caractères biochimiques

Les principaux caractères biochimiques de *B.cereus* sont résumés dans le tableau I.

Tableau I : Principaux caractères biochimiques de *Bacillus cereus* (DROMIGNY, 2008).

Tests	VP	CS	GEL	Caséine	URE	GLU	Mannitol
Résultats	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)

(+) Test positif ; (-) Test négatif

1-4-Réservoirs naturels

Il s'agit d'une espèce ubiquitaire très répandue dans la nature, retrouvée principalement sous forme de spores dans le sol (STENFORS *et al.*, 2008), à la surface des végétaux (KOUAME *et al.*, 2013), rivière (OSTENSVIK *et al.*, 2004), ou encore dans l'air ambiant (LUES *et al.*, 2007).

1-5-Risque infectieux

L'Institut National de Veille Sanitaire (INVS) a classé *B.cereus* comme étant la 2^{ème} cause de TIAC en France (INVS, 2012). En effet, le facteur le plus important de sa pathogénicité est la capacité d'élaborer des toxines responsables d'un syndrome émétique et d'un syndrome diarrhéique.

Il est également reconnu comme un agent indésirable en industrie agroalimentaire pour son altération aux qualités organoleptiques des aliments. Sa capacité à sporuler lui confère la possibilité de résister aux traitements thermiques ainsi que la formation des biofilms qui rend son éradication difficile (GRIESS, 2013).

1-6-Sensibilité de *Bacillus cereus*

Bacillus cereus présente une certaine sensibilité vis-à-vis d'un certain nombre d'antibiotiques tel que : l'érythromycine, clindamycine, chloramphénicol, vancomycine, aminosides, cyclines et les sulfamides. En revanche, elle présente une résistance aux β lactamines tel que : la pénicilline G, ceci est dû à des enzymes telle que la β -lactamase chromosomique (TEYSSOU *et al.*, 1998).

2-*Staphylococcus aureus*

2-1- Présentation et classification

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif, typiquement groupés en amas ou en grappes de raisin, rarement isolés ou groupés en diplocoque. Ils sont aéro-anaérobies facultatifs, immobiles, asporulés et acapsulés (AVRIL *et al.*, 2003).

La classification de *S.aureus* selon la seconde Edition de Bergey's Manuel of Systematic bacteriology (2004) est comme suite :

Classe : Bacilli
Ordre : Bacillales
Famille : Staphylococcaceae
Genre : *Staphylococcus*
Espèce : *Staphylococcus aureus*

2-2-Caractères cultureux

Les staphylocoques se cultivent sur milieux usuels (gélose ordinaire, bouillon), sélectifs (gélose au sang + acide nalidixique) gélose sélective salée (gélose Chapman 7,5% NaCl par litre). Le pH de ces milieux varie dans une large gamme allant de 4,2 jusqu'à 9,3 avec un optimum de croissance de 7 à 7,5. La température d'incubation est comprise entre 10 et 45°C (optimum 37°C). La plupart des souches produisent un pigment doré sur milieu gélosé (BRUN *et al.*, 2006).

2-3-Caractères biochimiques

Les principaux caractères biochimiques de *S.aureus* sont résumés dans le tableau II.

Tableau II : Les principaux caractères biochimiques de *S.aureus* (GARRITY *et al.*, 2003).

Tests	Coagulase	DNase	Mannitol	Catalase
Résultats	(+)	(+)	(+)	(+)

2-4-Réservoirs naturels

Les staphylocoques sont très répandus dans la nature, l'Homme représente une des niches écologiques les plus importantes pour ces germes. Il s'agit essentiellement de *S.aureus*, *S.epidermidis* qui vivent à l'état commensal ; sur la peau et les muqueuses et qui peuvent entraîner une dissémination chez l'Homme (AVRIL *et al.*, 2003).

2-5-Sources de contaminations

S.aureus peut être transmis directement du porteur ou du malade à un individu sain à partir des lésions ouvertes. La transmission indirecte est possible aussi, elle se fait par l'intermédiaire de l'eau, des aliments, des mains du personnel soignant et du matériel médical souillé. En milieu hospitalier, les souches transmises sont celles hébergées soit par un malade soit par le personnel médical lui-même. Ce qui est la base des infections nosocomiales d'autant plus grave qu'il s'agira de *S.aureus* résistant à la méticilline (BRUN *et al.*, 2006).

2-6-Sensibilité de *S.aureus*

S.aureus est une espèce qui présente une grande capacité d'adaptation vis-à-vis de la contrainte aux antibiotiques, les mécanismes de résistance de *S.aureus* sont différents selon la classe des antibiotiques. Elle est naturellement résistante aux monobactames (aztréonam), aux quinolones de 1^{ère} génération (acide nalidixique) et aux peptides cycliques. Les autres antibiotiques ont tous une action potentielle sur *S.aureus* sauf en cas de développement de résistance acquise, le cas de la résistance acquise à la méthicilline (ALIOUA, 2015 ; DIOPDEME, 2016).

3-*Pseudomonas aeruginosa*

3-1-Présentation et classification

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif qui se présente sous forme de bacille fin, droit et très mobile grâce à un flagelle polaire (ciliature monotriche) elle apparaît généralement isolée ou en diplobacille. Elle est aérobie strict, chimioorganotrophe à métabolisme oxydatif (TERRIER *et al.*, 1992).

La classification de *P.aeruginosa* selon la seconde Edition de Bergey's Manuel of Systematic bacteriology (2004) est comme suite :

- Classe :** proteobacteria
- Ordre :** Pseudomonadales
- Famille :** Pseudomonadaceae
- Genre:** *Pseudomonas*
- Especie :** *Pseudomonas aeruginosa*

3-2-Caractères cultureux et pigments

Le bacille pyocyanique se cultive facilement sur milieux ordinaires, il est incubé entre 30 et 37°C. Le pH favorable de sa croissance est de 7,2 mais peut varier de 6 à 8. Sur des surfaces biotiques et abiotiques il est capable de produire des agrégats structurés ou biofilms, constitués d'une matrice essentiellement composée de polysaccharides complexes dans laquelle sont insérées des bactéries.

La production de pigments hydrosolubles, diffusant dans les milieux de culture est l'une des caractéristiques les plus spectaculaires des souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

Les types de pigments produits sont :

- la pyocyanine
- la pyoverdine
- la pyorubrine ou aeruginosine
- la pyomelanine.

3-3-Caractères biochimiques

Les principaux caractères biochimiques de *P.aeruginosa* sont résumés dans le tableau III.

Tableau III : caractères biochimiques de *Pseudomonas aeruginosa* (AVRIL *et al.*, 1992).

Tests	ADH	ONPG	CS	GEL	H ₂ S	LDC	ODC	URE	VP	NIT
Résultats	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)

3-4-Réservoirs naturels

Les souches de *Pseudomonas* sont saprophytes des eaux, des sols humides, des végétaux, de l'environnement humain. C'est ainsi qu'on distingue :

- Les souches marines dans les eaux de mers ;
- Dans l'environnement ; elles sont surtout fréquentes en milieu hospitalier. Elles peuvent aussi vivre chez les animaux d'élevage ;
- Chez l'Homme ; elles peuvent vivre à l'état saprophyte dans son tube digestif (AVRIL *et al.*, 1992).

3-5-Sources de contaminations

Dans les habitations les réservoirs peuvent être des sources potentielles de bacilles pyocyaniques. En milieu hospitalier, les sources de contaminations sont très diverses, nébuliseurs et respirateurs artificiels, cathéters veineux, sonde urinaire, perfuseurs et aiguilles mal stérilisés, ainsi que le matériel opératoire (ciseaux, bistouri) (MAIMOUNA, 1993).

3-6-Risque infectieux

La liste des infections liées à *Pseudomonas aeruginosa* est longue et non exhaustive. Ce germe en tant que pathogène opportuniste, colonise puis infecte les sujets immunodéprimés ou affaiblis comme les grands brûlés, les cancéreux en unités de soins intensifs, les transplantés, les dialysés ou les sujets atteints de mucoviscidose ; ce qui explique

sa prévalence en milieu hospitalier ainsi que sa multi-résistance aux antibiotiques (KHALIL, 2009).

3-7-Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa n'est sensible qu'à quelques antibiotiques et le choix des molécules est donc délicat et important.

Pseudomonas aeruginosa est résistant à de nombreux antibiotiques : benzylpenicillines, aminopenicillines, cephalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} générations, phénicoles, tétracyclines, triméthoprimes. Cette résistance répond à trois mécanismes :

-l'imperméabilité de la paroi à certains antibiotiques entraîne une résistance naturelle pour les pénicillines M (mécilline, cloxacilline) ou encore une résistance acquise faisant intervenir des porines vis-à-vis de la ticarcilline, la cefsulodine et l'imipénème ;

-l'inactivation enzymatique par les 17 β -lactamases plasmidiques ainsi qu'une résistance naturelle aux premières β -lactamines qui se fait par synthèse d'une β -lactamase chromosomique ;

-la modification de l'affinité de l'antibiotique pour la cible (MAIMOUNA, 1993).

4-*Escherichia coli*

4-1-Présentation et classification

E.coli est un bacille de forme cylindrique à Gram négatif, non sporulé, anaérobie facultatif. Il se présente soit seul soit groupé par deux (diplobacille), très rarement rencontré en amas ; mobile grâce à une ciliature péritriche (GROSJEAN et PASQUIER, 2009).

La classification de *E.coli* selon la seconde Edition de Bergey's Manual of Systematic bacteriology (2004) est comme suite :

Classe : Gammoproteobacteria

Ordre : Enterobacteriales

Famille : Enterobacteriaceae

Genre : *Escherichia*

Espèce : *Escherichia coli*

4-2-Caractères cultureux

E.coli est une bactérie mésophile, avec un optimum de croissance de 35-43°C. Le pH favorable à sa croissance est de 7,2 avec une activité en eau (A_w) optimale de 0,99. *E.coli*

se multiplie rapidement sur gélose ordinaire ou sélective, après 18 à 24 heures d'incubation (FRENEY *et al.*, 2007).

4-3-Caractères biochimiques

Les principaux caractères biochimiques de *E.coli* sont résumés dans le tableau IV.

Tableau IV : Principaux caractères biochimiques d'*E.coli* (FRENEY *et al.*, 2007).

Tests	GLU	LAC	Mannitol	Dexterine	Gaz	Indole	Trp	Citrate	VP
Résultats	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)

4-4-Réservoirs naturels

Les souches de *Escherichia coli* sont retrouvées dans le tractus gastro-intestinal de nombreux animaux à sang chaud, y compris les humains, où elles jouent généralement le rôle des bactéries commensales (DIALLO, 2013). Les principaux réservoirs d'*E.coli* peuvent être : Les animaux en particulier les ruminants domestiques, les volailles, le sol, les végétaux et les eaux d'irrigation.

4-5-Sources de contamination

Ces bactéries sont considérées comme des agents zoonotiques, du faite de la possibilité de leur transmission directe ou indirecte des réservoirs animaux à l'Homme. La transmission directe est possible par contact avec les animaux infectés, mais aussi de personne à personne (transmission interhumaine féco-orale). Le principal mode de contamination est celui de consommation d'aliments d'origine animale ou végétale et d'eau contaminés (ANSES, 2011).

4-6-Sensibilité de *Escherichia coli*

L'acquisition des facteurs de virulence font des souches commensales des agents pathogènes capables de causer une variété de maladies. Le principal mécanisme impliqué dans la résistance des bactéries à Gram négatif aux β -lactamines sont des enzymes tels que les β -lactamases à spectre étendu capable d'hydrolyser une variété importante d'antibiotiques comme les céphalosporines à large spectre, les monobactames, et les pénicillines (MEGUENNI, 2016).

Le présent travail dont l'objectif est l'évaluation in vitro de l'activité antibactérienne d'extraits de quatre plantes médicinales de Kabylie ainsi que l'étude de l'effet antibactérien de l'association de ces extraits avec des antibiotiques a été réalisé au niveau du laboratoire de biochimie analytique et de biotechnologie (LABAB) de la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques.

1-Matériels

1-1-Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des feuilles de plantes médicinales sélectionnées en tenant compte de leurs utilisations thérapeutiques dans la médecine traditionnelle.

