

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE
ET BIOCHIMIE



DOMAINE:SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
FILIERE:SCIENCES BIOLOGIQUES
OPTION: MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

Mémoire présente pour l'obtention
du diplôme de master académique

Par
LAKEHAL NADJETTE

Intitulé

Polyphénols totaux et activité antibactérienne des
extraits de la plante médicinale *Ammi visnaga* L.

DEVANT LE JURY

Dr. Abderrahim BENSLAMA	Université de M'sila	Encadreur
Dr. Laerbi Zakaria NABTI	Université de M'sila	Examineur
Dr. Abd El Nacer HARRAR	Université de M'sila	Examineur

Année universitaire : 2020 /2021

Dédicace

*Je dédie ce travail à mes chers **Parents** qu'ils trouvent ici toute ma
gratitude*

Pour leur soutien tout le long de mes études

*A mes **Sœur** et mes **Frères***

*À mes **Amis***

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour.

NADJETTE

Remerciement

Je voudrais saisir cette occasion pour exprimer ma sincérité, mes remerciements et ma gratitude à Dieu Tout-Puissant pour m'avoir donné la force, la santé et la patience pour faire cet humble travail.

*Le directeur de mes recherches, le **DR ADERRAHIM BEN SLAMA** Docteur à la faculté des Sciences de La Nature et de la Vie à l'université de M'sila, d'avoir accepté de diriger avec beaucoup d'attention ce travail. Je lui suis très reconnaissante pour la bienveillance, l'aide et les précieux conseils. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma plus profonde seulement pour sa présence a pris soin de moi, mais surtout pour me donner aussi de précieux conseils, il m'a guidé tout au long de la préparation du mémoire.*

*Je remercie également **Mr .HARRAR ABD EL NACER** Docteur à la faculté des Sciences de La Nature et de la Vie à l'université de M'sila d'avoir accepté de de juger ce modeste travail et participer au jury.*

*Je remercie **Mr .NABTI LAERBIE ZAKARIA** Docteur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université de M'sila d'avoir accepté de juger ce modeste travail et participer au jury.*

Je remercie autre fois le jury d'avoir accepté de revoir mes travaux. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance et mes remerciements à tous les professeurs de la filière biologie sans exception pour les cinq années de formation.

J'exprime mes sincères remerciements à toute l'équipe du laboratoire de microbiologie et biochimie pour leur aide précieuse lors de nos travaux,

Sommaire

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01

Chapitre 01 : Synthèse bibliographique

1. Les plantes médicinales	02
1.1. Définition	02
1.2. Utilisation des plantes médicinales	02
2. Les polyphénols.....	02
2.1. Définition.....	02
2.2. Classification.....	03
2.3. Effets biologiques de polyphénols	03
3. Les flavonoïdes.....	04
3.1. Généralités.....	04
3.2. Classification	04
3.3. Méthodes d'extraction des polyphénols	05
3.3.1. Extraction méthanolique par macération.....	05
3.3.2. Extraction par décoction.....	05
4. Activité antibactérienne.....	05
4.1. Les infections bactériennes.....	05
4.2. Rappel sur les bactéries.....	06
4.2.1. Exemple de classification des bactéries.....	06
4.2.1.1. Bactéries en forme de sphère : les cocci.....	06
4.2.1.2. Bactéries en forme de bâtonnet : les bacille.....	08
4.2.1.3. Bactéries en forme de spirale : les spirochètes.....	07

5. Les Antibiotiques.....	07
5.1. Résistance des antibiotiques.....	07
6. Présentation de la plante.....	09
6.1. Description botanique.....	09
6.2. Position taxonomique de la plante.....	10
6.3. Répartition Géographique	10
6.4. Etude phytochimique	10

Chapitre 02 : Matériels et méthodes

1. Matériel.....	12
1.1 Matériel végétal	12
1.2 Appareillages.....	12
1.3 Réactifs	12
2. Méthodes.....	13
2.1. Extraction méthanoliques par macération.....	13
2.2. Extraction aqueux par décoction.....	13
3. Dosage des composés phénoliques.....	14
3.1 Dosage des polyphénols.....	14
3.2 Dosage des flavonoides.....	15
4. Activité antibactérienne.....	16
4.1 Les souches bactériennes utilisés.....	16
4.2 vérification de la pureté des bactéries et identification des souches.....	16
4.3 Milieux de cultures utilisés.....	16
4.4 Méthode de diffusion en milieux gélose	16
4.4.1 Préparation de l'inoculum bactérien.....	16
4.4.2 Ensemencement.....	17
4.4.3 Incubation.....	17
5. Analyse statiques.....	17

Chapitre 03 : Résultats et discussion

1. Rendement de la plante.....	18
2. Dosage des composés phénoliques de la plante.....	19

3. Activités antibactériennes.....	20
Conclusion.....	22
Références bibliographiques.....	23
Annexes	27

Résumé

Ammi visnaga L. est une plante médicinale appartenir à la famille des *Apiaceae*, largement utilisée en médecine traditionnelle, est une plante vivace, très fréquente dans le bassin méditerranéen. En Algérie *Ammi visnaga* est une plante annuelle ou bisannuelle, qui pousse généralement au printemps. Le but de ce travail est de déterminer la teneur des extraits méthanolique (EM), aqueux (EA) en composés phénoliques, ainsi que d'évaluer leur activité antibactérienne. Les rendements d'extraction : (extraction méthanolique par macération étaient de 9.2% , tandis que extraction aqueuse par décoction étaient de 7.2%). Le taux en polyphénols et flavonoïdes totaux a révélé une forte concentration dans l'extraits méthanoliques par rapport l'extraits aqueux avec un taux de de 243.57 (μg EAG/mg E) et 77.15 (μg EQ/mg E). L'activité antibactérienne a été évaluée, pour 05 souches bactériennes *salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Pseudomonas aeruginosa*; *staphylococcus* par la méthode (disques de diffusion). Ces résultats montrent que les extraits d'*Ammi visnaga* ne possèdent pas des propriétés antibactérienne.

Mots clés : *Ammi visnaga*, *Apiaceae*, Polyphénols, flavonoïdes , activité antibactérienne.

Abstract

Ammi visnaga L. is a medicinal plant belonging to the *Apiaceae* family, widely used in traditional medicine. It is a perennial plant, very common in the Mediterranean basin. In Algeria *Ammi visnaga* is an annual or biennial plant, which usually grows in spring. The aim of this work is to determine the content of methanolic (EM), aqueous (EA) extracts in phenolic compounds from this plant, as well as to evaluate their antibacterial activity. The extraction yields: (methanolic extraction by maceration was 9.2%, while aqueous extraction by decoction was 7.2%) (%). The level of total polyphenols and flavonoids revealed a high concentration in methanolic extracts compared to aqueous extracts with a level of 243.57 (μg EAG / mg E) and 77.15 (μg EQ / mg E). antibacterial activity was evaluated for 05 bacterial strains of salmonella, Escherichia coli, Bacillus, Pseudomonas aeruginosa; staphylococcus by the method (diffusion discs). These results show that *Ammi visnaga* extracts do not have antibacterial properties.

Keywords: *Ammi visnaga*, *Apiaceae*, Polyphenols, flavonoids, antibacterial activity.

المخلص

Ammi visnaga L. هو نبات طبي ينتمي إلى عائلة *Apiaceae* ويستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي، هو نبات معمر منتشر جدًا في حوض البحر الأبيض المتوسط. في الجزائر، *Ammi visnaga* أو النوخة هو نبات ينمو عادة في الربيع كل سنة أو سنتين. الهدف من هذا العمل هو تحديد محتوى الميثانول (EM)، والمستخلصات المائية (EA) في المركبات الفينولية من هذا النبات، وكذلك لتقييم نشاطها المضاد للبكتيريا. حصيللة الاستخلاص: (الاستخلاص الميثانولي بالنقع كان 9.2% بينما الاستخلاص المائي المغلي كان 7.2%). أظهر مستوى البوليفينول الكلي والفلافونويد تركيزًا عاليًا في المستخلصات الميثانولية مقارنة بالمستخلصات المائية بمستوى 243.57 (ميكروغرام EAG / مجم E) و 77.15 (ميكروغرام EQ / مجم E). تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لـ 05 سلالات بكتيرية من السالمونيلا، الإشريكية القولونية، العصوية، الزائفة الزنجارية، المكورات العنقودية عن طريق الطريقة (أقراص الانتشار). تظهر هذه النتائج أن مستخلصات *Ammi visnaga* لا تحتوي على خصائص مضادة للبكتيريا.

كلمات مفتاحية : *Ammi visnaga*، الفصيلة الخيمية، مستخلص ميثانولي، مستخلص مائي، نشاط مضاد للبكتيريا.

Liste des abréviations

ATB	Antibiotique
ATCC	American Type Culture Collection
DMSO	Le diméthylsulfoxyde
EA	Extrait aqueux
EM	Extrait Méthanolique
MHA	Mueller-Hinton Agar
PDA	Potato Dextrose Agar
PPT	Polyphénols totaux
BAAR	Bacilles acido-alcool résistants
NCLLS	National committee for clinical laboratory standards

Liste des figures

Figure 01: Structure de base des flavonoïdes	4
Figure 02: Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	8
Figure 03: Description botaniques d' <i>Ammi visnaga</i> La fleur(A) et les grains(B).....	9
Figure 04: <i>Ammi visnaga</i> au durée de la floraison (a) ; après le séchage (b)	12
Figure 05: Les différents étapes d'extraction par macération et par décoction.....	14
Figure 06: Rendement (%) des échantillons d' <i>Ammi visnaga</i> en extraits méthanolique et aqueux après l'extraction	18
Figure 07: Cinétique de pouvoir réductrice de l'extrait méthanolique d' <i>Ammi visnaga</i>	20
Figure 08: Cinétique de pouvoir réductrice de l'extrait aqueux d' <i>Ammi visnaga</i>	20

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification des composés phénoliques	3
Tableau 2: Compositions chimiques d' <i>Ammi visnaga</i>	11
Tableau 3: Taux de polyphénols et flavonoïdes totaux dans extraits méthanoliques et aqueux d' <i>Ammi visnaga</i>	19

INTRODUCTION

Introduction

Le discipline d'ethnobotanique étudie les relations entre l'homme et les plantes au fur et à mesure qu'il traite ces échantillons à travers une méthodologie appliquée à l'Institut international d'histoire naturelle de France. La recherche en ethnobotanique est une double compétence pour connaître les règles de la botanique pour toutes les espèces végétales utilisées par les populations et mener une enquête (Brousse, 2014).

