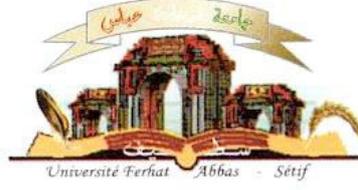


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/2016

Thèse

Présentée par

**EL KOLLI Meriem**

**Doctorat en Sciences**

**Filière: Biologie**

**Spécialité: MICROBIOLOGIE**

Thème

**COMPOSITION CHIMIQUES ET ACTIVITES BIOLOGIQUES  
DES HUILES ESSENTIELES DE QUELQUES APIACEES  
*Carum montanum* Benth. et Hook. et *Daucus gracilis* Stem.**

Soutenue publiquement le 15/06/2016

Devant le Jury

Président :	<b>Harzallah Daoud</b>	<b>Pr. UFA Sétif 1</b>
Directeur :	<b>Laouer Hocine</b>	<b>Pr. UFA Sétif 1</b>
Examineurs :	<b>Akkal Salah</b>	<b>Pr. U. Constantine</b>
:	<b>Zellagui Amar</b>	<b>Pr. U. Oum Bouaghi</b>
	<b>Zerroug Mohamed Mihoub</b>	<b>Pr. UFA Sétif 1</b>
	<b>Yahia Abdellouehab</b>	<b>Pr. CU de Mila</b>

*Laboratoire de Valorisation des Ressources Naturelles Biologiques*

## **REMERCIEMENTS**

Ce travail a été réalisé, en partie, au sein du laboratoire de Valorisation des Ressources Naturelles Biologiques (LVRNB) de la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de Sétif 1, ainsi qu'aux laboratoires de graduation de la faculté.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon encadreur monsieur le Pr. Laouer Hocine pour sa disponibilité, sa patience et son encouragement durant la réalisation de cette thèse. Je le remercie, également, pour ses grandes qualités humaines et son soutien moral, tout au long de ces années.

Ma vive reconnaissance va à Mr le Pr. Harzallah Daoud, professeur à l'université de Sétif 1, d'avoir accepté de présider le jury de soutenance de thèse, ainsi qu'à Mr le Pr. Akkal Salah de l'université de Constantine, le Pr. Zellagui Amar de l'université de Oum El Bouaghi, Mr le Pr. Zerroug Mohamed Mihoub de l'université de Sétif 1 et Mr le Pr. Yahia Abdelouehab du centre universitaire de Mila d'avoir accepté de juger ce travail.

Un grand merci pour Gérard Gastine et Manon VanderVennet du Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur, qui nous ont fournis les souches microbiennes et pour leur assistance technique aux tests antimicrobiens. Ainsi qu'au Muséum national d'Histoire naturelle

J'exprime mes vifs remerciements au D<sup>r</sup> Boussoualim Naouel du département de microbiologie, à M<sup>f</sup> Gaamoun Sofiane Chercheur à l'INRA de Sétif et à M<sup>me</sup> Nouioua Wafa du département de biologie et d'écologie végétale pour leur énorme aide matérielle ainsi que morale.

Je remercie également Chougui Sabrina, Almas Farida et Neffir Kaddour, ingénieurs de laboratoires au niveau de la faculté, pour leur aide précieuse

Que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, trouve ici l'expression de mes très vifs remerciements.

## **DEDICACES**

**JE DÉDIE CE TRAVAIL À ;**

**MA CHÈRE MÈRE**

**MON PÈRE**

**ET À MA PETITE YASMINE**

## Résumé

Les recherches récentes tendent à exploiter les ressources biologiques naturelles en raison de leurs vertus bénéfiques pour la santé humaine afin qu'on puisse contourner les problèmes liés à l'usage abusifs des substances synthétiques. Pour cet objectif, deux espèces appartenant à la famille des Apiacées; *Carum montanum*, provenant de Sétif, et *Daucus gracilis*, provenant de Skikda, ont fait l'objet de cette étude. Les HE de chaque plante ont été obtenu par hydrodistillation de leurs parties aériennes en utilisant un appareil d'extraction de type Clevenger et les extraits bruts ont été obtenus par macération hydroalcoolique méthanol/eau. L'analyse des HE a été faite par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/MS) et le Nothoapiole a été purifié par chromatographie successive sur colonne de gel de silice. Le dosage des polyphénols totaux des Eb a été réalisé suivant la méthode de Folin-Ciocalteu. L'activité antimicrobienne des HE et des Eb a été estimée qualitativement sur 25 souches microbiennes par la technique de diffusion sur gélose, ensuite quantifiée par trois méthodes pour déterminer les CMI correspondantes. Les souches sensibles ont fait l'objet de d'étude de bactéricidie et de lyse cellulaire. En parallèle, les effets antioxydants des HE et des Eb ainsi que ceux de leurs combinaisons ont été testé par la technique du DPPH et celle du pouvoir réducteur. Les Eb ont été testé pour évaluer leurs activités antihémolytiques et antidénaturantes. Les deux HE sont caractérisées par la présence des phénylpropanoïdes. L'HE de *C. montanum* contient principalement le Nothoapiole (62.8%), le Dillapiole (8.5 %) et l' $\alpha$ -Humulène (7.1%). Alors que celles de *D. gracilis* contient majoritairement l'Elemicine (35.3 %) et l'Acétate de géranyl (26.8 %). Les deux extraits sont très riches en polyphénols totaux ; *C. montanum* 101.50  $\mu\text{g}/\text{mg}$  et *D. gracilis* 149.05. Le criblage antimicrobien a montré une activité des HE et des extraits allant de la résistance à la sensibilité sur l'ensemble des souches testées. Les CMI des HE différent en fonction du germe et en fonction de la méthode utilisée. La souche de *B. cereus* est la plus sensible avec des CMI de l'HE de *C. montanum* de 4.86 $\mu\text{g}/\text{ml}$  par microdilution liquide, 55.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  par macrodilution liquide et de 17.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$  par macrodilution solide avec l'HE de *D. gracilis*. L'action des HE au cours du temps n'est pas trop prononcée. Les HE agissent modérément sur la membrane plasmique de *K. pneumoniae* et celle de *P. mirabilis* mais celle de *B. cereus* n'est pas du tout affectée. Les HE et les extraits de *C. montanum* et de *D. gracilis* présentent une activité antiradicalaire très importante en utilisant le test de piégeage du radical DPPH ;  $\text{IC}_{50}$ = 0.001, 0.002, 0.065 et 0.06 mg/ml respectivement. Ils ont montré également des pouvoirs réducteurs dose dépendants. Les extraits des deux plantes possèdent des activités antihémolytiques et antidénaturante des protéines ( $\text{IC}_{50}$  de *Carum* 298,12  $\mu\text{g}/\text{ml}$  et *Daucus* 554,07  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inférieurs à celles des références. En conclusion, ces plantes possèdent des effets biologiques intéressants qui varient en fonction de la souche testée et de technique utilisée.

**Mots clés :** Apiacées, huiles essentielles, phénylpropanoïdes, polyphénols, activité antimicrobienne, activité antioxydante, activité synergique.

## Abstract

Recent researches tend to exploit natural biological resources because of their beneficial properties for human health to overcome the problems associated with the improper use of synthetic substances. For this purpose, two species belonging to the family of Apiaceae; *Carum montanum*, from Setif, and *Daucus gracilis* from Skikda, were the subject of this study. Essential oils (EO) of each plant were obtained by steam distillation of their aerial parts using a Clevenger type extraction apparatus and the crude extracts (CEs) were obtained by hydroalcoholic maceration (methanol/water). The analysis of EOs was made by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) and the Nothoapiole was purified by successive chromatography on a silica gel column. The determination of total polyphenols in CEs was performed according to the method of Folin-Ciocalteu. The antimicrobial activity of EOs and CEs were estimated qualitatively on 25 microbial strains by the agar diffusion method, and then quantified by three methods for determining the corresponding MICs. The action of EOs on susceptible strains was tested by the time kill assay and bacterial lysis experience. In parallel, the antioxidant effects of EOs and CEs as well as their combinations were tested by the technique of DPPH and reducing power assay. CEs were tested to assess their antihémolytic and protein antidénaturant activities. Both of EOs are characterized by the presence of phenylpropanoids. The EO of *C. montanum* contains mainly Nothoapiole (62.8%), the Dillapiole (8.5%) and the  $\alpha$ -Humulene (7.1%). While *D. gracilis*'s EO contains predominantly the Elemicin (35.3%) and the Geranyl acetate (26.8%). Both of extracts are rich in total polyphenols; *C. montanum* 101.50 and *D. gracilis* 149.05 ug / mg. The antimicrobial screening showed an activity of EOs and extracts from the resistance to susceptibility on all strains tested. The MICs of EOs are different depending on the bacterial strain and the method used. *B. cereus* is most susceptible strain with MIC of *C. montanum*'s EO of 4.86 $\mu$ g /ml by liquid microdilution, 55.5 ug /ml by liquid macrodilution and 17.15 $\mu$ g /ml of *D. gracilis* 's EO by solid macrodilution. The action of EOs over time is not too pronounced. EOs act moderately on the cytoplasmic membrane of *K. pneumoniae* and *P. mirabilis* but *B. cereus*'s membrane is not at all affected. EOs and extracts of *C. montanum* and *D. gracilis* have a very important antioxidant activity by DPPH radical scavenging test; IC<sub>50</sub> = 0.001, 0.002, 0.065 and 0.06 mg / ml respectively. They also showed dose-dependent reducing powers. The extracts of the two plants have antihémolytic and protein antidénaturant activities of (IC<sub>50</sub> for *Carum* 298.12 ug /ml and 554.07 g /ml for *Daucus*) lower than those of references. In conclusion, these plants possess interesting biological effects that vary according to the tested strain and the technique used.