Les noms des plantes sélectionnées ainsi que les régions et les périodes de la récolte sont consignées dans le tableau V.

Tableau V: Plantes étudiées

Nom scientifique	Nom vernaculaire	Région de récolte	Période de récolte
<i>Arbutus unedo</i>	Assisnou	Beni yenni	Décembre 2016
<i>Phlomis bovei</i>	Amzough guilef	Assif el Hammam (Adekar)	Mai 2016
<i>Rosa sempervirens</i>	Thaafarth	Ain el Hammam	Décembre 2016
<i>Verbascum sinuatum</i>	Thoufalt	El kseur	Aout 2016

1-2-Les souches testées

Le test de l'activité antibactérienne a été mené sur quatre souches de référence fournies par l'équipe de recherche de LABAB, le choix des souches est basé sur leur implication en pathologie humaine et notamment leur résistance aux antibiotiques.

- bactéries à Gram négatif : *Echerichia coli* Béta Lactamase à Spectre Étendu (BLSE) E88, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- bactéries à Gram positif: *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* MU50.

1-3-Autres matériels

En plus du matériel de laboratoire de microbiologie (verrerie, becs bunsen, étuve...) la réalisation de ce travail a nécessité l'utilisation :

➤ Appareils

-rotavapeur : utilisé pour la concentration de l'extrait éthanolique (figure 5) ;

-lyophilisateur : utilisé pour la sublimation de l'extrait aqueux (figure 6) ;

-lecteur ELISA : lecture des DO sur microplaques (figure 7).



Figure 5 : Rotavapeur utilisé



Figure 6 : Lyophilisateur utilisé



Figure 7 : Lecteur ELISA utilisé

➤ Milieux de culture

Selon les méthodes employées et les souches étudiées on a utilisé :

- gélose MULLER HINTON (MH)
- gélose Chapman
- gélose Hecktoen
- gélose nutritive Composition des milieux utilisés : voir annexe02)
- milieu liquide MULLER HINTON(BMH) et BHIB.

➤ Réactifs chimiques et autres produits

- disques d'antibiotiques
- antibiotiques en poudre (amoxiciline, acide nalidixique)
- colorants pour la coloration de Gram (Coloration de Gram : voir annexe 03)
- éthanol
- eau physiologique

2-Méthodes

2-1-Extraction

Après la récolte la partie retenue des plantes a été séchée à température ambiante à l'abri de la lumière puis réduite en poudre, cette dernière a été utilisée pour la préparation des extraits.

On a procédé à des extractions avec deux solvants, eau distillée pour l'extraction aqueuse réalisée pour les quatre plantes et éthanol pour l'extraction éthanolique réalisée uniquement pour *Verbascum sinuatum*, selon les étapes suivantes :

2-1-1-macération

20 g de poudre sont laissés macérer dans 200 ml de solvant (eau distillée pour l'extraction aqueuse, éthanol pur 99,8% pour l'extraction éthanolique) sous agitation magnétique dans un flacon ambré pendant 24 heures.

2-1-2-filtration

le macérât obtenu a subi deux filtration ; une première filtration grossière qui consiste à le faire passer à travers une passoire pour se débarrasser des grosses particules et une deuxième filtration qui a été faite à l'aide du papier filtre wattman N°1.

2-1-3-évaporation du solvant

Cette étape a été effectuée avec deux méthodes selon le solvant utilisé

- cas de la préparation aqueuse : le filtrat a été versé dans des cristallisoirs, après une nuit au congélateur à -80°C on procède à une lyophilisation.
- Cas de la préparation éthanolique : le filtrat est concentré sous vide à une température de 60°C à l'aide d'un évaporateur rotatif, le reste du solvant a été laissé évaporer à l'air libre.

Les extraits récupérés sont conservés dans des flacons hermétique à une température de 4°C jusqu'à leur utilisation.

Les différentes étapes de l'extraction sont résumées dans la figure 8.

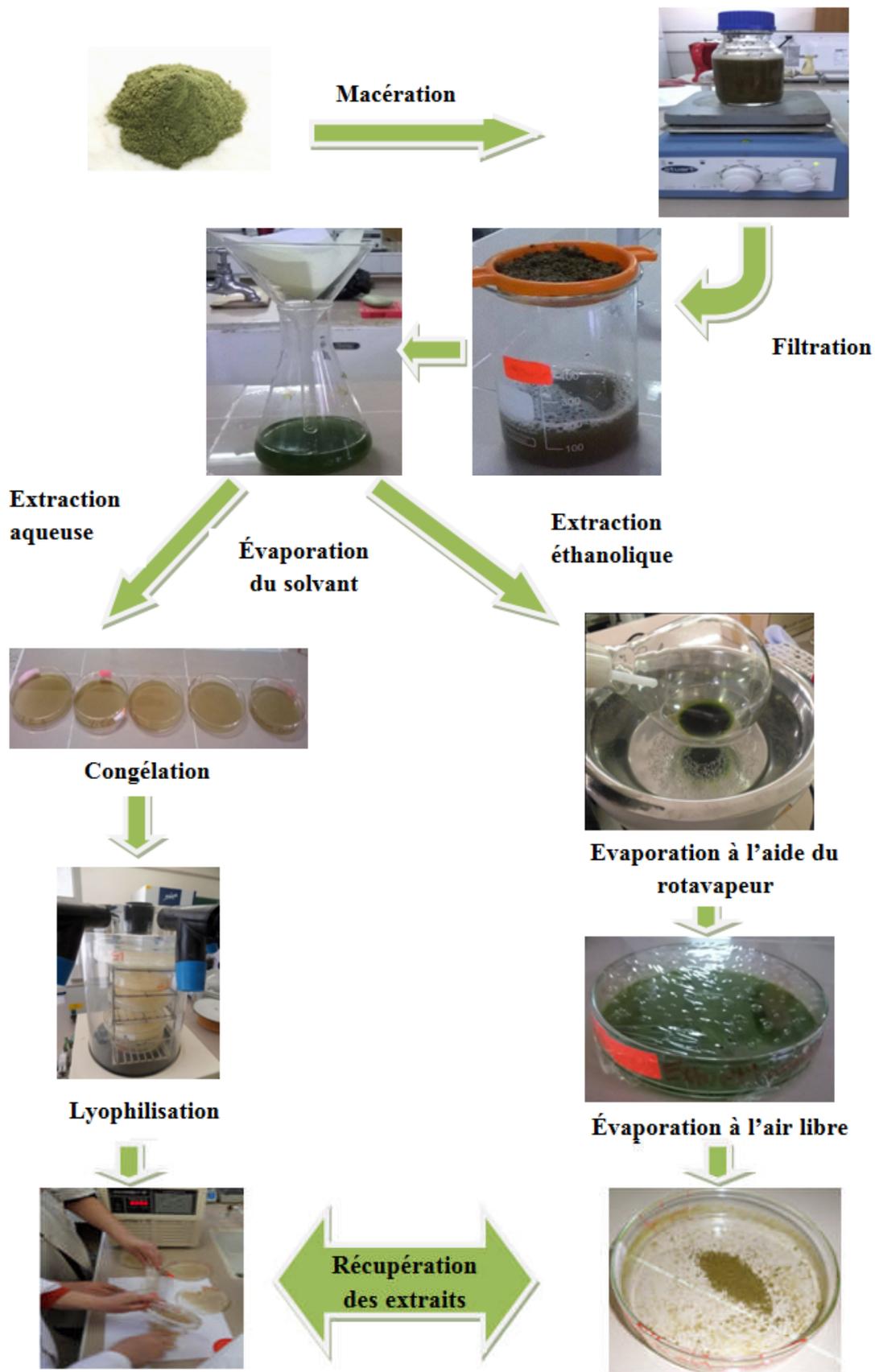


Figure 8 : Différentes étapes de l'extraction

2-2-Confirmation de la pureté des souches

Les germes qui ont fait l'objet des tests sont des souches de référence mais la confirmation de leur pureté était une étape primordiale avant d'entamer toute étude. A partir des stocks Cryoconservés, le milieu BHIB a été inoculé et incubé 18 à 24 heures à 37°C puis les suspensions bactériennes ont été ensemencées en stries sur milieux sélectifs après une incubation dans les mêmes conditions préalablement citées on a procédé à une confirmation qui s'est déroulée en deux étapes :

- Analyse des caractères macroscopiques (forme, contour, taille, couleur des colonies...)
- Analyse des caractères microscopiques (coloration de Gram, formes des germes et leurs modes de regroupement).

2-3-Etude de l'activité antibactérienne

Pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits de plantes nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose.

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri avec création d'un gradient de concentration, après un certain temps de contact avec le microorganisme ; l'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition (figure 9).

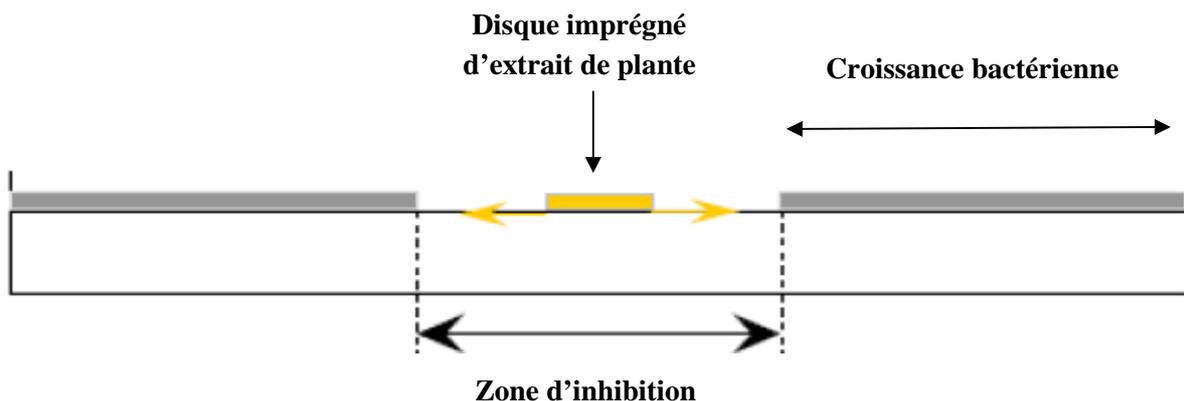


Figure 9: Schéma simplifié du principe de la méthode de diffusion sur gélose

2-3-1 Préparation de l'inoculum bactérien

L'inoculum bactérien a été préparé à partir d'une culture jeune de 18 à 24 heures sur gélose MH en prélevant 2 à 3 colonies isolées et les mettre en suspension dans une eau saline(0,9% NaCl).

La turbidité de cette suspension bactérienne est ajustée à l'aide d'un photomètre à une longueur d'onde de 625nm jusqu'à l'obtention d'une absorbance comprise entre 0,08 et 0,1 correspondant approximativement à une charge bactérienne de 10^8 UFC /ml.

2-3-2 Ensemencement

Des boîtes de MH coulées et séchées à l'étuve pendant 24 heures ont été ensemencées par écouvillonnage avec la suspension inoculum diluée au 1 /100 (10^6 UFC/ml) selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM 2017).

2-3-3 Préparation et dépôt des disques

Du papier filtre Wattman N°3 a été découpé en disques de 6mm de diamètre et stérilisés à l'autoclave avant leur utilisation. Ces derniers ont été imbibés de 15µl d'extraits de plantes à tester solubilisés dans de l'eau distillée et stérilisés sous ultraviolet (UV) pendant 30min.

Les disques imprégnés ont été déposés à l'aide d'une pince fine stérilisée à la flamme du bec bunsen de sorte que chaque boîte préalablement ensemencée renferme un disque de chacun des extraits et un disque imbibé d'eau distillée stérile (témoin négatif) ainsi qu'un disque d'antibiotique de référence (témoin positif).

Les antibiotiques de référence utilisés sont :

- la gentamicine (G 10 µg) pour *Bacillus cereus* ATCC 10876, *E.coli* BLSE E88, *Staphylococcus aureus* MU50
- la méropénème (MRP 10µg) pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Les concentrations des extraits des plantes testées sont représentées dans le tableau VI.

