

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri
FACULTE DE MEDECINE
TIZI OUZOU



وزارة التعليم العالي
والبحث العلمي
جامعة مولود معمري
كلية الطب
تيزي وزو

Département de Pharmacie
N° D'ordre :

†.⊙%∧∧.∪ξ†C%∞∧.†C∩%CC%Q

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Présenté sous forme d'article et soutenu publiquement
En vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en Pharmacie

Le : 20/07/2023

Sous le Thème

**EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIRADICALAIRE ET
ANTIMICROBIENNE D'UN EXTRAIT METHANOLIQUE DE
Dittrichia viscosa (L.) Greuter, 1973 ORIGINAIRE DE HAUTE KABYLIE**

Présenté par : Melle TALEB Sarah Melda

Encadré par : Dr MOKRANI Belaid

Devant le jury composé de :

Pr DAHMOUNE A.	MCA	Faculté de Médecine UMMTO	Présidente du jury
Dr LOUADJ L.	Enseignant	Faculté de Médecine UMMTO	Examineur
Dr CHERIFI L.	MAHU	Faculté de Médecine UMMTO	Examinatrice

Abstract - In this study, the antimicrobial activity and antioxidant potential of a methanolic extract obtained by ultrasonic assisted extraction of *Dittrichia viscosa* leaves harvested in the Ait Yahia region of Upper Kabylia were investigated in vitro.

A phytochemical screening of the dried leaf powder revealed the presence of polyphenols, including flavonoids. Antimicrobial activity was evaluated qualitatively and quantitatively against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 14575), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), and *Candida albicans*. The antioxidant potential was determined by the DPPH free radical scavenging assay. The evaluation of the antimicrobial activity revealed a significant antibacterial effect against the gram-positive bacteria, namely *Bacillus cereus* (17,83mm \pm 0,24 ; CMI = 0,781 mg/ml) and *Staphylococcus aureus* (16.5 mm \pm 0,4 ; MIC = 6.25 mg/ml), a moderate antifungal activity against *Candida albicans* (13 mm \pm 1,08 ; CMI = 50 mg/ml), and an absence of activity against gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*). The DPPH free radical scavenging assay showcased the extract's moderate scavenging potential, with an IC50 of 1.55 mg/ml.

Keywords : *Dittrichia viscosa*, Kabylia, antimicrobial activity, antioxidant activity.

Résumé - Dans la présente étude, l'activité antimicrobienne et le pouvoir antioxydant d'un extrait méthanolique obtenu par extraction assistée par ultrasons à partir des feuilles de *Dittrichia viscosa* provenant de la région d'Ait Yahia en Haute-Kabylie ont été étudiés in vitro. Dans un premier temps, un screening phytochimique de la poudre de feuilles séchées a été effectué, mettant en évidence la présence de polyphénols, dont des flavonoïdes. L'activité antimicrobienne a été évaluée qualitativement et quantitativement vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 14575), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), et *Candida albicans*. L'effet antioxydant a été déterminé par la méthode du piégeage du DPPH. L'évaluation de l'activité antimicrobienne a révélé une activité antibactérienne significative contre les bactéries gram positif étudiées, soit *Bacillus cereus* (17,83mm \pm 0,24 ; CMI = 0,781 mg/ml) et *Staphylococcus aureus* (16,5mm \pm 0,4 ; CMI = 6,25 mg/ml), une activité antifongique modérée vis-à-vis de *Candida albicans* (13 mm \pm 1,08 ; CMI = 50 mg/ml), et un effet inexistante vis-à-vis des gram négatif *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Le test au DPPH a révélé l'activité antiradicalaire modérée de l'extrait, avec une IC50 de 1,55 mg/ml.

Mots clés : *Dittrichia viscosa*, Kabylie, activité antimicrobienne, activité antioxydante.

I. Introduction

A travers les siècles et les continents, les traditions humaines ont su développer les connaissances et le savoir nécessaires pour mettre à profit les propriétés thérapeutiques des végétaux. Les peuples natifs en particulier ont toujours eu un lien privilégié avec la nature. Leurs traditions orales, riches d'un savoir ancestral, fruit d'une expérience accumulée depuis les temps les plus anciens, furent une source dans lequel la communauté scientifique du siècle dernier a puisé sans relâche. C'est par ailleurs grâce à ces connaissances, souvent multimillénaires, qu'a été mis en lumière nombre de molécules actives qui ont révolutionné la médecine moderne.

En effet, les plantes, étant dépourvues de système immunitaire à l'image de ceux des mammifères, ont dû évoluer dans le sens du développement de molécules actives capables de combattre les microorganismes les menaçant. [1]

La large diversité chimique qui caractérise les plantes médicinales utilisées dans les médecines traditionnelles de par le monde s'est néanmoins vue négligée depuis l'avènement des antibiotiques au cours de la seconde moitié du 19^{ème} siècle, et s'en retrouve de ce fait largement inexploitée.

Cependant, le mésusage et l'abus de médicaments –et plus spécifiquement d'antimicrobiens- sont à l'origine du développement de résistances chez un nombre croissant de microorganismes pathogènes. Ceci constitue un problème de santé publique global, puisqu'il est responsable d'une diminution de l'efficacité des traitements des maladies infectieuses qu'ils engendrent, ce qui a pour conséquence une hausse de la morbidité et de la mortalité. [2]

De ce fait, la mise en évidence de nouvelles molécules pourvues de propriétés pharmacologiques exploitables est l'un des grands défis auxquels les chercheurs sont confrontés. [3]

C'est ainsi que ces dernières années les végétaux font l'objet d'un regain d'intérêt, étant donné leur richesse en composés chimiques qui en fait une source prometteuse de molécules antimicrobiennes, qui pourraient être une solution durable à l'émergence de souches pathogènes multi-résistantes. [1]

L'Algérie est caractérisée par une multitude de bioclimats, diversité à l'origine d'une riche flore estimée à près de 3000 espèces appartenant à de nombreuses familles botaniques, dont 15% sont endémiques. [4]

La tradition médicinale kabyle a connaissance de plusieurs plantes possédant des vertus thérapeutiques reconnues. Parmi elles, *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter, 1973, appartenant à la

famille botanique des Astéracées, connue localement sous le nom de « Amagraman », dont l'utilisation comme antiseptique, cicatrisant et anti-inflammatoire est très répandue. [5]

Il s'agit d'un sous-arbrisseau vivace, buissonnant, et très dense qui pousse à travers tout le pourtour méditerranéen. On le retrouve au bord des chemins, dans les friches, les décombres, les terrains en jachère, ou au milieu des garrigues ouvertes. Elle affectionne les terrains rocailloux et argileux. [6]

Sa tige, dont la hauteur s'articule entre 40 cm et 1 m, est frutescente au niveau de la base et très ramifiée. Le système racinaire rhizomateux, glanduleux, et odorant peut atteindre jusqu'à 30 cm de long. Les feuilles basilaires sont entières, sessiles, alternes, oblongues, aigües, sinuées et dentées, tandis que les feuilles caulinaires sont amplexicaules et plus largement lancéolées. Elles sont couvertes de poils glanduleux libérant une huile essentielle camphrée, ce qui rend la plante visqueuse, collante, et odorante. [5]

L'inflorescence est un ensemble de capitules assez gros, regroupés en longues grappes pyramidales. Ils sont hétérogames, multiflores et radiés. L'involucre est campanulé, et ses bractées, inégales, sont imbriquées sur plusieurs rangs. Les bractées externes sont scarieuses et souvent foliacées. Le fruit est un akène cylindrique côtelé surmonté d'un pappus. [7]

Dans le but de contribuer à la valorisation de cette plante issue de la médecine traditionnelle algérienne, de confirmer ou d'infirmer certaines des vertus thérapeutiques qui lui sont prêtées, nous avons évalué l'activité antimicrobienne d'un extrait méthanolique de ses feuilles vis-à-vis de cinq souches pathogènes de l'homme, ainsi que ses propriétés antiradicalaires.

II. Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal destiné à l'extraction, à savoir les parties aériennes de *Dittrichia viscosa*, a été récolté sur des pieds spontanés dans le village de Taka, dans la région d'Ait Yahia, commune de Ain El Hemmam, wilaya de Tizi-Ouzou, et ce en période automnale au cours du mois de Novembre 2022. La récolte a été effectuée en matinée, à une température ambiante s'articulant aux environs de 25°C.

Après effeuillage du matériel végétal, les feuilles ont été soigneusement criblées, puis mises à sécher à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant trois semaines. Elles ont par la suite été fragmentées, puis conservées à l'abri de la lumière et de l'humidité dans un endroit aéré.

Un spécimen complet de la plante, destiné aux études botanique, morphologique, et histo-anatomique, a également été prélevé pour l'étude botanique dans le but de confirmer son identité.

1.2. Micro-organismes

L'extrait de la plante a été testé sur un panel de souches bactériennes de référence de l'American Type Culture Collection (ATCC) fournies par la faculté de Biologie de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, ainsi que sur une souche candidosique isolée et identifiée par le laboratoire de parasitologie du CHU Nedir Mohamed de Tizi-Ouzou.

Type de microorganisme	Espèce	Caractéristiques	Origine
Bactérie	<i>Escherichia coli</i>	Bacille gram négatif	ATCC 25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		ATCC 27853
	<i>Bacillus cereus</i>	Bacille gram positif	ATCC 14575
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocci gram positif	ATCC 25923
Levure	<i>Candida albicans</i>		Souche pathologique

1.3. Autre matériel

Appareils, verrerie et petit matériel de laboratoire, divers produits et réactifs nécessaires à la réalisation des différentes étapes de l'étude.

2. Méthodes

2.1. Etude botanique

Elle est basée, d'une part, sur l'étude morphologique, consistant à décrire les différentes parties de l'appareil végétatif (tige, racine, feuille) et de l'appareil reproducteur (inflorescence, fleur, fruit) de la plante, et d'autre part sur l'étude histo-anatomique, par des observations microscopiques de coupes transversales de la tige, de la racine et de la feuille, préalablement préparées par la technique de double coloration de Deyson.

2.2. Etude phytochimique

2.2.1. Screening phytochimique

La mise en évidence de la composition en métabolites secondaires des feuilles de *Dittrichia viscosa* est effectuée par criblage phytochimique. Il s'agit d'un ensemble de tests qualitatifs permettant d'orienter le choix de la méthode et du solvant d'extraction.

Il consiste à mettre la drogue réduite en poudre en contact avec divers réactifs. La présence des familles chimiques recherchées est affirmée par virage coloré ou formation de précipités, et infirmée le cas échéant.

Les essais sont effectués suivant les méthodes décrites dans les travaux de **Bruneton (2009)**, **Longanga et al. (2000)**, **Bekro et al. (2008)**, **N'Guessan (2009)**, et **Zafilaza et al. (2019)**.

2.2.1.1. Mise en évidence des alcaloïdes

Les tests de caractérisation sont effectués sur un extrait acide, obtenu après ajout de 10 ml d'acide sulfurique à 10% à 200 mg de poudre de feuilles séchées. Le tout est agité pendant 2 minutes, puis filtré sur papier filtre.

Le filtrat obtenu est réparti sur 3 tubes à essai. Dans chacun de ces tubes, on ajoute deux gouttes de l'un des trois réactifs iodés suivants :

- Le réactif de Bouchardat, qui réagit avec les alcaloïdes totaux en donnant un précipité brun.
- Le réactif de Dragendorff, qui réagit en donnant un précipité rouge vermillon.
- Le réactif de Mayer, qui réagit en donnant un précipité blanc crème.

2.2.1.2. Mise en évidence des polyphénols

A 200 mg de poudre de feuille est ajouté un mélange de 6 ml d'acide acétique et de 2 ml d'eau distillée. Le tout est placé au bain-marie à 60°C pendant 5 minutes, sous agitation occasionnelle. Après filtration au papier filtre, on ajoute au filtrat obtenu une à deux gouttes de perchlorure ferrique (FeCl₃).

Le FeCl₃ réagit avec les polyphénols en engendrant une coloration noire.

2.2.1.3. Mise en évidence des tanins

100 ml d'eau sont ajoutés à 1g de poudre de drogue, et l'ensemble porté à ébullition pendant 30 minutes.

Dans un tube sont versés 5 ml du décocté obtenu, auquel est ajouté 1 ml de gélatine salée. Les tanins de poids moléculaire élevé sont précipités par la gélatine, et forment un précipité blanc gélatineux.