**Keywords:** Apiaceae, essential oils, phenylpropanoids, polyphenols, antimicrobial activity, antioxidant activity, synergistic activity

المخلص

تميل البحوث التي أجريت مؤخرا إلى استغلال الموارد البيولوجية الطبيعية بسبب خصائصها المفيدة لصحة الإنسان و ذلك من اجل الوقاية من المشاكل المرتبطة بالاستخدام المفرط للمواد الصناعية. لهذا الغرض، تمت دراسة نوعين نباتيين من العائلة الخيمية ؛ *Carum montanum*، من ولاية سطيف، و *Daucus gracilis* من ولاية سكيكدة. تم الحصول على الزيوت الأساسية للأجزاء الهوائية للنبتين عن طريق التقطير المائي باستخدام جهاز الاستخلاص من نوع Clevenger ، أما المستخلصات الخام فقد تم الحصول عليها عن طريق النقع في محلول مائي كحولي (ميثانول/ماء). تم إجراء التحليل الكيميائي للزيوت الأساسية بتقنية كروماتوغرافيا الطور الغازي المرفقة بمطيافية الكتلة كما تمت تنقية المركب الأساسي لزيت *C. montanum* بواسطة كروماتوغرافيا متسلسلة على عمود هلام السيليكا. تم تقدير المحتوى الإجمالي للمستخلصات الخام من عديدات الفينول الكلية بطريقة Folin-Ciocalteu. كما قدرت النشاطية ضد ميكروبية للمستخلصات نوعيا على 25 سلالة ميكروبية عن طريقة تقنية الانتشار على الوسط الصلب، ثم كميا من خلال ثلاث طرق لتحديد التركيز الأدنى المثبط. بعد ذلك، خضعت البكتيريا التي أبدت حساسية للزيوت لاختبار موت الخلايا عبر الوقت ودراسة تأثيرها على انحلال الخلية البكتيرية. في موازاة ذلك، تم اختبار النشاطية المضادة للأكسدة لكل من الزيوت و المستخلصات الخام وكذلك مزيج كل منهما عن طريق تقنيتي ال DPPH والقدرة الارجاعية. بالإضافة، قمنا بدراسة قدرة المستخلصات على حماية كريات الدم الحمراء و حماية البروتينات من التمسخ. يتميز التركيب الكيميائي لكلا الزيتين بوجود نسب عالية من مركبات الفينيل بروبانويد. وجد ان زيت *C. montanum* يحتوي اساسا على ال Nothoapiole (62.8%) ، ال Dillapiole (8.5%) و ال  $\alpha$ -Humulène (7.1) . أما زيت *D. gracilis* فيتكون أساسا من ال Elemicine (35.3%) و ال Geranylacetat (26.8%) . كما بينت معايرة المستخلصات الخام وجود نسب كبيرة من عديدات الفينول قدرت ب 101.5 مكغ/ملغ في مستخلص *C. montanum* و 149.05 مكغ/ملغ في مستخلص *D. gracilis* . امتدت النشاطية ضد ميكروبية للمستخلصات من المقاومة للحساسية، فيما اختلفت قيم التراكم الدنيا المثبطة حسب السلالة المدروسة والطريقة المستعملة. تبين من الدراسة أن بكتيريا *B. cereus* هي الأكثر حساسية لزيت *C. montanum* بتركيز 4.86 مكغ/مل بتقنية التخفيف المصغر في وسط سائل، 55.5 مكغ/مل بتقنية التخفيف العادي في وسط سائل و 17.15 مكغ/مل بتقنية التخفيف العادي في وسط صلب مع زيت *D. gracilis* . لم تكن الزيوت الأساسية ذات تأثير يذكر عبر الزمن، كما لم تؤثر على الغشاء البلازمي لبكتيريا *B. cereus* غير أنها أثرت قليلا على أغشية كل من *K. pneumoniae* و *P. mirabilis* . تملك كل من الزيوت و المستخلصات لنباتي *C. montanum* و *D. gracilis* خصائص إزاحة جذر DPPH بنسب قدرت ب 0.001، 0.002، 0.065 و 0.06 مكغ/مل على الترتيب. أظهرت المستخلصات خصائص حماية الكريات الحمراء من الانحلال وخصائص حماية البروتينات من التفسخ ( 298,12 مكغ/مل عند *Carum* و 554,07 مكغ/مل عند *Daucus*)، بينما تبقى هذه النسب اقل من تلك المسجلة لدى المادة المعيارية. في الختام، نستنتج أن هاتين النبتتين تمتلك خصائص بيولوجية مثيرة للاهتمام تختلف حسب السلالة المدروسة والتقنية المستخدمة .

**الكلمات المفاتيح :** العائلة الخيمية، الزيوت الأساسية، الفينيل بروبانويد، عديدات الفينول، النشاطية ضد ميكروبية، النشاطية المضادة للأكسدة، النشاط التعاوني

## **ABREVIATIONS**

**AMP** : Ampicilline

**ATCC** : American Type Culture Collection

**ATP** : Adénosine Tri Phosphate

**BHT**: Butylated hydroxytoluen

**BN** : Bouillon Nutritif

**CG/SM** : Chromatographie en Phase Gaz Couplée à la Spectrométrie de masse

**CMB** : Concentration Minimale Bactéricide

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**CPG** : Chromatographie en Phase Gaz

**DMSO** : Diméthyle sulfoxyde

**DPPH** : 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl

**Eb** : Extrait brut

**ERO** : Espèces Réactifs à l'Oxygène

**G** : Gentamicine

**GN** : Gélose Nutritive

**HE** : Huile essentielle

**IC<sub>50</sub>**: Concentration inhibitrice à 50%

**MHA**: Muller-Hinton Agar

**NA**: Nothoapiole

**NCLSI**: National Clinical and Laboratory Standards Institute

**OMS** : Organisation mondiale de la Santé

**QMI** : Quantité Minimale Inhibitrice

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**UFC** : Unité Formant Colonies

## LISTE DES FIGURES

	<b>Page</b>
<b>Figure</b>	
Figure 1 : Quelques structures des composés des huiles essentielles.....	5
Figure 2 : Micrographie montrant le détail d'un canal sécréteur dans la graine de <i>Carum carvi</i> .....	6
Figure 3 : Structure de la molécule phénol.....	7
Figure 4 : Sites et mécanismes d'action des composants des HE sur les bactéries.....	9
Figure 5 : Maladies et dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène.....	11
Figure 6 : Effet des espèces réactives à l'oxygène dans les maladies et rôle préventif des polyphénols.....	12
Figure 7 : Mécanismes d'action des molécules responsables de la multi-résistance et effets des métabolites secondaires.....	15
Figure 8 : Schéma représentant ; <i>D. gracilis</i> (A), fruit de <i>D. gracilis</i> (B) et Fruit de <i>C. montanum</i> (C).....	19
Figure 9: Photo de <i>Carum montanum</i> .....	20
Figure 10 : Photo de <i>Daucus gracilis</i> .....	20
Figure 11 : Montage d'hydrodistillation de type Clevenger.....	23
Figure 12: Technique de diffusion sur gélose par disques.....	25
Figure 13: Technique de macro-dilution sur milieu solide.....	26
Figure 14: Technique de macro-dilution en milieu liquide.....	27
Figure 15 : Technique des micro-atmosphères.....	29
Figure 16: Test de l'activité antioxydante.....	31
Figure 17 : Pourcentages des différentes familles chimiques dans l'HE de <i>C. montanum</i> .....	37
Figure 18 : Pourcentages des différentes familles chimiques dans l'HE de <i>D. gracilis</i> .....	39
Figure 19: Structures chimiques du Nothoapiole .....	39
Figure 20 : Mise en évidence des interactions entre les deux HE et entre chaque HE et la Gentamicine.....	49
Figure 21: Déterminations des CMI des huiles essentielles.....	51
Figure 22 : Courbes de la mort cellulaire en fonction du temps.....	53
Figure 24 : Le pourcentage de la lyse bactérienne en fonction du temps.....	55
Figure 24 : Détermination des valeurs des QMI des huiles essentielles.....	56
Figure 25 : Courbes de l'activité antioxydante des HE et celle de la référence.....	58
Figure 26 : Courbes de l'activité antioxydante des extraits bruts et des références.....	60
Figure 27: Effet antioxydant des combinaisons des HE et des combinaisons des extraits bruts comparées aux ...références	62
Figure 28: Pouvoir réducteur des HE comparé à celui BHT.....	63
Figure 29 : Pouvoir réducteur des extraits bruts comparé à celui du BHT.....	65
Figure 30 : Activité anti-hémolytique des extraits bruts en fonction des concentrations .....	66
Figure 31 : Activité anti-inflammatoire des extraits bruts .....	67

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau</b>	<b>Page</b>
Tableau 1 : distribution géographique mondiale des Apiacées.....	16
Tableau 2 : Propriétés pharmacologiques de quelques Apiacées.....	17
Tableau 3 : Souches microbiennes utilisées dans le test antimicrobien.....	21
Tableau 4 : Variations des rendements des HE de quelques espèces d'Apiacées en fonction de plusieurs facteurs	35
Tableau 5 : composition chimique de e l'huile essentielle de <i>Carum montanum</i> par CPG/SM.....	36
Tableau 6 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Daucus gracilis</i> par CPG/SM.....	38
Tableau 7 : Dosage des polyphénols totaux dans les extraits bruts.....	41
Tableau 8 : diamètres d'inhibition en mm des l'HE .....	43
Tableau 9 : diamètres d'inhibition en mm du Nothoapiole .....	44
Tableau 10 : Effet des HE sur les champignons.....	46
Tableau 11 : Activité antimicrobiennes des extraits bruts.....	47
Tableau 12 : Valeurs des activités antioxydantes des deux HE.....	57
Tableau 13 : Valeurs des activités antioxydantes des deux extraits bruts.....	59
Tableau 14 : Valeurs des IC <sub>50</sub> des combinaisons des HE et des combinaisons des Extraits méthanoliques .....	61

## SOMMAIRE

	Page
Résumé .....	I
Liste des abréviations .....	IV
Liste des figures .....	V
Liste des tableaux .....	VI