Tableau VI : Concentrations des extraits testés

Nom de la plante	Concentration de l'extrait (mg/ml)
<i>Arbutus unedo</i>	200
<i>Phlomis bovei</i>	1000
<i>Rosa sempervirens</i>	200
<i>Verbascum sinuatum</i> (extrait aqueux)	500
<i>Verbascum sinuatum</i> (extrait éthanolique)	500

Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures, chaque test a été répété 3 fois pour chaque souche et les résultats ont été appréciés en mesurant à l'aide d'une règle millimétrée le diamètre des zones d'inhibitions induites par les extraits testés et les antibiotiques de référence.

2-4-Détermination de la concentration minimale bactéricide

La détermination des CMB des extraits ayant présentés une activité antibactérienne ainsi que la CMB de deux antibiotiques en poudre a été réalisée par la technique de dilution en milieu liquide (bouillon MH) sur microplaque (plaque ELISA) couplée à un dépôt de spots sur milieu solide (gélose MH) selon ORHAN *et al.*, (2005).

Dans la méthode de dilution en bouillon on distribue dans un premier temps 100µl de bouillon MH dans une série de puits allant du puits A jusqu'au puits G de la ligne de la microplaque puis on rajoute dans un second temps 100µl d'extrait dans la première cupule à partir de laquelle une série de dilution décroissante en demi a été réalisée dans le bouillon MH, ensuite chaque puits a étéensemencé par 100µl de l'inoculum bactérien (10^6 UFC/ml) pour un volume total de 200µl (voir figure 10). La série de dilution a été répétée 3 fois pour chaque extrait.

Les puits de la colonne H ont servi à contrôler d'une part la présence d'une éventuelle contamination du milieu de culture en déposant 200µl de bouillon MH (témoin négatif) et d'autre part à contrôler la qualité de croissance de la souche en ensemençant un puits comportant 100µl de bouillon MH par 100µl de l'inoculum bactérien à 10^6 UFC/ml (témoin positif). La plaque est ensuite recouverte et incubée à 37°C pendant 24 heures.

La CMB a été déterminée par dépôt de spot de 100µl du contenu de chaque cupule de la série de dilution sur milieu solide.

La CMB correspond à la plus petite concentration de l'extrait qui ne laisse survivre que 0,01% des bactéries de la suspension de départ en 24 heures.

Les concentrations maximales et minimales des gammes de dilutions réalisées pour les extraits et les antibiotiques sont représentées dans les tableaux VII et VIII.

Tableau VII : Les concentrations minimales et maximales des gammes de dilutions des extraits ainsi que les souches pour lesquelles les CMB sont déterminées.

Extrait	Souche	Concentration maximale (mg /ml)	Concentration minimale (mg/ml)
<i>Arbutus unedo</i>	<i>B.cereus</i> <i>S.aureus</i>	200	3,12
<i>Phlomis bovei</i>	<i>B.cereus</i>	1000	15,62
<i>Rosa sempevirens</i>	<i>B.cereus</i> <i>S.aureus</i>	200	3,12
<i>Verbascum sinuatum</i> (extrait aqueux)	<i>B.cereus</i>	1000	15,62
<i>Verbascum sinuatum</i> (extrait éthanolique)	<i>S.aureus</i>	500	7,81

Tableau VIII : Les concentrations minimales et maximales des gammes de dilutions des antibiotiques ainsi que les souches pour lesquelles les CMB sont déterminée.

Antibiotique	Souche	Concentration maximale (µg/ml)	Concentration minimale (µg/ml)
Acide nalidixique	<i>B.cereus</i>	100	1,56
Amoxiciline	<i>S.aureus</i>	100	1,56

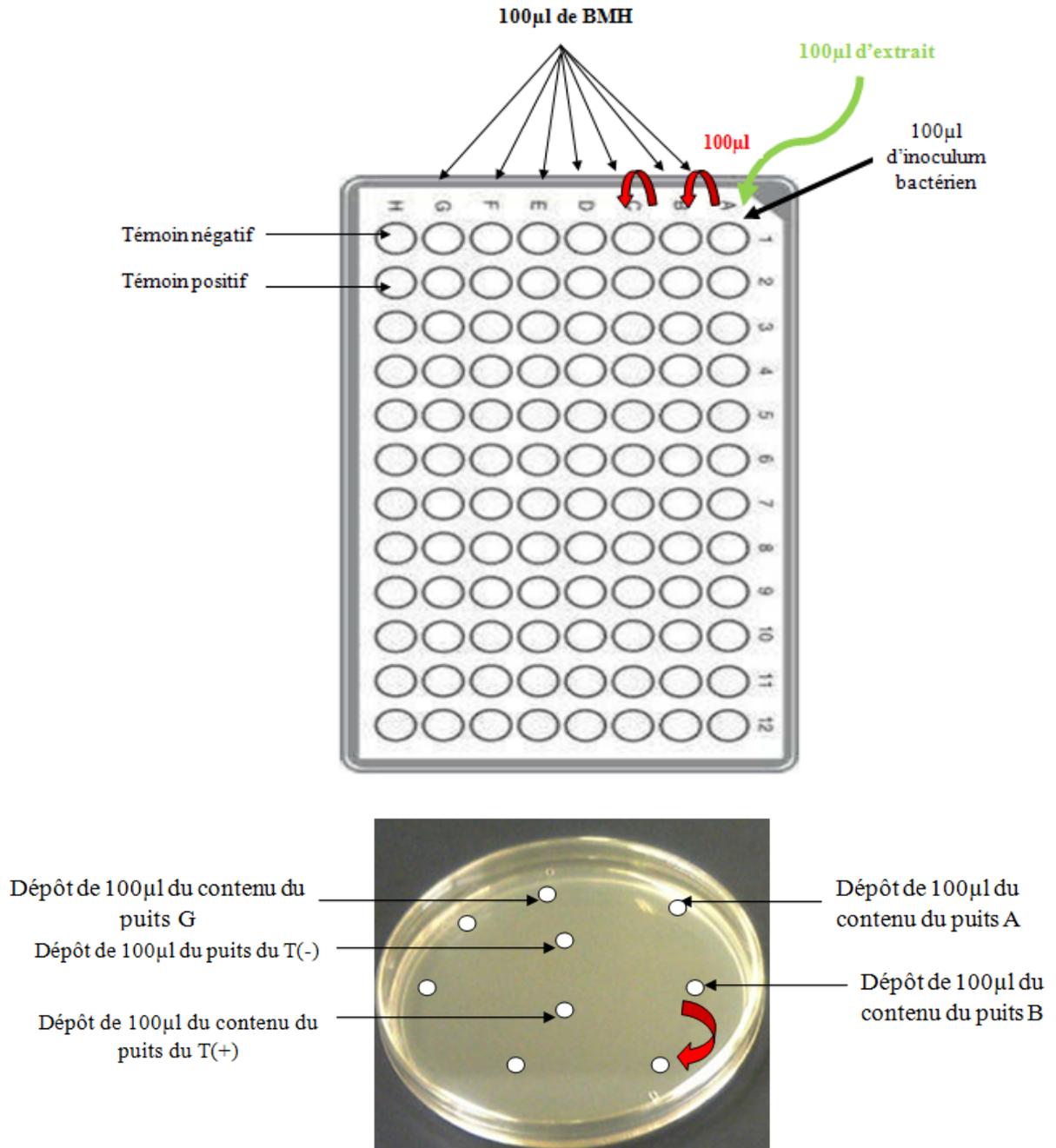


Figure 10 : schéma de la détermination des CMB

2-5- Étude de l'effet antibactérien de l'association extrait-antibiotique

Le but de ce test est d'étudier l'effet antibactérien d'une association entre extrait de plante médicinale et un antibiotique. L'étude a été effectuée en combinant un extrait avec un antibiotique selon la méthode de l'échiquier en milieu liquide de ORHAN *et al.*, (2005), sur microplaque (49 puits sont utilisés).

On introduit verticalement 50µl des concentrations décroissantes en demi de l'extrait de plante et horizontalement 50µl des concentrations décroissantes en demi de l'antibiotique de façon que chaque puits contienne un croisement de 50µl d'une concentration de la gamme de dilution de l'extrait et 50µl d'une concentration de la gamme de dilution de l'antibiotique, ensuite 100µl de l'inoculum bactérien à 10^6 UFC/ml a été apporté à tous les puits (voir figure 11).

Les antibiotiques choisis pour les combinaisons sont l'acide nalidixique pour *B.cereus* et l'amoxiciline pour *S.aureus* en raison de leur CMI élevées.

La CMI de chacun des extraits et antibiotiques tout seul a été déterminée en parallèle où 50µl de la même série de dilution ont reçu 50µl de BMH et inoculés de 100µl de la suspension bactérienne. Après 24 heures d'incubation à 37°C la plaque est portée sous agitation et les résultats de la combinaison vis-à-vis de la souche sont appréciés avec un lecteur ELISA à une longueur d'onde de 560-630 nm.

L'interprétation des résultats se fait en calculant la concentration fractionnelle inhibitrice (CFI) en anglais FIC : Fractional Inhibitory Concentration

$$\text{CFI de l'extrait} = \frac{\text{CMI de l'extrait combiné avec l'antibiotique}}{\text{CMI de l'extrait seul}}$$

$$\text{CFI de l'antibiotique} = \frac{\text{CMI de l'antibiotique combiné avec l'extrait}}{\text{CMI de l'antibiotique seul}}$$

$$\text{CFI} = \text{CFI de l'extrait} + \text{CFI de l'antibiotique}$$

Les différentes associations extraits-antibiotiques testées sont représentées dans le tableau IX.

Tableau IX : Les combinaisons testées

Souche	Combinaison testée
<i>B.cereus</i>	Acide nalidixique- <i>Verbascum sinuatum</i> (extrait aqueux) Acide nalidixique- <i>phlomis bovei</i>
<i>S.aureus</i>	Amoxiciline- <i>Arbutus unedo</i> Amoxiciline- <i>Rosa sempervirens</i>

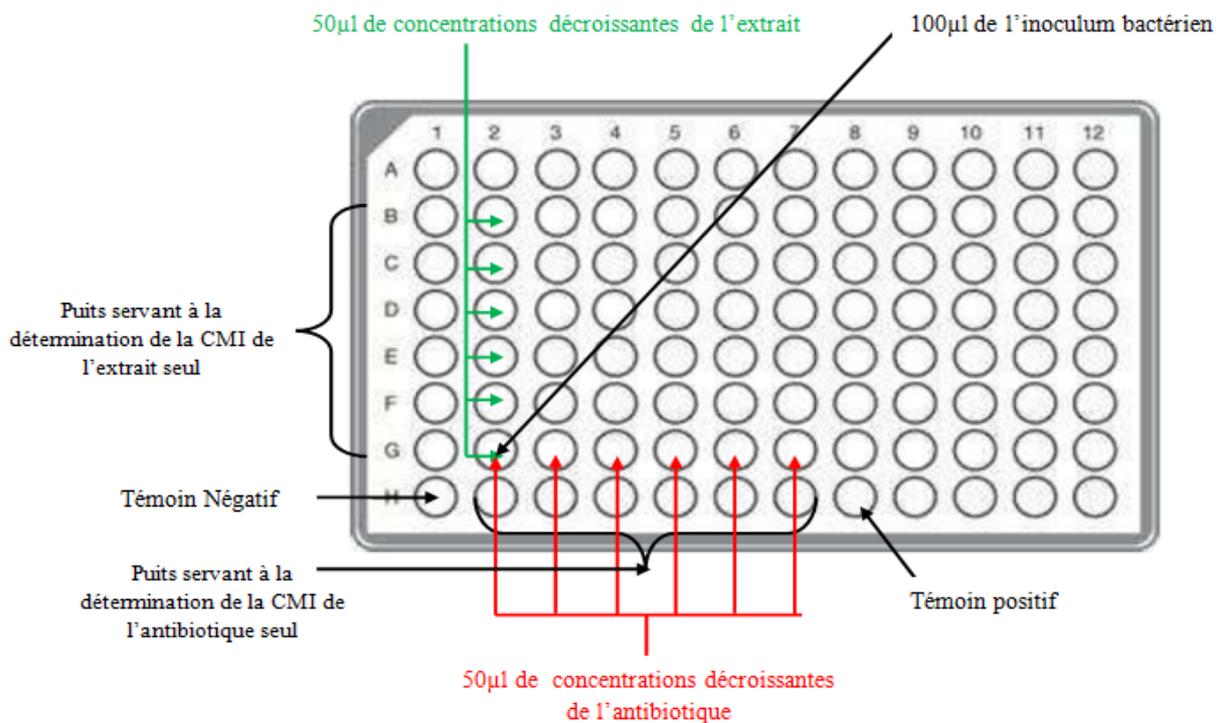


Figure 11 : Démarche de l'étude de l'association extrait-antibiotique

1-Confirmation de la pureté des souches bactériennes

Les aspects macroscopiques et microscopiques qui ont permis de confirmer la pureté des souches utilisées sont représentés dans les figures 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19.