2.2.1.4. Mise en évidence des flavonoïdes : Réaction à la cyanidine

A quelques milligrammes de poudre de drogue sont ajoutés quelques gouttes d'HCl concentré. Des copeaux de magnésium sont ensuite ajoutés au mélange. En présence de l'hydrogène naissant de l'action de l'acide chlorhydrique sur le magnésium, plusieurs groupes de flavonoïdes développent des colorations variées ; leur présence se traduit ainsi par un virage coloré ;

- Orange dans le cas des Flavones.
- Rouge cerise avec les Flavonols.
- Rouge violacé en présence de Flavonones.

2.2.1.5. Mise en évidence des anthracénosides : Réaction de Bornträger

Les anthracénosides sont des hétérosides hydrosolubles. Leur hydrolyse acide oxydante libère la génine, de nature anthraquinonique caractérisée par sa lipophilie, ainsi qu'un résidu glucidique. Les anthraquinones, en milieu basique, génèrent une coloration rouge.

La caractérisation des anthracénosides se fait en 2 étapes.

- **1^{ère} étape : Extraction des anthracénosides et hydrolyse acide oxydante.**

A 200 mg de poudre sont ajoutés 1 ml d'eau oxygénée et 5 ml d'acide sulfurique à 10%. Le mélange est porté au bain marie pendant 10 minutes à 95°C, puis filtré sur papier filtre.

Le filtrat obtenu renferme anthracénosides et anthraquinones libres.

- **2^{ème} étape : Extraction des génines libres.**

A l'extrait acide obtenu sont ajoutés 3 ml d'éther éthylique. Le tout est introduit dans une ampoule à décanter, avant d'être agité et dégazé à plusieurs reprises.

Après décantation, les deux phases non-miscibles sont séparées.

- **3^{ème} étape : Réaction colorée.**

A chacune des deux phases récupérées est ajouté un volume égal de NaOH (50 g/L).

En présence de quinones libres, la phase aqueuse vire au rouge et la phase organique à l'incolore.

2.2.1.6. Les saponosides

1g de poudre de drogue est introduit dans 100 ml d'eau, puis porté au bain-marie à 95°C pendant 30 minutes. La décoction obtenue est ensuite filtrée sur papier filtre.

Dans une série de 11 tubes à essai numérotés de 1 à 11, des dilutions sont réalisées à partir du décocté et d'eau distillée. Les volumes introduits sont représentés dans le tableau suivant.

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Décocté (ml)	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
Eau (ml)	10	9.5	9	8.5	8	7.5	7	6.5	6	5.5	5

Chacun des tubes est agité dans le sens de la longueur pendant 15 secondes. Après 15 minutes de repos, la hauteur de la mousse formée dans chaque tube est mesurée.

2.2.1.7. Mise en évidence des mucilages

A 1 ml de décocté à 10% sont ajoutés 5 ml d'éthanol absolu. En présence de mucilages, il se forme, après une dizaine de minutes, un précipité floconneux.

2.2.1.8. Mise en évidence des stérols et triterpènes : Réaction de Liebermann

1g de poudre de feuilles séchées est introduit dans un tube à essai avec 20 ml d'éther. Le tube est ensuite bouché, agité, et laissé au réfrigérateur pendant 24h. Ce temps écoulé, le tout est filtré sur papier filtre et complété à 20 ml d'éther.

L'extrait éthéré est évaporé sans une capsule, et le résidu résultant récupéré par 1 ml d'anhydride acétique et 1 ml de chloroforme. A l'aide d'une pipette, 1 à 2ml de H₂SO₄ concentré sont déposés au fond du tube à essai sans agitation.

En présence de stérols et de triterpènes, il se forme, à l'interface des deux liquides, un anneau rouge brunâtre à violet.

2.2.2. Préparation des extraits

Les extraits végétaux sont des préparations obtenues par l'action extractive d'un solvant sur une drogue végétale, le plus souvent sèche et broyée. En plus de renfermer des composés issus du métabolisme primaire, ils sont particulièrement riches en métabolites secondaires, à l'image des alcaloïdes, des polyphénols, des terpènes et de leurs dérivés. Ils concentrent ainsi l'ensemble des molécules bioactives de la plante.

Une série d'extraits méthanoliques est préparée à l'aide de la technique de l'extraction assistée par ultrasons à partir des feuilles d'inule visqueuse séchées et broyées. Ce choix est justifié par les résultats du screening phytochimique ainsi que les données de la littérature.

2.2.2.1. Choix du solvant d'extraction

Le méthanol et l'éthanol, solvants polaires et protiques, sont les solvants les plus utilisés dans l'obtention d'extraits de plantes, à l'inverse des solvants apolaires (i.e., chloroforme, dichlorométhane, hexane, éther diéthylique) ou polaires aprotiques (i.e., acétone, acétate d'éthyle). Ceci s'explique par la capacité des solvants polaires à solubiliser la majorité des métabolites secondaires, et d'optimiser leur libération des tissus végétaux [13].

Le travail de **Ben Sassi et al. (2007)** a prouvé que l'utilisation du méthanol comme solvant d'extraction à partir des parties aériennes de *Dittrichia viscosa* fournissait le rendement le plus intéressant, tandis que le plus bas a été obtenu avec l'hexane.

Car en plus de solubiliser les phytoconstitués polaires, le méthanol est en effet capable de conférer une certaine polarité aux phytoconstitués apolaires ; il agit de ce fait comme un solvant intermédiaire, permettant la miscibilité de composés polaires et apolaires [13], ce qui maximise le rendement et est à l'origine de la diversité de la nature des métabolites secondaires extraits.

2.2.2.2. Choix de la méthode d'extraction

Les principales méthodes d'extraction mises en pratique dans l'extraction de composés bioactifs à partir de matrices végétales sont l'extraction au Soxhlet, l'extraction assistée par micro-ondes, et l'extraction par broyage par reflux d'air.

Bien que leur utilisation soit très répandue, ces techniques présentent un certain nombre d'inconvénients. En effet, elles sont associées à des temps d'extraction prolongés, à une importante consommation de solvants organiques, et à de faibles rendements. [15]

Cette efficacité d'extraction limitée est notamment due aux hautes températures qui constituent l'une des conditions opératoires les plus cruciales de ces techniques. Un nombre

important de composés organiques sont thermolabiles, à l'image des flavonoïdes, et sont donc facilement et rapidement dénaturés. [16]

Au cours des trente dernières années, le recours à l'extraction assistée par ultrasons (Ultrasound-assisted extraction, dite UAE en anglais) s'est vue prendre de plus en plus d'ampleur. De par ses caractéristiques particulières, elle permet de contourner les inconvénients associés aux autres techniques d'extraction ; elle permet en effet d'augmenter les taux de transfert de masse, de diminuer le temps de traitement en réduisant la durée des cycles d'extraction, d'abaisser la température opératoire, et de réduire la consommation de solvants organiques. Ceci en fait une technique d'éco-extraction propre et performante, actuellement très utilisée dans l'extraction des composés organiques pharmacologiquement actifs à partir de matières végétales. [17]

2.2.2.3. Mode opératoire

L'extrait méthanolique des feuilles de *Dittrichia viscosa* est obtenu selon le protocole décrit par **Kubra et al. (2019)** et adapté à notre échantillon.

Dans un erlenmeyer de 250 ml sont introduits 10 g de drogue fragmentée ainsi que 100 ml de méthanol. Le tout est soumis à une sonication, menée à bien en plaçant l'erlenmeyer dans un dispositif type Fisherbrand™ Bain à ultrasons chauffant série S (FB15052), fonctionnant à une fréquence de 37 kHz et à une puissance maximale de 560 W. L'opération se poursuit pendant 20 minutes, à l'issue desquelles on procède à une filtration.

Cette opération est reproduite cinq fois. Au total, 50 g de feuilles séchées fragmentées sont soumises à l'extraction.

Le filtrat méthanolique total récupéré est transféré dans un ballon de distillation et concentré par évaporation rotative à basse pression au rotavapor (HAHNSHIN-2005V). L'extrait brut obtenu est séché dans un cristalliseur à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant une semaine.

Le résidu solide résultant est raclé à la spatule, et les copeaux obtenus pesés. Ils sont ensuite récupérés au diméthylsulfoxyde (DMSO).

Calcul du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction, qui se définit comme étant le rapport entre la masse d'extrait après évaporation du solvant et la masse du matériel végétal utilisé, est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante [19]

$$R\% = 100 m_{\text{extrait}} / m_{\text{échantillon}}$$

Où :

« R » est le rendement en pourcentage.

« m_{extrait} » est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en grammes.

« $m_{\text{échantillon}}$ » est la masse sèche la plante en grammes.

2.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne

2.3.1. Evaluation qualitative : Technique de diffusion sur milieu gélosé

La méthode de diffusion en milieu gélosé telle que décrite par **Bauer & al (1966)** est une méthode permettant d'évaluer la sensibilité des germes aux potentiels agents antibiotiques étudiés. Il s'agit d'une méthode dite qualitative, car permettant d'identifier l'existence ou non d'éventuelles propriétés antimicrobiennes.

Elle consiste à déposer des disques de papier Wattman imprégnés des substances actives à étudier à la surface d'une gélose préalablement inoculée avec une suspension de la souche à tester. Après incubation, une zone d'inhibition circulaire se forme autour des disques, traduisant l'absence de croissance microbienne. L'effet du produit antibiotique sur la cible est apprécié par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition.

L'extrait solide d'inule visqueuse est récupéré au DMSO stérile, un solvant biologiquement inerte, de façon à obtenir un extrait liquide à 200 mg/ml. Sont ensuite réalisées deux dilutions successives à raison de $\frac{1}{2}$. Une gamme de trois extraits liquides de concentrations décroissantes (200 mg/ml, 100 mg/ml, et 50 mg/ml) est ainsi obtenue. [21, 22]

Des disques stériles de 6mm de diamètre préalablement stérilisés à l'autoclave sont imbibés de 15 μ l de chacun des trois extraits.

La gentamicine à 10 μ g/disque est utilisée comme témoin positif pour les bactéries Gram positif, l'imipenème à 10 μ g/disque pour les Gram négatif, et la Terbinafine à 10 μ g/disque pour *Candida albicans*. Le DMSO stérile fait office de témoin négatif.

Chacun des trois extraits d'inule, de concentrations différentes, est confronté aux cinq germes. Trois répétitions sont réalisées pour chaque confrontation.

Les boîtes sont fermées et incubées à température ambiante pendant 20 minutes, puis dans une étuve à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les levures.

Après incubation, le diamètre des zones d'inhibition (DZI) formées autour des disques est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse.

Selon **Ponce et al. (2003)**, la zone d'inhibition est définie comme étant une auréole claire formée autour du disque, où aucune croissance n'est observée. Les résultats sont classés suivant la sensibilité des souches vis-à-vis des substances testées comme suit :

- Diamètre < 8 mm : Souche non sensible ou résistante.
- Diamètre de 9 à 14 mm : Souche sensible. (+)
- Diamètre de 15 à 19 mm : Souche très sensible. (++)
- Diamètre \geq 20 mm : Souche extrêmement sensible. (+++)

2.3.1.1. Analyse statistique des données

Chaque expérience a été réalisée trois fois ($n = 3$). La valeur moyenne et l'écart type ont été calculés à partir de données obtenues. Les données des essais biologiques ont fait l'objet d'un test de Spearman à l'aide du logiciel SPSS.

2.3.2. Evaluation quantitative : Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

2.3.2.1. Détermination de la CMI

Pour les bactéries, elle est réalisée par la méthode de microdilution en milieu liquide, décrite par **Thabaut et Durosoir (1979)** et adaptée par **Celiktas (2007)**.

Pour ce faire, un bouillon Muller-Hinton est préparé, et 40 μ l sont répartis dans chacune des cupules d'une microplaque à 96 puits.

15 μ l d'extrait méthanolique à 200 mg/ml sont ensuite introduits dans la 1^{ère} cupule de chacune des rangées de la plaque. La microdilution est alors réalisée de la 1^{ère} à la 11^{ème} cupule. On obtient ainsi une gamme de 11 concentrations décroissantes, de raison 2 (200 à 0,195 mg/ml), la 12^{ème} cupule servant de témoin négatif.

L'inoculum, préparé en introduisant 0,1 mL (3 gouttes de pipette Pasteur) d'une culture de 24h en milieu liquide dans 25 mL de bouillon Mueller-Hinton, est une suspension bactérienne correspondant à une concentration de 10^5 à 10^6 bactéries par mL. Il est réparti dans chacune des cupules. Chaque plaque est ensuite scellée à l'aide d'un ruban adhésif et placée à l'étuve pendant 18 heures à 37°C.