La plupart des types des plantes sont utilisées en phytothérapie classique pour leur apporter plusieurs avantages, notamment des médicaments car elles contiennent des substances qui peuvent agir à plusieurs niveaux (Iserin, 2001). Les plantes médicinales sont donc importantes pour la recherche pharmaceutique et L'élaboration des médicaments, directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme Matière première pour la synthèse des médicaments ou comme modèle pour les composés Pharmaceutiquement actifs (Decaux, 2002).

L'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques est un problème Mondial sérieux qui a orienté la recherche pour l'identification des nouvelles biomolécules avec une large activité antibactérienne. Les plantes et leurs dérivés, tels que les extraits méthanoliques et aqueux, sont utilisés dans la médecine Populaire. Les antibiotiques ont constitué une découverte thérapeutique importante pour la santé humaine. Leur utilisation a permis de diminuer le taux de mortalité et de morbidité mondiale depuis longtemps. Cependant, le mauvais usage des agents antimicrobiens et leur utilisation accrue ont eu pourconséquence de faire apparaître certaines formes de résistances des souches microbiennes contrebalançant les effets des antibiotiques (Goossens, 2005).

L'objectif de ce travail est d'estimer la teneur des extraits méthanoliques et aqueux, en polyphénols dans les parties aériennes de la plante médicinale *Ammi visnaga* . et d'en évaluer leur pouvoirs antimicrobien. Cette plante est une plante annuelle qui croit spontanément en Afrique du nord et au Proche-Orient mais également dans le bassin méditerranéen, dans la moitié sud de la France et utilisée par la population locale. Ce travail est constitué d'une partie théorique présentant en bref les activités biologiques et une description de la plante étudiée, une partie expérimentale relative aux différentes méthodes et techniques utilisées pour évaluer activité antibactérienne. Enfin une conclusion générale.

CHAPITRE 01
SYNTHESE BOBLIOGRAPHIQUE

1. Les plantes médicinales

1.1 Définition.

Les plantes médicinales sont utilisées dans le domaine de la préparation pharmaceutique, vétérinaire, cosmétique et des boissons, qu'elles soient ordinaires ou en préparation de galénique, ou encore sous forme de substance active comme matières pour l'obtention de médicaments, qui sont toutes des plantes qui ont des activités médicinales pouvant conduire à des usages thérapeutiques car elles en contiennent un certain nombre. C'est l'une des substances actives qui s'appliquent notamment au corps humain (Naghibi *et al.*, 2005; Babulka, 2007).

1.2 Utilisation des plantes médicinales

Seules les plantes ont longtemps été utilisées dans la nature sous forme de tisanes ou de poudres, mais maintenant elles se présentent sous forme de capsules de formes variées et utilisées par les plantes médicinales où de nombreuses plantes sont mélangées pour créer de nouvelles et bonnes pratiques pharmaceutiques tout en respectant de nombreuses conditions (numéro de plante, saveur, goût). Dans l'intérêt du client et de l'âge du patient également (Chabrier, 2010).

2. Les polyphénols

2.1. Définition

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 8000 structures connues différentes (Bahorun, 1997) de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins. Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

Les polyphénols occupent une part importante de notre alimentation sous diverses formes (vitamines, zinc, etc.), puisque cette substance est produite par de grands groupes de plantes. Plus qu'une simple molécule de composés complexes est divisé en plusieurs classes différentes et est codé pour les acides (coumarine, flavonoïdes...etc.). (Uthurry *et al.*, 2011).

2.2. Classifications

Les polyphénols sont repartit en plusieurs classes (Uthurry *et al.*, 2011) (**tableau 01**) :

- Les flavonoïdes
- Les tanins
- Les lignanes et les coumestanes
- Autres phytoestrogènes
- Les saponines (triterpenoides)
- Les phytostérols et les phytostanols

Les isothiocyanates sont généralement ajoutés à cette liste qui sont dérivés de l'hydrolyse de glucosinolates et qui n'appartiennent pas aux polyphénols (Dacosta, 2003).

Tableau 1 : Principales classes des composés phénoliques

Squelette carboné	Classe
C6	Phénols simples
C6-C3	Acides hydroxycinnamique coumarines
C6-C2-C6	Stilbènes
C6-C3-C6	Flavonoïdes
(C6-C3) ₂	Lignanes
(C6-C3) _n	Lignines
(C6-C3-C6) _n	Tanins condensés

2.3. Effets biologiques de polyphénol

Les polyphénols sont associées de nombreux processus physiologiques des aliments ou des plantes. Ces derniers sont interviennent dans la protection des espèces végétales contre les attaques d'insectes, de micro-organismes et même lorsque les plantes sont exposées à des blessures mécaniques (Bahorun, 1997). Les composés phénoliques montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux (Babar *et al.*, 2007), anti-allergènes, vasodilatateurs (Falleh *et al.*, 2008), et antioxydants (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006) jouent un rôle majeur contre les infections, la coagulation sanguine, les bactéries, virus et allergiques. Donc a été utilisé dans le traitement en les regroupant dans une catégorie des veinotoniques et des vasculoprotecteurs (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

3. Les flavonoïdes

3.1. Généralités

Les flavonoïdes représentent le groupe principal des polyphénols et contiennent plus de 5000 composés différents pour le règne des végétaux. Ces molécules forment un squelette commun comme le montre la première figure en fonction du nombre et de la composition chimique du carbone. Ces composés ont la capacité de protéger les plantes contre les effets néfastes des chéloïdes. Attaques environnementales, bactéries, virus et infections. On le trouve également dans les plantes à feuilles (épinards), les agrumes (citron), les plantes médicinales et notre alimentation quotidienne (Heim K.E *et al.*, 2002).

3.2. Classification

Les flavonoïdes sont classés en différentes catégories dont les plus importantes sont (Heim K.E *et al.*, 2002) :

- Les flavanones
- Les flavonols
- Les flavones
- Les flavanols
- Les isoflavones
- Les anthocyanes

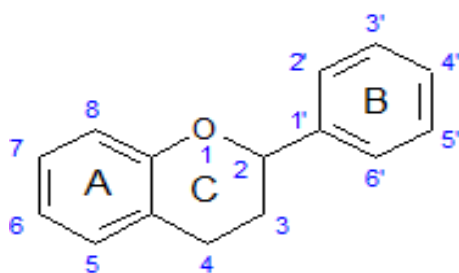


Fig. 01 : Structure de base des flavonoïdes (Heim *et al.*, 2002)

3.3. Méthodes d'extraction des polyphénols

3.3.1. Extraction méthanolique par macération

Cette technique dépend de la présence d'un solvant tel que le méthanol et de tout type de matière végétale, où le volume de méthanol ajouté est un dixième de la quantité de matière végétale broyée, appelée technique d'extraction méthanolique par macération, comprend deux conditions de base: premièrement, le mélange doit être sous agitation constante pendant une période de 24 heures à température ambiante. Deuxièmement, le mélange doit être filtré et le filtrat concentré à l'évaporateur rotatif à 60°C, puis pesé et stocké à 4°C (Atere *et al.*, 2018).

3.3.2 Extraction par décoction

Cette technique comprend une plaque chauffante, un bécher d'une quantité d'eau distillée avec un dixième de la quantité de matière végétale broyée. Mélanger cette quantité avec de l'eau distillée et laisser bouillir pendant (20-30) minutes, puis filtrer et sécher à 40°C (Boubakeur *et al.*, 2017).

4. Activité antibactérienne

Les plantes ont été une source d'inspiration dans la recherche médicale pour être utilisées comme traitement pour toutes les maladies. Cependant, ces dernières années, d'autres alternatives sont apparues, comme l'utilisation d'antibiotiques principalement pour traiter les infections bactériennes et la consommation de ces médicaments a conduit à la sélection des souches résistantes (Ali-Shtayeh *et al.*, 1998).

4.1. Les infections bactériennes

Une infection est un processus infectieux pathologique due à une souche bactérienne pathogène. Elle peut être :

- ❖ **Locale** : lorsqu'elle se manifeste uniquement au niveau où les germes ont pénétré.
- ❖ **Générale** : lorsqu'un germe franchit les barrières opposées par l'organisme à son entrée (peau, muqueuses) ou au niveau des ganglions, il pénètre dans le sang et se dissémine par celui-ci dans tout l'organisme.
- ❖ **Focale** : c'est l'infection en foyer dans les tissus ou organes où les germes sont apportés par la circulation sanguine (Pocidalo *et al.*, 1989; Marc *et al.*, 2001).

4.2. Rappel sur les bactéries

Une bactérie c'est un micro-organisme unicellulaire que l'on trouve partout. Les bactéries sont souvent unicellulaires (constituées d'une cellule) et sont toujours procaryotes, contenant un chromosome dont le génome est constitué d'acide nucléique et d'un petit morceau circulaire qui se compose également d'ADN appelé plasmide. La science qui étudie les propriétés des bactéries et des bactéries s'appelle la bactériologie.