Figure 12 : Aspect des colonies de *B.cereus* sur gélose nutritive

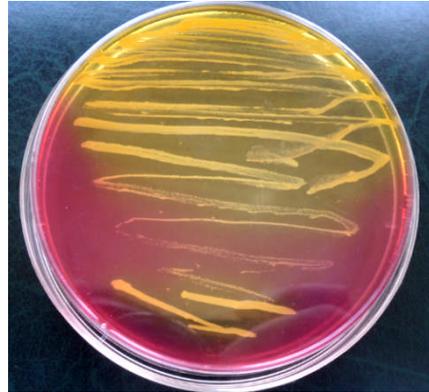


Figure 13 : Aspect des colonies de *S.aureus* sur gélose Chapman

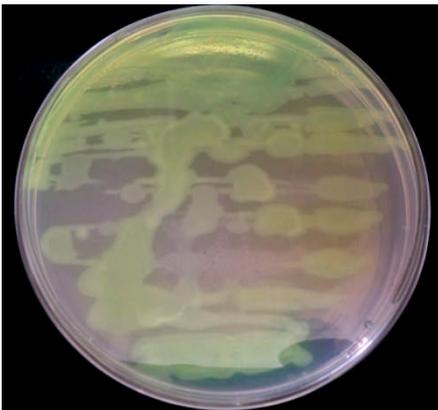


Figure 14 : Aspect des colonies de *P.aeruginosa* sur gélose King B



Figure 15 : Aspect des colonies de *E.coli* sur gélose Hecktoen

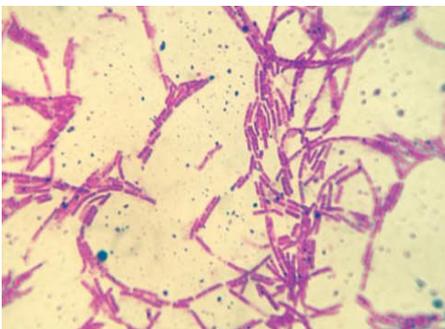


Figure 16 : *B.cereus* observée au microscope photonique G×100 après coloration de Gram

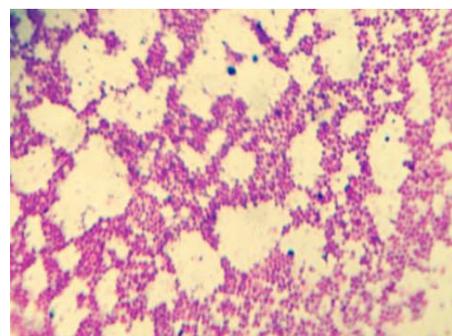


Figure 17 : *S.aureus* observée au microscope photonique G×100 après coloration de Gram

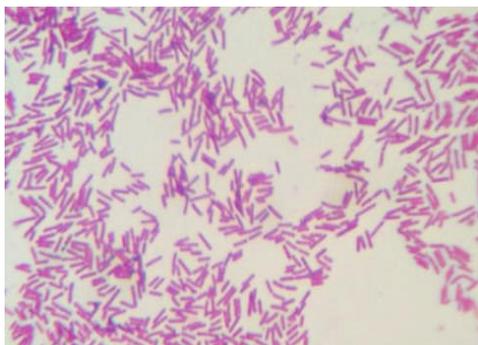


Figure 18 : *P.aeruginosa* observée au microscope photonique G×100 après coloration de Gram

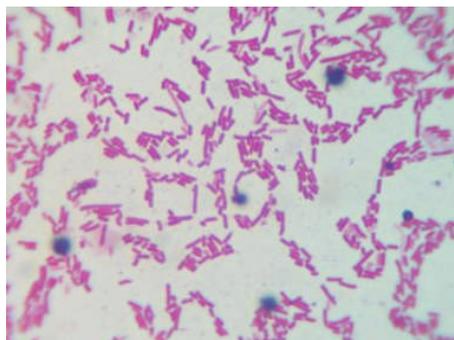


Figure 19 : *E.coli* observée au microscope photonique G×100 après coloration de Gram

Les caractères macroscopiques et microscopiques des différentes souches étudiées sont résumés dans le tableau X.

Tableau X : Caractères morphologiques considérés pour la confirmation

Bactérie	Milieu de culture	Gram	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
<i>B.cereus</i>	Gélose nutritive	Positif	Colonies blanches, volumineuse, plate, crémeuse à bords irréguliers	Grand bacille retrouvé soit isolé ou en chaînette
<i>S.aureus</i>	Gélose Chapman	Positif	Colonies jaunes dorées de 1mm de diamètre, rondes, lisses, bombées	Coccis groupés en amas ou en grappes de raisin
<i>P.aeruginosa</i>	Gélose King B	Négatif	Colonies jaune vertes, larges de 2 à 3 mm de diamètre à bords réguliers, surface lisse, plates sur les bords et un peu bombées au centre	Bacille fin, droit, isolé ou groupé en diplobacilles
<i>E.coli</i>	Gélose Hecktoen	Négatif	Colonie de 2mm de diamètre, ronde bombée à contours réguliers, surface lisse	Bacille de forme cylindrique, se présente seul ou groupé en diplobacilles et rarement en amas

2-Etude de l'activité antibactérienne des extraits de plantes

Les résultats du test préliminaire de l'activité antibactérienne des extraits de plantes sur les quatre souches bactériennes sont représentés dans les figures 20, 21 et tableau XI.

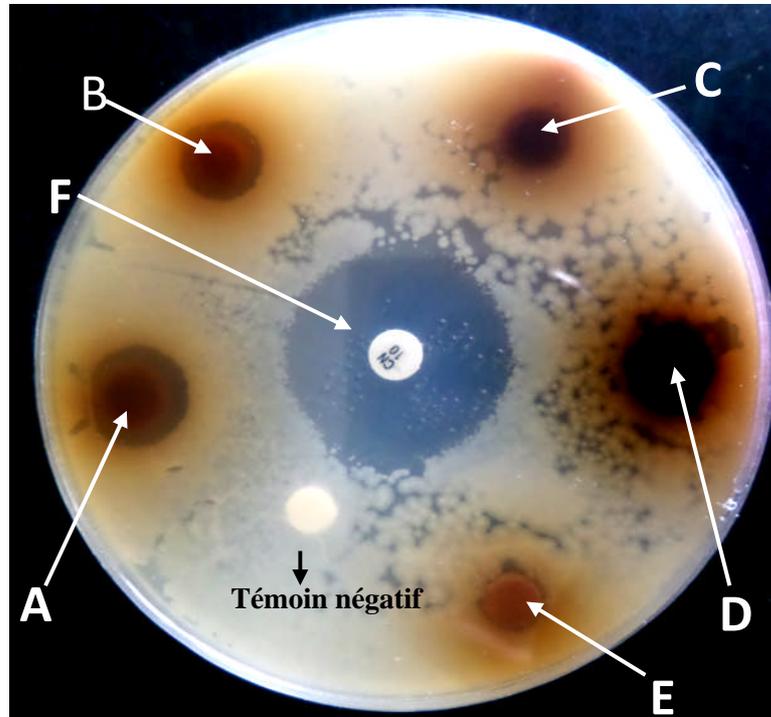


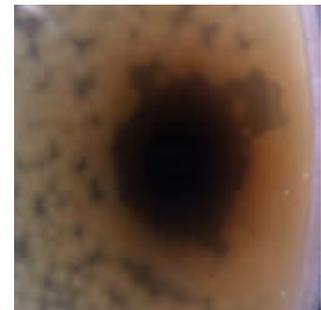
Figure 20: Résultats du test de l'activité antibactérienne des extraits vis-à-vis de *Bacillus cereus* ATCC 10876



A : Effet de l'extrait d'*Arbutus unedo*



B : Effet de l'extrait de *Rosa sempervirens*



D : Effet de l'extrait de verbascum aqueux



E : Effet de l'extrait de *Phlomis bovei*



F : Effet de l'antibiotique de référence (G)

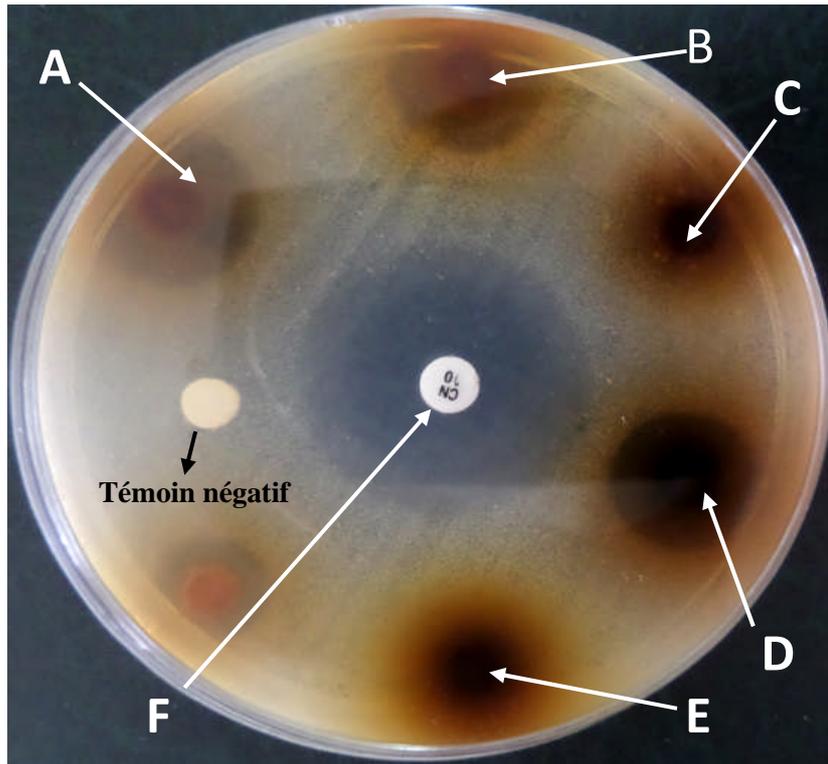


Figure 21 : Résultats du test de l'activité antibactérienne des extraits vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* MU 50



A : Effet de l'extrait d'*Arbutus unedo*



B : Effet de l'extrait de *Rosa sempervirens*



D : Effet de l'extrait de verbascum éthanolique



F : Effet de l'antibiotique de référence (G)

Tableau XI : Diamètres d'inhibition de la croissance des souches bactériennes testées

Souche	Diamètre d'inhibition (mm)					ATB de référence
	<i>Arbutus unedo</i>	<i>Phlomis bovei</i>	<i>Rosa sempervirens</i>	<i>Verbascum sinuatum</i>		
				E.A	E.E	
<i>B.cereus</i>	14 ± 1,73	12,67 ±1,15	14 ± 1,73	13 ± 1	-	32 ± 1
<i>S.aureus</i>	21 ± 1,73	-	25,67 ± 0,58	-	21,61 ±1,15	33 ± 1
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	33,6 ±1,53
<i>E.coli</i> BLSE	-	-	-	-	-	31,3 ± 2,31

- Diamètre de la zone d'inhibition en (mm) = (moyenne ± écart type)
- Le diamètre des disques (6mm) est inclus dans la mesure des zones d'inhibitions
- (-) : Absence de zone d'inhibition
- E.A : extrait aqueux ; E.E : extrait éthanolique

D'après les résultats obtenus, il apparaît que chacune des quatre plantes a une activité assez bien définie sur la croissance d'au moins une des bactéries testées. Les diamètres d'inhibitions se sont prononcées que chez les bactéries Gram (+) et varient de 12,67 à 25,67mm.