INTRODUCTION.....	01
-------------------	----

### 1-REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I-SUBSTANCES BIOACTIVES.....</b>	<b>03</b>
I-1- LES SUBSTANCES D'ORIGINE VEGETALE.....	03
I-1- 1- LES HUILES ESSENTIELLES (HE) .....	03
I-1- 1- 1- ROLE DANS LA NATURE.....	03
I-1- 1- 2- EXTRACTION.....	03
I-1- 1- 3- COMPOSITION.....	04
I-1- 1- 4 -REPARTITION ET LOCALISATION.....	05
I-1- 2- LES COMPOSES PHENOLIQUES.....	07
I-1- 2- 1- LES PHENOLS SIMPLES ET LES ACIDES PHENIQUES .....	07
I-1- 2- 2- LES FLAVONOÏDES .....	07
I-1- 2- 3- LES QUINONES .....	80
I-2- 2- 4-LES TANNINS.....	08
I-2- 2- 5-LES COUMARINES.....	08
I-2- MECANISMES D' ACTIONS DES SUBSTANCES PHYTO-BIOACTIVES.....	08
I-2- 1- EFFET ANTIMICROBIEN.....	08
I-2- 2- LE STRESS OXYDANT.....	10
I-2- 3- EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE.....	12
I-3- LES ANTIBIOTIQUES .....	13
I-3- 1- CARACTERISTIQUES .....	13
I-3- 2- LA RESISTANCE AUX AGENTS ANTIMICROBIENS.....	14
I-3- 2-1- MECANISMES DE RESISTANCE.....	14
I-3- 2-2- L'UTILISATION DES PLANTES CONTRE LA RESISTANCE.....	15
<b>II-LES APIACEES.....</b>	<b>16</b>
II-1- DISTRIBUTION.....	16
II-2- MORPHOLOGIE.....	16
II-3- PHYTOCHIMIE.....	16
II-4- PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES.....	17
II-5- <i>Carum montanum</i> .....	18
II-5-1- SYSTEMATIQUE .....	18
II-6- <i>Daucus gracilis</i> .....	18
II-6-1- SYSTEMATIQUE .....	18

### 2-PARTIE PRATIQUE

<b>III- MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>20</b>
III- 1- MATERIEL VEGETAL.....	20
III- 2- MATERIEL DU TESTE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE.....	20
III- 2-1-SOUCHES MICROBIENNES.....	20
III- 2- 2-MILIEUX DE CULTURE .....	21
III- 3 - EXTRACTIONS DES HE.....	21
III- 3- 1- ANALYSE DES HE.....	22
III- 3- 2- PURIFICATION DU COMPOSE MAJORITAIRE.....	23
III- 4- PREPARATION DES EXTRAITS BRUTS.....	23
III- 4- 1- DOSAGE DES COMPOSES POLYPHENOLIQUES .....	23
III- 5- L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE PAR CONTACT DIRECT.....	24
III- 5-1- METHODE DE DIFFUSION.....	24
III- 5-1- 1- INTERACTIONS ENTRE LES HE ET LA GENTAMICINE.....	25
III- 5-2- DETERMINATION DES CMI.....	25
III- 5-2- 1- MACRO-DILUTION EN MILIEU SOLIDE.....	25
III- 5-2- 2- MACRO-DILUTION EN MILIEU LIQUIDE.....	27
III- 5-2- 3- MICRO-DILUTION EN MILIEU LIQUIDE.....	27
III- 5- 3- COURBE DE BACTERICIDIE .....	28
III- 5- 4- EXPERIENCE DE LA LYSE CELLULAIRE.....	28
III- 6- L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE PAR CONTACT INDIRECT.....	28
III- 7- ACTIVITE ANTIOXYDANTE.....	29
III- 7- 1- TEST DU DPPH.....	29
III- 7- 1-1- DES HUILES ESSENTIELLES ET DES EXTRAITS BRUTS.....	29
III- 7- 1-3- EFFET ANTIOXYDANT DES COMBINAISONS.....	30
III- 7- 2- TEST DU POUVOIR REDUCTEUR.....	31
III- 8- ACTIVITE ANTI-HEMOLYTIQUE.....	31
III- 9- ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE.....	32
III- 10- ANALYSES STATISTIQUES.....	32
<b>IV-RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>32</b>
IV- 1- RESULTATS DES EXTRACTIONS.....	32
IV- 1- 1- LES HUILES ESSENTIELLES.....	32
IV- 1- 1-1-RENDEMENT .....	32
IV- 1-1-2- ETUDE PHYTOCHIMIQUE DES HE.....	34
IV- 1-1- 3- PURIFICATION DU NOTHOAPIOLE.....	39
IV- 1- 2- LES EXTRAITS BRUTS.....	40
IV- 1- 2- 1- RENDEMENT.....	40
IV- 1- 2- 1- DOSAGE DES POLYPHENOLS.....	40
IV- 2 - ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE .....	41
IV- 2 -1- TEST DE DIFFUSION SUR GELOSE.....	41
IV- 2 -1-1- LES HUILES ESSENTIELLES.....	41
IV- 2 -1-2- LE NOTHOAPIOLE.....	44
IV- 2 -1-3- EFFET SUR LES CHAMPIGNONS.....	45
IV- 2 -1-4- LES EXTRAITS BRUTS.....	46
IV- 2 -1-5- MISE EN EVIDENCE DES INTERACTIONS .....	47
IV- 2- 2- DETERMINATION DES CMI.....	50
IV- 2- 2- 1-MACRO-DILUTION EN MILIEU SOLIDE.....	50
IV- 2- 2- 2- MACRO-DILUTION EN MILIEU LIQUIDE.....	50
IV- 2- 2- 3-MICRO-DILUTION EN MILIEU LIQUIDE.....	51
IV- 2- 3- DYNAMIQUE D'ACTION DES HE .....	52

IV- 2- 4- EXPERIENCE DE LA LYSE CELLULAIRE.....	54
IV- 2- 5- TECHNIQUE DES MICRO-ATMOSPHERES.....	56
IV- 3 - ACTIVITE ANTI-OXYDANTE.....	57
IV- 3 -1- TEST DU DPPH TEST DU DPPH.....	57
IV- 3 -1- 1-HUILES ESSENTIELLES.....	57
IV- 3 -1- 2-EXTRAITS BRUTS.....	59
IV- 3 -1- 3-EFFET ANTIOXYDANT DES COMBINAISONS.....	60
IV- 3 -1- 3-1-HUILES ESSENTIELLES.....	60
IV- 3 -1- 3-2-EXTRAITS BRUTS.....	61
IV- 3 -2- TEST DU POUVOIR REDUCTEUR.....	62
IV- 3 -2-1- HUILES ESSENTIELLES.....	62
IV- 3 -2- 2-EXTRAIT BRUTS.....	63
IV- 4 - ACTIVITE ANTI-HEMOLYTIQUE.....	65
IV- 5 - ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE.....	66
<b>V- CONCLUSION.....</b>	<b>68</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>70</b>
<b>ANNEXE</b>	

## INTRODUCTION

La médecine traditionnelle existe depuis toujours : elle est la somme totale des connaissances, des compétences et des pratiques qui reposent, rationnellement ou non, sur les théories, les croyances et les expériences propres à une culture et qui sont utilisées pour maintenir les êtres humains en bonne santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, traiter et guérir des maladies physiques ou mentales (OMS, 2000). Grâce à la nouvelle attraction pour les produits naturels, certains produits d'origine végétale sont devenus des alternatives efficaces ou des compléments à des composés synthétiques de l'industrie chimique, sans aboutir aux effets secondaires manifestés par ces derniers (Bakkali *et al.*, 2008).

Le terme «produits naturels» couvre une gamme très vaste et diversifiée de composés chimiques issus et isolés à partir d'une source biologique, ces produits peuvent être ; soit des organismes entiers (par exemple, une plante, un animal, ou un micro-organisme) qui n'a pas été soumis à tout type de traitement autre qu'un simple processus de conservation (par exemple le séchage), soit une partie d'un organisme (par exemple, les feuilles ou les fleurs d'une plante ou un organe animal isolé), soit un extrait d'un organisme ou d'une partie d'un organisme, et des exsudats ou bien des composés purs (par exemple, des alcaloïdes, des coumarines, des flavonoïdes, des glycosides... etc.) isolés à partir de plantes, d'animaux ou de microorganismes (Sarker *et al.*, 2006).

La lutte contre la résistance des micro-organismes aux antibiotiques et les espèces réactifs à l'oxygène (ROS) présentent un vrai défi pour les chercheurs, ce qui a fait orienter les recherches vers l'exploitation des substances végétales bioactives, ces dernières montrent de plus en plus, des capacités significatives concernant leurs pouvoirs biologiques totalement ou presque exemptes d'effets secondaires.

Notre travail est concerné par cet axe général, et dans le but d'exploiter les propriétés biologiques des plantes de la flore algérienne, nous avons essayé d'évaluer ces propriétés chez deux espèces végétales appartenant à la famille des Apiacées à savoir *Carum montanum* provenant de Sétif et *Daucus gracilis* provenant de Skikda.

Pour atteindre ce but, nous avons procédé en plusieurs étapes ;

- L'extraction des huiles essentielles (HE)
- La préparation des extraits bruts (Eb).
- L'analyse phytochimique des HE
- Le dosage des polyphénols dans les Eb.

- L'évaluation Qualitative et quantitative de l'activité antimicrobienne des huiles et des extraits par différentes techniques sur une panoplie de souches bactériennes et fongiques.
- L'estimation de l'effet antioxydant des He et des Eb par différentes techniques ensuite l'estimation de ce pouvoir chez les combinaisons des deux HE et des deux Eb.
- La mise en évidence du pouvoir anti hémolytique et du pouvoir anti-inflammatoire des Eb *in vitro*.

Le manuscrit est divisé en deux parties : une revue bibliographique, contenant les notions principales sur les substances bioactives d'origine végétale et la présentation des deux plantes étudiées ainsi que leurs systématiques et une partie expérimentale qui présente les techniques étudiées pour la valorisation des extraits de ces deux plantes pour différentes activités biologiques suivie par les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

## **I-SUBSTANCES BIOACTIVES**

### **I-1-LES SUBSTANCES D'ORIGINE VEGETALE**

Malgré les progrès en chimie de synthèse, les plantes restent une source importante de composés pharmaceutiques. Une grande partie de la population mondiale a recours aux plantes pour des soins de santé primaires. La recherche de nouveaux principes actifs fait ressortir une grande diversité de structures chimiques ayant des activités biologiques potentielles. Ainsi, les microbiologistes cliniciens ont deux raisons d'être intéressés par le sujet des extraits végétaux à effet antimicrobien ; tout d'abord, il est très probable que ces composés phytochimiques trouveront leur chemin dans l'arsenal de médicaments prescrits par les médecins ; deuxièmement, le public est de plus en plus conscient des problèmes de l'utilisation abusive des antibiotiques traditionnels menant aux différentes formes de résistance (**Cowan, 1999**).