Certaines bactéries sont mobiles grâce à des cils vibratiles. Selon leur mode de nutrition et leur comportement vis-à-vis de l'oxygène, les bactéries sont classées en aérobies et en anaérobies. Les bactéries se reproduisent selon deux modes :

-la division simple ou scissiparité.

-la sporulation, la spore représentant la forme de résistance et de dissémination du germe.

Pour croître, les bactéries doivent trouver dans le milieu extérieur des conditions physicochimiques favorables qui leur sont nécessaires et les aliments couvrant leurs besoins énergétiques élémentaires et spécifiques. Afin d'étudier les bactéries, l'homme a développé des milieux qui remplissent toutes ces conditions et répondre à tous les besoins des bactéries. (Leclerc *et al.*, 1995; Madigan *et al.*, 2001).

4.2.1. : Exemple de classification des bactéries**4.2.1.1 : Bactéries en forme de sphère : les cocci**

- Coccies Gram positif : les genres Staphylococcus, Streptococcus, Micrococcus, Pneumococcus. Enterococcus
- Coccies Gram négatif : le genre Neisseria.

4.2.1.2. : Bactéries en forme de bâtonnet : les bacilles

- Bacilles Gram positif : les genres Listeria, Erysipelothria, Bacillus, Cynetobacter, Actynomyces.
- Bacilles Gram négatif : les genres Enterobacter, Pasteurella, Haemophilus, Bordetella, Brucella, Francisella, Pseudomonas, Acinetobacter, Vibriion, Campylobacter, Moraxella, Aeromonas, Escherichia, Klebsiella.

- Bacilles acido-alcool résistants (BAAR) : Ici, nous retrouvons le bacille de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) et celui de la lèpre (*Mycobacterium leprae*).

4.2.1.3. Bactéries en forme de spirale : les spirochètes

Les genres *Treponema*, *Leptospira*, *Borrelia*, *Spirillum*.

- **4.2.1.4. Flore bactérienne anaérobie**
- Gram positif : les genres *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*.
- Gram négatif : les genres *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Bacteroides* (Lechat *et al.*, 1992; Marc *et al.*, 2001).

5. Les antibiotiques

Les premiers ATB, substances naturelles, ont probablement été utilisés bien avant la découverte de leurs propriétés thérapeutiques au XXe siècle . L'avènement des antibiotiques a constitué un formidable progrès thérapeutique, leur utilisation a permis de réduire considérablement la mortalité liée aux infections bactériennes souvent voire toujours fatales comme la tuberculose et les méningites bactériennes (Lode H et Am J Med, 2010).

Un antibiotique, comme tout médicament, expose au risque d'interaction médicamenteuse en réduisant ou augmentant l'effet d'autres traitements (Dancer, 2004).

D'autres effets secondaires non désirés sont liés à l'activité antimicrobienne elle même : par son impact sur la flore bactérienne, l'antibiotique peut favoriser la prolifération de certaines espèces qui seront à l'origine d'infections secondaires (Baxter R *et al.*, 2008).

5.1. Résistance bactérienne aux antibiotiques

Les plantes médicinales ont joué un rôle important dans le traitement de nombreuses maladies jusqu'à l'émergence d'autres alternatives, qui sont les antibiotiques, qui ont une très grande importance dans la pratique médicale en traitant les infections bactériennes (Bouyahia *et al.*, 2017b). La résistance des bactéries aux antibiotiques leur permet de survivre (Duvaland Cossart, 2019).

La multi résistance est décrite comme la résistance ou diminution de la sensibilité à au moins trois classes d'antibiotiques actifs sur les souches sauvages: (1) Bactamines, pénicillines, céphalosporines et monobactames; (2) carbapénèmes; (3) fluoroquinolones et (4) aminosides (Shorr, 2009).

Microbes ont des formes récemment développées. Il existe deux formes: soit naturelle, programmée au niveau du génome, soit acquise selon les états métaboliques, qui peuvent se résumer en plusieurs modes de résistance (Bouyahia *et al.*, 2017b).

- Diminution de l'adsorption des aminoglycosides.
- Modification de l'interaction des lipopeptides avec la membrane cellulaire.
- Modification de l'activité enzymatique des aminoglycosides.
- Modification de liaisons des β -lactamines à des cibles intracellulaires.
- Modification de liaisons à des cibles intracellulaires.
- Réduction de l'affinité des glycopeptides à des cibles membranaires.

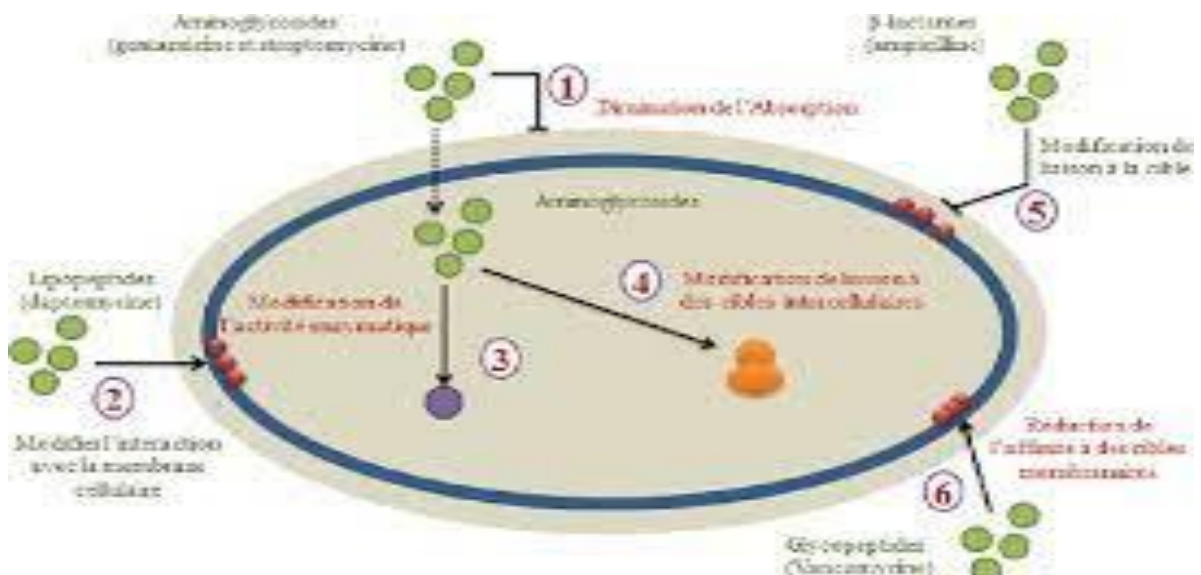


Fig. 02: Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques (Bouyahia *et al.*, 2017b).

6. Etude bibliographique d'*Ammi visnaga*

6.1 Description botanique

Khella ou bien « Noukha » en Algérie (Belkacem *et al.*, 2016) est une plante vivace qui pousse annuelle ou bisannuelle généralement au printemps (Vogel, 2013; Jaradat *et al.*, 2015). On la trouve en abondance dans la mer Méditerranée, sa hauteur est d'environ 120 cm (figure 03). Elle a une légère odeur et un goût très amer. Elle possède des feuilles alternes et basales, sessiles (dans les pousses supérieures) et courtes en pétioles (vers le bas) (Bishr *et al.*, 2014). Attribué à plusieurs langues différentes («Sowak ANabi » en **arabe** ; « Tabellaout » en **Berbère** , « Pick tooth, Tooth pick » en **anglais** , « Bishop`s weed » et « Herbe aux cure-dents » en **français**) (Bishr *et al.*, 2014). L'inflorescence naturelle a lieu de juillet à septembre, lorsque des fleurs blanches très gonflées se forment à la base (Keddad *et al.*, 2016). Possèdent une odeur particulière sur les feuilles (Bishr *et al.*, 2014). *Ammi visnaga* porte des fruits ovoïdes, contracté par deux méricarpes (d'environ 3 mm de longueur), ces derniers privilégiés par une couleur brun-vert avec une nuance violette et portent des graines ovales (figure 03), minuscules (environ 2 mm de long) (Bishr *et al.*, 2014 ; Hashim *et al.*, 2014 ; Meepagala *et al.*, 2016).

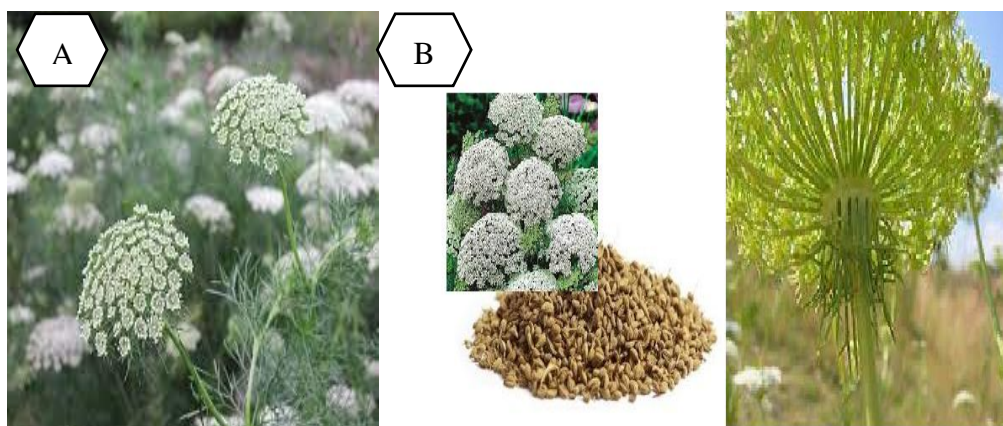


Fig. 03 : Description botanique (A). (Dirar *et al.*, 2014) ,La fleur (Jaradat *et al.*, 2015) et les grains(B) (Pavela *et al.*, 2016).