Pour cette méthode de diffusion, un extrait est considéré comme actif lorsqu'il induit une zone d'inhibition. Ainsi, l'extrait de *Rosa sempervirens* et d'*Arbutus unedo* se sont révélés les plus actifs donnant un même diamètre d'inhibition de 14mm vis-à-vis *B.cereus* et des diamètres assez proches qui sont de 25,67mm pour l'extrait de *Rosa sempervirens*, 21mm pour l'extrait de *Arbutus unedo* sur *S.aureus*.

L'extrait de *Phlomis bovei* et l'extrait aqueux de *Verbascum sinuatum* inhibent la croissance de *B.cereus* avec des diamètres de 12,67 et 13mm par contre ces deux extraits n'ont montré aucun effet vis-à-vis de *S.aureus*.

L'extrait éthanolique de *Verbascum sinuatum* contrairement à l'extrait aqueux de la même plante a manifesté une bonne activité vis-à-vis de *S.aureus* avec un diamètre d'inhibition de 21,61mm et aucune activité vis-à-vis de *B.cereus*. Ce qui laisse dire que le solvant utilisé lors de l'extraction affecte considérablement l'activité antibactérienne des extraits de plantes.

Indubitablement, le solvant utilisé n'a peut être pas pu retenir les molécules recherchées. Ce qui a été montré par les travaux de TRAORE *et al* (2012) sur l'activité antibactérienne et antifongique des feuilles d'*Annona senegalensis* et qui ont également suggéré que l'éthanol était un meilleur solvant que l'eau.

Cependant, le test de diffusion par disque a montré que tous les extraits n'ont aucun effet sur les bactéries Gram (-) testées à savoir *P.aeruginosa* et *E. coli* BLSE.

La différence de sensibilité observée entre les souches testées pourrait s'expliquer par la différence pariétale des 2 types de bactéries. En effet, les bactéries Gram (+) composées d'une paroi exclusivement de peptidoglycane épais semblent être plus favorables à la pénétration des phytomolécules qui atteindraient facilement leurs cibles intracellulaires. A l'opposé, les bactéries Gram (-) avec leur membrane externe composée de phospholipides qui interféreraient avec les molécules, rend leur passage à travers la paroi difficile surtout les composés hydrosolubles (TIAN *et al.*, 2009 ; SOUNDARARAJAN *et al.*, 2012).

3-Détermination de la concentration minimale bactéricide

Dans l'ensemble, les extraits des quatre plantes se sont révélés actifs sur *B.cereus* et *S.aureus* ce qui a mené à la détermination de leur concentration minimale bactéricide vis-à-vis de ces souches afin d'estimer le degré de sensibilité du microorganisme au produit testé.

La CMB a été déterminée par dépôt de spot de 100µl du contenu de chaque cupule de la série de dilution sur milieu solide, après incubation la plus faible concentration pour laquelle on n'observe aucune colonie bactérienne est la CMB de l'extrait sur la souche testée (figures 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30).

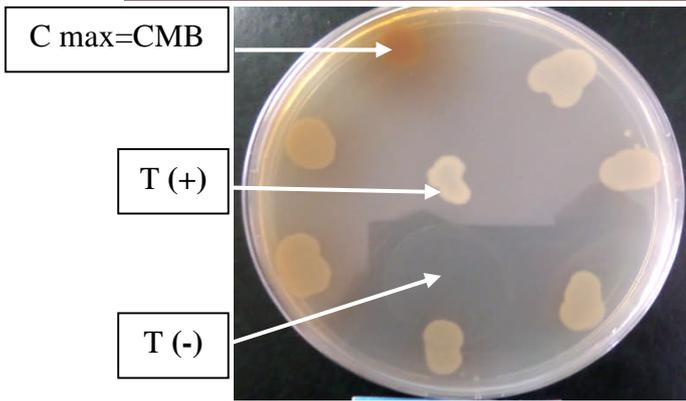


Figure 22 : Résultats CMB de *Arbutus unedo* sur *B.cereus*

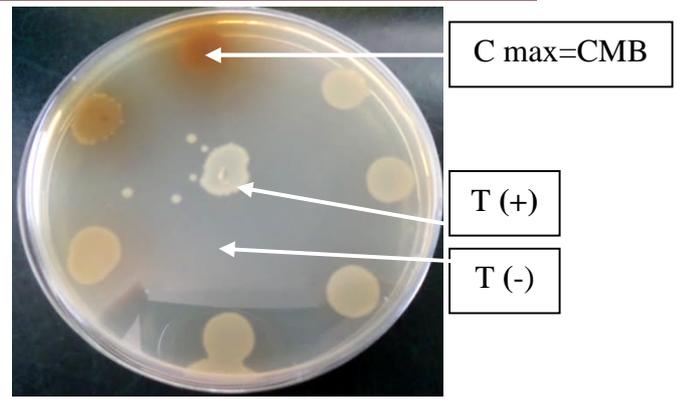


Figure 23 : Résultats CMB de *Rosa sempervirens* sur *B.cereus*

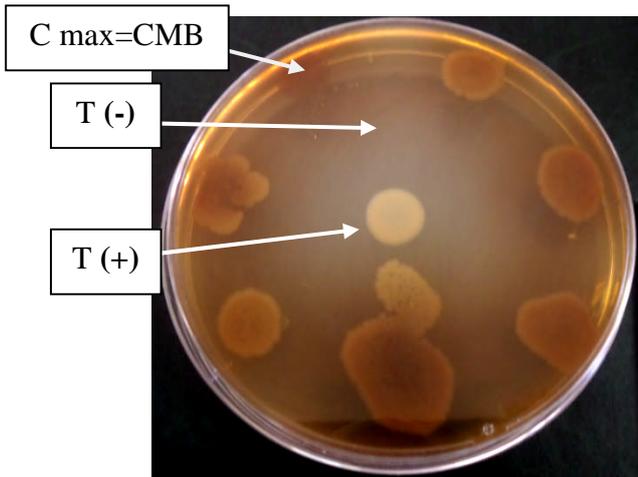


Figure 24 : Résultats CMB de *Phlomis bovei* sur *B.cereus*

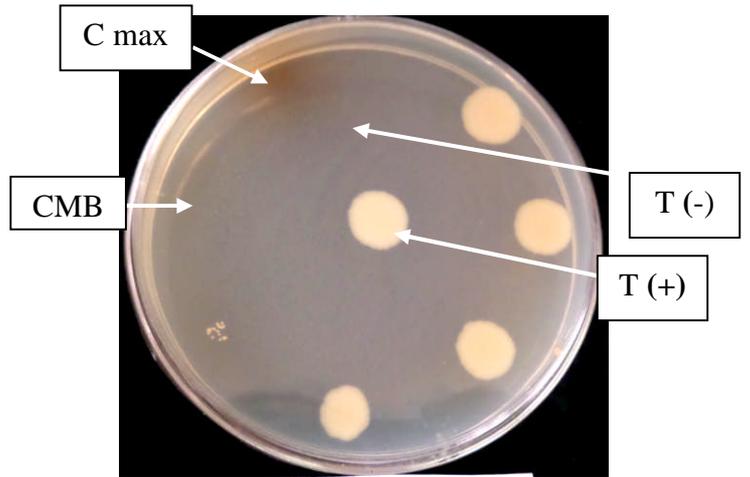


Figure 25 : Résultats CMB de *Verbascum aqueux* sur *B.cereus*

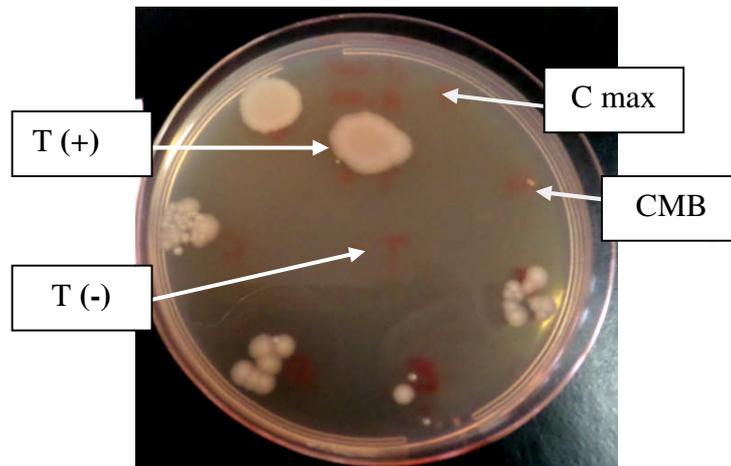


Figure 26 : Résultats CMB de l'acide nalidixique sur *B.cereus*

C max : concentration maximale ; T (+) : témoin positif ; T(-) : témoin négatif

Les valeurs de CMB obtenues sont consignées dans les tableaux XII et XIII.

Tableau XII : Résultats des CMB des extraits et des antibiotiques

Souche	Concentration minimale bactéricide				
	<i>Arbutus unedo</i> (mg/ml)	<i>Rosa sempervirens</i> (mg/ml)	<i>Phlomis bovei</i> (mg/ml)	<i>Verbascum sinuatum</i> (E.A) (mg/ml)	Acide nalidixique (µg/ml)
<i>B.cereus</i>	200 ± 0	200 ± 0	1000 ± 0	500 ± 0	58,33±38,19

- CMB = (moyenne ± écart type)