Les plantes ont une capacité presque illimitée de synthétiser des métabolites secondaires, au moins 12 000 ont été isolés. Dans de nombreux cas, ces substances servent de mécanismes de défense des plantes contre la prédation par les micro-organismes, les insectes et les herbivores. Certains, comme les terpènes, donnent aux plantes leurs odeurs, d'autres (quinones et des tanins) sont responsables de pigments végétaux. De nombreux composés sont responsables de la saveur de la plante (par exemple les terpènes du piment) (**Cowan ; 1999**). Les substances phytochimiques à effets biologiques notables peuvent être divisées en plusieurs catégories ;

#### **I-1-1- LES HUILES ESSENTIELLES (HE)**

Les HE, appelées aussi huiles volatiles, sont des liquides huileux obtenus par les végétaux (fleurs, tiges, feuilles, bois, bourgeons, liège, fruits et racines). Elles peuvent être obtenues par expression, fermentation, enfleurage ou extraction mais la méthode la plus utilisée pour la production commerciale est la distillation par la vapeur d'abord développée au moyen âge par les Arabes (**Burt, 2004; Bakkali et al., 2008**).

##### **I-1-1-1- ROLE DANS LA NATURE**

Selon certains, les HE jouent un rôle important dans la protection des plantes en tant qu'antibactériennes, antivirales, antifongiques, insecticides et jouent aussi bien un rôle contre les herbivores en réduisant leur appétit donc de repousser les indésirables (**Bakkali et al., 2008**). Elles peuvent également attirer certains insectes pour favoriser la dispersion de pollens et de graines, et constituent une défense chimique contre les prédateurs (animaux et parasites) et les maladies (**Teixeira da Silva, 2004**).

### **I-1-1- 2- EXTRACTION**

Il existe plusieurs méthodes pour l'extraction des HE. Celles-ci peuvent inclure la distillation en utilisant de l'eau bouillante et la vapeur chaude, l'utilisation du dioxyde de carbone liquide et l'utilisation des micro-ondes.

Le type d'extraction est choisi en fonction de la fin de l'utilisation, l'extraction par distillation à la vapeur ou par expression, par exemple pour les agrumes, est préférée. Pour les utilisations en parfumerie, l'extraction avec des solvants lipophiles et parfois avec le dioxyde de carbone est favorisée. Ainsi, le profil chimique des HE varie en nombre de molécules extraites (**Bakkali et al., 2008**).

D'une façon générale, le temps de distillation affecte la composition de l'HE dans la mesure où l'hydro-diffusion des composés volatils présents dans les tissus végétaux à travers les parois cellulaires constitue l'étape limitante du processus. Le mélange HE-eau est refroidi dans un condenseur ; la séparation se fait le plus souvent par simple décantation dans un vase florentin. Des vitesses d'entraînement 3 à 5 fois supérieures sont atteintes par hydrodistillation accélérée, par suite de l'accélération de l'hydro-diffusion obtenue après dilacération et broyage de la matière végétale en phase liquide. La qualité du produit s'en trouve améliorée par suite de la réduction des temps de séjour ; par ailleurs, l'agitation mécanique liée au broyage entraîne une amélioration des échanges thermiques. Enfin, il est possible de procéder à un traitement enzymatique à l'aide de cellulase en vue d'augmenter le rendement (**Crouzet, 1998**).

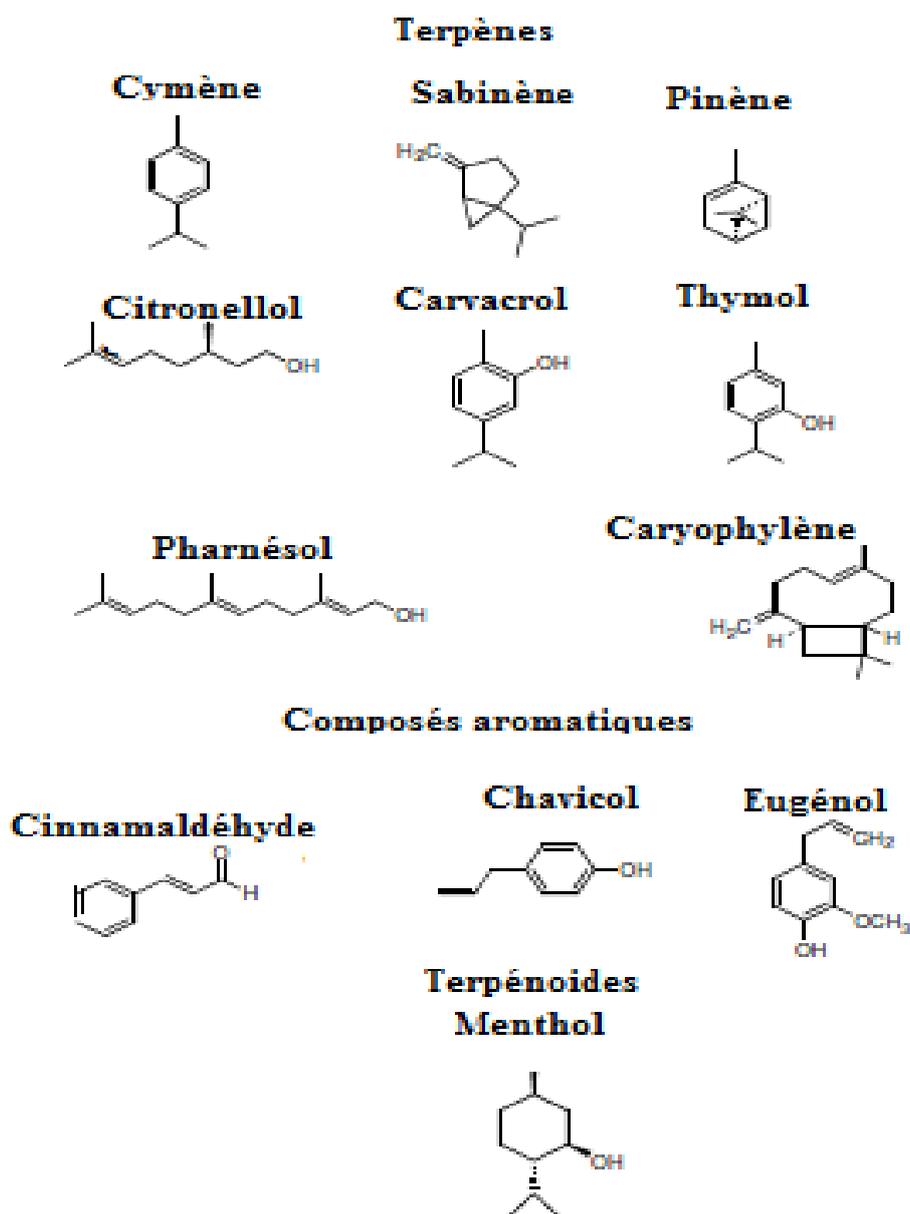
Cependant, plusieurs inconvénients sont à énumérer par ces techniques ; le rendement faible, les pertes des composés volatils, le temps d'extraction long et la toxicité des solvants. L'extraction par fluide supercritique (SFE) est une technique intéressante pour l'extraction de composés aromatiques à partir des matières végétales. Elle peut constituer une alternative aux procédés d'extraction par les solvants et la distillation à la vapeur. Néanmoins, le processus SFE, dans de nombreux cas ne permet pas une extraction sélective en raison de l'extraction simultanée de nombreux composés indésirables. La SFE suivie d'une séparation fractionnée de l'extrait en plusieurs séparateurs de phase, permet de surmonter ces limitations et produit des HE de haute qualité (**Khajeh et al., 2004**).

### **I-1-1-3- COMPOSITION**

Les HE peuvent être constitués d'un nombre élevé de composés variés appartenant aux différentes classes chimiques. Les terpènes et les phénylpropanoïdes forment les principaux constituants des HE. En outre, quelques constituants aromatiques et aliphatiques sont également présents. Les monoterpènes, les sesquiterpènes et les dérivés oxygénés représentent la plus grande partie d'entités chimiques présentes dans les HE (**Raut and Karuppayil, 2014**). Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une HE, la composition de cette dernière peut varier selon sa

localisation, par exemple l'HE de la fleur l'orange amère et celle de la feuille et des fruits donnent deux compositions différentes (**Bruneton, 1999**). La composition chimique peut également varier en fonction du mode de préparation et de la durée de conservation. Cette variation de la composition a des conséquences importantes sur le plan thérapeutique et nécessite une procédure de contrôle adaptée (**Ghestem et al., 2001**).

Les HE présentent des structures et des fonctions chimiques très diverses. Il n'est pas rare de reconnaître par les moyens de l'analyse instrumentale moderne (chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) plusieurs dizaines voire une ou deux centaines et parfois plus de constituants dans une HE. Ainsi l'HE de Rose Bulgare est riche de plus de 300 constituants connus. Par contre, certaines HE sont très riches en un constituant donné, c'est le cas de l'HE de Bois de Rose du Brésil riche en linalol mais aussi celui des HE de Citronnelle riches en citral, des HE de Badiane, d'Anis vert et de Fenouil doux et amer riches en anéthol, l'HE d'*Eucalyptus globulus* est riche en cinéole, etc. Mais plus souvent, les HE sont plus complexes dans leur composition chimique (**Garnero, 1996**).