En milieu liquide, la croissance bactérienne est visualisée par un trouble ou un culot bactérien. La lecture des résultats détermine la dernière cupule dépourvue de culture microbienne visible ; elle contient la C.M.I de l'antibiotique.

La CMI est également déterminée vis-à-vis de *Candida albicans*. Elle est réalisée en milieu solide par la méthode de diffusion en milieu gélosé décrite par **Dzomba et**

Muchanyereyi (2012), qui consiste à imprégner des disques antibiotiques d'un gradient prédéfini de concentrations croissantes d'extrait. Ces disques sont appliqués directement à la surface d'une gélose Sabouraud inoculée avec une suspension de *Candida albicans* à 0,5 McFarland, puis incubée 48 heures à 25°C. La concentration minimale inhibitrice correspond à la plus basse concentration d'extrait inhibant toute culture visible de la souche candidosique après incubation.

2.3.2.2. Détermination de la CMB

Elle est réalisée suivant le protocole de **Thabaut et Durosoir (1979)**. Une aliquote du contenu de chaque cupule n'ayant pas présenté de croissance bactérienne est puisée à la micropipette puis déposée en points à la surface d'un milieu gélosé de Müller-Hinton, contenu dans une boîte de Pétri.

Après 18 h d'incubation, le dernier point d'inoculation dépourvu de culture microbienne visible correspond à la concentration minimale bactéricide.

La CMB n'a pas été déterminée pour *Candida albicans*.

2.3.2.3. Le rapport CMB/CMI

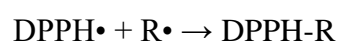
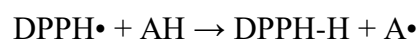
Il permet de définir la nature du pouvoir antibiotique des potentielles substances antibactériennes étudiées vis-à-vis des germes sur lesquels elles sont testées. Autrement dit, il permet de distinguer une substance bactéricide d'une substance bactériostatique. [26]

Selon **Razafintsalama (2013)**, lorsque ce rapport se trouve inférieur ou égal à 4 (CMB/CMI \leq 4), la substance étudiée est dite bactéricide, alors que s'il est supérieur à 4 (CMB/CMI $>$ 4), elle est dite bactériostatique.

2.4. Evaluation de l'activité antioxydante

2.4.1. Test du piégeage du radical libre DPPH

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique préparé à partir des feuilles de *Dittrichia viscosa* a été réalisée selon le protocole décrit par **Brand-Williams W. & al. (1995)** et adapté par **Baliyan et al. (2022)**, qui permet de mettre en évidence la capacité de l'extrait étudié à réduire un radical libre stable, le DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl ou (α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl).



Sous sa forme radicalaire et en solution méthanolique, le DPPH est de couleur violette et absorbe entre 515 et 517 nm. Sa réduction est donc reflétée par la diminution de son

absorbance à cette longueur d'onde spécifique, puisque la formation de DPPH réduit, de couleur jaune et absorbant à une longueur d'onde différente, se fait au dépend du DPPH radicalaire. Cette diminution est mesurée par spectrophotométrie.

Le pouvoir anti-radicalaire des extraits est exprimé en pourcentage de piégeage du radical DPPH (I%) par la formule suivante :

$$I \% = 100 [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}}]$$

$A_{\text{contrôle}}$: Absorbance de DPPH avant l'addition de l'extrait.

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance de l'échantillon.

On associe généralement au test DPPH la valeur IC50, qui exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire de 50% la quantité initiale de DPPH. Plus la valeur de l'IC50 est faible, plus l'activité antioxydante est importante [30]

Celui-ci est obtenu par extrapolation après avoir tracé une courbe des concentrations de l'extrait en fonction du pourcentage d'inhibition I %, ou calculé graphiquement à partir des équations des courbes de régressions linéaires des pourcentages d'inhibitions en fonction des concentrations des extraits testés. [31]

2.4.2. Mode opératoire

La solution de DPPH• à 0,1mM est préparée en ajoutant 39,4 mg de DPPH à 1000 ml de méthanol. [32]

40 mg d'extrait solide d'inule sont dissouts dans 10 ml de DMSO, de façon à obtenir une solution mère de concentration de 4 mg/ml. A partir de cette dernière est réalisée une série de dilutions, à raison de 1/2, de façon à obtenir une gamme de 8 concentrations décroissantes (4 mg/ml ; 2 mg/ml ; 1 mg/ml ; 0.5 mg/ml ; 0.25 mg/ml ; 0,125 mg/ml ; 0,06 mg/ml ; 0,03 mg/ml). [33]

50 µl d'extrait à différentes concentrations sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanolique de DPPH, puis incubés pendant 30 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante. Ce délai écoulé, l'absorbance de chaque mélange est mesurée au spectrophotomètre à 517 nm. L'acide ascorbique sert de témoin, et le DPPH seul de contrôle. [34]

3. Résultats

3.1. Etude botanique

L'analyse organographique de la plante a permis, en se référant aux données floristiques [7] et à l'APG IV (2016), de collecter des informations systématiques aboutissant à son

identification. Il s'agit bien de *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter, 1973 appartenant à la famille des Astéracées, sous-famille des *Astreroideae*, tribu *Inuleae*.

L'étude histo-anatomique a quant à elle permit de fournir des informations complémentaires, notamment concernant le type de tissus sécréteurs ; il s'agit de poils sécréteurs, confirmant le caractère aromatique de la plante. Trois types de poils sécréteurs ont d'ailleurs pu être distingués au cours de l'observation au microscope optique au grossissement G(10 x40). (**Figure 1**)

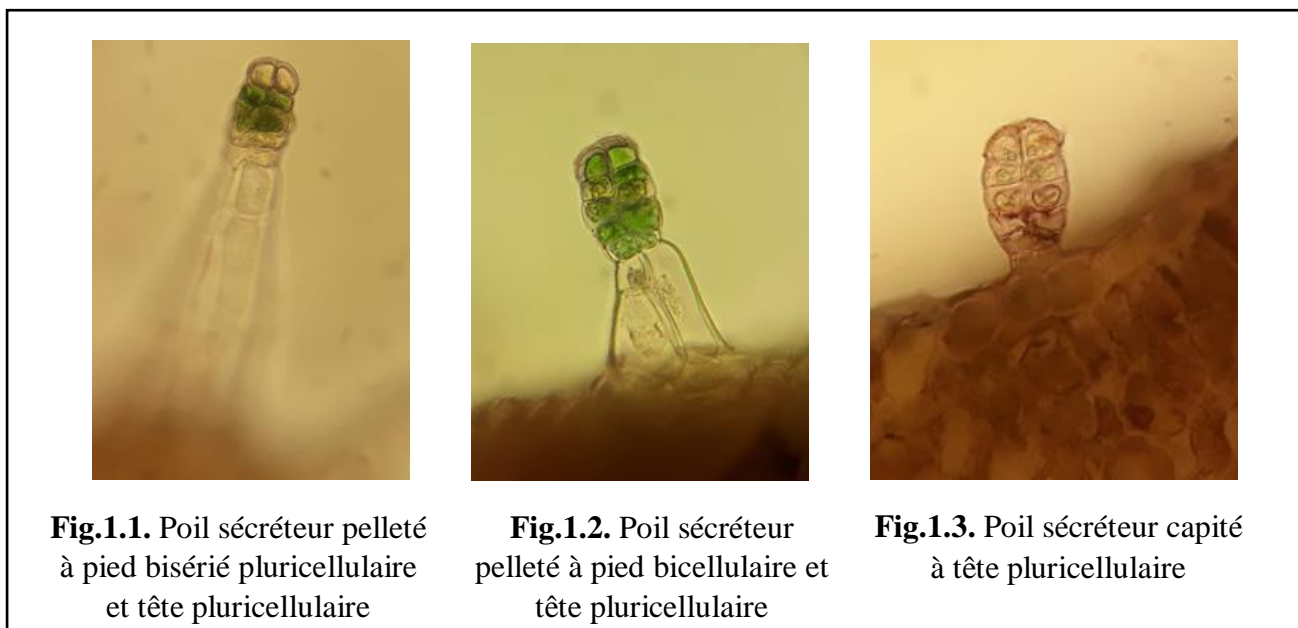


Figure 1. Observation au microscope optique à G(10 x 40) de trois types de poils sécréteurs à la surface des feuilles de *Dittrichia viscosa*.

3.2. Etude phytochimique

3.2.1. Screening phytochimique

Le screening phytochimique a mis en évidence la présence de polyphénols dans les feuilles d'inule visqueuse, et notamment celle de flavonoïdes. Le virage du milieu réactionnel au rouge cerise indique par ailleurs que les flavonols sont la classe de flavonoïdes la plus abondante. Il indique également la présence de tannins et de mucilages, ainsi que l'absence d'alcaloïdes, d'anthracénosides, et de terpénoïdes.

3.2.2. Rendement d'extraction

L'extrait obtenu après évaporation totale du méthanol est de consistance solide à pâteuse, de couleur foncée, et fortement odorant.

Pour 50g de matériel végétal, 6548 mg soit 6,548 g d'extrait solide ont été récupérés. Le rendement total est donc de 13,096%.

3.3. Activité antimicrobienne

3.3.1. Evaluation qualitative

La Gentamycine et l'Imipenème, utilisés comme contrôle positif lors de l'étude de l'activité antibactérienne, se sont montrés très efficaces, formant des zones d'inhibition étendues autour des disques antibiotiques. Ceci contraste avec la Terbinafine, qui n'a donné lieu à aucune zone d'inhibition.

Le DMSO n'a affiché aucune activité inhibitrice vis-à-vis des souches bactériennes et candidosique.

Les résultats de la confrontation de l'extrait méthanolique de feuilles de *Dittrichia viscosa* aux cinq souches microbiennes étudiées par la technique de diffusion sur milieu gélosé sont exprimés dans le **Tableau I**.

Tableau I. Expression des diamètres des zones d'inhibition formées après confrontation de l'extrait de *Dittrichia viscosa* à chacun des cinq germes étudiés.

		<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
50 mg/ml	DZI (mm)	12,83 ± 2,05	11,33 ± 1,43	8,83 ± 0,62	4,66 ± 1,91	0
	Sensibilité	+	+	-	-	-
100 mg/ml	DZI (mm)	17,66 ± 1,31	14,33 ± 0,94	2,5 ± 2,88	4 ± 4,62	11 ± 1,08
	Sensibilité	++	+	-	-	+
200 mg/ml	DZI (mm)	17,83 ± 0,24	16,5 ± 0,4	3 ± 3,46	2,33 ± 2,7	13 ± 1,08
	Sensibilité	++	+	-	-	+
Témoin positif (mm)		20,06 ± 0,4	20,53 ± 1,23	31,2 ± 0,14	34,4 ± 1,49	0
Témoin négatif (mm)		0	0	0	0	0

Leur analyse a permis de déterminer que l'extrait n'a exhibé de propriétés antibactériennes que vis-à-vis des bactéries gram positives. Ainsi, les plus hauts niveaux d'activité ont été observés contre *Bacillus cereus*, avec des zones d'inhibition dont le diamètre est de l'ordre de 12,83 mm ± 2,05 pour 50 mg/ml, de 17,66 mm ± 1,31 pour 100 mg/ml, et de 17,83 mm ± 0,24 pour 200 mg/ml.

L'extrait s'est également montré efficace contre *Staphylococcus aureus*, ayant donné des diamètres d'inhibition de 11,33 mm ± 1,43 ; 14,33 mm ± 0,94 ; et 16,5 mm ± 0,4 pour 50 mg/ml, 100 mg/ml, et 200 mg/ml respectivement.

Le test de Spearman a démontré l'effet de l'extrait vis-à-vis de ces deux souches bactériennes est caractérisé par une relation dose-effet (**Figure 2**) ; plus l'extrait est concentré, plus l'effet antibactérien est marqué.