6.2 Position taxonomique de la plante

Selon (bok benit, 2011). *Ammi visnaga* appartient au:

Règne :	<i>plante</i>
Embranchement :	<i>Magnoliophyta</i>
Ordre :	<i>Apiales</i>
Famille :	<i>Apiaceae</i>
Genre :	<i>visnaga</i>

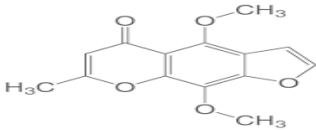
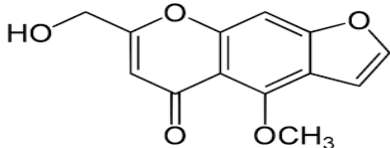
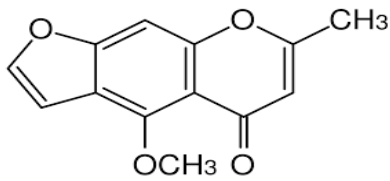
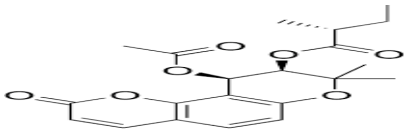
6.3 Répartition Géographique

La plante *Ammi visnaga* pousse dans un climat chaud (Hashim *et al.*, 2014), elle est originaire d'Afrique du Nord (dans un sol argileux) et du bassin méditerranéen (Ullah R *et al.*, 2012), elle s'acclimate également en Russie, au Mexique, aux États-Unis d'Amérique, dans l'océan Atlantique, en Argentine et en Australie (Kenner & Requena, 2001; Al –Sanfi A .I , 2013 ; Bihor *et al.*, 2014). Utilisé en Iran et par le Pakistan comme plante médicinale (Ullah *et al.*, 2012).

6.4 Etude phytochimique

Les études phytochimiques d'*Ammi visnaga* ont révélé sa richesse en différentes composants (Khalfallah *et al.*, 2011). Résumé dans le tableau suivant :

Tableau 02: Compositions chimiques d'*Ammi visnaga*.

Famille	Composants	Structure de majeurs composants (Dirar <i>et al.</i> , 2014; Hashim <i>et al.</i> , 2014)
Furanochromones	γ-pyrones 4%., la khelline (0,3-1,2%), la visnagine (0,05 à 0,30%), khellinol, ammiol, khellol et khellinin visammiol ,khellinone, visnaginone (Hashim <i>et al.</i> , 2014)	 <p data-bbox="1289 533 1406 566">Khelline</p>
Pyranocoumarines	0,2-0,5% comprenant: la visnadine, lasamidine et dihydrosamidine Ghoneim <i>et al.</i> , 2014)	
Furanocomarines	xanthotoxine et d'amoidine (Jaradat <i>e al.</i> , 2015)	<p data-bbox="1297 913 1401 947">Khellol</p>
Flavonoïdes	Comprenant :la quercétine et l'isorhamnetine et leurs trisulfates ainsi que le kaempferol (Jaradat <i>et al.</i> , 2015)	
Volatiles	Les plus abondant :linalool and aliphatic esters (Ghoneim <i>et al.</i> , 2014)	<p data-bbox="1273 1361 1409 1395">Visnagine</p>
Protéines	(fruits mûrs sèches) 12-16% (Bishr <i>et al.</i> , 2014)	 <p data-bbox="1273 1641 1409 1675">Visnadine</p>

CHAPITRE 02

MATERIELS ET METHODES

1. Matériel

1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal étudié dans ce travail est constitué des parties aériennes de la plante *Ammi visnaga* (feuilles, fleurs et feuilles de la tige). Cette plante est répandue en Afrique du Nord et comprend de nombreux états d'Algérie (M'sila, Djelfa, Bordj Bou Arerige ...). La plante a été identifiée par enseignant au département des sciences de la nature et de la vie de l'université de M'sila. Après la floraison naturelle de cette plante (de juillet à fin septembre) (figure 04), elles sont récoltées et laissées à l'air naturel jusqu'à ce qu'elles soient complètement sèches (figure 04) afin d'en étudier les parties aériennes uniquement de plusieurs manières différentes.



Fig.04 : *Ammi visnaga* au durée de la floraison (a) ; après le séchage (b) (Jaradate *et al.*, 2015).

1.2. Appareillages

Éprouvette, Entonnoir, Béchers, Papier filtre (whatman) , Spatule, Flacon, boites de pétré, tubes à essais, plaque chauffant ,micropipette, Réfrigérateur, Balance de précision, Evaporateur rotatif (Rotavapor), vortex, Bain-marie, spectrophotomètre, étuve, centrifugeuse, marqueur ,ependrof tube ,Etiquettes ,bec bunsen ,cristallisoir ,erlenmeyer.

1.3.Réactifs

Les réactifs chimiques utilisés dans cette travail sont: Le méthanol pur(CH_3OH), quercitine, chlorure d'aluminium (AlCl_3), carbonate de sodium(NaCO_3), folin-Ciocalteu, l'acide gallique (DMSO) Dimethylsulfoxyde.

2. Méthodes

2.1. Extraction méthanolique par macération

Après broyage des parties aériennes de la plante, 50 g ont été pesés et mélangés avec 500 ml de méthanol pendant 24 heures à température ambiante. Du papier Whatman a été utilisé pour filtrer l'extrait à concentrer dans un milieu sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40 ° C. Enfin il a été séché à l'étuve à 40 ° C, puis collectez-le, pesez-le et stockez-le à 4 ° jusqu'à son utilisation (Atere *et al.*, 2018). Le rendement en extrait est exprimé en pourcentage par rapport au poids sec de la plantes et est calculé par la formule (01) (Muniyandi *et al.*, 2019):

$$\text{RendementExt}\% = \text{MExt} / \text{MEch} \times 100 \dots \dots \dots (01)$$

Où

MExt: Masse de l'extrait après évaporation du solvant en g.

MEch: Masse de l'échantillon végétal en g.

2.2. Extraction aqueuse par décoction

Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par (Boubakeur *et al.*, 2017). Une quantité de 50 g du matériel végétal broyé est mise à bouillir pendant 30 minutes dans 500 ml d'eau distillée (Akassa *et al.*, 2019). Après filtration sur papier-filtre Whatman, Le filtrat obtenu a été concentré et séché à 40°C dans une étuve. L'extrait sec a été récupéré et stocké à 4°C à l'obscurité jusqu'à son utilisation (Benothman *et al.*, 2017). Nommés EA puis conservés à 4 °C pour les travaux ultérieurs .



Fig. 05 : Les différents étapes d'extraction par macération et par décoction .

3. Dosage des composés phénoliques

3.1. Dosage des polyphénols

❖ Principe

La méthode est l'une des meilleures méthodes pour déterminer la teneur totale en polyphénols d'extraits de plantes c'est la méthode de Folin Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999); c'est le résultat de la réaction entre l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et l'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) en milieu alcalin. Cette réduction se traduit par l'apparition de couleur bleue et se compose de formation d'un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) qui sont proportionnels à la concentration en polyphénols dans le mélange (Blouin *et al.*, 1972).

Mode opératoire

Un volume de 500µl de l'extrait en solution est mélangé avec 1ml du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué avec de l'eau distillée); après 4 minute additionner 400 µl de carbonate de sodium Na₂CO₃. L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 2 heure et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 765nm. Les résultats sont exprimés en µg équivalent d'acide gallique par mg d'extrait sec (µg EAG/mg d'extrait) (voir annexe 01).

3.2. Dosage des flavonoïdes**❖ Principe**

La formation d'une liaison covalente entre le trichlorure groupements hydroxyles (OH) des flavonoïdes produise un complexe de couleur jaune ayant une absorbance maximale à 430 (Rezzaghi, 2012). La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée spectrophotométriquement selon la méthode de trichlorure d'aluminium AlCl₃ décrite par (Ayoola *et al.*, 2008 ; Mbaebie, 2012) avec des modifications : Le chlorure d'aluminium forme des complexes jau-nâtres avec les atomes, d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes.

Mode opératoire

Un volume de 1 ml de l'échantillon (1mg/ml) est ajouté à 1 ml de la solution de trichlorure d'aluminium AlCl₃, vigoureusement agité. Après 10 min d'incubation, à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance est lue à 430 nm. La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalent de Quercétine par un milligramme d'extrait de feuilles (µg EQ/mg) (voir annexe 01).

4. Activité antibactérienne :

Différents types de bactéries sont exposés à l'effet d'extraits de méthanol et d'extraits aqueux de la plante d'*Ammi visnaga* , sont des bactéries de référence de type ATCC (American Type Culture Collection) disponibles au niveau de laboratoire de microbiologie du département de Microbiologie et Biochimie;. Ce sont des bactéries pathogènes, infectieuses et responsables de divers problèmes qui surviennent au niveau des denrées alimentaires, tels que les intoxications et autres, et susceptibles de causer de nombreux maladies sérieuses. Ce test est réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie de Msila . L'activité antibactérienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé standardisée par (NCLLS) cité par (Celiktas *et al.*, 2007a).

4.1. Souches bactériennes utilisées

Cinq souches bactériennes ont été testées :

Des bactéries à G+ dont, *Bacillus subtilis* ATCC9372, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 et des bactéries à G- dont *Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella enterica* ATCC13311.*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853.

4.2. Vérification de la pureté des bactéries et identification des souches :

Les souches bactériennes utilisées sont des souches déjà identifiées et référenciées. Nous avons tenu à vérifier leur pureté ; après incubation et à partir de colonies isolées sur milieux sélectifs, on vérifie immédiatement la pureté par morphologie (aspect des colonies ,mobilité à l'état frais ,coloration de Gram (voir annexe 02) et par les caractéristiques chimiques .