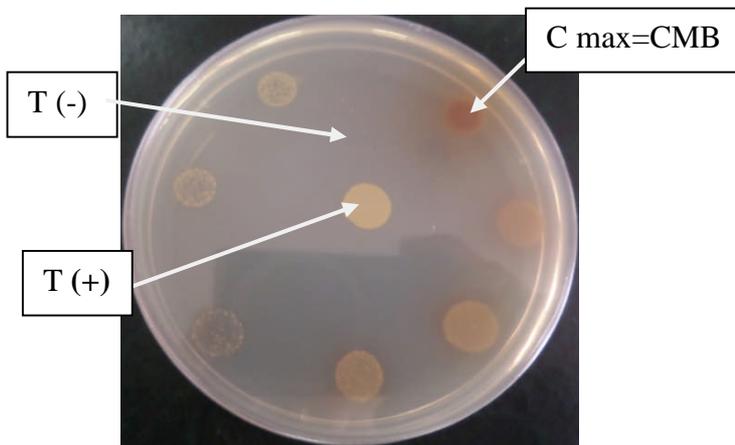


Figure 27 : Résultats CMB de *Arbutus unedo* sur *S.aureus*

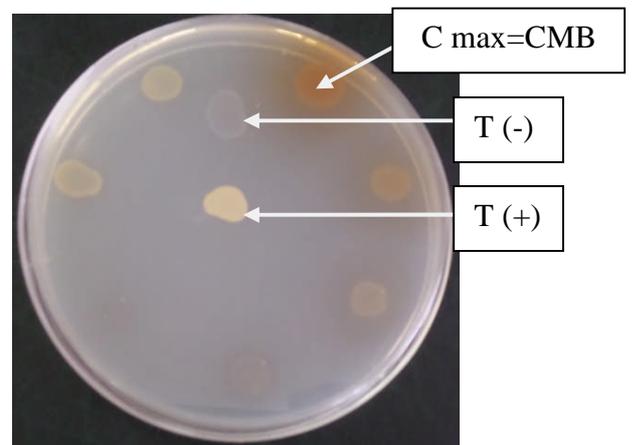


Figure 28 : Résultats CMB de *Rosa sempervirens* sur *S.aureus*

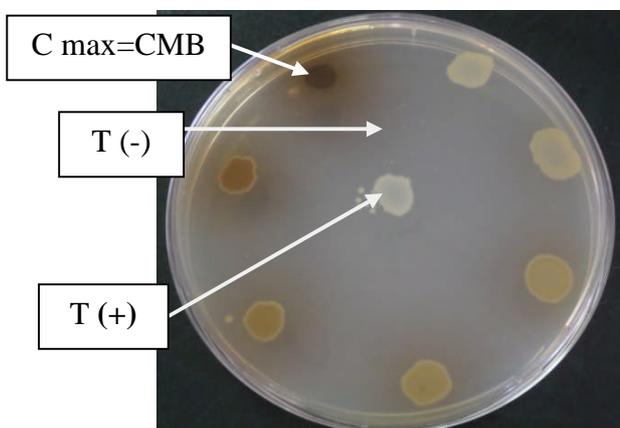


Figure 29 : Résultats CMB de verbascum éthanolique sur *S.aureus*

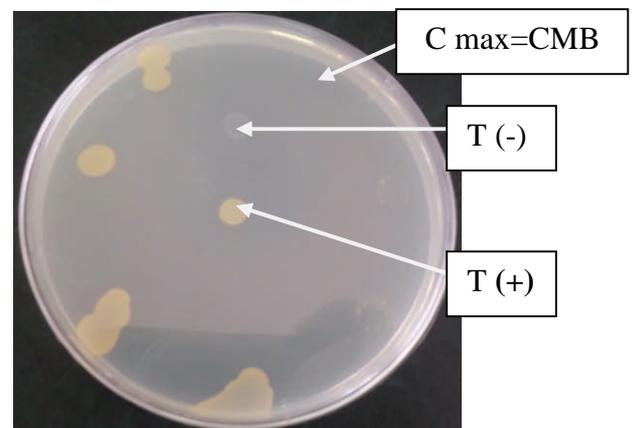


Figure 30 : Résultats CMB de l'amoxiciline sur *S.aureus*

Tableau XIII : Résultats des CMB des extraits et des antibiotiques

Souche	Concentration minimale bactéricide			
	<i>Arbutus unedo</i> (mg/ml)	<i>Rosa sempervirens</i> (mg/ml)	<i>Verbascum sinuatum</i> (E.E) (mg/ml)	Amoxiciline (μ g/ml)
<i>S.aureus</i>	200 \pm 0	200 \pm 0	500 \pm 0	50 \pm 0

- CMB = (moyenne \pm écart type)

Les valeurs de CMB concordent d'une manière générale avec celles des diamètres d'inhibition, des résultats similaires ont été obtenus par BIYITI *et al* (2004) où les extraits ayant induit une importante zone présentent les plus petites CMB sur les souches correspondantes.

- C'est le cas de *Arbutus unedo* et *Rosa sempervirens* sur *B.cereus* et *S.aureus* avec la plus petite CMB qui est de 200 mg/ml ;

-l'extrait éthanolique et aqueux de *Verbascum sinuatum* ont présenté une CMB identique (500 mg/ml) sur des souches différentes ;

-l'extrait de *Phlomis bovei* ayant révélé la plus faible zone d'inhibition sur *B.cereus* (12,67mm) a présenté la CMB la plus élevée qui est de 1000 mg/ml.

Les CMB des antibiotiques (acide nalidixique pour *B.cereus* et amoxiciline pour *S.aureus*) ont été assez élevées (58,33 et 50 μ g/ml) comparant aux CMB d'autres antibiotiques le cas de la gentamicine (8 μ g/ml).

4-Etude de l'effet antibactérien de l'association extrait de plante-antibiotique

Dans la présente étude, nous avons essayé d'évaluer les effets antibactériens possibles de différentes combinaisons d'extraits de plantes avec des antibiotiques et de déterminer si ces extraits possèdent des interactions positives (synergie) ou négatives (antagonisme) ou n'ayant aucun effet (indifférence) avec l'antibiotique.

Cette étude est réalisée sur microplaque où chaque puits renferme une combinaison extrait-antibiotique en contact de la souche à tester. Après incubation le développement bactérien est apprécié à l'aide d'un lecteur ELISA à une longueur d'onde de 560-630 nm (tableau XIV, XVI, XVIII, XX).

Tableau XIV : Valeurs des DO de l'association *Verbascum sinuatum* (extrait aqueux)-acide nalidixique vis-à-vis de *B.cereus*.

Verbascum aqueux (mg/ml)	500	0,001	0,045	0,046	0,001	0,001	0,001	0,001
	250	0,045	0,152	0,108	0,143	0,134	0,065	0,047
	125	0,289	0,274	0,306	0,301	0,284	0,112	0,051
	62,5	0,318	0,301	0,325	0,333	0,306	0,539	0,419
	31,5	0,154	0,207	0,203	0,179	0,199	0,271	0,260
	15,62	0,112	0,154	0,140	0,133	0,112	0,111	0,112
	0		0,119	0,125	0,085	0,024	0,015	0,011
		0	3,125	6,25	12,5	25	50	100
Acide nalidixique (µg/ml)								

L'interprétation des résultats des associations réalisées se fait en comparant la DO de chaque puits à celle du témoin négatif et du témoin positif (tableau XV, XVII, XIX, XXI).

Tableau XV: Interprétation des valeurs de DO de l'échiquier

<i>Verbascum sinuatum</i> (E.A) (mg/ml)	500							
	250							
	125							
	62,5							
	31,5							
	15,62							
	0							
		0	3,125	6,25	12,5	25	50	100
	Acide nalidixique (µg/ml)							

Absence de développement ;
 Présence de développement

L'effet de la combinaison extrait-antibiotique est déterminée par le calcul de l'indice CFI, notons que la corrélation entre l'indice CFI et l'effet des associations extrait-antibiotique selon ORHAN et al (2005), est comme suite :

- Synergie lorsque le $CFI \leq 0,5$
- Indifférence lorsque $0,5 < CFI < 2$
- Antagonisme lorsque le $CFI \geq 2$

1- Association de *Verbascum* aqueux et Acide nalidixique vis-à-vis de *B.cereus*

Le calcul des CFI à donné les résultats suivants :

$$CFI = CFI \text{ de l'antibiotiques} + CFI \text{ de l'extrait}$$

$$CFI = 0,5 + 1$$

$$CFI = 1,5$$

$$0,5 < CFI < 2 \rightarrow \text{Indifférence}$$

Tableau XVI : Valeurs des DO de l'association *Phlomis bovei*-acide nalidixique vis-à-vis de *B.cereus*

<i>Phlomis bovei</i> (mg/ml)	500	0,148	0,089	0,061	0,129	0,001	0,015	0,001
	250	0,274	0,342	0,414	0,248	0,203	0,512	0,371
	125	0,305	0,282	0,286	0,535	0,565	0,549	0,361
	62,5	0,328	0,374	0,372	0,289	0,380	0,391	0,437
	31,25	0,214	0,248	0,230	0,238	0,236	0,232	0,229
	15,62	0,160	0,162	0,164	0,169	0,159	0,138	0,094
	0		0,119	0,125	0,085	0,024	0,015	0,011
		0	3.125	6.25	12.5	25	50	100
Acide nalidixique (µg/ml)								

Tableau XVII: Interprétation des valeurs de l'échiquier

<i>Phlomis bovei</i> (mg/ml)	500							
	250							
	125							
	62,5							
	31,25							
	15,62							
	0							
		0	3.125	6.25	12.5	25	50	100
Acide nalidixique (µg/ml)								

2-Association de *Phlomis bovei* et acide nalidixique vis-à-vis de *B.cereus*

CFI= CFI de l'antibiotiques + CFI de l'extrait

CFI= 1 + 0,5

CFI= 1,5

0,5 < CFI < 2 → Indifférence

Tableau XVIII : Valeurs des DO de l'association *Arbutus unedo*-amoxiciline vis-à-vis de *S.aureus*

<i>Arbutus unedo</i> (mg/ml)	200	0,001	0,001	0,001	0,001	-	0,001	0,001
	100	0,159	0,058	0,049	0,047	-	0,045	0,039
	50	0,185	0,073	0,071	-	0,066	0,063	0,058
	25	0,189	0,198	0,182	0,206	0,181	0,222	0,216
	12,5	0,106	0,108	0,103	0,116	0,109	0,111	0,119
	0		0,097	0,106	0,129	0,020	0,019	0,015
		0	3,125	6,25	12,5	25	50	100
Amoxiciline (µg/ml)								

Tableau XIX: Interprétation des valeurs des DO de l'échiquier

<i>Arbutus unedo</i> (mg/ml)	200					-		
	100					-		
	50				-			
	25							
	12,5							
	0							
		0	3,125	6,25	12,5	25	50	100
Amoxiciline (µg/ml)								

3-Association de *Arbutus unedo* et amoxiciline vis-à-vis de *S. aureus*

CFI= CFI de l'antibiotiques + CFI de l'extrait

CFI= 0,25 + 0,125

CFI= 0,375

CFI ≤ 0,5 = Synergie

Tableau XX : Valeurs des DO de l'association *Rosa sempervirens*-amoxiciline vis-à-vis de *S.aureus*

Rosa sempervirens (mg/ml)	200	0,001	-	0,012	0,001	0,001	0,001	0,001
	100	0,127	0,140	0,70	0,58	0,52	0,037	0,030
	50	0,173	0,182	0,182	0,196	0,173	0,186	0,174
	25	0,213	0,213	0,213	0,219	0,233	0,225	0,227
	12,5	0,122	0,122	0,121	0,129	0,197	0,122	0,129
	6,25	0,107	0,107	0,116	0,112	0,149	0,104	0,103
	0		0,097	0,106	0,129	0,020	0,019	0,015
		0	3,125	6,25	12,5	25	50	100
Amoxiciline (µg/ml)								

Tableau XXI: Interprétation des valeurs de DO de l'échiquier

Rosa sempervirens (mg/ml)	200		-					
	100							
	50							
	25							
	12,5							
	6,25							
	0							
		0	3,125	6,25	12,5	25	50	100
Amoxiciline (µg/ml)								

4-Association de *Rosa sempervirens* et amoxiciline vis-à-vis de *S. aureus*

CFI= CFI de l'antibiotique + CFI de l'extrait

CFI= 0,25+ 0,5

CFI= 0,75

0,5 < CFI < 2 → Indifférence

Les résultats de la combinaison ont montré que l'extrait *Arbutus unedo* à une synergie avec l'amoxiciline vis s vis de *S.aureus* MU 50 avec une CFI de 0,375 ce qui se traduit par la diminution des concentrations minimales inhibitrices de l'extrait et de l'antibiotique notamment qui était à une valeur de 25µg/ml tout seul pour atteindre la valeur de 3,125µg/ml dans la combinaison.

Ces résultats ont été prouvés par plusieurs travaux qui ont montré la possibilité de l'association des extraits de plantes avec des antibiotiques dans le but d'augmenter leurs effets antimicrobiens et de réduire leurs concentrations, ainsi diminuer les effets secondaires et indésirables des antibiotiques (SHIN et KANG, 2003 ; ROSATO *et al.*, 2008).

Selon les travaux de SPOORTHI *et al* (2011) la synergie est définie comme une diminution de l'organisme viable lorsqu'il est associé à un antibiotique efficace. Selon JUDE *et al* (2016) les métabolites secondaires des plantes sont connus pour leurs activités antimicrobiennes, cependant lorsqu'il y a synergie, elles sont capable de bloquer des voies métaboliques au sein de la cellule cible, agissant ainsi comme un modificateur des mécanismes de résistances.

Les trois autres associations n'ont montré aucun effet avec l'antibiotique.

Pour ORHAN *et al* (2005), cette méthode utilisée afin de détecter d'éventuelles synergies entre extrait et antibiotiques. *In vitro*, elle est qualifiée de simple, précise, reproductible et facilement appliquée dans la pratique de routine du laboratoire.

Au terme de cette étude qui a pour but d'évaluer *in vitro* l'activité antibactérienne d'extraits de quatre plantes médicinales : *Arbutus unedo*, *Phlomis bovei*, *Rosa sempervirens*, *verbascum sinuatum* sur des bactéries Gram positif et Gram négatif, il ressort que :

Les extraits testés se sont avérés actifs vis-à-vis des Gram positif et inactifs vis-à-vis des Gram négatif.

Tous les extraits testés à l'exception de l'extrait éthanolique de *V.sinuatum* ont révélés des diamètres d'inhibitions assez proches qui varient de 12mm à 14mm vis-à-vis de *B.cereus*. Les valeurs des CMB quant à elles sont de 200mg/ml pour *A.unedo* et *R.sempervirens* et de 500mg/ml pour l'extrait aqueux de *V.sinuatum*, l'extrait de *Phlomi bovei* a enregistré la plus grande CMB qui est de 1000mg/ml.