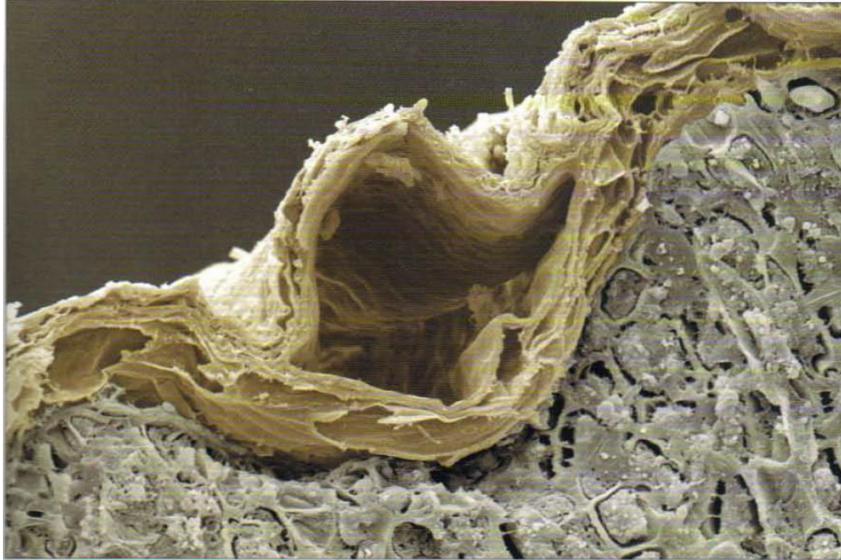


**Figure 1 : Quelques structures des composés des huiles essentielles (Bakkali *et al.*, 2008)**

#### **I-1-1-4- REPARTITION ET LOCALISATION**

Les HE ne se trouvent presque que chez les végétaux supérieurs dans un nombre limité de familles qui en sont particulièrement riches, par exemple chez les Myrtacées, les Lauracées, les Astéracées, les Apiacées, les Rutacées et les Lamiacées. Toutefois on peut les trouver dans tous les organes végétaux: fleurs (Bergamotier), feuilles (Eucalyptus, Laurier), racines (Vétiver), écorces (Cannelier), fruits (Anis, Agrumes, Badiane), graines (Muscade), rhizomes (Gingembre) et bois (Bois de Rose), mais leurs compositions varient selon cette localisation (Bruneton, 1999; Ghestem *et al.*, 2001). L'ambre gris (du Cachalot), le castoréum (du Castor) et le musc (du Chevrotin) sont, également, des substances odorantes et huileuses de provenance animales (Osmothèque, 2015), sont utilisées en parfumerie en parallèle avec les HE.

Les éléments sécréteurs peuvent se trouver dans tous les organes végétaux végétatifs ou reproducteurs et il arrive que dans une même plante, plusieurs organes contiennent les éléments sécréteurs (**Belaiche, 1979**).

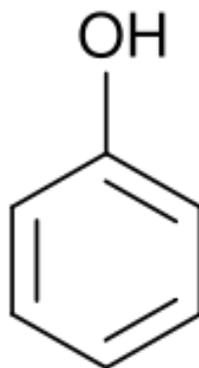


**Figure 2 : Micrographie montrant le détail d'un canal sécréteur dans la graine de *Carum carvi* (Svoboda et Svoboda, 2000)**

La synthèse et la localisation des HE sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées (**Figure 2**), souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante: des cellules sécrétrices, des poches sécrétrices, des canaux sécréteurs ou des poils sécréteurs (**Bruneton, 1999**).

### **I-1-2- LES COMPOSES PHENOLIQUES**

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances. L'élément structural fondamentale qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est lié directement au moins un groupe hydroxyle (**Figure 3**), libre ou engagé dans une autre fonction (éther, ester, hétéroside...etc.) (**Bruneton, 1999**). Le phénol est le composé de base de ce groupe et les dérivés portant plusieurs cycles sont appelés les polyphénols.



**Figure 3 : Structure de la molécule phénol**

Les phénols sont anti-inflammatoires, antiallergiques, anti-inflammatoires, antimicrobiens, anti-thrombotiques, cardio-protecteurs et vasodilatateurs (**Ksouri et al., 2008**). On suppose que les plantes en les produisant, cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes phytophages. Les acides phénoliques comme les acides rosmariniques sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales. La Gaulthérie (*Gaultheria procumbens*) et le saule blanc (*Salix alba*) contiennent des acides phénoliques qui donnent par distillation des dérivés de l'acide salicylique ; le précurseur de l'aspirine (**Patrick, 2003; Iserin, 2001**).

#### **I-1-2-1- LES PHENOLS SIMPLES ET LES ACIDES PHENIQUES**

Certains des plus simples composés phytochimiques bioactifs sont constitués d'un seul anneau phénolique. Structurellement, les composés phénoliques comportent un noyau aromatique portant un ou plusieurs groupes hydroxyles substitués et vont de la molécule phénolique simple à des composés hautement polymérisés (**Ksouri et al., 2008**).

#### **I-1-2-2- LES FLAVONOÏDES**

Les flavonoïdes sont des pigments polyphénoliques presque toujours hydrosolubles qui contribuent, entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaunes ou en blanc. Ils ont un champ d'action important et possèdent de nombreuses vertus médicinales (**Iserin, 2001**).

Un des rôles de la couleur, due aux flavonoïdes chez les plantes, est d'attirer les insectes et cela afin de déclencher la fécondation, de les charger de pollen ou de graines de façon à en assurer la dissémination nécessaire à la reproduction de l'espèce. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent également jouer un rôle dans la protection de ces plantes (**Cowan, 1999**).

Le monde animal est lui aussi très concerné par les flavonoïdes. On trouve par exemple de la chrysin, de la quercétine et de la galangine dans la propolis des abeilles. Ces insectes la fabriquent à partir des sécrétions des bourgeons de nombreux arbres (le Bouleau, le Sapin, le Saule et l'Orme) et la modifient par leurs enzymes salivaires. Les abeilles mettent instinctivement en œuvre les propriétés antifongiques et antibactériennes des polyphénols pour aseptiser leurs ruches et pour en colmater les fentes. Les propriétés cicatrisantes et anti-infectieuses de la propolis étaient entre autre utilisées par les civilisations égyptienne, romaine, grecque et inca (**Bruneton, 1999**).

#### **I-1-2-3- LES QUINONES**

Ils sont omniprésents dans la nature et sont hautement réactifs. Ces composés, étant colorés, sont responsables de la réaction de brunissement des fruits (coupés ou blessés) et des légumes. Leur présence dans le henné donne ses propriétés de teinture.

Les quinones sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques. Il y a plus de 1200 quinones chez les Angiospermes, les Gymnospermes, les

champignons, les lichens et très rarement chez les fougères. Ces molécules se trouvent, également, dans le règne animal, en particulier chez les Arthropodes et les Echinodermes (**Cowan, 1999**).

#### **I-2-2-4- LES TANINS**

Les tannins sont des composés polyphénoliques qui contractent les tissus en liant les protéines et en les précipitant, d'où leur emploi pour « tanner » les peaux. Ils permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Les tanins ont des couleurs qui vont du blanc jaunâtre au brun et foncent à la lumière. Ils possèdent une légère odeur caractéristique et sont astringents. Ils se dissolvent dans l'eau, l'acétone et l'alcool. On les trouve, pratiquement, dans tous les végétaux, mais ils sont particulièrement abondants chez les Conifères, les Fagacées et les Rosacées. Ils peuvent être présents dans toutes leurs parties (écorces, racines, feuilles, etc.) et ils sont caractérisés par leur astringence (sensation de dessèchement en bouche). Par exemple, les pépins de raisins sont très chargés en tanins (**Ghestem et al., 2001**).

#### **I-2-2-5-LES COUMARINES**

Les coumarines sont des lactones des acides cinnamiques. Ils sont largement distribués dans tous le règne végétal et possèdent des propriétés très diverses. Les coumarines du Mélilot et du Marronnier d'Inde contribuent à fluidifier le sang (anti-thrombotiques) et les furanocoumarines comme le bergaptène, contenu dans le Céleri, soignent les affections cutanées (**Iserin, 2001**).

Les coumarines sont dotées de propriétés anti-inflammatoires, vasodilatatrices, oestrogéniques et antivirales (**Cowan, 1999**). Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et dans des solvants organiques tels que le dioxyde d'éthyle ou les solvants chlorés avec lesquels on peut les extraire (**Bruneton, 1999**).

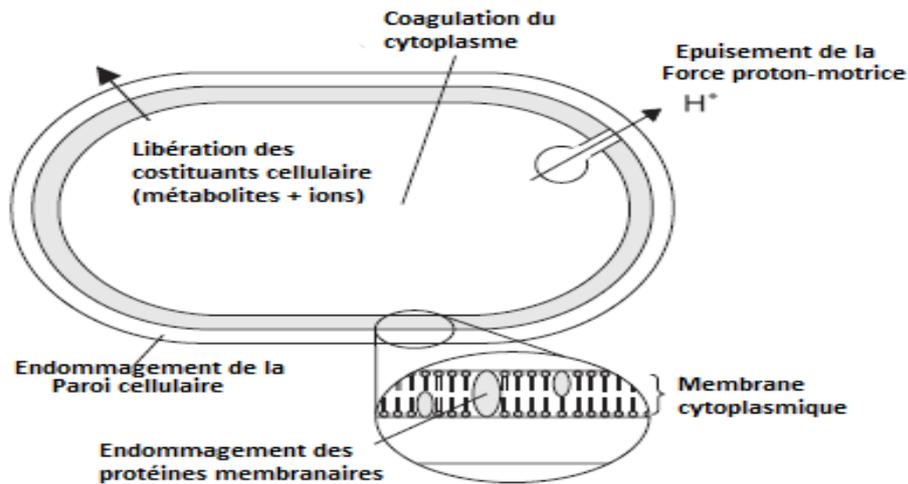
### **I-2- MECANISMES D' ACTIONS DES SUBSTANCES PHYTO-BIOACTIVES**

#### **I-2-1- EFFET ANTIMICROBIEN**

Bien que les propriétés antimicrobiennes des HE et de leurs composants aient été connus au passé, le mécanisme d'action n'a pas été étudié en détail. Compte tenu du grand nombre de composés chimiques présents dans les HE, il est fort possible que leur activité antibactérienne n'est pas attribuable à un mécanisme spécifique mais qu'il existe plusieurs cibles dans la cellule. Ces mécanismes ne sont pas tous indépendants, certains se produisent à la suite des autres (**Burt, 2004**).

Une caractéristique importante des HE est le caractère hydrophobe de leurs composants, ce qui leur permet la diffusion dans les lipides de la membrane cellulaire des bactéries et des mitochondries (**Figure 4**), perturbant ainsi leurs structures et les rendant plus perméables. Il peut se produire un flux des ions et d'autres contenus cellulaires ce qui conduit à la mort cellulaire.