4.3. Milieux de culture utilisé

Nous avons utilisé trois milieux de culture (voir annexe 01): Gélose Nutritive, Gélose Mueller Hinton et Bouillon nutritif .

4.4. Méthode de diffusion en milieu gélosé

4.4.1. Préparation de l'inoculum bactérien

Après s'être assuré de la pureté des échantillons, Chaque souche a étéensemencée sur un

milieu de gélose nutritive et incubé pendant 24 heures à 37 ° C. Après incubation, nous choisissons parmi 4 des 5 colonies isolées et les mettons dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile . afin d'avoir une densité cellulaire initiale ou une turbidité voisine à celle de McFarland 0,5 (106 UFC/ml).(voir annexe 02) , Cette comparaison est mesurée à l'aide d'un densitomètre.

4.4.2. Ensemencement :

Après l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum, Nous trempé un écouvillon dans la suspension et on a étalé la surface entière de la gélose (Gélose Mueller Hinton) à trois reprises , en tournant la boîte à environ 60° après chaque application dont le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum . Enfin, on a écouvillonné partout autour du bord de la surface de la gélose.

4.4.3. Incubation :

Les disques stériles imprégnés des concentrations croissantes d'extraits(aqueux et méthanoliques) à raison de(10 à 15 µl) par disque (Ngameni *et al.*, 2009), ont été déposés stérilement à l'aide d'une pince sur la surface de la gélose. Des témoins imbibés seulement par le DMSO ont été réalisés. Les boîtes ont été incubées 24 h à 37 °C dans incubateur .

5. Analyse statiques

Toutes les analyses de l'activité antibactérienne sont faites en trois répétitions et la comparaison des moyennes est réalisée par Analyse de la Variance (ANOVA), permettant de calculer les moyennes et les écarts types. Les comparaisons statistiques ont été faites au moyen de Excel 2010.

CHAPITRE 03

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Rendement de l'extraction

Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), affectent en métabolites secondaires, et par conséquent affecte les activités biologiques médiées par ces métabolites

Dans nos études sur *Ammi visnaga*, nous avons procédé à la préparation de deux extraits par macération et décoction à partir de la partie aérienne (feuilles, les tiges et les feuilles de tige), et cela afin d'évaluer leur activité antibactérienne. Les deux extraits obtenus suivant (figure.7).

Afin de ces résultats on a noté que l'extrait méthanolique a permis d'obtenir le meilleur rendement 9.2% suivi par l'extrait aqueux avec un rendement de 7.2%. Les études rapportées par la littérature (Maupetit, 1994 ; Chehab, 1993 ; Mouslih, 2001) ont indiqué que le rendement des extraits d'*Ammi visnaga* varient en fonction de la période de récolte, du mode d'extraction et du séchage de la plante. La sélection individuelle a également un effet sur ces deux facteurs (Chehab, 1993). Sont donnés un rendement de 0.48% ; nettement inférieur à notre résultat.

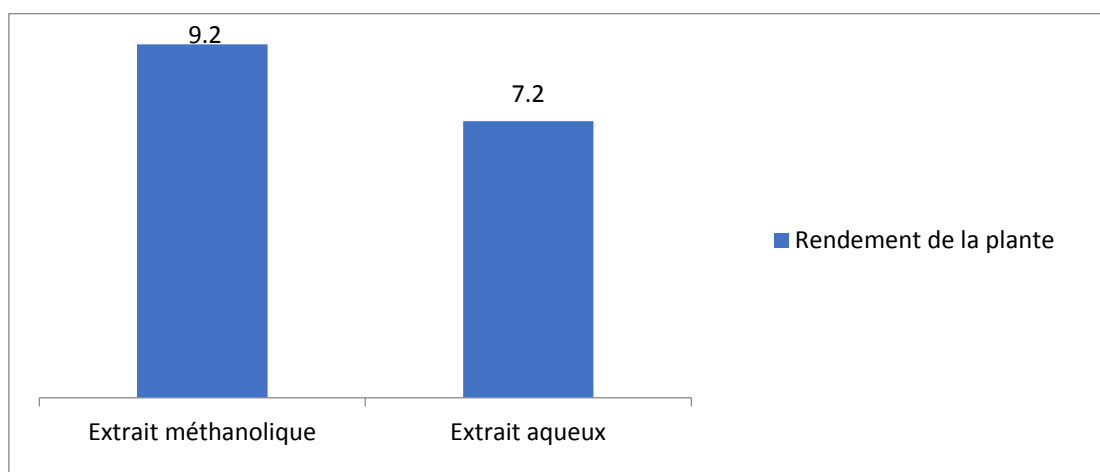


Fig. 06: Rendement (%) des échantillons d'*Ammi visnaga* en extraits méthanolique et aqueux après l'extraction.

Le rendement d'extraction dépend de plusieurs facteurs à savoir l'environnementaux tels que (la géographie, la température, la longueur du jour, les éléments nutritifs, etc....) . Ainsi que la variation de l'espèce végétale elle-même, l'organe végétale, le stade de la croissance , la conservation du matériel végétale et la méthode d'extraction .Nous pouvons dire que les solvants polaires donnent des rendements meilleurs que les solvants apolaires, étant donné que les solvants polaires ont la capacité de diffuser à l'intérieur de la poudre végétale . Tandis que les solvants apolaires, non miscibles avec l'eau, (Ghedaba *et al.*, 2010). Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par d'autres auteurs (Ghedaba *et al.*, 2010).

2. La teneur de polyphénols et flavonoïdes

Tableau 3: Taux de polyphénols et flavonoïdes totaux dans extraits méthanoliques et aqueux d'*Ammi visnaga* .

	Rendement(%)	Polyphénol ($\mu\text{g EAG/mg E}$)	Flavonoïde ($\mu\text{g EQ/mg E}$)
E.Méth	9.2%	243.57 \pm 0.57	77.15 \pm 0.73
E.Aq	7.2%	198 \pm 0.59	41.74 \pm 0.25

La détermination de la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux a été effectuée par la méthode spectrophotométrique en utilisant le réactif de Folin–Ciocalteu et le trichlorure d'aluminium (AlCl_3), respectivement. Les teneurs en polyphénols ont été rapportées en μg équivalent d'acide gallique/mg d'extrait du matériel végétal, tandis que la teneur en flavonoïdes a été rapportée en μg équivalent de queurcitine / mg d'extrait (Georgé *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2007).

Les résultats de la courbe d'étalonnage d'acide gallique et de la queurcitine sont représentés respectivement dans les figures 08 et 09.

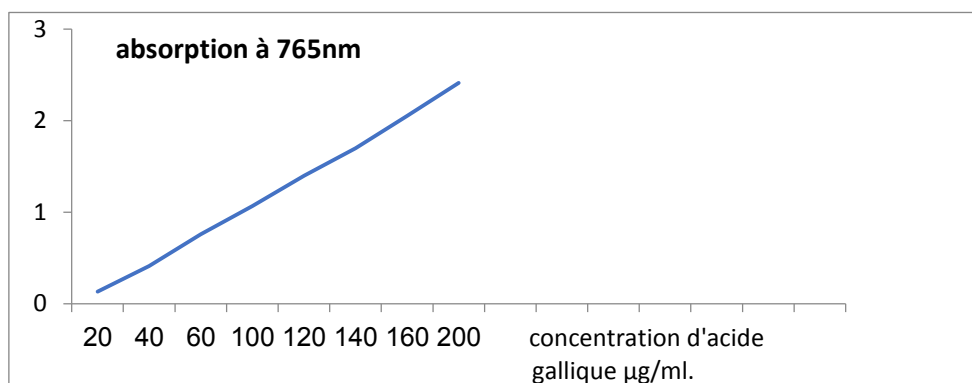


Fig 07: Cinétique de pouvoir réductrice de l'extrait méthanolique d'*Ammi visnaga*.

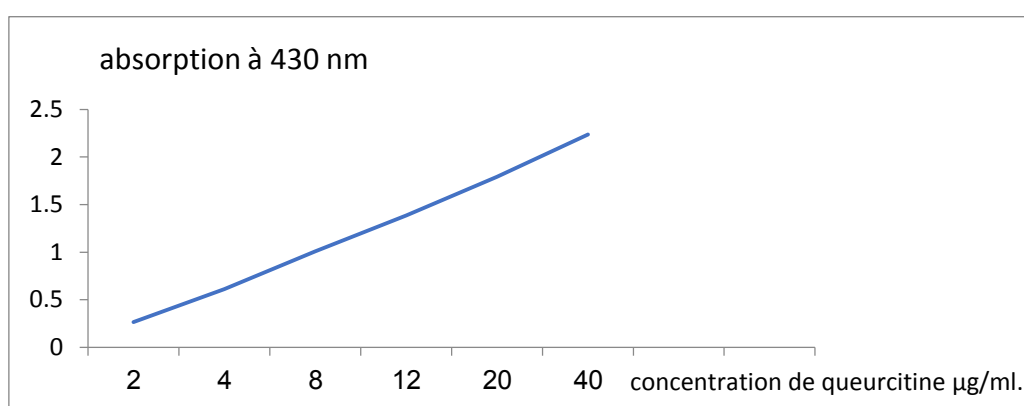


Fig 08: Cinétique de pouvoir réductrice de l'extrait aqueux d'*Ammi visnaga*.

À partir des valeurs obtenues dans le **tableau 3** nous avons remarqué que: la teneur en polyphénols est variable dans les deux extraits méthanoliques et aqueux d'*Ammi visnaga*, dont le taux le plus élevé a été enregistré dans l'extrait méthanolique avec une valeur de 243.57 ($\mu\text{g EAG/mg E}$) par rapport à l'extrait aqueux, le taux diminue avec une valeur de 198 ($\mu\text{g EAG/mg E}$).