En ce qui concerne l'effet antibactérien des extraits d'*Arbutus unedo*, *Rosa sempervirens* et extrait éthanolique de *Verbascum sinuatum* sur *S.aureus*, des zones d'inhibitions importantes ont été obtenues qui sont de 21mm, 25,67mm et 21,61mm avec des CMB de 200mg/ml pour *A.unedo* et *R.sempervirens* et 500mg/ml pour l'extrait éthanolique de *V.sinuatum*.

L'étude de l'effet antibactérien de l'association extrait-antibiotique a révélé un effet synergique entre *A.unedo* et amoxiciline vis-à-vis de *S.aureus* avec une CFI de 0,375. Les trois autres associations réalisées n'ont montré aucun effet avec les antibiotiques à savoir *R.sempervirens*-amoxiciline, extrait aqueux de *V.sinuatum* et l'acide nalidixique, *Phlomis bovei*-acide nalidixique.

Perspectives

- Cibler et isoler les molécules bioactives de chaque extrait
- Elucider le mécanisme d'action de la synergie établie entre *Arbutus unedo* et amoxiciline
- Tester l'activité antibactérienne de nos extraits végétaux combinés avec d'autres antibiotiques.

Références bibliographiques

- ABEDINI A. (2014).** Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis artrorubens* Poit. (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extrait de 42 plantes, thèse de doctorat, Université Lille Nord de France, France.198p.
- AFIF-CHAOUICHE T., ARAB K., BENDAHOU M. (2015).** Phytochemical screening of Algerian *Borago officinalis* L. and evaluation of its antioxidant and antimicrobial activities against respiratory pathogens., *International journal of phytomedicine*, 0975-0185, 369-376.
- AGENCE NATIONAL DE SECURITE SANITAIRE (2011).** *E.coli* entérohémorragiques (EHEC). Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments.
- AIT-YOUSSEF M. (2006).** Les plantes médicinales en Kabylie. Ed : Ibis presse, Paris.349p.
- ALIOUA M.A. (2005).** Sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline ; thèse de doctorat ; université BADJI-MOKHTAR ; Annaba ; Algérie.
- AVRIL J., DABERNAT H., DENIS F. (1992).** Bactériologie Clinique., 2^{ème} Ed., Elipses., Paris.
- AVRIL J.L., DABERNAT H., DENIS F. (2003).** Bactériologie Clinique., 3^{ème} Ed., Ellipses, Paris, 8-28.
- BABA-AISSA.F. (2000).** Encyclopédie des Plantes Utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb, Substances Végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. EDAS Algérie.
- BENZEGGOUTA N. (2005).** Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments., Mémoire de Magister., Université Mentouri-Constantine., Constantine., Algérie.
- BERGEY'S MANUEL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY (2004).** The Protobacteria. Volume 2 : Procaryotic Domains. Noel R. Editors Garrity, Gerorge, pp26.

BIYITI L.F., MEKOO D.J.L., TAMZE V et AMVAN Z.P.H. (2004). Recherche de l'activité Antibactérienne de quatre plantes Médicinales Camerounaises. *Pharm. Méd. Trad. Afr*, Vol.13,pp.11-20.

BNOUHAM M., MERHFOUR FZ., LEGSSYR A., MEKHFI H., MAALLEM S and ZIYYAT A. (2007). Antihyperglycemic activity of *Arbutus unedo*, *Ammoides pusilla* and *Thymelaea hirsuta*. *An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, volume 62,630-632.

BOUHARB H., BADAUI K., ZAIR T., EL AMIR J., CHAKIR S., ALAOUI T. (2014). Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun pour l'activité antibactériennes contre *Pseudomonas aeruginosa* ., *Journal of Applied Bioscience.*, 1997-5902, 6685-6693.

BOULLARD B. (2001). Plantes médicinales du monde croyance et réalités. Ed ESTM. Paris, 63p.

BRUN Y., BES M., VANDENESCH F. (2006). *Staphylococcus.*, in : FRENEY J, RENAUD F., BOLLET C., LECLERCQ R, "Actualités permanentes en bactériologie clinique". ESKA (Ed), Paris, chapitre 1 : 1-55.

BROSSE J. et PELET J.M. (2005). Larousse des Arbres. Ed Larousse. Paris. 576p.

BUSH K. (2001). New beta-lactamase in gram- negative bacteria: diversity and impact on the selection of the antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis*. Apr 1;32(7):1087-1089.

DIALLO A.A. (2013). *Escherichia coli* pathogens et resistances aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale: Prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire, thèse de doctorat, université de Toulouse, france,160p.

DIDI A. (2009).Eude de l'activité antioxydant des flavonoïdes de l'*Arbutus unedo* et du *Dapline gaidini l* de la région de Tlemcen ; Thèse magister ; université aboubeker belkaid- Tlemcen, Algérie.128p.

- DIOP DEME N. (2016).** Epidémiologie des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline isolées au laboratoire de bactériologie du CHU Aristide le Dantec., Thèse de doctorat : Pharmacie. Université de Cheikh Anta DIOP de Dakar., Dakar.
- DOUKANI K., TABAK S. (2014).** Profil physicochimique du fruit lenj (*Arbutus unedo* L.). Laboratoire d'agro biotechnologie et nutrition en zones semi arides, Université de Tiaret, Algérie. P 53.
- DROMIGNY E. (2008).** *Bacillus cereus*. Editions TEC & Doc, Paris, p :338-339.
- ESCOBEDO-MARTINEZ C., CRUZ-MORALES S., FRAGOSO-SERRANO M., RAHMAN M. M., GIBBONS S., PEREDA-MIRANDA R. (2010).** Characterization of a xylose containing oligosaccharide, an inhibitor of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*, from *Ipomoea pes-caprae*. *Phytochemistry*. 71(14-15):1796-1801.
- EL HAOUARI M., LOPEZ J.J., MEKHFI H., ROSADO J.A. and SALIDO M.G. (2007).** Antiaggregant effects of *arbutus unedo* extracts in human platelets. *J. Ethnopharmacology*,325-331.
- FATTAHI A., NIYAZI F., SHAHBAZI B., FARZAEI M.H., BAHRAMI G. (2017).** Antidiabetic Mechanisms of *Rosa canina* Fruits : An in Vito Evaluation. *Journal of Evidence Based Complementary & Alternative Medicine*,22(1) :127-133
- FRENEY J., RENAUD F., LECLERCQ R et RIEGEL P. (2007).** Précis de bactériologie clinique. Ed. ESKA, Paris, pp990-995.
- GARRITY G.M., JOHNSON K.L., BELL J. (2002).** Bergy's Manuel of systematic bacteriology., 2^{ème} Ed., Springer-verlag., New York.
- GERIN.M. (2002).** Solvants et Prévention : Nouvelles Perspectives. , *In*: GERIN M. (Ed) Solvants industriels: Santé, Sécurité, Substitution. Masson, Paris. p1-12.
- GHAZGHAZI A.H. (2012).** Caractérisation phrénologique, multiplication et valorisation de deux espèces autochtones de la Kroumirie (nord-ouest-tunisien) : *Rosa canina* L. et *Rosa sempervirens* L. thèse doctorat, Institut National Agronomique de Tunisie, Tunis.129p.

GOOTZ T. D. (2010). "The global problem of antibiotic resistance." *Crit. Rev. Immunol.* 30(1): 79-93.

GRAYEY R.J., ECKERT M.R., VEITCH N.C., KITE GC. (2003). The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic esters, Nepetoidins A and B, in the Lamiaceae. *Phytochemistry*, 64(2) : 519-528.

GRIESS S. (2013). Les problèmes posés par *Bacillus cereus* dans l'industrie agroalimentaire. Synthèse bibliographique en biologie et biotechnologie, Université de Rennes 1, France.

GROSJEAN J et PASQUIER C. (2009). Bactériologie et virologie pratique. 11^{ème} De Doeck s-a, Bruxelles, p128.

GUIGNARD J.L. (2001). Botanique systématique moléculaire. Ed : Masson. Paris. 290p.

HEYWOOD V.H., BRUMITT R.K., CULHAM A., SEBERG O. (2007). Flowering plant families of the world. Royal botanic Gardenes, kew, England.

INVS. (2012). Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire. Portail documentaire *InVS*.

ISERIN P. (2001). Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Ed Larousse.170p.

JUDE C., CHUKWUJEKWU., and JOHANNES V S. (2016). *In Vitro* Antibacterial Activity of *Combretum edwardsii*, *Combretum krausii*, and *Maytenus nemorosa* and Their Synergistic Effects in Combination with Antibiotics. *Journal of Frontiers in Pharmacology*. Volume7:208.

KABOUCHE A., KABOUCHE Z., SEGUIN E., BRUNEAU C. (2004). Comparative phytochemical study of the extracts of two Algerian *phlomis* species. *Chemistry of natural Compounds*, 40, 188-189.

- KATAYOUN M.S., MOHAMMED A., AFSANEH G. (2004).** The essential oil composition of *Phlomis herba-venti* L and Flowers of Iranian origin. *J Flav Fragr*,19,p 29-31
- KHALIL ZADDEH P. (2009).** Formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* : evaluation d'inhibiteurs naturels de quorum sensing., These doctorat : microbiologie. Université Paul SABATIER., France.
- KOUAME A.K., DJENI T.N., N'GUESSAN F.K., DJEMI. (2013).** Postprocessing microflora of commercial allieke (à fermented cassava product) produced in south of cote d'ivoire *lett Appl Microbiol*, 56,44-50.
- KRAFT K and HOBBS C. (2004).** Pocket Guide to Herbal Medicine. Thieme, Stuttgart, New York.p16.
- LAZREG H., MEMMI A., BALDOVINI N., FEKIH A. (2011).** Chemical composition of TUNISIAN spontaneous *phlomis crinita* essential oil. *Journal de la Société Algérienne de Chimie*.p15-23.
- LELAY J. (2014).** Compréhension des mécanismes impliqués dans l'activité réductrice et dans les adaptations métaboliques à pH acide de *Bacillus cereus* : implication des thiols exofaciaux ; thèse doctorat ; Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, France.181p.
- LOUAMI S. (2012).** Métabolisme et toxinogénèse de *Bacillus cereus* : Rôles de l'enzyme fermentaire LdhA et du régulateur rédox Rex ; thèse doctorat ; Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, France.162p.
- LUES J.F., THERON M.M., VENTER P., RASPHEL M.H. (2007).** Microbial composition bioaerosols of a high-throughput chicken-slaughtering facility. *Pault sci*,86,142-9.
- MAIMOUNA B. (1993).** Etude des marqueurs épidémiologiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées à Dakar., Thèse de doctorat : Pharmacie., Université CHEIKH ANTA DIOP-Dakar.,Dakar.

MEGUENNI N. (2016). Caractérisation phénotypique et génotypique de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds chez des souches d'*Escherichia coli* pathogènes aviaires, thèse doctorat, Algérie, 176p.

MILENI G., KASHIF A., KALINA A., VERPORT R., YOUNG H.G. (2011). Metabolic differentiations and classification of verbascum species by NMR-based Metabolics. Institut of Organic Chemistry with centre phytochemistry, Volume 72, P2045-2051.

MOUALEK I., IRATNI G.A., MESTAR N.G., LAHCENE S and HOUALI K. (2016). Antioxidant and anti-inflammatory Activities of *Arbutus unedo* aqueous extract. *Asian Pacific Journal of tropical Biomedicine*, Volume 6, p-937-944.

MORRIS R. (2007). Plante for a future, Edible, Medecinal and Useful plants for healthier world, plantes for a futur. 70p. 2^{ème} Ed, Larousse, Londres. 275p.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE. (2005).

ORHAN G., BAYRAM A., ZER Y and BALCI I. (2004). Synergy Tests by E test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, p.140-143.

OSTENSVIK O., FRAM C., HEIDENREICH B., O'SULLIVAN K et GRANUM P E. (2004). Cytotoxic *Bacillus* spp. Belonging to the *B.cereus* and *B.subtilis* groups in Norwegian surface waters. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 987-993.