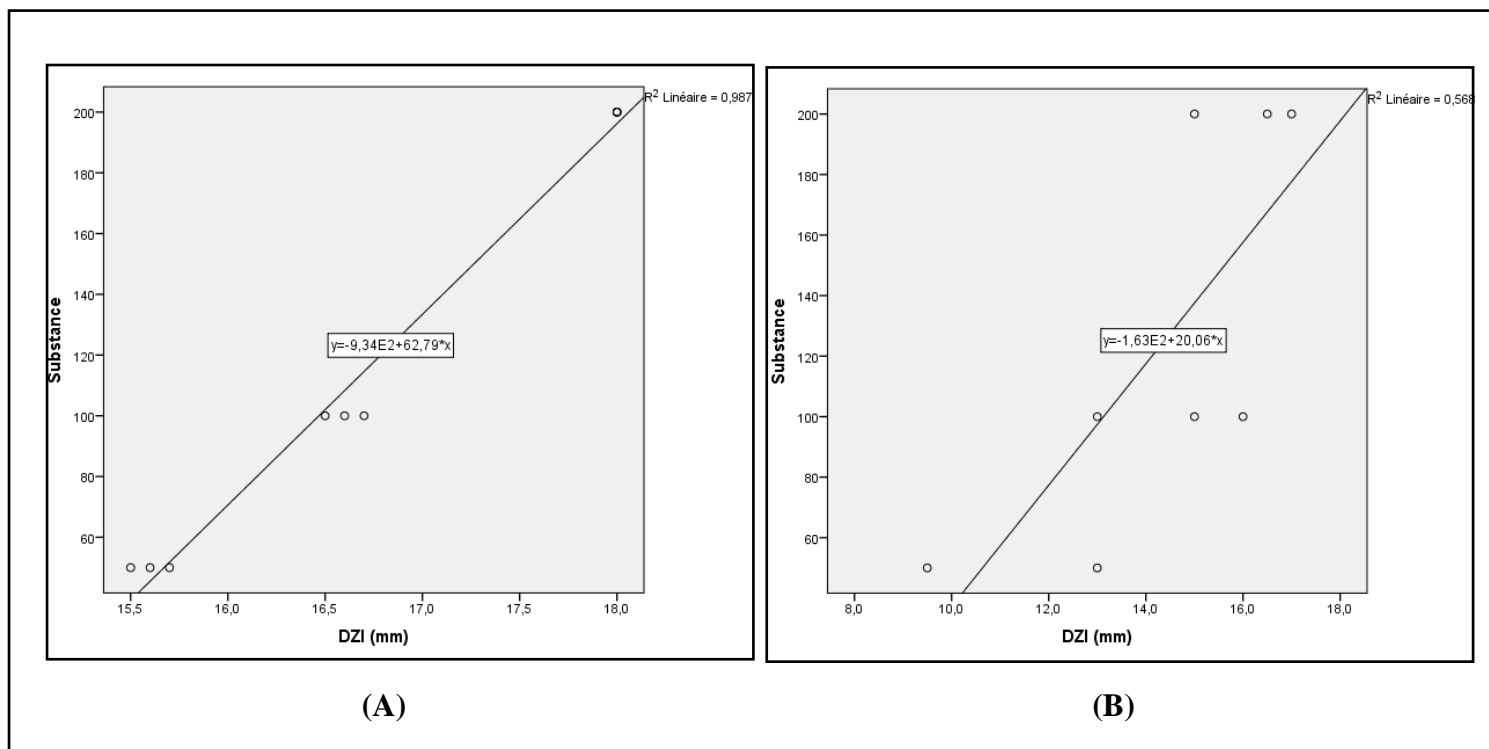


Figure 2. Etude de la corrélation entre la concentration de l'extrait méthanolique des feuilles de *Dittrichia viscosa* et l'effet antibactérien exercé par celui-ci contre (A) *Bacillus cereus* et (B) *Staphylococcus aureus*.

Aucune activité antibiotique n'a été notée contre les gram négatives. En effet, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* ne se sont pas montrées sensibles à l'extrait de *Dittrichia viscosa*. Les zones d'inhibition formées se sont révélées très réduites, voire inexistantes. Il n'y a par ailleurs pas de corrélation entre concentration et effet antibactérien. (**Figure 3**)

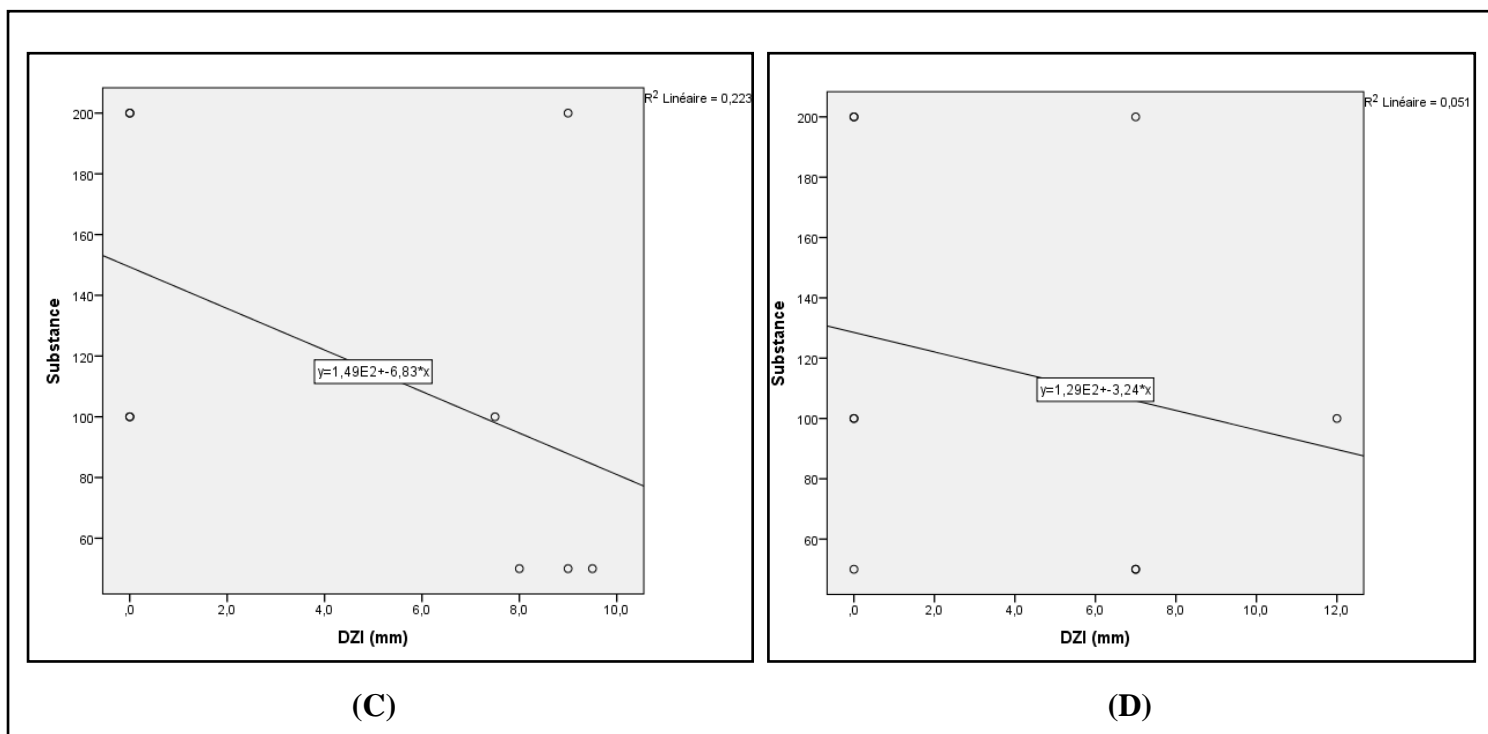


Figure 3. Etude de la corrélation entre la concentration de l'extrait méthanolique des feuilles de *Dittrichia viscosa* et l'effet antibactérien exercé par celui-ci contre (C) *Pseudomonas aeruginosa* et (D) *Escherichia coli*.

Bien que l'extrait n'ait donné aucun résultat à 50 mg/ml contre *Candida albicans*, il a fait preuve d'un effet inhibiteur modéré à 100 mg/ml et 200 mg/ml ; à ces concentrations, il a en effet formé des zones d'inhibition de 11 mm \pm 1,08 et 13 mm \pm 1,08 de diamètre respectivement. Le test de Spearman révèle que la concentration de l'extrait et son activité antifongique sont positivement corrélées. (Figure 4)

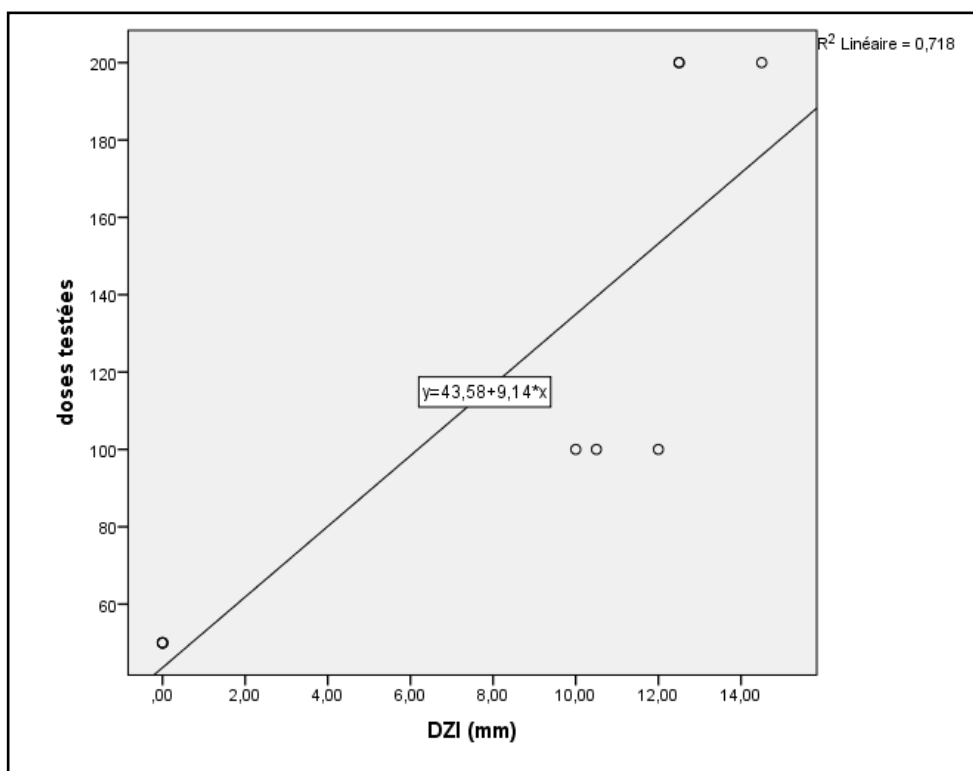


Figure 4. Etude de la corrélation entre la concentration de l'extrait méthanolique des feuilles de *Dittrichia viscosa* et l'effet antifongique exercé par celui-ci sur *Candida albicans*.

3.3.2. Evaluation quantitative

3.3.2.1. Détermination de la CMI

Les concentrations minimales inhibitrices de l'extrait ont été déterminées pour les cinq germes étudiés. Les résultats, qui rejoignent ceux obtenus lors de l'évaluation qualitative de l'effet antibiotique, sont exprimés dans le tableau suivant.

Le germe ayant affiché la CMI la plus faible est *Bacillus cereus* (CMI = 0,78 mg/ml) ; il s'agit donc du germe le plus sensible à l'activité antibiotique de l'extrait de *Dittrichia viscosa*. Il est suivi de *Staphylococcus aureus* (CMI = 6,25 mg/ml).

Pseudomonas aeruginosa, *Escherichia coli*, et *Candida albicans* ont tous présenté une CMI de 50 mg/ml.

Tableau II. Expression des résultats de l'évaluation de la concentration minimale inhibitrice de l'extrait de *Dittrichia viscosa* vis-à-vis de chacun des 5 germes étudiés

Concentration testée (mg/ml)	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,563	0,781	0,391	0,195
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

3.3.2.2. Détermination de la CMB

Pour l'ensemble des bactéries étudiées, la CMB est indéterminée pour les concentrations inférieures ou égales à 200 mg/ml (≤ 200 mg/ml), puisque le repiquage des cupules au niveau desquelles l'extrait a exercé une activité antibactérienne a à chaque fois donné lieu à une croissance bactérienne. (**Tableau 3**)

Ceci a ainsi permis d'établir que dans les limites des concentrations considérées, l'extrait méthanolique de *Dittrichia viscosa* possède des propriétés bactériostatiques vis-à-vis de l'ensemble des bactéries sur lesquelles il a été testé.