Concernant les flavonoïdes, l'extrait aqueux présente un faible taux de flavonoïdes 41.74 ($\mu\text{g EQ/mg E}$), par rapport à l'extrait méthanolique avec une valeur de 77.15 ($\mu\text{g EQ/mg E}$).

Les extraits méthanoliques des parties aériennes d'*Ammi visnaga* présentent le taux le plus important en polyphénol et flavonoïdes 243.57 μg équivalent acide gallique par mg d'extrait et 77.15 μg équivalent de quercétine/mg de l'extrait, respectivement.

3. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits aqueux et extraits méthanoliques d'*Ammi visnaga* est déterminée par la technique de diffusion sur gélose (antibiogramme) par la mesure du diamètre de la zone inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis des cinq souches. Après 24 h d'incubation à 37 °C .

Aucun résultat n'a été obtenu (résultat négatif) dans les cinq boîtes contenant les échantillons de bactéries (chaque boîte nous avons mis trois disques un pour l'extrait méthanolique, un pour l'extrait aqueux et un pour le DMSO comme témoin).

Nous avons répété la partie appliquée de ce travail plusieurs fois et quatre concentrations (la masse des extraits par µg) différentes pour chacun des extraits méthanoliques et aqueux, mais nous n'avons obtenu aucun résultat. Ces concentrations sont :

- 50 µg de chaque extrait, nous le dissolvons dans 1 ml de DMSO avec l'agitation , (car l'extrait aqueux est difficile à dissoudre, nous ajoutons un peu d'eau distillée) Nous prenons 10 µl de chaque solution et le mettons sur un disque dans la boîte . Après incubation pendant 24 heures à 37 ° C, nous n'avons remarqué aucun résultat (zones d'inhibition) .

- Nous avons augmenté les concentrations d'extraits à 80 µg .Nous prenons 10 µl de chaque solution et le mettons sur un disque dans la boîte . Après incubation pendant 24 heures à 37 ° C, nous n'avons remarqué aucun résultat (zones d'inhibition) .

- Nous avons augmenté autre fois les concentrations d'extraits à 120 µg .Nous prenons 10 µl de chaque solution et le mettons sur un disque dans la boîte . Après incubation pendant 24 heures à 37 ° C, nous n'avons remarqué aucun résultat (zones d'inhibition) .

-Nous avons suggéré que ces concentrations pourraient être très élevées sur les échantillons, nous n'avons donc obtenu aucun résultat (zones d'inhibition). Nous avons réduit le niveau de concentration à 20 µg pour chaque extrait (car il existe plusieurs types de bactéries qui nécessitent de faibles concentrations pour donner un résultat) encore une fois, aucun résultat n'a été montré.

Nous recommandons et confirmons que la négativité de ces résultats n'est pas due à la méthode de travail (car nous avons bien travaillé et suivi toutes les étapes requises) ou à la validité et à la qualité du matériel de laboratoire (car nous sommes ceux qui ont préparé la communauté agricole et qui s'est également assuré de la pureté des échantillons.

Ces résultats négatifs sont dus aux facteurs environnementaux affectant la plante, (mode de cueillette, lieu de mise en place et de stockage avant utilisation ... etc.). Parmi les facteurs que nous mentionnons :

- 1- Facteurs climatiques: (température, chaleur, humidité, lumière, vent, pluie, CO₂.)
- 2- Les facteurs du sol (sol): le sol et ses propriétés naturelles, chimiques et biologiques.
- 3- Facteurs biologiques: les influences mutuelles entre les plantes cultivées et entre les organismes végétaux et animaux et les plantes.
- 4- Facteurs humains: influence humaine directe et indirecte sur la croissance et le développement.

En plus des différentes conditions environnementales, la composition génétique des plantes a un impact important sur son succès agricole. En outre, la vie végétale n'est que le résultat de l'interaction de facteurs environnementaux avec des facteurs de constitution génétique. L'environnement et ses facteurs influencent la croissance et le développement des plantes, et ils se chevauchent dans leur influence sur les processus physiologiques et métaboliques de la plante.

CONCLUSION

Conclusion

Les plantes étaient utilisées dans le passé dans plusieurs domaines, en particulier dans le domaine de la médecine, car elles étaient très populaires dans toutes les régions du monde (Egypte, Chine, Inde ...) et c'est avant l'émergence des médicaments chimiques et des antibiotiques qui ont des effets secondaires sur le corps humain et la santé du patient. De nombreux cas de maladie difficiles à traiter avec des médicaments par crainte pour la santé du patient, les médecins ont donc préféré recourir à un traitement à base de plantes médicinales, qui s'est avéré efficace dans le traitement de nombreux cas de maladie.

En Afrique du Nord en général, et en Algérie en particulier, on trouve de nombreuses plantes médicinales, dont la plante que *Ammi visnaga* discutée dans cet ouvrage en termes de composés phénoliques(PPT) , d'extrait méthanolique (EM) et d'extrait aqueux(EA) , et son activité antimicrobienne est évaluée en fonction de la zone en Nos études sur cette plante ont montré qu'elle n'a pas d'activité antibactérienne, avec différentes concentrations d'extraits aqueux et de méthanoliques , mais ces résultats ne prouvent pas qu'il n'y a pas d'activité antibactérienne pour cette plante en raison de la présence de plusieurs raisons (la différence de qualité du sol, le moment de sa cueillette, la méthode de stockage et de conservation avant de l'étudier..... etc.).

Que les résultats de l'étude soient positifs ou négatifs, ils constituent une étape importante dans la recherche de matériaux d'origine naturelle. L'étude des différents extraits nous permet de trouver de nombreuses applications dans plusieurs domaines (traitement des infections microbiennes, alimentation conservation, etc.), qui ont besoin Une analyse chimique est souhaitable pour obtenir une spécification plus approfondie de la composition quantitative et qualitative.

Nous restons toujours dans le besoin d'étudier les corps vivants pour diverses activités antimicrobiennes, antifongiques, antibacterienne et oxydantes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Ali-Shtayeh MS., Yaghmour RM-R., Faidi YR., Salem K., Al-Nuri MA. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of ethnopharmacology*, 1998; 60: 265-271.

Al-Snafi AE. Chemical constituents and pharmacological activities of *Ammi majus* and *Ammi visnaga*. A review. *International Journal of Pharmacy and Industrial Research*, 2013; 3(3): 257-265.

Atere, T.G., Akinloye, O.A., Ugbaja, R.N., Ojo, D.A., Dealtry, G., (2018). *In vitro* antioxidant capacity and free radical scavenging evaluation of standardized extract of *Costus afer* leaf. *Food Science and Human Wellness*, 10 : 1016 .

Ayoula.G.A., Ipay S.S., Solidiya M.O., Adepojou-Bello A.A., Coker H.A.B., Odugbemi T.O.2008. Phytochemical screening and free radical scavenging activities of the fruits and leaves of *Allanblackia floribunda* Oliv (Guttiferae). *International journal of health research*, 1(2):pp.81-93

Babar Ali, M., Hahn, E.J., Paek, K.Y. (2007) Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules*. 12: 607-62

Babulka P- Plantes médicinales du traitement des pathologies rhumatismales : de la médecine traditionnelle à la phytothérapie moderne, phytothérapie, vol.5, pp 137- 145. 2007

Ben Othmen, M., Salah-Fatnassi, K.B.H., Ncibi, S., Elaissi, A., & Zourgui. L., (2017). Antimicrobial activity of essential oil and aqueous and ethanol extracts of *Tercium polium* L subsp. *gabesianum* (LH) from Tunisia. *Physiologie and molecular biology of plants*, 23 (3) : 723-729

Blouin J., Lorca L., Montreau F.R., Dufour J.H.1972. Etude des conditions optimales pour la détermination des composés phénoliques totaux par le réactif de Folin Ciocalteu .In connaissance de la vigne et du vin 6 :pp.405-413

Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., ... & Dakka, N. (2017b). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 1-11 food spoilage *Bacillus cereus*, 9(4), 32-47 d spoilage *Bacillus cereus*, 9(4), 32-47

Bishr, M. M., Desoukey, S. Y., & Magdy, M .(2014). The effect of soil on *Ammi visnaga* (L) Lam. plant grown in several localities of Egypt and Sudan

- Bock B., (2011). Base de données nomenclaturale de la flore de France, version 4.02. *Tela Botanica, Montpellier (France)*
- Boubakeur H.,Rebbas., K.,Belhattab R.(2017.) Activité antioxydante et antibactérien des extraits d'Helichrysum stoechas (L.)Moench. *Phytothérapie* :pp.1-11
- Bock B., (2011). Base de données nomenclaturale de la flore de France, version 4.02. *Tela Botanica, Montpellier (France)*
- Celiktas, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., Baser, K.H.C. (2007a) Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* 100: 553-559
- Chabrier J.Y (2010). Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Doctorat en Pharmacie. Université Henri Poincaré - Nancy 1Moreau B., maître de conférences de pharmacognosie à la faculté de Pharmacie de Nancy Travaux dirigés et travaux pratiques de pharmacognosie de 3ème année de doctorat de pharmacie, 2003 Bruneton , J. (1999).
- Chehab M., 1993.- Les huiles essentielles de l'Ammi visnaga du Maroc. Memoire ATS, Institut agronomique et veterinaire Hassan II (Maroc), 123 p.
- Dacosta, E. (2003) Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed). Paris, 317p Bahorun, T. (1997) Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and agricultural resarch council, Réduit, Mauritus.*83-94
- Dancer SJ. How antibiotics can make us sick: the less obvious adverse effects of antimicrobial chemotherapy. *Lancet Infect Dis* 2004; 4:611-9.
- Decaux I. (2002). *Phytothérapie : Mode d'emploi*. Ed : Le bien public. Pp 6
- Dirar, A. I., Mohamed, M. A., Osman, W. J., Abdalgadir, H., & Khalid, H. S. (2014). A Phytopharmacological review on four antitumor medicinal plants grown in sudan. *Am. J. PharmTech Res*, 4(5), 28-41
- Duval, M., et Cossart, P., (2019), Un nouveau mécanisme de résistance aux antibiotiques, le recyclage des ribosomes , *nouvelle magazine*, 35: 8-9
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008) Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .*C. R. Biologies.* 331: 372-379
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, J.M.,(2005) Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products. *J. Agric. and Food Chemist.*53 1370-1373