Les composants des HE semblent également agir sur les protéines membranaires comme les ATP-ases qui sont situées dans la membrane cytoplasmique et bordées par des molécules de lipide. Les hydrocarbures cycliques pourraient agir sur ces derniers, s'accumuler dans la bicouche lipidique et fausser les interactions protéine-lipide.



**Figure 4 : Sites et mécanismes d'action des composants des HE sur les bactéries (Burt, 2004)**

Des études avec *Bacillus cereus* ont montré que le carvacrol interagit avec la membrane cellulaire, où il se dissout dans la bicouche phospholipidique et est supposé pour s'aligner entre les chaînes d'acides gras. Cette déformation de la structure physique causerait l'expansion et la déstabilisation de la membrane, augmentant ainsi la fluidité membranaire, qui à son tour augmente la perméabilité passive. Il est donc présumé que le taux de synthèse d'ATP a été réduit ou que la vitesse hydrolyse d'ATP a été augmenté (Burt, 2004).

Cependant, les champignons pathogènes (étant des eucaryotes) ont des similitudes avec leurs hôtes, à la fois aux niveaux cellulaire et moléculaire. Par conséquent, les champignons sont des cibles difficiles à atteindre. Il ya des options limitées de médicaments disponibles pour la chimiothérapie antifongique. Plusieurs champignons pathogènes se sont révélés sensibles aux HE. Leurs effets varient en fonction des organismes cibles et de l'huile testée. La croissance et la production de l'aflatoxine d'*A. flavus* est empêchée par des HE d'origine végétale. L'huile de Citronnelle est l'une des huiles les plus efficaces contre les champignons filamenteux. L'agent principal pathogène de l'homme, *C. albicans*, est inhibé par les terpènes (Raut et Karuppayil, 2014). Ces activités peuvent être dues à l'inhibition de l'ergostérol de la membrane et des voies de signalisation impliquées dans les levures. L'Eugénol, le Thymol et le Carvacrol induisent la perte d'ions et l'inhibition de *S. cerevisiae*. Les anomalies de la fluidité membranaire entraînent la fuite du contenu cytoplasmique et la perte de la viabilité des champignons. Par exemple, la perméabilité de la membrane et l'activité de la chaîne respiratoire dans les cellules de *C. albicans* sont empêchées en présence de l'HE du thé ce qui entraîne la mort cellulaire. La membrane mitochondriale, rendue perméable, par un traitement aux HE, conduit à l'apoptose et la nécrose cellulaires (Raut et Karuppayil, 2014).

Les sites et les nombres de groupes hydroxyle sur le groupe de phénol sont considérés responsables de leur toxicité aux micro-organismes. De plus, certains auteurs ont constaté que plus

fortement le phénol est oxydé plus il est inhibiteur. Le mécanisme pensé pour être responsable de la toxicité phénolique pour les micro-organismes inclue l'inhibition des enzymes par les composés oxydés, ainsi que plus d'interactions non spécifiques avec les protéines. Les composés phénoliques possédant une chaîne latérale en C<sub>3</sub> à niveau d'oxydation moindre et ceux ne contenant pas d'oxygène sont classés comme HE et souvent cités comme antimicrobiens ainsi l'eugénol est un représentant bien caractérisé se trouve dans l'huile de clou de girofle. L'eugénol est considéré comme bactériostatique contre les champignons et les bactéries. Les plantes communes comme l'Estragon et le Thym contiennent tous les deux l'acide caféique, qui est efficace contre les virus, les bactéries, et les champignons. Le catéchol et le pyrogallol sont toxiques pour les micro-organismes. (**Cowan, 1999**).

En plus de fournir une source de radicaux libres stables, les quinones sont connues pour complexer de manière irréversible avec les acides aminés dans les protéines, ce qui conduit souvent à une inactivation de la protéine et la perte de sa fonction. Pour cette raison, le potentiel d'effets antimicrobiens est grand. Les cibles probables dans la cellule microbienne sont les adhésines, les polypeptides de la paroi et les enzymes liées à la membrane (**Cowan, 1999**). Il a été rapporté, également, que les coumarines agissent sur *Candida albicans*. Les acides hydroxycinnamiques, liés à des coumarines, semblent avoir un effet inhibant des bactéries Gram-positif. En outre, les phytoalexines, qui sont dérivés de coumarines, sont produites dans les carottes en réponse à une infection fongique et peut être présumé avoir activité antifongique (**Cowan, 1999**).

### **I-2-2- LE STRESS OXYDANT**

Le stress oxydant survient lorsqu'il y'a un déséquilibre dans le taux des oxydants et des anti-oxydants dans un système biologique donné, et cela arrive s'il y'a :

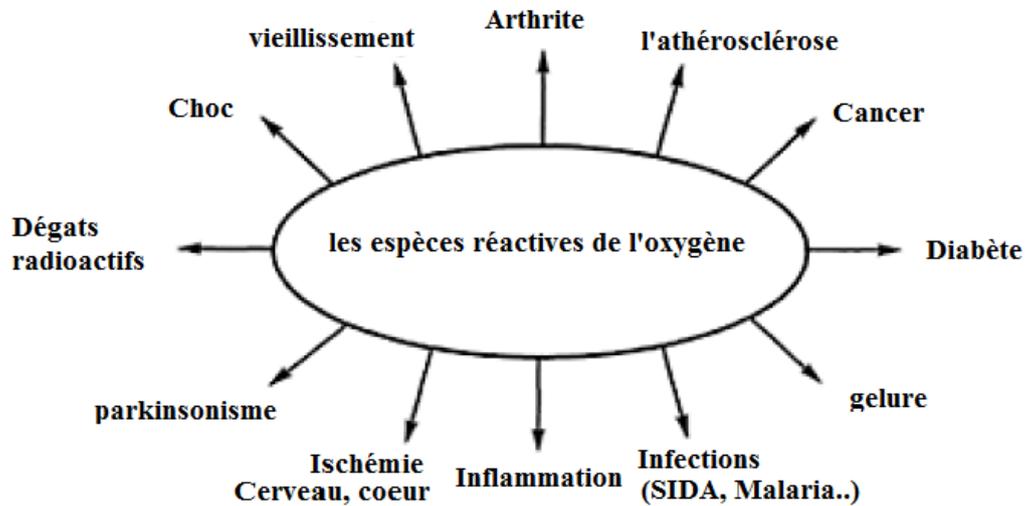
- Un déficit nutritionnel en antioxydants
- Une surproduction endogène d'agents pro-oxydants
- Une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (médicaments, radiations ionisantes)

#### **I-2-2-1- EFFET ANTIOXYDANT**

La recherche de nouveaux antioxydants à partir de matières végétales a pris une très grande attention cette dernière décennie. De nombreux groupes de recherche mettent leur accent sur l'extraction d'antioxydants des plantes et des sous-produits agro-industriels et de mettre ce sujet à l'avant-garde de la recherche. L'utilisation des extraits du thé dans les produits alimentaires comme les yaourts et dans les cosmétiques a été largement popularisé (**Franco et al., 2008**).

Les antioxydants peuvent inhiber ou retarder l'oxydation des substrats oxydables et cela semble être très important dans la prévention du stress oxydatif qui est considéré comme la cause

principale de nombreuses maladies (**Figure 5**). En raison des effets secondaires indésirables tels que la toxicité et la cancérogénicité des additifs synthétiques, l'intérêt a considérablement augmenté pour trouver des antioxydants d'origine naturelle appropriés pour une utilisation dans les denrées alimentaires et / ou en médecine (**Bamoniri et al., 2010**).



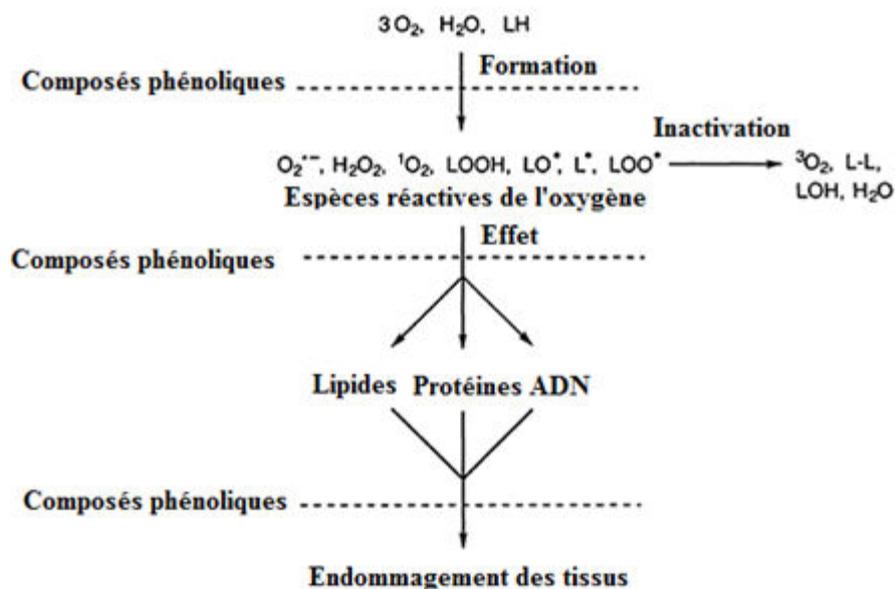
**Figure 5 : Maladies et dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène (Shahidi et Naczki, 2006).**

Pratiquement, plusieurs HE ont été étudiés pour leur efficacité antioxydante et leur capacité à réduire les pourritures de fruits. L'HE de *Carum nigrum* (cumin noir) et son oléorésine étaient capables de piéger les radicaux libres DPPH avec un effet de 41-71 % et 50-80 %, respectivement. Ceci peut être comparé avec l'efficacité du BHT. Cependant, cette activité ne pouvait être observée qu'en utilisant une concentration élevée de l'HE et son oléorésine. Une bonne activité antioxydante a été évaluée également par d'autres tests: le dosage de l'acide linoléique a montré que l'HE était capable de diminuer le taux du peroxyde au cours de la période d'incubation (**Baser et Buchbauer, 2010**).