Tableau III. Rapport CMB/CMI correspondant à chaque souche bactérienne traitée à l'extrait méthanolique de *Dittrichia viscosa*.

	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
CMI (mg/ml)	0,781	6,25	50	50
CMB (mg/ml)	ND	ND	ND	ND
CMB/CMI	ND	ND	ND	ND
Interprétation	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique	Bactériostatique

ND : Non déterminé.

3.4. Activité antioxydante

D'après les résultats, illustrés par le graphique en **Figure 4**, l'extrait a fait preuve d'une action antioxydante contre le DPPH[·], et ce de manière dose dépendante ($R^2 = 0,879$) ; en effet, il atteint son maximum d'activité à 4 mg/ml, avec un pourcentage d'inhibition de 96,71%.

L'acide ascorbique, utilisé comme standard, a quant à lui inhibé 93,30 % du radical DPPH à 0,5 mg/ml, concentration à partir de laquelle son activité a évolué en plateau jusqu'à atteindre les 97,35% à 4 mg/ml. (**Figure 5**)

Pour une meilleure évaluation de l'activité antioxydante, les CI50 de l'extrait et de l'acide ascorbique ont été déterminées ; l'extrait a présenté une CI50 de 1,55 mg/ml, reflet d'une activité antiradicalaire modérée comparée à celle de l'acide ascorbique, dont la CI50 est de l'ordre de 0,165 mg/ml.

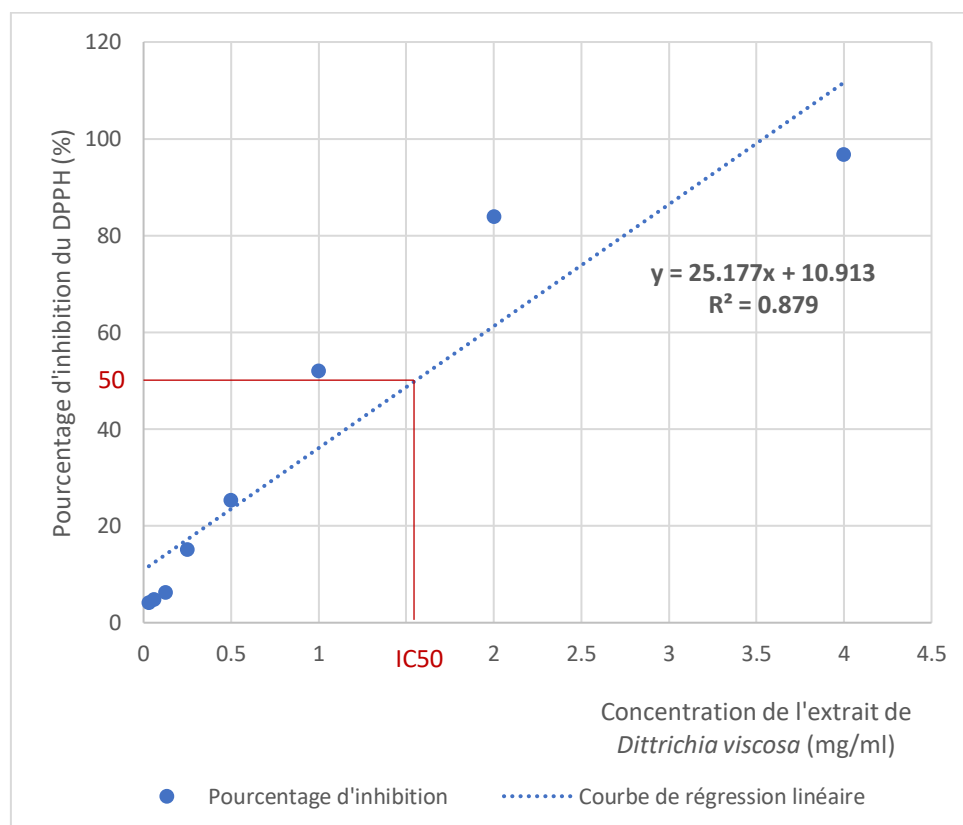


Figure 4. Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de *Dittrichia viscosa* (mg/ml)

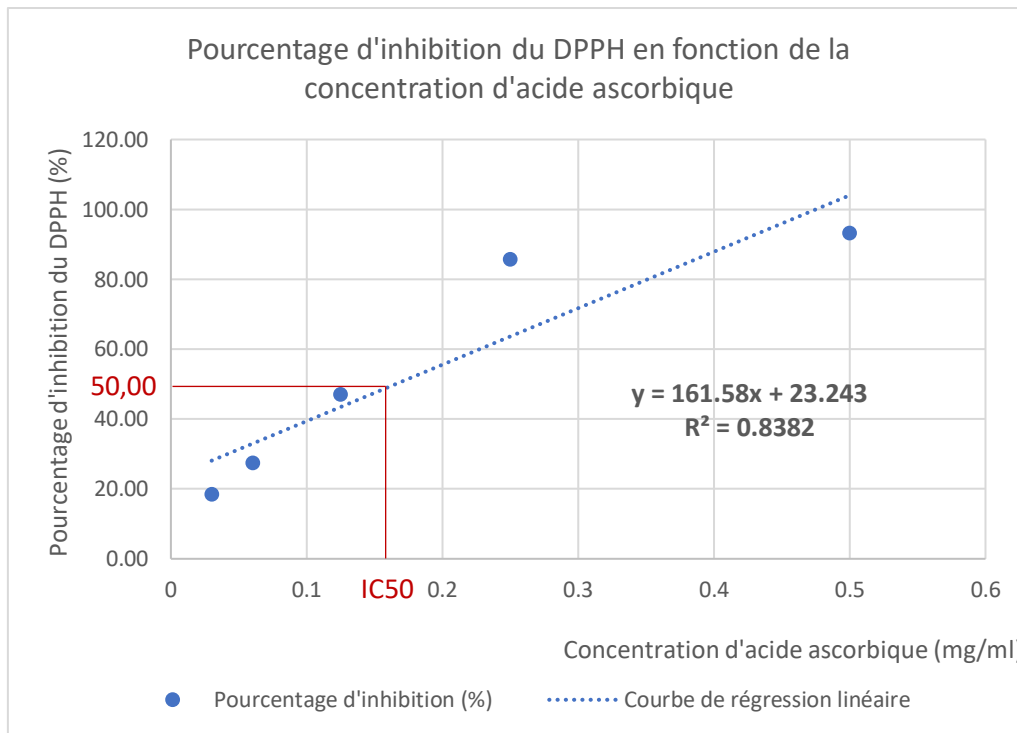


Figure 5. Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration d'acide ascorbique (mg/ml)

4. Discussion

Nos résultats sont, dans l'ensemble, conformes aux données rapportées par la littérature. En effet, la présente étude a révélé que les feuilles de *Dittrichia viscosa*, après avoir été soumises à une extraction assistée par ultrasons, avec le méthanol comme solvant d'extraction, donnaient un rendement de **13,096%**.

Ce résultat est comparable à celui de **Side Larbi et al. (2016)** qui, après extraction méthanolique à froid et évaporation à basse pression de feuilles et de fleurs d'inule visqueuse récoltées à Mascara, Algérie, en période hivernale (Octobre-Décembre), a obtenu un rendement de **12.46%**.

Il rejoint ceux de **Mohti et al. (2020)** et **Mrid et al. (2022)**, qui ont procédé à des extractions méthanoliques à température ambiante et sous agitation constante à partir des parties aériennes de *Dittrichia viscosa* récoltées à Ait Ouikhalfen pour le premier, et sur des feuilles récoltées à Tanger pour le second, et dont les rendements respectifs sont de **14.9%** et de **14.2%**.

Gökbulut et al. (2013) a, quant à lui, obtenu un rendement de **15%** après extraction méthanolique à chaud et sous agitation à partir de feuilles d'inule visqueuse originaire d'Isparta en Turquie, et **Karygianni et al. (2014)** un rendement de **17.55%** après extraction méthanolique à chaud et sous pression.

Ounaissia et al. (2020), qui a travaillé sur les parties aériennes (feuilles et tiges) de *Dittrichia viscosa* récoltée à Guelma, Algérie, en Décembre 2019, a obtenu un rendement de **22.3%** pour les tiges et de **20.73%** pour les feuilles après macération méthanolique à froid du matériel végétal pendant 24h et évaporation à basse pression.

Il faut noter que le rendement d'extraction dépend de nombreux facteurs ; il varie non seulement en fonction de la méthode d'extraction choisie et des conditions expérimentales dans lesquelles s'est faite cette dernière – à savoir la température d'extraction, la durée d'extraction, la nature du solvant utilisé et son pouvoir extractant [41], mais aussi et surtout de la matrice végétale en elle-même. En effet, la quantité, la distribution, et la composition en métabolites primaires et secondaires des végétaux fluctuent en fonction de leur cycle phénologique, de la variation saisonnière [42], mais aussi de facteurs extrinsèques.

Durant leur croissance, les végétaux interagissent avec leur environnement, ce qui les rend très vulnérables à l'influence de différents facteurs abiotiques, tels l'eau, la lumière, la température, le sol, et les agents chimiques synthétiques. Le stress hydrique, la surexposition lumineuse, les températures extrêmes, la pauvreté du sol ainsi que la présence de pesticides génèrent des stress secondaires, qui créent des conditions défavorables pour le végétal et sont donc à l'origine d'une perturbation de la biosynthèse de métabolites secondaires. [43]

Les plantes sont également amenées à faire face à des stress engendrés par des facteurs biotiques, qui sont le résultat de dommages causés à ces dernières par d'autres organismes vivants à l'image des bactéries, des virus, des champignons, et des parasites. [44].

Les facteurs environnementaux, en plus de justifier le rendement d'extraction, pourraient expliquer les résultats obtenus au cours du screening phytochimique. Celui-ci a en effet révélé la présence de polyphénols en général, et de flavonoïdes en particulier.

De nombreuses études attestent du fait que *Dittrichia viscosa* est une plante riche en flavonoïdes. Ainsi, **Abu Zarga et al. (1998)** a extrait puis caractérisé 5 flavonoïdes à partir de plants entiers de *Dittrichia viscosa* en provenance de Jordanie ; 3 flavonols, à savoir la 3-O-Acétylepadmatine, la 3-O-Méthylquercétine, et la 3,3'-Di-O-méthylquercétine, ainsi que 2 flavanones, la Népétine et l'Hispiduline. **Hernandez et al. (2007)** a, quant à lui, pu identifier 3 flavanones ; la sakuranetine (ou 5,4'-dihydroxy-7-O-methoxyflavanone), la 3-acetyl-7-O-methylaromadendrine (ou 3-acetoxy-5,4'-dihydroxy-7-methoxyflavanone), et la 7-O-methylaromadendrine (ou 3,5,4'-trihydroxy-7-methoxyflavanone), à partir d'un extrait de sommités florales de *Dittrichia viscosa* récoltées dans Le Parc Naturel de La Albufera, Sueca, Espagne.

La présence de rutine et de lutéoline dans les feuilles de *Dittrichia viscosa* a par ailleurs été mise en évidence par **Gökbulut et al. (2013)**.

Plus récemment, 23 flavonoïdes appartenant à cinq différentes classes ont été identifiés à partir d'un extrait éthanolique de feuilles de *Dittrichia viscosa* récoltées dans la région de Béjaïa. Des flavonols (rhamnétine, isorhamnetin, et quercétine), des flavones (népétine, hispiduline, et pour la première fois la diosmetine et la circimaritine), et des flavanones (naringenine et padmatine, et pour la première fois l'hesperétine) ont, entre autres, pu être identifiés à partir de l'extrait. [47]

Des dérivés de la quercétine, de la taxifoline, de la myricétine, et de l'apigénine ont par ailleurs été détectés par **Catello et al. (2023)**

De nombreuses études, qui ont été menées dans le but d'identifier et de caractériser les flavonoïdes renfermés dans les extraits de *Dittrichia viscosa*, ont révélé pour la plupart la nette prédominance de la quercétine et de ses dérivés, qui appartiennent à la sous-classe des flavonols. [45-49]

Ceci est en alignement avec les résultats de notre screening phytochimique.

En plus de l'acide chlorogénique [38, 50], une série de composés phénoliques dérivés de l'acide caffeoylquinique ont été isolés par HPLC/RMN à partir d'un extrait méthanolique de feuilles fraîches d'inule visqueuse par **Danino et al. (2009)** ; l'acide 1-O-caffeoylquinique, l'acide 4-O-caffeoylquinique, l'acide 1,3-di-O-caffeoylquinique, et l'acide 3,4-di-O-caffeoylquinique.