- Ghedadba N, Hanbaba L, Aberkane MC, Oueled Mokhtar SM, Ferch N et Bousselsela H. (2014). Evaluation de l'activité hémostatique in vitro de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubun Vulgare* L. *Algerian journal of Natural Products*. 2, p64-74
- Ghoneim, K., Mohammad, A. A., Al-Daly, A. G., Amer, M. S., Khadrawy, F., & Mahmoud, M. A. (2014). Metabolic responsiveness of desert locust *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Orthoptera: Acrididae) to the khella plant *Ammi visnaga* L. (Apiaceae) extracts. *Int. J. Adv. Life Sci*, 7(2), 204-216
- Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2006) Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1220- 123
- Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, et al (2005) Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: across-national database study *Lancet* 365:579–87
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdely, C. (2008) Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*. 331: 372-379
- Ghareeb, A. M., Zedan, T. H., & Gharb, L. A. (2011). Antibacterial and antifungal activities of *Ammi visnaga* extracts against pathogenic microorganisms. *Iraqi J Sci*, 52(1), 30-6
- Ghoneim, K., Mohammad, A. A., Al-Daly, A. G., Amer, M. S., Khadrawy, F., & Mahmoud, M. A. (2014). Metabolic responsiveness of desert locust *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Orthoptera: Acrididae) to the khella plant *Ammi visnaga* L. (Apiaceae) extracts. *Int. J. Adv. Life Sci*, 7(2), 204-216
- Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2006) Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1220- 123
- Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, et al (2005) Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: across-national database study *Lancet* 365:579–87
- Hanes, D., 1996, Nontyphoid Salmonella, Bier J. (Eds) International Handbook of Foodborne Pathogens Edition. MiltisN., New york, 137-149 pp.
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002) Flavonoid antioxidants : chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem* 13(10) : 572-584.
- Iserin, P, 2001. Larousse Encyclopédie des plantes médicinales. Ed Larousse, pp10,335.

- Keddad, A., Baaliouamer, A., & Hazzit, M. (2016). Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from Umbels of Algerian Ammi visnaga (L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(5), 1243-1250
- Kenner, D., & Requena, Y. (2001). *Botanical medicine: a European professional perspective*. Paradigm Publications
- Lechat P.; Lagiers G.; Rouveix B. ; Vincens M.; Weber S. (1992). Abrégé de pharmacologie médicale. 4ème édition Masson M, Paris. P 764.
- Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y.,(2007) Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemist*. 102 771-776
- Lode H. Safety and tolerability of commonly prescribed oral antibiotics for the Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. [Eds] 1997. *Biology of Microorganisms*, 8th ed. Prentice Hall Upper Saddle River Press, London, 986 pp. treatment of respiratory tract infections. *Am J Med* 2010; 123: S26-38
- Marc T.; Gerard W.; Denis L (2001). Classification des anti-inflammatoires in *Guide pharmacologie. Etudiants et professionnels paramédicaux*. 4ème Edition. P 426
- Maupetit P., 1994.- Nouveaux constituants de l'essence de visnaga (Ammi visnaga(L.) Lam.). Actes des 11es journées internationales des huiles essentielles.Digne-les-Bains. Rivista italiana EPPOS, n° spé.,95-246.
- Meepagala, K. M., Estep, A. S., & Becnel, J. J. (2016). Mosquitocidal Activity of Extracts from Ammi visnaga (Apiaceae) Seeds. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 5(04), 170
- Mouslih M., 2001.- Valorisation de l'Ammi visnaga (L.) Lam. du nord du Maroc par la coproduction d'huile essentielle et d'actifs pharmacologiques. These de 3^e cycle, Institut agronomique et veterinaire Hassan II (Maroc), 103 p.
- Muniyandi, K., George, E., Sthyanarayanan., S., George, B. P., Abrahamse, H.,Thamburaj, S.,&Thangaraj, P., (2019). Phenolique, tannins, flavonoids and anthocyanins contents influenced antioxidant and anticancer activities of Rubus fruits from Western Ghats, India. *Food Sciences and Human wellness*, 8 (1) : 73-81
- Naghibi F, Mosaddegh M, Mohammadi M.S et Ghorbani A- Labiatae Family in folk Medicine in Iran : from Ethnobotany to pharmacology- Iranian Journal of Pharmaceutical Research, Vol.2, pp 63-79. 2005

Ngameni, B., Kuete, V., Simo I.K., Mbaveng, A.T., Awoussong, P.K., Patnam, R., Roy, R., Ngadjui, B.T. (2009) Antibacterial and antifungal activities of the crude extract and compounds from *Dorstenia turbinata* (Moraceae). *South African J Botany*. 75 : 256-261

Notamment par ceux du Musée ethnologique de Salagon. Pour plus de renseignements, voir : BROUSSE, Carole. *Ethnographie des ethnobotanistes de Salagon*. Paris : ministère de la Culture,(2014).

Pharmacognosy. Phytochemistry. Medicinal plants(second ed.). Paris: Lavoisier Publishing

Pocidal J-J (1989) Des infections d'origine microbiennes ou virale. In: Brisset C et Stoufflet J (Directeurs) Santé et médecine, l'état des connaissances et des recherches. Editions La Découverte / INSERM / ORSTOM .

Rezzaghi A.2012. Evaluation de l'effet toxique de l'extrait brut et de l'activité antioxydantes différents extraits des graines des *peganumharmala* L.Thèse demagistère, Biochimie et Physiologie Expérimentale. Université Farhat Abbas.Sétif.78p

UthurryC.A.,HeviaD.,Gomez-CordovesC(2011) Role of honey polyphenol in health. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 3(4) : 141-1 30

Todar, k. (2003). Online textbook. Emertitus, University of Wisconsin-Madison. Department of bacteriology. (<http://www.textbookofbacteriology.net/>).

Ullah, R., Hussain, I., Khader, J. A., AbdElIslam, N. M., & Samreen, T. (2012). Investigation of fatty acid composition of *Ammi visnaga* seed oil by gas chromatographymass spectrometry (GC-MS). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(47), 3265-3267

Vogel A., (2013). Encyclopédie des plantes. L'univers des plantes médicinales; Act as potent inhibitors of phorbol ester-induced nitric oxide generation in rat hepatocytes independent of their antioxidant properties. *Cancer Lett*. 2000, 153 (1- 2): 1-5

Singleton V.L.,Orthofer R.Lamuella-Raventos RM.1990.Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxydants by means of folin-ciocalteu reagent.Methods.Enzymology 29:pp.152

Annexe

Annexe n°1

1. Préparation des Milieux de culture

✓ **Mueller-Hinton(38g/l), préparé dans 1L d'eau distillée.**

- Extrait de viande 3 g
- Hydrolysate acide de caséine 17.5 g
- Amidon 1.5 g
- Agar 16 g
- Eau distillée 1000 ml
- pH 7.3

✓ **Gélose nutritif (23g/l), préparé dans 1L d'eau distillée.**

- Peptone 10 g
- Extrait de viande 3 g
- Extrait de levure 3 g
- Chlorure de sodium 5 g
- Agar 18 g
- Eau distillée 1000 ml
- pH 7.3

✓ **bouillon nutritif (g/l), préparé dans 1L d'eau distillée.**

- Peptone 10 g
- Extrait de viande 5 g
- Chlorure de sodium 5 g
- Eau distillée 1000 ml
- pH 7.3

Les milieux de culture préparés comme suit :

Dissoudre chaque milieu dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis autoclave pendant 20 min à 130°C et finalement couler le milieu dans les boîtes de pétri.

2. Préparation de (dosage de polyphénols)

- ✓ Extrait méthanolique :(500 µg extrait méthanolique sec +1 ml de méthanol).
- ✓ Extrait aqueux : (500 µg extrait aqueux sec +500µl de l'eau distillé +500µl de méthanol).
- ✓ Folin Ciocalteu : (1ml de folin +500µl de chaque solution d'extrais préparés aqueux et méthanolique +9ml d'eau distillée et cette mélange diluée 10 fois).
- ✓ Acide gallique : (500µg + 1ml de methanol ,en utilisant 100 µl pour dosage).
- ✓ carbonate de sodium (Na₂CO₃) : (3.75 g + 500 ml de l'eau distillé).

3. Préparation de (dosage de flavonoïdes)

- ✓ Extrait méthanolique :(2 g extrait méthanolique sec +1 ml de méthanol).
- ✓ Extrait aqueux : (2 g extrait aqueux sec +500µl de l'eau distillé +500µl de méthanol).
- ✓ Dissolution de Quercitain dans le méthanol (1 mg/ml) ,dilution 50 µg/ml.
- ✓ Préparation de chlorure d'aluminium (1 g dans 50 ml de méthanol)

Annexe n°2

1. Coloration de Gram

La **coloration de Gram** doit son nom au bactériologiste danois **Hans Christian Gram** . Les bactéries présentent toutes une paroi constituée d'une substance, la muréine qui est un peptidoglycane. Celle-ci est recouverte par une membrane externe chez les bactéries Gram-, tandis que les bactéries à Gram+ en sont dépourvues. Cette paroi de part son organisation permet de les classer soit dans les Gram+ ou les Gram-. Cette information est importante car elle est utilisée dans la taxonomie. Elle permet ainsi, avec la reconnaissance de la morphologique et le mode de groupement des bactéries de renseigner sur l'ordre dont fait partie les bactéries étudiées.