POLESE J.M. (2010). Arbres et arbustes de Méditerranée. Ed EDISUD, Imprimé en UE.135p

QUEZEL P et SANTA S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1 centre national de la recherche scientifique.

ROMAN I., STANILA A., STANILA S. (2013). Bioactive Compounds and Antioxidant activity of *Rosa canina* L. Biotypes from spontaneous flora of Transylvania. Food Science and Technology Faculty, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine. Romania. 7-73

- ROSATO A., VITALI C., GALLO D., BALENZANO L and MALLAMACI R. (2008).** The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B, *Phytomedicine*, 15. 635–638
- SCHERRMANN M.-C., MALACRIA M., GODDAR J.-P., OLLIVIER C. (2008).** Chimie dans l'Eau (K1210). Editions Techniques de l'Ingénieur, Paris, France.
- SHARIFNIA F. (2011).** Scrophulariaceae, in *Flora of Iran*. Edition Of Organization of Forest and Pasture Research (in Persian), 68 :57-74.
- SHIN S and KANG C.A. (2003).** Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* kutze and its synergism with Ketoconazole. *Letters in Applied Microbiology*, 36,111-115.
- SPICHIGER R.E., SAVOLAINEN V.V., FIGEAT M., et MONOD J.D. (2004).** Botanique systématique des plantes à fleur. 3^{ème} Ed. Presses polytechniques et universitaires Romandes.413p.
- SPOORTHI N., JAIN., VISHWANATHA T., REENA V., DIVYASHREE B.C., AISHWARYA S., SIDDHALINGESHWARA K.G., VENUGOPAL N et RAMESH I. (2011).** Antibiotic Synergy test : Checkerboard Method on multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *International Reserarch Journal of Pharmacy* , 2(12), 196-198.
- STENFORS A.L., FAGERLUND A., GRANUM P. (2008).** From soil to gut : *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *Fens Microbiol Rev*,32,579-606.
- SOUNDARARAJAN V., ZURAINI Z., YENG C., LACHIMANAN Y.L., JAGAT R.K et SREENIVASAN S. (2012).** The Antimicrobial Efficacy of *Elaeis guineensis* :Characterization, *in Vitro* and *in Vivo* Studies, *Molecules*, 17:4860-4877
- SOTOODEH A. (2015).**Histoire biogéographique et évolutive des genres *Verbascum* et *Artemisia* en Iran à l'aide de la phylogénie moléculaire. Thèse doctorat, Université Toulouse 3 Paul Sablier. France. P181
- TATLI I.I., ESRA K.A., ERDEM Y., ZELIHA S.A. (2008).** Antinociceptive and anti-inflammatory Activities and seven Endemic *Verbascum* species Growing in Turkey. *Pharmaceutical biology*, vol.46 pp781-788

TERRIER C., HANSEN W., KENAUD F., FRENEY J. (1992). *Pseudomonas aeruginosa.*, Manuel de bactériologie Clinique., 2^{ème} Ed., Elsevier., Paris.

TEYSSOU R., HANCE P., NICOND E., NIZOU JY et BUISSON Y. (1998). Les infections à *Bacillus cereus* : bactériologie. Clinique et traitement. La lettre de l'infectiologue Tome XIII-n°3.

TIAN F, LI B, JI B, YANG J, ZHANG G, CHEN Y, LUO Y. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*:The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*, 113 (1):173-179.

TRAORE Y, OUATTARA K, YEO D, DOUMBIA I, COULIBALY A. (2012). Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). *Journal of Applied Biosciences* 58:4234– 4242.

VIDRIH J., HRIBAR J., PERGOMET Z., POKLAR U N. (2013). The physico-chemical properties of strawberry tree(*Arbutus unedo* L.)Fruits. *Journal Food science and technology*, 5(1) : 29-33.

WANG Y., WANG T., HU J., REN C., LEI H., HOU Y., BRANTENER A. H. (2011). Anti-biofilm activity of TanReQing, a Traditional Chinese Medicine used for the treatment of acute pneumonia. *Journal of Ethnopharmacol.* 134 (1):165-170.

WANG L., WELLER C.L. (2006). Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants, *Trends in Food Science and Technology*, 17, 300-312.

Annexe 1 : Matériels utilisés

Outils	Appareillages	Produits et réactifs chimique	Milieux de culture
Anse	Autoclave	Alcool	Bouillon BHI (Brain Heart Infusion Broth)
Boîtes de Pétri	Agitateur à plaque chauffante	Antibiotique en poudre	Milieux MH (Mueller Hinton)
Becher	Bain marie	Chlorure de sodium NaCl	Agar
Bec bunsen	Balance de précision	Disques d'antibiotiques	Gélose Chapman
Cristallisoirs	Broyeur électrique	Eau physiologique (NaCl 9g/l)	Gélose nutritive
Cuve du spectrophotomètre	Etuve	Eau distillée	Gélose Hektoen
Entonnoir	Four Pasteur	Fuschine	Gélose King B
Erlenmeyer	Hotte	Violet de gentiane	
Ecouvillons	Lyophilisateur		
Ependorfs	Lecteur ELISA		
Embouts	Spectrophotomètre		
Flacons	Rotavapeur		
Filtres	Réfrigérateur		
Fioles	Vortex		
Micropipette			
Microplaques			
Pipettes Pasteur			
Papier wattman			
Papier aluminium			
Passoir			
Portoir			
Pinces			
Seringues			
Tubes à essais			
Tubes à hémolyse			

Annexe 2 : Composition des milieux de culture

- **Gélose Mueller Hinton**

Infusion de viande bovine	3g
Hydrolysate acide de caséine	17.5g
Amidon soluble	01.5g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml
pH à 25°C	7.4±0.2

- **Gélose Chapman**

Peptone	10.0g
Extrait de viande de bœuf	01.5g
Chlorure de sodium	75.0g
Mannitol	10.0g
Rouge de phénol	0.025g
Agar	15.0g
Eau distillée	1000ml
pH à 25°C	7.4±0.2

- **Bouillon Brain Heart Infusion (BHIB)**

Extrait cœur-cervelle	200g
Peptone pancréatique de gélatine	250g
Chlorure de sodium	05.0g
Phosphate disodique	02.5g
Dextrose	02.0g
Eau distillée	1000ml
pH à 25°C	7.4±0.2

- **Gélose Hecktoen**

Peptone pepsique de viande	12.0g
Extrait autolytique de levure	03.0g
Lactose	12.0g
Saccharose	12.0g
Salicine	02.0g
Sels biliaire	09.0g
Chlorure de sodium	05.0g
Thiosulfate de sodium	05.0g
Citrate ferrique ammoniacal	01.5g
Bleu de bromothymol	65.0mg
Fuschine acide	40.0mg
Agar	13.5g
pH à 25°C	7.6±0.2

- **Gélose Nutritive (GN)**

Tryptone	06.0g
Extrait de viande	03.0g
Agar	12.0g
pH à 25°C	7.0±0.2

- **Eau physiologique**

NaCl	9g
Eau distillée	1000ml

- **Gélose King B**

Peptone	20.0g
Glycérol	10.0ml
Phosphate dipotassique	1.5g
Sulfate de magnésium	1.5g
Agar	15.0g
pH à 25°C	7.2±0.2

Annexe 03 : Coloration de Gram

- Dépôt du colorant violet de gentiane sur le frottis fixé et laisser agir 1 mn
- Dépôt du lugol et laisser agir 45s×2
- Dépôt de l'alcool et laisser agir 30s
- Dépôt de la solution fushine et laisser agir 1 mn
- Rinçage de la lame avec d l'eau.

Résumé

Le présent travail portant sur l'étude de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales sélectionnées en tenant compte de leur utilisation thérapeutique dans la médecine traditionnelle : *Arbutus unedo* L., *Phlomis bovei* de Noé., *Rosa sempervirens* L. et *Verbascum sinuatum* L. récoltées dans la région de Kabylie.

L'activité antibactérienne des extraits de plantes a été évaluée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé vis-à-vis de quatre souches bactériennes de références ; deux Gram positif (*Staphylococcus aureus* MU 50 et *Bacillus cereus* ATCC 10876) et deux Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* BLSE E 88). Les concentrations minimales bactéricides des extraits ayant révélés des propriétés antibactériennes ont été déterminées par la méthode de dilution en milieu liquide sur microplaque suivis de dépôt de spots sur milieu solide. L'étude de l'activité antibactérienne des différentes associations extrait de plante-antibiotique ont été testées par la méthode de l'échiquier en milieu liquide sur microplaque.

Les résultats obtenus révèlent une activité importante des extraits de *Arbutus unedo*, *Rosa sempervirens* et extrait éthanolique de *Verbascum sinuatum* avec des diamètres d'inhibition allant de 21mm à 25mm vis-à-vis de *S.aureus*. Une activité modérée est obtenue avec les extraits de *Phlomis bovei*, extrait aqueux de *Verbascum sinuatum*, *Arbutus unedo* et *Rosa sempervirens* avec des diamètres de 12mm à 14mm vis-à-vis de *B.cereus*. Les bactéries Gram négatif se sont révélées résistantes vis-à-vis des extraits testés.

Les valeurs des CMB obtenues sont de 200 mg/ml pour *Arbutus unedo* et *Rosa sempervirens* vis-à-vis *B.cereus* et *S.aureus*, l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique de *verbascum sinuatum* ont donné la même CMB qui est de 500 mg/ml aussi bien sur *B.cereus* que sur *S.aureus*, l'extrait de *Phlomis bovei* a manifesté la CMB la plus élevée qui est de 1000 mg/ml vis-à-vis de *B.cereus*.

Les résultats ressortant des combinaisons réalisées révèlent une synergie entre l'extrait *Arbutus unedo* associé à l'amoxiciline avec une concentration fractionnelle inhibitrice de 0.375 vis-à-vis de *S.aureus*. Les trois autres combinaisons n'ont présenté aucun effet avec les antibiotiques testés.

Mots clés : Activité antibactérienne, plantes médicinales, CMB, synergie.

Abstract

The present work on the study of the antibacterial activity of four medicinal plants selected taking into account their therapeutic use in traditional medicine : *Arbutus unedo* L., *Phlomis bovei* de Noé, *Rosa sempervirens* L., *Verbascum sinuatum* L. harvested in the region of Kabylie.

The antibacterial activity of the plant extracts was evaluated by the diffusion method on an agar environment with respect to four bacterial reference layers, two Gram positive (*Staphylococcus aureus* MU 50, *Bacillus cereus* ATCC 10876) and two Gram negative (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* BLSE E 88). The minimum bactericidal concentrations of the extracts having revealed antibacterial properties were determined by the method of the dilution in a liquid environment on a microplate followed by the deposit of spots on a solid environment. The study of the antibacterial activity of the various plant extract-antibiotic combinations were tested by the method of the checkerboard in a liquid environment on a microplate.

The results obtained reveal an activity of the extracts of *Arbutus unedo*, *Rosa sempervirens*, and ethanol extracts of *Verbascum sinuatum* with inhibition diameters ranging from 21mm to 25mm with respect to *S.aureus*. A moderate activity is obtained with the extracts of *Phlomis bovei*, an aqueous extract of *Verbascum sinuatum*, *Arbutus unedo* and *Rosa sempervirens* with diameters of 12 to 14mm with respect to *B.cereus*. The Gram negative bacteria were found to be resistant to the extracts tested.

The obtained CMB values were 200mg/ml for *Arbutus unedo* and *Rosa sempervirens* against *B.cereus* and *S.aureus*, aqueous extract and ethanol extract of *Verbascum sinuatum* gave the same CMB which 500 mg/ml both on *B.cereus* and on *S.aureus*, the extract of *Phlomis bovei* showed the highest CMB which is 1000 mg/ml with respect to *B.cereus*.

The results emerging from the combinations carried out reveal a synergy between the *Arbutus unedo* extract associated with amoxicillin with a fractional inhibitory concentration of 0,375 with respect to *S.aureus*. the three other combinations showed no effect with antibiotics tested.

Keywords: Antibacterial activities, medicinal plants, CMB, synergy.