Les mêmes résultats ont été obtenus par **Kheyar-Kraouche et al. (2018)** ; les acides hydroxycinnamiques les plus abondants identifiés sont les dérivés d'acides cafféique et p-cinnamique, dont les acides O-caffeoylquiniques et di-O-caffeoylquiniques.

L'analyse par CCM d'un extrait aqueux de *Dittrichia viscosa* par **Khalil et al. (2007)**, et méthanolique par **Abuhamdah et al. (2013)** ont par ailleurs révélé que les parties aériennes de la plante sont dépourvues d'alcaloïdes, d'antraquinones, et de tanins catéchiques, corroborant nos résultats.

Notre étude vient par ailleurs confirmer la pertinence de l'utilisation empirique de l'inule visqueuse en Kabylie ; cette plante, connue traditionnellement pour ses vertus antiseptiques, a révélé, d'après les zones d'inhibition générées, une activité antibactérienne marquée vis-à-vis des bactéries gram positif étudiées, à savoir *Bacillus cereus* (17,83 mm ± 0,24) et *Staphylococcus aureus* (16,5 mm ± 0,4). Le potentiel inhibiteur de son extrait méthanolique est confirmé par les tests de détermination de la CMI. La plus faible a été obtenue sur *Bacillus*

cereus (CMI = 0,78 mg/ml). Elle a en revanche été inactive contre les gram négatif, soit *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Ces résultats concordent avec ceux d'**Ozkan et al. (2019)**, dont l'étude a porté sur l'évaluation du potentiel antibactérien, antioxydant, et antiprolifératif de deux extraits de *Dittrichia viscosa*, et a révélé l'action inhibitrice de l'extrait méthanolique vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ; le diamètre moyen des zones d'inhibition formées par celui-ci furent de 14 mm. Aucun effet n'a été observé contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.

Abuhamdah et al. (2013), qui a évalué l'activité antibactérienne d'extraits méthanoliques obtenus à partir de six plantes médicinales de Jordanie, est également arrivé à des conclusions similaires aux nôtres concernant *Dittrichia viscosa* ; en effet, l'extrait brut s'est révélé actif sur *Staphylococcus aureus* et un autre germe du genre *Bacillus*, à savoir *Bacillus subtilis*, formant des zones d'inhibition de 11,16 mm et 14,4 mm respectivement. Il a en revanche été totalement inactif sur *Escherichia coli*.

Il en est de même pour résultats d' **Oskay et Sar (2007)**, dont le travail a porté sur les propriétés antimicrobiennes des extraits éthanolique de 19 plantes médicinales en provenance de Turquie, puisqu'ils ont révélé l'efficacité de l'extrait brut de feuilles de *Dittrichia viscosa* sur *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*, ainsi que son absence totale d'activité vis-à-vis d'*Escherichia coli*.

De même, l'extrait de feuilles et de fleurs a exhibé, pour **Assaf et al (2016)**, un effet antibactérien intéressant contre *Staphylococcus aureus*, avec une CMI de 2,5 mg/ml pour l'extrait de feuilles et de 5 mg/ml pour l'extrait de fleurs. Aucun effet n'a été observé à l'encontre de *Pseudomonas aeruginosa*.

Pour **Karygianni et al (2014)**, l'extrait méthanolique de *Dittrichia viscosa* a affiché une action antibactérienne marquée contre les bactéries gram positif de la flore buccale, à l'image de *Staphylococcus aureus* avec une CMI de 1,25 mg/ml, tandis que les gram négatif se sont révélés moins sensibles voir résistants. Ce fut notamment le cas d'*Escherichia coli*.

Les extraits méthanoliques de feuilles de *Dittrichia viscosa* de **Mrid et al. (2022)**, comme le nôtre, ont affiché une inactivité vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, mais ont par contre exercé un effet inhibiteur modéré sur *Bacillus subtilis* (10.3 mm).

Néanmoins, certaines études ne corroborent que partiellement nos résultats. Nous citerons notamment celles d'**Oskay et al. (2009)** et de **Najefi et al. (2011)** qui, bien qu'elles révèlent une inactivité des extraits éthanolique et méthanoliques sur *Escherichia coli* et leur efficacité sur *Staphylococcus aureus*, rapportent également une action antibactérienne marquée contre

des gram négatif, comme *Pseudomonas aeruginosa*, dont la croissance s'est trouvée fortement inhibée.

Ounaissia et al. (2020) a démontré une inefficacité de l'extrait méthanolique de feuilles de *Dittrichia viscosa* sur *Escherichia coli* et *Bacillus cereus*, ainsi qu'un effet antibactérien marqué contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas spp.* avec des zones d'inhibition allant de 15,3 à 21,2 mm de diamètre.

Talib et Mahasneh (2010) ont mis en évidence que *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (MRSA) étaient inhibées par l'extrait éthanolique des fleurs de *Dittrichia viscosa*, contrairement à *Escherichia coli* qui y a été insensible.

Quant à **Gökbulut et al. (2013)**, il rapporte que les extraits obtenus à partir des différents organes de *Dittrichia viscosa* se sont illustrés par leur efficacité contre les gram positif et les gram négatif, notant néanmoins une activité antibactérienne plus marquée vis-à-vis des gram positif.

De la même façon, les travaux de **Mohti et al. (2019)** et de **Rhimi et al. (2017)** ont révélé l'action antibactérienne de l'extrait éthanolique, pour l'un, et méthanolique pour l'autre, contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

L'inule visqueuse étant caractérisée par sa richesse en polyphénols, et tout particulièrement en flavonoïdes, il est possible que les propriétés antibactériennes dont elle fait preuve soient le fait de ces derniers. En effet, il a été prouvé que les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques capables d'exercer un effet antibactérien. [60, 61]

Comme pour tout composé phytochimique, cette activité semble être multifactorielle, fruit de l'interaction des flavonoïdes avec diverses cibles pharmacologiques du pathogène. [61]

L'un des mécanismes d'action au niveau moléculaires ayant été mis en lumière consiste en la formation de complexes avec les protéines par l'établissement de liaisons non-spécifiques telles les liaisons hydrogène, de liaisons de London (interactions hydrophobes), et de liaisons covalentes avec celles-ci. De ce fait, leurs propriétés antibactériennes pourraient être liées à leur capacité à entraver l'adhésion microbienne, inhiber les enzymes, et bloquer le fonctionnement des protéines de transport membranaires. Certains flavonoïdes pourraient également altérer les membranes microbiennes. [62]

De nombreuses études ont permis d'affirmer l'activité antibiotique de flavonoïdes directement extraits de *Dittrichia viscosa*, à l'image du travail mené par **Talib et al (2012)**. Cette dernière, au cours de laquelle treize composés précédemment isolés et identifiés à partir de *Dittrichia viscosa* ont été testés pour leurs activités antiprolifératives, antimicrobiennes et

d'induction de l'apoptose, a démontré l'activité antibiotique de la quercétine et de ses dérivés ; en effet, il a révélé que la 3,3'-di-*O*-méthylquercétine possédait un effet fortement inhibiteur contre le SARM à 250 µg/ml. D'autre part, la 3-*O*-méthylquercétine et de la 3,3'-di-*O*-méthylquercétine se sont montrées efficaces vis-à-vis de *Salmonella typhimurium* et de *Bacillus cereus*, ayant inhibé leur croissance à 125 µg/ml pour le premier germe, et à 62,5 µg/mL- 125 µg/mL pour le second. A également été notée la résistance d'*Escherichia coli* à tous les flavonoïdes étudiés.

Dans le but d'élucider le mécanisme antibactérien de la quercétine, **Wang et al. (2018)** a étudié son effet à la fois sur les gram-négatif (*Escherichia coli*) et les gram-positif (*Staphylococcus aureus*). Ses répercussions sur la morphologie et l'ultrastructure des bactéries ont été observés au microscope électronique en transmission (TEM) ; d'importantes altérations morphologiques et structurales ont ainsi été notées, à savoir une déstructuration de la paroi cellulaire ainsi qu'une désorganisation de la membrane plasmique. La modification de la perméabilité membranaire résultant est à l'origine d'une fuite du contenu cytoplasmique.

Les travaux de **Yang (2020)** ont par ailleurs confirmé que les altérations de la morphologie bactérienne occasionnées par la quercétine sont responsables d'une perturbation de la synthèse protéique, de la réduction de l'activité enzymatique, et de l'inhibition de la synthèse d'acides nucléiques

La structure des bactéries gram négatives les rend moins sensible à l'action de la quercétine. Si les bactéries gram positives possèdent une paroi épaisse caractérisée par un peptidoglycane abondant, les gram négatives, elles, sont munies d'une paroi bactérienne plus fine, à peptidoglycane réduit et riche en lipides. [64]

Elles présentent aussi un lipopolysaccharide (LPS), qui leur confère une résistance marquée. [66, 67]

De plus, la quercétine et la naringénine inhibent significativement la motilité bactérienne en perturbant le gradient électrochimique/la force motrice du proton. La motilité et la chimiotaxie bactériennes jouent un rôle important dans la virulence, puisqu'elles guident la bactérie vers ses sites d'adhérence et d'invasion. **Mirzoeva et al.** suggèrent que l'action antimotilité des composants de la propolis pourraient jouer un rôle important dans l'inhibition de la pathogénèse bactérienne et le développement d'infections [68].

En plus des bactéries gram positives, *Candida albicans* s'est également révélée sensible à l'action de l'extrait méthanolique de feuilles de *Dittrichia viscosa*, avec des diamètres moyens d'inhibition allant de 11mm à 13mm.

Nos résultats sont comparables à ceux de **Karygianni et al. (2014)** qui, en testant divers extraits de *Dittrichia viscosa* (éthanolique, aqueux, et au DMSO) contre les germes du microbiote oral responsables d'infections chez l'homme, a rapporté leur action inhibitrice sur *Candida albicans*.

Le travail de **Ounaissia et al. (2020)** a par ailleurs mis en évidence l'effet inhibiteur marqué de l'extrait méthanolique des feuilles de *Dittrichia viscosa*, qui a formé des zones d'inhibition de diamètres compris entre 14 et 15 mm. Ces résultats se rapprochent de ceux d'**Oskay et Sari (2007)**, qui a observé, avec un extrait éthanolique de feuilles récoltées en Turquie, des zones d'inhibition dont le diamètre moyen est de 14 mm.

En effet, il a été démontré par **Maoz et Neeman (2000)** que l'extrait de feuilles de *Dittrichia viscosa* possède des propriétés antifongiques dues à sa capacité d'inhibition de la synthèse de chitine chez les dermatophytes ainsi que *Candida albicans*.

Des études se sont récemment penchées sur la possible activité antifongique des flavonoïdes. Bien que peu de travaux aient été menés, il en ressort que, pour la quercétine comme pour plusieurs autres flavonoïdes, les principaux mécanismes d'action mis en place rejoignent ceux dirigés contre les bactéries, à savoir la désorganisation de la membrane plasmique, l'inhibition de la synthèse d'acides nucléiques, de la synthèse protéique, des systèmes d'efflux, ainsi que l'induction de dysfonctionnement mitochondriaux. [70]

Le travail de **Talib et al. (2012)** a révélé que *Candida albicans* était inhibée par la 3-*O*-méthylquercétine ainsi que la 3,3'-di-*O*-méthylquercétine, deux flavonoïdes isolés à partir de *Dittrichia viscosa*, à une CMI de 250 µg/ml.

Bien que l'extrait méthanolique des feuilles de *Dittrichia viscosa* présente une activité antioxydante, il s'est révélé beaucoup moins marqué que l'acide ascorbique. Nos résultats se trouvent donc être en contradiction avec plusieurs études, qui ont rapporté la puissante capacité antiradicalaire des extraits de *Dittrichia viscosa* vis-à-vis du DPPH ;

Les résultats de **Chahmi et al (2015)** révèlent que les extraits éthanoliques obtenus à partir des parties aériennes de *Dittrichia viscosa* récoltées dans différentes régions du Maroc au moins de Juillet 2012 présentent un potentiel antioxydant marqué, mais variant en fonction de l'origine géographique de la plante. En effet, l'extrait ayant montré l'activité inhibitrice la plus marquée est celui de Taounate, avec un IC₅₀ d'une valeur de 0.18 g/L (ou 180 µg/mL) ; cette dernière se rapproche en effet de la capacité d'inhibition des contrôles positifs, soit le BHT (IC₅₀=0.15 g/L) et l'acide ascorbique (IC₅₀=0.12 g/L). Il est suivi par l'extrait de Sefrou (IC₅₀=0.20 g/L), et celui d'Imouzzer (IC₅₀=0.27 g/L).