❖ **Cette coloration de Gram se réalise en 7 étapes:**

-Réalisation de frottis sur une lame de microscope à partir d'une suspension bactérienne: on agite la suspension afin de l'homogénéiser et d'éviter d'avoir un culot au fond du tube. Avec l'aide d'une anse que l'on aura préalablement stérilisé (en la passant sous le bec benzène), on prélève un peu de la solution bactérienne en plongeant le fil de platine de la anse dans le tube à essai.

-On dépose ensuite ce prélèvement au milieu de la lame en faisant des rotations jusqu'à séchage.

-On procède à **la fixation du frottis** soit avec de l'éthanol à 90° (5 minutes) puis on enflamme la lame ou on passe directement 3 fois la lame dans la flamme du bec Bunsen.

-**La coloration au violet de Gentiane** (colorant basique): la lame est plongée pendant 2 à 3 minutes (en fonction de la concentration) dans la coloration au violet de gentiane. Toutes les bactéries sont colorées en violet puis rincer à l'eau déminéralisée.

-**Mordantage au lugol** (solution iodo-iodurée) : étaler le lugol et laisser agir 20 secondes ; Rincer à l'eau déminéralisée. Cette étape permet de stabiliser la coloration violette.

-**Décoloration à l'alcool**: verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau déminéralisée. L'alcool pénètre dans la bactérie. La coloration au violet de Gentiane disparaît. Les bactéries décolorées sont des bactéries Gram-. Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.

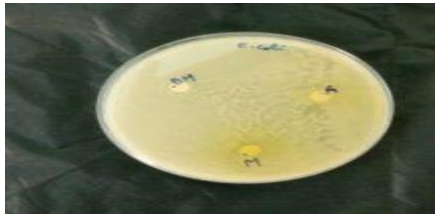

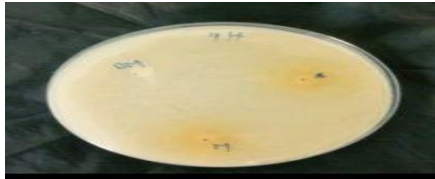
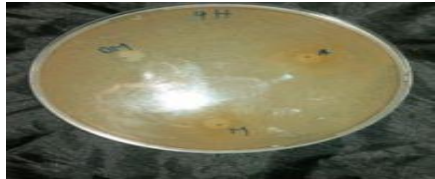
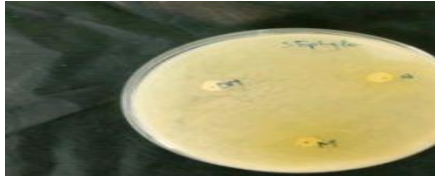
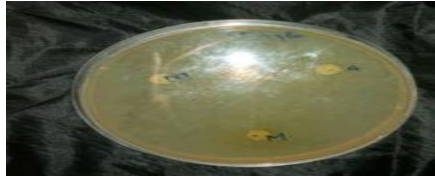
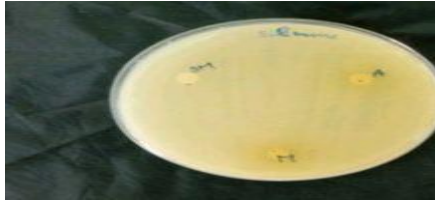

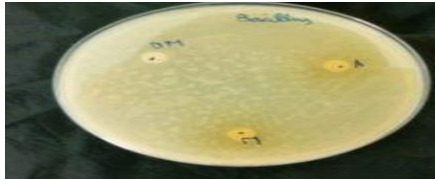

-**Contre coloration avec de la Fuchsine ou de la Safranine**: laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame sur une platine chauffante à 40°C, 10 à 15 minutes. Les bactéries Gram- sont colorées en rose.

2. McFarland PMS 0,5 pour la microbiologie

- ❖ Les étalons McFarland PMS sont des étalons de turbidité équivalents aux étalons originaux de sulfate de baryum. La suspension de microparticules de polymère optimisée (PMS) se mélange plus lentement que la variante du sulfate de baryum.
- ❖ La densité cellulaire d'une suspension bactérienne est ajustée au cours d'une simple comparaison avec la turbidité de l'étalon. Cela peut aussi bien se faire par une comparaison visuelle directe qu'au moyen d'une mesure dans un spectrophotomètre.
- ❖ La valeur de turbidité de l'étalon de 0,5 MFU (McFarland Units) correspond à peu près à une densité de culture de $1,5 \times 10^8$ cellules/ml. Cette densité cellulaire est particulièrement requise pour l'inoculum bactérien pour le test de sensibilité aux antibiotiques.
- ❖ Uniquement pour la recherche. Produit non approuvé pour une utilisation en médecine humaine ou vétérinaire, ni pour les applications sur l'homme ou l'animal, ni pour des applications cliniques ou de diagnostic in vitro.

- ❖ Uniquement pour la recherche. Produit non approuvé pour une utilisation en médecine humaine ou vétérinaire, ni pour les applications sur l'homme ou l'animal, ni pour des applications cliniques ou de diagnostic in vitro.

Annexe n°3. les zones d'inhibition des témoins négatif pour les cinq souches

Concentration ($\mu\text{g/ml.}$) Souches bactérienne	Poids d'extraits méthanolique et aqueux (50 $\mu\text{g/ml.}$)	Poids d'extraits méthanolique et aqueux (120 $\mu\text{g/ml.}$)
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Pseudomonas</i>		
<i>Staphylococcus</i>		
<i>Salmonella</i>		
<i>Bacillus</i>		

Résumé

Ammi visnaga L. est une plante médicinale appartenir à la famille des *Apiaceae*, largement utilisée en médecine traditionnelle, est une plante vivace, très fréquente dans le bassin méditerranéen. En Algérie *Ammi visnaga* est une plante annuelle ou bisannuelle, qui pousse généralement au printemps. Le but de ce travail est de déterminer la teneur des extraits méthanolique (EM), aqueux (EA) en composés phénoliques, ainsi que d'évaluer leur activité antibactérienne. Les rendements d'extraction : (extraction méthanolique par macération étaient de 9.2% , tandis que extraction aqueuse par décoction étaient de 7.2%). Le taux en polyphénols et flavonoïdes totaux a révélé une forte concentration dans l'extraits méthanoliques par rapport l'extraits aqueux avec un taux de de 243.57 (μg EAG/mg E) et 77.15 (μg EQ/mg E). L'activité antibactérienne a été évaluée, pour 05 souches bactériennes *salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Pseudomonas aeruginosa*; *staphylococcus* par la méthode (disques de diffusion). Ces résultats montrent que les extraits d'*Ammi visnaga* ne possèdent pas des propriétés antibactérienne.

Mots clés : *Ammi visnaga*, *Apiaceae*, Polyphénols, flavonoïdes , activité antibactérienne.

Abstract

Ammi visnaga L. is a medicinal plant belonging to the *Apiaceae* family, widely used in traditional medicine. It is a perennial plant, very common in the Mediterranean basin. In Algeria *Ammi visnaga* is an annual or biennial plant, which usually grows in spring. The aim of this work is to determine the content of methanolic (EM), aqueous (EA) extracts in phenolic compounds from this plant, as well as to evaluate their antibacterial activity. The extraction yields: (methanolic extraction by maceration was 9.2%, while aqueous extraction by decoction was 7.2%) (%). The level of total polyphenols and flavonoids revealed a high concentration in methanolic extracts compared to aqueous extracts with a level of 243.57 (μg EAG / mg E) and 77.15 (μg EQ / mg E). antibacterial activity was evaluated for 05 bacterial strains of salmonella, Escherichia coli, Bacillus, Pseudomonas aeruginosa; staphylococcus by the method (diffusion discs). These results show that *Ammi visnaga* extracts do not have antibacterial properties.

Keywords: *Ammi visnaga*, *Apiaceae*, Polyphenols, flavonoids, antibacterial activity.

المخلص

Ammi visnaga L. هو نبات طبي ينتمي إلى عائلة *Apiaceae* ويستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي، هو نبات معمر منتشر جدًا في حوض البحر الأبيض المتوسط. في الجزائر، *Ammi visnaga* أو النوخة هو نبات ينمو عادة في الربيع كل سنة أو سنتين. الهدف من هذا العمل هو تحديد محتوى الميثانول (EM)، والمستخلصات المائية (EA) في المركبات الفينولية من هذا النبات، وكذلك لتقييم نشاطها المضاد للبكتيريا. حصيللة الاستخلاص: (الاستخلاص الميثانولي بالنقع كان 9.2% بينما الاستخلاص المائي المغلي كان 7.2%). أظهر مستوى البوليفينول الكلي والفلافونويد تركيزًا عاليًا في المستخلصات الميثانولية مقارنة بالمستخلصات المائية بمستوى 243.57 (ميكروغرام EAG / مجم E) و 77.15 (ميكروغرام EQ / مجم E). تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لـ 05 سلالات بكتيرية من السالمونيلا، الإشريكية القولونية، العصوية، الزائفة الزنجارية، المكورات العنقودية عن طريق الطريقة (أقراص الانتشار). تظهر هذه النتائج أن مستخلصات *Ammi visnaga* لا تحتوي على خصائص مضادة للبكتيريا.

كلمات مفتاحية : *Ammi visnaga*، الفصيلة الخيمية، مستخلص ميثانولي، مستخلص مائي، نشاط مضاد للبكتيريا.