L'effet antioxydant est dû à la présence de groupes hydroxyle dans leurs structures chimiques. Plusieurs composés non volatils tels que le carnosol, la quercétine, l'acide caféique et l'acide rosmarinique sont bien connus pour être de bons capteurs de radicaux libres, mais certains composés volatils d'HE possèdent également le potentiel de conserver les aliments. Un certain nombre d'études sur les activités antioxydantes des HE de diverses plantes aromatiques ont indiqué que l'HE d'Origan, riche en thymol et en carvacrol, a un effet antioxydant considérable sur le procédé de l'oxydation (**Kulisic et al., 2004**). **Mohammedi et Atik (2012)**, ont conclu que l'HE de *Lavandula stoechas* peut être employé comme antioxydant vue sa liposolubilité et donc il serait intéressant d'envisager l'utilisation de cette huile pour protéger les silos de céréales contre une dégradation par les champignons contaminants au cours de leur conservation.

Les polyphénols et les acides phénoliques, de leur tour, sont des antioxydants principaux et puissants, les phénols existant dans *D. carota* sont l'acide chlorogénique, l'acide caféique et

l'acide p-hydroxybenzoïque avec de nombreux dérivés de l'acide cinnamique. Les caroténoïdes des légumes ont reçu une grande attention puisqu'ils sont liés à des propriétés antioxydantes importantes (Goncalves *et al.*, 2010 ; Ksouri *et al.*, 2008).



**Figure 6 : Effet des espèces réactives à l'oxygène dans les maladies et rôle préventif des polyphénols (Shahidi et Nacz, 2006)**

### I-2-3- EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE

L'inflammation est un symptôme très fréquent de nombreuses maladies chroniques. C'est une réponse protectrice normale à une lésion tissulaire causée par agent microbien, un traumatisme physique ou un agent chimique nocif. L'inflammation est une tentative de protection par le corps à éliminer les stimulants nuisibles ainsi que lancer le processus de guérison pour le tissu. Les médicaments anti-inflammatoires sont couramment utilisés pour la gestion des états inflammatoires, mais ceux-ci sont associés à de nombreux effets secondaires indésirables tels que l'irritation gastrique, l'ulcère...etc. Les plantes médicinales utilisées dans la médecine traditionnelle pour traiter les cas d'inflammations semblent être une alternative fiable et logique à la recherche d'agents anti-inflammatoires sûr et efficace. Il est bien connu que la dénaturation des protéines tissulaires conduit à des maladies inflammatoires et des arthritiques. Les produits naturels qui peuvent empêcher la dénaturation des protéines seront donc utiles pour le développement de la thérapie anti-inflammatoire (Alhakmani *et al.*, 2013).

Les plantes constituent une source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet d'études scientifiques rigoureuses pour leur éventuelle utilisation comme alternative, particulièrement pour la protection contre la peroxydation lipidique et le traitement des maladies anti-inflammatoires (Bourkhis *et al.*, 2010).

### I-3- LES ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques sont des substances chimiques employées pour le traitement des maladies, ces agents tuent les microorganismes pathogènes en inhibant leur développement à des concentrations suffisamment faibles pour éviter d'occasionner des dommages chez l'hôte, la plupart de ces agents sont des produits microbiens ou leurs dérivés. Ils peuvent être d'origine non microbienne tels que les sulfamides qui sont synthétiques (Yala *et al.*, 2001).

Les antibiotiques utilisés sont produits par les micro-organismes pour assurer leur propre vie par le phénomène de compétition (Hancock, 2005).

Les antifongiques inhibant ou tuant les mycètes sont toxiques pour l'être humain, du fait que les cellules fongiques sont eucaryotes donc semblables aux cellules humaines. Les agents antifongiques agissent fréquemment par extraction des stérols membranaires, ou par inhibition de la synthèse de ceux-ci ou encore par inhibition de la chitine synthase comme la Polyoxine D et la Nikomycine (Prescott *et al.*, 2003).

### **I-3-1- CARACTERISTIQUES**

Pour être efficace, un agent chimio-thérapeutique doit avoir une toxicité sélective; il doit tuer ou inhiber le germe pathogène en portant le moins possible préjudice à l'hôte. Une substance interrompant une fonction microbienne absente dans une cellule eucaryote, a souvent une toxicité sélective, par exemple la pénicilline inhibe la synthèse du peptidoglycane pariétale de la bactérie mais a peu d'effet sur les cellules hôtes car elles n'ont pas de peptidoglycane, mais comme les effets secondaires de ces agents peuvent être graves, ils doivent être administrés avec grande prudence (Prescott *et al.*, 2003).

Un agent bactéricide tue l'organisme cible, mais son activité dépend de la concentration et dans certains cas, aux faibles concentrations, il peut être seulement bactériostatique. L'effet d'un agent varie également selon l'espèce cible : un agent bactéricide pour une espèce peut être bactériostatique pour une autre. On peut avoir une idée sur l'efficacité des agents chimio-thérapeutiques contre un microorganisme en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI), c'est la concentration la plus faible d'un antibiotique capable d'empêcher le développement d'un microorganisme particulier. La concentration minimale bactéricide (CMB), ou létale (CML) est la concentration la plus faible capable de tuer les microorganismes. Une substance bactéricide détruit les microorganismes à des concentrations à peine 2 à 4 fois supérieure à la CMI, alors qu'un agent bactériostatique tue à des concentrations nettement supérieures (si elles peuvent être atteintes) (Prescott *et al.*, 2003).

### **I-3-2- LA RESISTANCE AUX AGENTS ANTIMICROBIENS**

Après un demi-siècle d'utilisation des antibiotiques, l'émergence et la dissémination de la résistance bactérienne à cette classe thérapeutique pose un problème de santé publique important. De nombreux facteurs en sont responsables, parmi lesquels la pression de sélection antibiotique et la transmission croisée de certaines espèces hospitalières, favorisent les infections à germes multi

résistants (**Bertrand *et al.*, 2005**). La chimiothérapie est devenue moins efficace et plus complexe suite à la propagation de plasmides de résistance aux antibiotiques (**Prescott *et al.*, 2003**).

### **I-3-2-1- MECANISMES DE RESISTANCE**

Le développement de la résistance aux antibiotiques peut être naturel ou acquis, ce qui peut être transmis au sein des espèces identiques ou différentes de bactéries. La résistance naturelle apparaît par mutation génétique spontanée alors que la résistance acquise se passe par le transfert de fragments d'ADN par exemple par des transposons d'une bactérie à l'autre (**Hemaiswary *et al.*, 2008**).

Les bactéries peuvent manifester une résistance à l'égard des substances antibactériennes par des mécanismes divers. Quelques espèces bactériennes sont résistantes à une classe des agents et dans quelques cas, toutes les souches de cette espèce sont résistantes à tous les membres de cette classe d'antibiotiques (**Guillemot et Leclercq, 2005**).

Le microorganisme peut acquérir des gènes qui codent pour des enzymes qui limitent l'accès des agents dans la cellule par la régulation des gènes codant les porines (une stratégie de résistance est de rejeter hors de la cellule, la substance qui vient d'y entrer) (**Pagès et Garnotel, 2003; Walsh et Amyes, 2004**)

De nombreuses bactéries pathogènes résistent à l'attaque en inactivant les antimicrobiens par des modifications chimiques, l'exemple le plus connu est l'hydrolyse du noyau  $\beta$ -lactame de nombreuses pénicillines par la pénicillinase. Les antimicrobiens sont également inactivés par l'addition de groupes chimiques, des organismes résistants peuvent phosphoryler ou acétyler les amino-glycosides et acétyler le chloramphénicol (**Yala *et al.*, 2001**). La résistance peut apparaître lorsque l'enzyme ou l'organite cible est modifié de façon à ne plus être sensible à cet agent, par exemple les entérocoques deviennent résistants à la vancomycine en modifiant la terminaison D-alanine D-alanine de leur peptidoglycane en D-alanine D-lactate, ce qui réduit d'une façon remarquable la fixation de l'antibiotique (**Yala *et al.*, 2001**).

Les bactéries résistantes peuvent soit utiliser une voie alternative pour éviter la séquence inhibée par l'agent, soit augmenter la production du métabolite cible. Certaines bactéries sont, par exemple, résistantes aux sulfamides simplement parce que, plutôt que le synthétiser elles-mêmes, elles utilisent de l'acide folique préformé provenant de leur environnement. D'autres souches accroissent leur vitesse de production de l'acide folique et contrecarrent ainsi l'inhibition due aux sulfamides (**Quincampoix et Mainardi, 2001**).

L'association à d'autres mécanismes de résistance (enzymes inactivatrices, efflux) est responsable du caractère souvent multi-résistant des souches nosocomiales (**Cloète, 2003**).

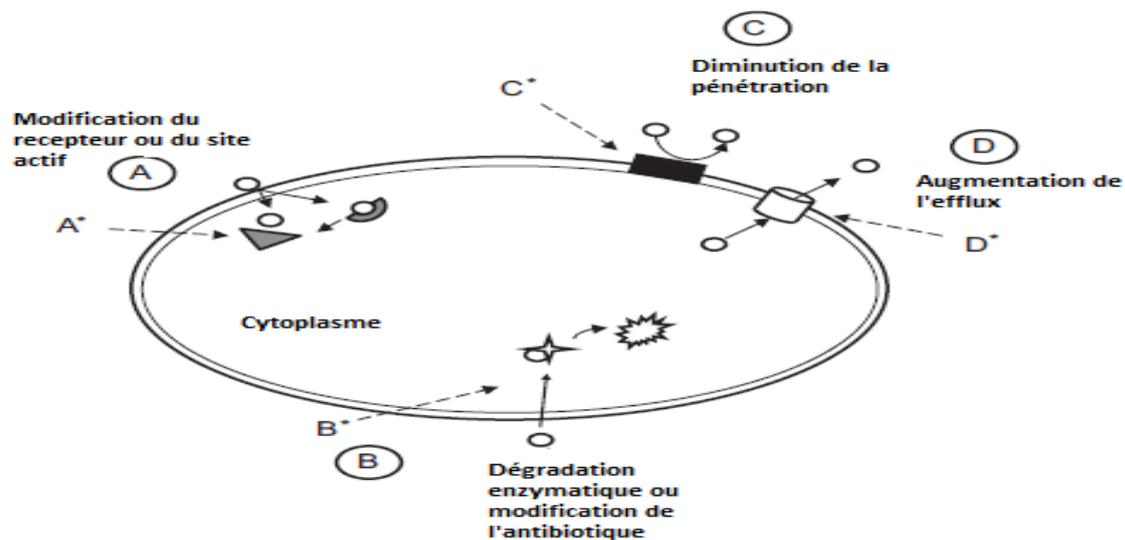
### **I-3-2-2- L'UTILISATION DES PLANTES CONTRE LA RESISTANCE**

Les métabolites secondaires de plantes sont de bonnes sources de thérapie de combinaison. comme le montre la (**Figure 6**), il existe une large gamme de produits phytochimiques qui agissent comme modificateurs ou élimineurs de résistance aux médicaments (**Hemaiswary *et al.*, 2008**).