Selon **Ben Mrid et al. (2022)**, les extraits obtenus à partir des feuilles de *Dittrichia viscosa* sont tous deux caractérisés par un potentiel antioxydant important indépendamment de la nature du solvant d'extraction. En effet, les IC50 respectifs des extraits méthanolique et aqueux sont de 80 µg/mL et de 120 µg/mL.

L'extrait éthanolique de *Dittrichia viscosa* récoltée en Mai 2016 au Maroc a affiché, pour **Ennacerie et al (2019)**, une activité antioxydante largement supérieure à celle de l'acide ascorbique, utilisé comme contrôle avec un IC50 de 0,09 mg/ml contre 3,55 mg/ml.

Ozkan et al. (2019) a obtenu des résultats similaires, avec une IC50 de 20.4 µg/ml avec l'extrait méthanolique de *Dittrichia viscosa* récoltée en Turquie au mois d'Août 2015. L'effet antioxydant antiradicalaire de l'extrait s'est par ailleurs révélée dose-dépendante, puisque l'augmentation de la concentration de l'extrait (de 5 à 60 µg/ml) a eu pour résultat une augmentation croissante du pourcentage d'inhibition du DPPH.

Mahmoudi et al. (2015), qui a évalué la capacité antioxydante de feuilles de *Dittrichia viscosa* récoltées au mois de Mai 2014 en Tunisie en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction, a rapporté un IC50 de 23.33 µg/ml.

Les résultats du screening phytochimique, qui a établi la présence de polyphénols dans la poudre de feuilles de *Dittrichia viscosa*, pourraient expliquer les propriétés antioxydantes antiradicalaires des extraits obtenus à partir de ces dernières.

En effet, plusieurs études lient le potentiel antioxydant de cette plante à sa composition en acides phénoliques [47, 48, 73] ; de par leur structure chimique idéale, ils constituent des donateurs d'hydrogène efficaces, ce qui leur permet d'assurer l'épuration des radicaux libres et leur conversion en composés plus stables. [73]

Des dérivés de l'acide caffeoylquinique, à l'image des acides chlorogénique et di-O-caffeoylquiniques, ont été extraits et isolés à partir d'échantillons de *Dittrichia viscosa*, puis identifiés comme faisant preuve d'une activité antioxydante marquée [47]

Ohnishi et al. (1994), qui a étudié l'influence des acides 5-caffeoylquinique et 3,5-dicaffeoylquinique sur la peroxydation lipidique induite par un anion superoxyde, a déterminé qu'ils inhibaient la formation de diènes conjugués au cours de la phase initiale de la peroxydation de l'acide linoléique.

L'acide cafféique, chlorogénique, et 3,5-dicaffeoylquinique ont également révélé une activité inhibitrice vis-à-vis de l'hémolyse et de la peroxydation lipidique d'érythrocytes de souris induite par traitement au H₂O₂. Il a été suggéré que ces composés stabiliseraient la membrane cellulaire en épurant les radicaux peroxydes.

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont physiologiquement produites de façon continue, et peuvent facilement initier une peroxydation des membranes lipidiques, conduisant à l'accumulation de peroxydes lipidiques au sein de la cellule. Néanmoins, ils sont épurés par des mécanismes de défense antioxydants. Il existe donc, au sein des organismes vivants, un équilibre entre la génération et l'inactivation des ROS par les systèmes antioxydants. Dans des conditions pathologiques, ils sont produits en excès, provoquant un stress oxydatif à l'origine d'une exacerbation de la dégradation cellulaire et le processus de vieillissement [50]

Certains stress environnementaux, à l'image de la surexposition, des basses températures, du stress hydrique, de la salinité, et de la pauvreté du sol en nutriments, peuvent réduire l'activité des enzymes de détoxification des ROS chloroplastiques de façon significative. La conséquence en est que les plantes intensifient la biosynthèse des métabolites secondaires à activité anti-radicalaires, qui vont non seulement absorber aux longueurs d'ondes solaires les plus énergétiques (UV-B et UV-A), mais vont également épurer les ions métalliques libres, les superoxydes, les peroxydes, et les peroxy-nitrites radicalaires, évitant ainsi la peroxydation lipidique et la dégradation oxydative d'autres biomolécules. [61]

On peut en déduire que la saison de récolte, l'origine géographique, et les conditions climatiques de la plante influent significativement sur sa teneur en biomolécules antiradicalaires.

Notre récolte ayant eu lieu au mois de Novembre, ceci pourrait expliquer la discordance entre nos résultats, qui ont mis en évidence des propriétés antioxydantes modérées, et ceux obtenus par les études antérieures, dont le matériel végétal a été récolté en été dans la plupart des cas.

5. Conclusion

Au terme de cette étude, il est apparu de la caractérisation qualitative la présence de mucilages, de tannins, de polyphénols, et de flavonoïdes dans les feuilles de *Dittrichia viscosa*. Quant à l'extrait méthanolique, obtenu par extraction assistée par ultrasons à partir des feuilles séchées, il a révélé d'un effet bactériostatique marqué vis-à-vis de deux bactéries gram positif, à savoir *Bacillus cereus* (17,83mm ± 0,24 ; CMI = 0,781 mg/ml) et *Staphylococcus aureus* (16,5mm ± 0,4 ; CMI = 6,25 mg/ml), et modérément antifongique contre *Candida albicans* (13 mm ± 1,08 ; CMI = 50 mg/ml). Cette action antimicrobienne est dose-dépendante. L'extrait a également montré une activité antioxydante modérée, avec une IC50 de 1,55 mg/ml.

Aux vues des résultats obtenus, il serait intéressant d'étendre les essais à des souches microbiennes résistantes, en considérant des concentrations plus élevées.

Une caractérisation des flavonoïdes par HPLC-SM ne serait par ailleurs que bénéfique pour comprendre l'origine de la bioactivité de l'extrait. Eventuellement, une extraction et une purification des composés identifiés à utiliser séparément et en synergie.

Une observation au microscope électronique en transmission des bactéries traitées pourrait permettre de révéler les cibles pharmacologiques de ces phytocomposés, et d'élucider ainsi leurs modes d'action.

Eventuellement, la formulation d'une lotion antiseptique, faisant écho à son utilisation traditionnelle, pourrait être envisageable.

Références

- (1) **Song M, Liu Y, Li T, Liu X, Hao Z, Ding S et al.** Plant Natural Flavonoids Against Multidrug Resistant Pathogens. *Advanced Science*, 2021. 8, n° 15: 2100749.
- (2) **Berendonk TU, Manaia CM, Merlin C, Fatta-Kassinos D, Cytryn E, Walsh F, et al.** Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 310–317. doi:10.1038/nrmicro3439
- (3) **Grauso L, Cesarano G, Zotti M, Ranesi M, Sun W, Bonanomi G, et al.** Exploring *Dittrichia Viscosa* (L.) Greuter Phytochemical Diversity to Explain Its Antimicrobial, Nematicidal and Insecticidal Activity. *Phytochemistry Reviews*, 2020. 19, n° 3: 659-89
- (4) **Gaussen H, Deuroy JF, Ozenda P.** Précis de Botanique : Les Végétaux Supérieurs. Ed Masson, 1982 ; pp 215-408.
- (5) **Aït Youcef M,** Plantes Médicinales de Kabylie, Ibis Press, Paris, 2006, 349 p.
- (6) **Bellakhdar J.** La pharmacopée marocaine traditionnelle-Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Editions Ibis Press, Paris, 1997, 208p.
- (7) **Quezel F, Santa S.** Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques et Méridionales, Ed. CNRS, Paris France, 1963, Tome 2 :218-940.
- (8) **Bruneton J.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 4ème ed. Lavoisier, 2009.
- (9) **Longanga OA, Vercruyse A, Foriers A.** Contribution to the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment of dysentery and diarrhoea in Lomela area, Democratic Republic of Congo (DRC). *Journal of Ethnopharmacology*, 71(3), 411–423. doi:10.1016/s0378-8741(00)00167-7
- (10) **Bekro YA, Mamyrbekova J, Boua B, Tra Bi F, Ehile E.** Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Sciences & Nature*, 2008. 4(2). doi:10.4314/scinat.v4i2.42146
- (11) **N'Guessan K, Kadja B, Zirihi G, Traoré D, & Aké-Assi L.** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Kroubo (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 2009. 6(1). doi:10.4314/scinat.v6i1.48575
- (12) **Zafilaza A, Andriantsimahavandy A, Ramamonjisoa DJ, et Andrianainarivelo M.** *Zanthoxylum Tsihanimposa*: Used to Cure Measles in Madagascar and Analyzes of Phytochemicals, Antimicrobial Activities and Molecules in Leaves and Bark. *International Journal of Plant Research* 9, 2019. n° 2: 23-32.

- (13) **Visht S, Chaturvedi S.** Isolation of natural products. *Curr Pharma Res*, 2012. 2:584–599.
- (14) **Ben Sassi A, Harzallah-Skhiri F, Mahjoub A.** Investigation of Some Medicinal Plants from Tunisia for Antimicrobial Activities. *Pharmaceutical Biology*, 2007. 45, n° 5 : 421-28. doi : 10.1080/13880200701215406.
- (15) **Shirsath SR, Sonawane SH, Gogate PR,** Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 2012. Volume 53, Pages 10-23.
- (16) **Xiaonan Zhang, Lubin Zhang, Yingdi Zhang, Tingting Xiong, Yaqian Niu, Yan Huang,** Extracting myricetin and dihydromyricetin simultaneously from *Hovenia acerba* seed by Ultrasound-Assisted extraction on a lab and small Pilot-Scale, *Ultrasonics Sonochemistry*, 2023. Volume 93, 106304.
- (17) **Yang Hu, Tao Wang, Mingxiao Wang, Sufang Han, Pingyu Wan, Maohong Fan,** Extraction of isoflavonoids from *Pueraria* by combining ultrasound with microwave vacuum, *Chemical Engineering and Processing : Process Intensification*, 2008. Volume 47, Numéro 12, p2256-2261.
- (18) **Kubra D, Kubra Akman P, et Tornuk F.** Improvement of Bioavailability of Sage and Mint by Ultrasonic Extraction 2 (2019): 122-35. doi:10.38001/ijlsb.582148.
- (19) **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 2008. 331(5), 372–379. doi:10.1016/j.crv.2008.02.008
- (20) **Bauer A, Kirby WMM, Sherris JC, & Turch M.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, *American Journal of Clinical Pathology*, 1966. 45, 493–496.
- (21) **Bolou GEK, Attioua B, N'Guessan AC, coulibaly A, N'Guessan JD, & Djaman AJ,** Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*, *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 2011. Vol. 80, p. 772 – 790
- (22) **Celiktas OY, Kocabas EEH, Bedir E, Sukan FV, Ozek T, & Baser KHC.** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 2007. 100(2), 553–559. doi:10.1016/j.foodchem.2005.10.01

- (23) **Ponce AG, Fritz R, Del Valle C, Roura SI**, Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 2003. 36, 679–684
- (24) **Thabaut A & Durosoir JL**. L'Antibiogramme : Méthodes classiques et Méthodes automatisées, *Médecine et Maladies Infectieuses*, 1979. N°9, 490-495.
- (25) **Dzomba P, Muchanyereyi N**. Potential Antimicrobial Plant Extract Based Therapeutics from *Temnocalyx obovatus* Roots, *European Journal of Medicinal Plants*, 2012. Volume 2, Issue 3, p209-215
- (26) **Bonou J, Baba-Moussa F, Noumavo ADP, Ahouandjinou H, Kifouli A, Métognon I, Koffi A, et al.** « Composition Chimique Et Influence De Différents Tweens Sur Le Pouvoir Antimicrobien Des Huiles Essentielles De *Ocimum gratissimum*, *Ocimum basilicum*, *Laurus nobilis* Et *Melaleuca quinquenervia* ». *European Scientific Journal*, 2016. 12 : 162-76.
- (27) **Razafintsalama V, Sarter S, Randrianarivo R, Rakoto D, Petit T, et Jeannoda V.** « Valorisation d'une plante médicinale malgache, *Dilobeia thouarsii*, pour la sécurité des aliments ». Journées scientifiques qualiREG. 3ème édition. QualiREG. QualiREG Food Symposium. Qualité des produits alimentaires en océan Indien. s.n., 2013.
- (28) **Brand-Williams W, Cuvelier ME & Berset C**. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, *Lebensm. -Wiss. u. -Technol.*, Food, Science, and Technology, 1995. 28 (1), 25-30.
- (29) **Baliyan S, Mukherjee R, Priyadarshini A, Vibhuti A, Gupta A, Pandey RP, et Chang CM**. Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules*, 2022. 27, n° 4 : 1326.
- (30) **Miguel MG**. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. *Flavor and fragrance journal*. 2009. 25(5). 291-312.
- (31) **Bougandoura N, Bendimerad N**. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta* (L.) Briq., *Nature & Technologie*, B- Sciences Agronomiques et Biologiques, 2012. n° 09, pages 14 à 19.
- (32) **Ladoh Yemeda CF, Dibong SD, Nyegue MA, Djembissi Talla RP, Lenta Ndjakou B, Mpondo Mpondo E et al.** Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*, *Journal of Applied Biosciences*, 2014. 84:7636– 7643.

- (33) **Chahmi N, Anissi J, Jennan S, Farah A, Sendide K, El Hassouni M.** Antioxidant activities and total phenol content of *Inula viscosa* extracts selected from three regions of Morocco, *The Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2015. 5(3): 228-233
- (34) **Ghedadba N., Hambaba L, Ayachi A et al.** Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*, 2015. 13, 118–129.
- (35) **Side Larbi K, Meddah B, Tir Touil Meddah A, et Sonnet P.** The antibacterial effect of two medicinal plants *Inula viscosa*, *Anacyclus valentinus* (Asteraceae) and their synergistic interaction with antibiotic drugs. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 2016. 8, n° 2 (10 mai 2016): 244
- (36) **Mohti H, Taviano MF, Cacciola F, Dugo P, Mondello L, Marino A, et al.** *Inula viscosa* (L.) Aiton Leaves and Flower Buds: Effect of Extraction Solvent/Technique on Their Antioxidant Ability, Antimicrobial Properties and Phenolic Profile. *Natural Product Research*, 2020. 34, n° 1 (janvier 2020): 46-52
- (37) **Ben Mrid R, Bouchmaa N, Kabach I, Zouaoui Z, Chtibi H, El Maadoudi M, et al.** *Dittrichia viscosa* L. Leaves: A Valuable Source of Bioactive Compounds with Multiple Pharmacological Effects. *Molecules*, 2022. 27, n° 7 : 2108.
- (38) **Gökbulut A, Ozhan O, Satilmis B, Batçioğlu K, Günal S, Şarer E.** Antioxidant and antimicrobial activities, and phenolic compounds of selected *Inula* species from Turkey. *Nat Prod Commun*, 2013. 8:475–478.
- (39) **Karygianni L, Cecere M, Skaltsounis AL, Argyropoulou A, Hellwig E, Aligiannis N, et al.** High-Level Antimicrobial Efficacy of Representative Mediterranean Natural Plant Extracts against Oral Microorganisms ». *BioMed Research International* 2014 (2014): 839019. doi : 10.1155/2014/839019.
- (40) **Ounaissia K, Nassar A, Soltani B, Bennadja S, et Djahoudi A.** Anti-bacterial activity of methanolic extracts of *Inula viscosa* L., from Guelma (Algeria). *AJMAP*, 2020. Volume 6, n°3.
- (41) **Poirot R,** Méthodologie pour le Passage en Continu d'Extraction de Soluté à Partir de Matière Végétale, Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 2007, 133 p.
- (42) **Calatayud PA, Desneux N, Le Gall P,** Caractéristiques chimiques des plantes in : *Interactions Insectes-Plantes*, Calatayud PA, Marion-Poll F, Sauvion N and Thiéry D, IRD Éditions, Éditions Quae, 2013, pages 224-226.

- (43) **Li Y, Kong D, Fu Y, Sussman MR, & Wu H.** The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2020. doi:10.1016/j.plaphy.2020.01.006
- (44) **Verma N et Shukla S.** Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2015. 2(4), 105–113. doi:10.1016/j.jarmap.2015.09.002
- (45) **Abu Zarga MH, Hamed EM, Sabri SS, Voelter W, & Zeller KP.** New Sesquiterpenoids from the Jordanian Medicinal Plant *Inula viscosa*. *Journal of Natural Products*, 1998. 61(6), 798–800.
- (46) **Hernández V, Recio MC, Máñez S, Giner RM, et Ríos JL.** Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. *Life Sciences*, 2007. 81(6), 480–488. doi:10.1016/j.lfs.2007.06.006
- (47) **Kheyar-Kraouche N, Da Silva AB, Serra AT, Bedjou F, et Bronze MR.** Characterization by liquid chromatography–mass spectrometry and antioxidant activity of an ethanolic extract of *Inula viscosa* leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018. 156, 297–306.
- (48) **Catello P, Manganiello G, Vitti A, Celano R, Piccinelli AL, et De Falco E.** Phytochemical Extracts of *Dittrichia Viscosa* (L.) Greuter from Agroecological Systems: Seed Antigerminative Properties and Effectiveness in Counteracting *Alternaria* Leaf Spot Disease on Baby-Leaf Spinach. *Biology*, 2023. 12, n° 6 : 790.
- (49) **Grande M, Piera F, Cuenca A, Torres P, & Bellido I.** Flavonoids from *Inula viscosa*. *Planta Medica*, 1985. 51(05), 414–419. doi:10.1055/s-2007-969536
- (50) **Danino O, Gottlieb HE, Grossman S, & Bergman M.** Antioxidant activity of 1,3-dicaffeoylquinic acid isolated from *Inula viscosa*. *Food Research International*, 2009. 42(9), 1273–1280. doi:10.1016/j.foodres.2009.03.023
- (51) **Khalil EA, Afifi FU, et Al-Hussaini M.** Evaluation of the wound healing effect of some Jordanian traditional medicinal plants formulated in Pluronic F127 using mice (*Mus musculus*). *Journal of Ethnopharmacology*, 2007. 109(1), 104–112.
- (52) **Abuhamdah S, Abuhamdah R, Al-Olimat S, et Chazot P,** « Phytochemical Investigations and Antibacterial Activity of Selected Medicinal Plants from Jordan ». *European Journal of Medicinal Plants*, 2013, 394-404.
- (53) **Ozkan E, Pehlivan Karakas F, Arzu Birinci, Birinci Yildirim, Isa Tas, Ismail Eker, Muhsine Zeynep Yavuz, et Arzu Ucar Turker.** Promising Medicinal Plant *Inula*

- Viscosa L.: Antiproliferative, Antioxidant, Antibacterial and Phenolic Profiles. *Progress in Nutrition*, 2019. 21, n° 3 : 652-61. doi : 10.23751/pn.v21i3.7186
- (54) **Oskay M, et Sarı D.** Antimicrobial Screening of Some Turkish Medicinal Plants. *Pharmaceutical Biology*, 2007. 45, n° 3 : 176-81.
- (55) **Assaf, Areej M., Bassam I. Amro, Sundus Mashallah, et Randa N. Haddadin.** Antimicrobial and Anti-Inflammatory Potential Therapy for Opportunistic Microorganisms, 2016. 10, n° 5 : 494-505.
- (56) **Oskay M, Oskay D, et Kalyoncu F.** Activity of Some Plant Extracts Against Multi-Drug Resistant Human Pathogens. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2009. 8, n° 4 : 293-300.
- (57) **Najefi RB, Asghari G, & Abbas A.** Antimicrobial Activities of Phenolic and Non-phenolic Fractions of *Inula viscosa* (L) Extract. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 2011. 1(5-6), 325–331. doi:10.1080/22311866.2011.10719100
- (58) **Talib WH, Mahasneh AM.** Antimicrobial, cytotoxicity and phytochemical screening of Jordanian plants used in traditional medicine. *Molecules*. 2010. 15: 1811–1824.
- (59) **Rhimi W, Ben Salem I, Immediato D, Saidi M, Boulila A, et Cafarchia C,** Chemical Composition, Antibacterial and Antifungal Activities of Crude *Dittrichia Viscosa* (L.) Greuter Leaf Extracts. *Molecules* 22, 2017. n° 7 : 942. doi : 10.3390/molecules22070942.
- (60) **Nur Farisya Shamsudin, Qamar Uddin Ahmed, Syed Mahmood, Syed Adnan Ali Shah, Alfi Khatib, Sayeed Mukhtar, Meshari A. Alsharif, Humaira Parveen, and Zainul Amiruddin Zakaria,** Antibacterial Effects of Flavonoids and Their Structure-Activity Relationship Study: A Comparative Interpretation, *Molecules*, 2022, 27(4), 1149;
- (61) **González A, Casado J, et Lanas A.** Fighting the Antibiotic Crisis: Flavonoids as Promising Antibacterial Drugs Against *Helicobacter pylori* Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021.
- (62) **Bouabedelli F, Missoun F, Benhamimed E, Djebli N.** Phytochemical and antimicrobial study of the seeds and leaves of *Peganum harmala* L. against urinary tract infection pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2016. 6(10), 822–826. doi:10.1016/S2222-1808(16)61139-8
- (63) **Talib WH, Abu Zarga MH, et Mahasneh AM.** Antiproliferative, Antimicrobial and Apoptosis Inducing Effects of Compounds Isolated from *Inula Viscosa*. *Molecules*, 2012. 17, n° 3 : 3291-3303. doi : 10.3390/molecules17033291.

- (64) Wang, Shengan, Jiaying Yao, Bo Zhou, Jiaxin Yang, Maria T. Chaudry, Mi Wang, Fenglin Xiao, Yao Li, et Wenzhe Yin. Bacteriostatic Effect of Quercetin as an Antibiotic Alternative In Vivo and Its Antibacterial Mechanism In Vitro. *Journal of Food Protection*, 2018. 81, n° 1 : 68-78. doi : 10.4315/0362-028X.JFP-17-214.
- (65) Yang, Dengyu, Tiancheng Wang, Miao Long, et Peng Li. « Quercetin: Its Main Pharmacological Activity and Potential Application in Clinical Medicine ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020 (31 décembre 2020): e8825387.
- (66) Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2010, 2, 1–16.
- (67) Nguyen, Thi Lan Anh, et Debanjana Bhattacharya. « Antimicrobial Activity of Quercetin: An Approach to Its Mechanistic Principle ». *Molecules* 27, n° 8 (janvier 2022): 2494.
- (68) Cushnie TPT, Lamb AJ, (2005). *Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343–356. doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002
- (69) Maoz M, Neeman I., Effect of *Inula viscosa* extract on chitin synthesis in dermatophytes and *Candida albicans*, *Journal of Ethnopharmacology*,. 2000 Aug;71(3):479-82, doi: 10.1016/s0378-8741(00)00187-2.
- (70) Aboody & Mickymaray. (2020). *Anti-Fungal Efficacy and Mechanisms of Flavonoids. Antibiotics*, 9(2), 45. doi:10.3390/antibiotics9020045
- (71) Ennacerie FZ, Rhazi Filali F, Moukrad N, et Bouymajane A, « Polyphenols, Antioxidant Activity and Mode of Action of Antimicrobial Compounds of *Dittrichia Viscosa* Extracts ». *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 5, n° 3 (2 décembre 2019): 90-106. doi : 10.48347/IMIST.PRSM/ajmap-v5i3.18669.
- (72) Mahmoudi H, Hosni K, Zaouali W, Amri I, Zargouni H, Hamida NB, ... Ouerghi Z, (2015). *Comprehensive Phytochemical Analysis, Antioxidant and Antifungal Activities of Inula viscosa Aiton Leaves. Journal of Food Safety*, 36(1), 77–88. doi:10.1111/jfs.12215
- (73) Zeouk I, Sifaoui I, Ben Jalloul A, Bekhti K, Bazzocchi IL, Piñero JE, Jiménez IA, et Jacob Lorenzo-Morales. « Isolation, Identification, and Activity Evaluation of Antioxidant Components from *Inula Viscosa*: A Bioguided Approach ». *Bioorganic Chemistry* 119 (février 2022): 105551. doi : 10.1016/j.bioorg.2021.105551
- (74) Ohnishi, M., Morishita, H., Iwahashi, H., Toda, S., Shirataki, Y., Kimura, M., & Kido, R. (1994). *Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. Phytochemistry*, 36(3), 579–583. doi:10.1016/s0031-9422(00)89778-2