Du moment que cette stratégie est largement utilisée par les plantes pour lutter contre les phyto-pathogènes, l'étude des interactions des extraits de plantes avec les antibiotiques est devenue l'une des nouveaux moyens de surmonter les mécanismes de résistance des bactéries et peut être, également, exploitée sur les animaux et l'être humain en choisissant les substances les moins toxiques aux doses les plus faibles.

En plus du problème de résistance aux agents antimicrobiens, il y'a plusieurs autres raisons de tester les combinaisons citant ;

- L'élargissement du spectre d'action dans les infections dues à plusieurs microorganismes lors des infections poly-bactériennes.
- L'ignorance des germes en cause.
- La recherche d'un effet synergique
- Limiter les risques de toxicité de certains antibiotiques en réduisant les doses de chacun



**Figure 7: Mécanismes d'action des molécules responsables de la multi-résistance et effets des métabolites secondaires (Hemaiswarya *et al.*, 2008).**

○ : Antibiotique, ◡ : Récepteur, ▽ : Récepteur modifié, □ : Pompe à efflux, ✨ : Enzyme, ✨ : Dégradation de l'antibiotique. A\* : les diterpènes agissent sur l'expression des protéines de liaison à la pénicilline, B\* : l'epigallocatechine gallate inhibe les β-lactamases, C\* : le thymol, le carvacrol et l'acide gallique augmentent la perméabilité de la membrane externe des bactéries, D\* : l'epigallocatechine gallate, le methoxyhydnocarpin, la reserpine, l'acide carnosique et les dérivés isopimarane inhibent les pompes à efflux (**Hemaiswary *et al.*, 2008**).

## II-LES APIACEES

C'est une famille très importante dans la Flore algérienne où elle est représentée par 55 genres. La détermination des espèces appartenant à cette famille est délicate et doit toujours porter sur des échantillons complets, présentant en particulier des fruits mûrs (**Quezel et Santa, 1963**).

Les espèces de cette famille ont une grande histoire dans l'utilisation médicinale, en revenant au passé à travers des milliers d'années, c'est pourquoi qu'elles sont encore très utilisées en médecine qu'en cuisine (*Anethum graveolens*, *Angelica archangelica*, *Apium graveolens*, *Carum carvi*, *Coriandrum sativum*, *Foeniculum vulgare*), quoique cette famille comprend aussi les espèces les plus toxiques du monde causant des problèmes digestifs, des intoxications neurologiques, allant jusqu'à la mort (*Cicuta maculata*, *Conium maculatum*) (Németh, 2006).

## II-1- DISTRIBUTION

Les espèces de la famille des Apiacées sont largement distribuées un peu partout dans le monde (Tableau 1), apparemment l'Asie est le centre de la biodiversité de cette famille. La famille est divisée en trois sous-familles ; Les Apioideae avec 250 genres, les Hydrocotyloideae avec 34 genres et les Saniculoideae avec 9 genres (Nemeth, 2006).

**Tableau 1 : distribution géographique mondiale des Apiacées (Pimenov et Leonov in Nemeth, 2006)**

Continent	Nombre de genres	Nombre de genres
Europe	139	29
Asie	265	159
Afrique	<b>126</b>	<b>50</b>
Australie	36	11
Amérique	197	52
Antarctique	02	00

## II-2- MORPHOLOGIE

Les Apiacées sont des arbustes ou plantes sous-frutescentes ou herbacées, très variables, à feuilles en général très divisées. Inflorescences ombelliformes. Fleurs de type 5, sépales en général très petits ou nuls, pétales libres, égaux ou parfois rayonnants, 5 étamines alternipétales. Ovaire infère, formé de 2 carpelles, un ovule par loge. Fruit constitué par un diakène. Vallécules pourvues de 1 ou plusieurs canaux sécréteurs (Quezel et Santa, 1963).

La plante porte de petites fleurs hermaphrodites ou unisexuelles. La famille peut être divisée selon la forme des cotylédons (Nemeth, 2006).

## II-3- PHYTOCHIMIE

Les Apiacées sont riches en métabolites, et surtout en huiles essentielles (HE). Ces métabolites sont sécrétés dans des canaux schizogènes dans tous les organes. Quelques molécules ont été identifiées la première fois dans des HE d'Apiacées, ainsi leur dénomination en était dépendante tel que le Carvone qui a été isolé au début dans l'HE de *Carum carvi* (Nemeth, 2006).

## II-4- PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES

La plupart des plantes de la famille des Apiacées à HE sont surtout des espèces destinées à l'alimentation et à l'industrie agro-alimentaire. En phytothérapie, on leur attribue principalement des propriétés digestives (Bruneton, 1999).

Les Apiacées possèdent un ensemble de composants à activités biologiques diversifiées (**Tableau 2**). Ces propriétés vont de l'induction de l'apoptose, aux activités antibactériennes, hépatoprotectrices, vaso-relaxantes et anti-tumorales (**Oroojalian et al., 2010**), Quelques molécules identifiées dans l'HE de quelques Apiacées ont montré un effet sur les contractions cardiaques (**Nemeth, 2006**). On a aussi déterminé des propriétés antioxydantes, anti-tumorales et anti-inflammatoires manifestées par les métabolites secondaires appartenant aux différents membres de cette famille (**Valente et al., 2015**). Le **tableau 2** récence quelques effets pharmacologiques rapportés dans la littérature chez les espèces les plus connues des Apiacées.

**Tableau 2 : Propriétés pharmacologiques de quelques espèces des Apiacées**

Espèces d'Apiacées	Propriétés pharmacologiques	Références
<i>Ammi visnaga</i>	Traiter l'asthme (HE)	<b>Khalfallah et al., 2011</b>
<i>Bunium persicum</i>	Stimulants, carminatives, traitement de la diarrhée et de la dyspepsie.	<b>Oroojalian et al. 2010</b>
<i>Carum copticum</i>	Diurétique, anti-vomissements, carminatives et antihelminthique, carminatif pour les enfants et un remède anti-choléra	
<i>Cuminum cyminum</i>	Guérir les maux d'estomac, la diarrhée et la dysenterie.	
<i>Daucus crinitus</i>	Expulser le placenta lors de l'accouchement, tonique et froideur.	<b>Bendiabdellah et al., 2013</b>
<i>Daucus spp</i>	Antibactérien, stimulant, antiseptique, carminative, diurétique, et anti-inflammatoires	<b>Abd Alla et al., 2013</b>
<i>Daucus carota</i>	Hypotenseur, diurétique, carminatif, stomachique et hypolipémiant, diurétiques et dépuratives.	<b>Bendahou et al., 2008</b>
<i>Anethum graveolens</i>	Contre les problèmes digestifs et apaise les coliques chez les nourrissons Traiter les maux d'estomac. réduire l'enflure, y compris les furoncles, et réduire les douleurs communes.	<b>Lawton, 2007</b>
<i>Apium graveolens</i>	traiter l'arthrite, la goutte, l'inflammation des voies urinaires et de l'insomnie, traiter les flatulences, les rhumatismes, la jaunisse, l'hydropisie, les ulcères de la bouche, les piqûres d'araignées venimeuses, et même l'hystérie et diurétique. traiter les plaies.	<b>Lawton, 2007</b>
<i>Carum carvi</i>	les troubles digestifs, augmenter la lactation chez les mères allaitantes.	<b>Lawton, 2007</b>
<i>Coriandrum sativum</i>	aphrodisiaque, aide à la digestion, et un stimulant de l'appétit. prévenir la variole, abaisse le cholestérol. Réputé pour ces fortes propriétés antibactériennes et fongicides.	<b>Lawton, 2007</b>

## II-5- *Carum montanum* Benth. et Hook

Plante des lieux humides salés ou non, à souche épaisse mais non ligneuse. Feuilles bipennatiséquées à lobes linéaires lancéolés. Tiges plus robustes, de 20-40 cm, fortement cannelées. Ombelles à pédoncules épais-cannelés. Fruits globuleux de 1-1,5 mm, cette espèce est appelée aussi

*Selinopsis foetida* Coss. Et Dur et *Carum foetidum* (Coss. et Dur.) Benth. et Hook (**Quezel et Santa, 1963**).

#### **II-5-1- SYSTEMATIQUE (Euro Med, 2013)**

Reigne : Plantae  
Division : Tracheophyta  
Subdivision : Spermatophytina  
Classe : Magnoliopsida  
Superordre : Asteranae  
Ordre : Apiales  
Famille : Apiaceae  
Genre : *Carum*  
Espèce : *Carum montanum*

#### **II-6- *Daucus gracilis* Stem.**

Plante annuelle à tiges jusqu'à 40 cm, debout, peu ramifiée, glabre. Feuilles, alternatives, glabre, les segments linéaires, aiguës. Ombelles longues pédonculées, contractées à la fructification. Fruit jaunâtre, 3,5 x 2 mm, nettement comprimé dorsalement; primaire crêtes discrets, avec deux rangées de simple court et poils étoilés, commissure largement espacés; crêtes secondaires avec une rangée d'épines, 1,5 à 2 fois plus long que la largeur du fruit, légèrement élargies à la base, faisceaux vasculaires très petits. Fruits hérissés de poils courts blanchâtres (**Quezel et Santa, 1963 ; Sáenz Laín, 1981**).

#### **II-6-1- SYSTEMATIQUE (EuroMed, 2013)**

Règne : Plantae  
Division : Tracheophyta  
Subdivision : Spermatophytina  
Classe : Magnoliopsida  
Superordre : Asteranae  
Ordre : Apiales  
Famille : Apiaceae  
Genre : *Daucus*  
Espèce : *Daucus gracilis*

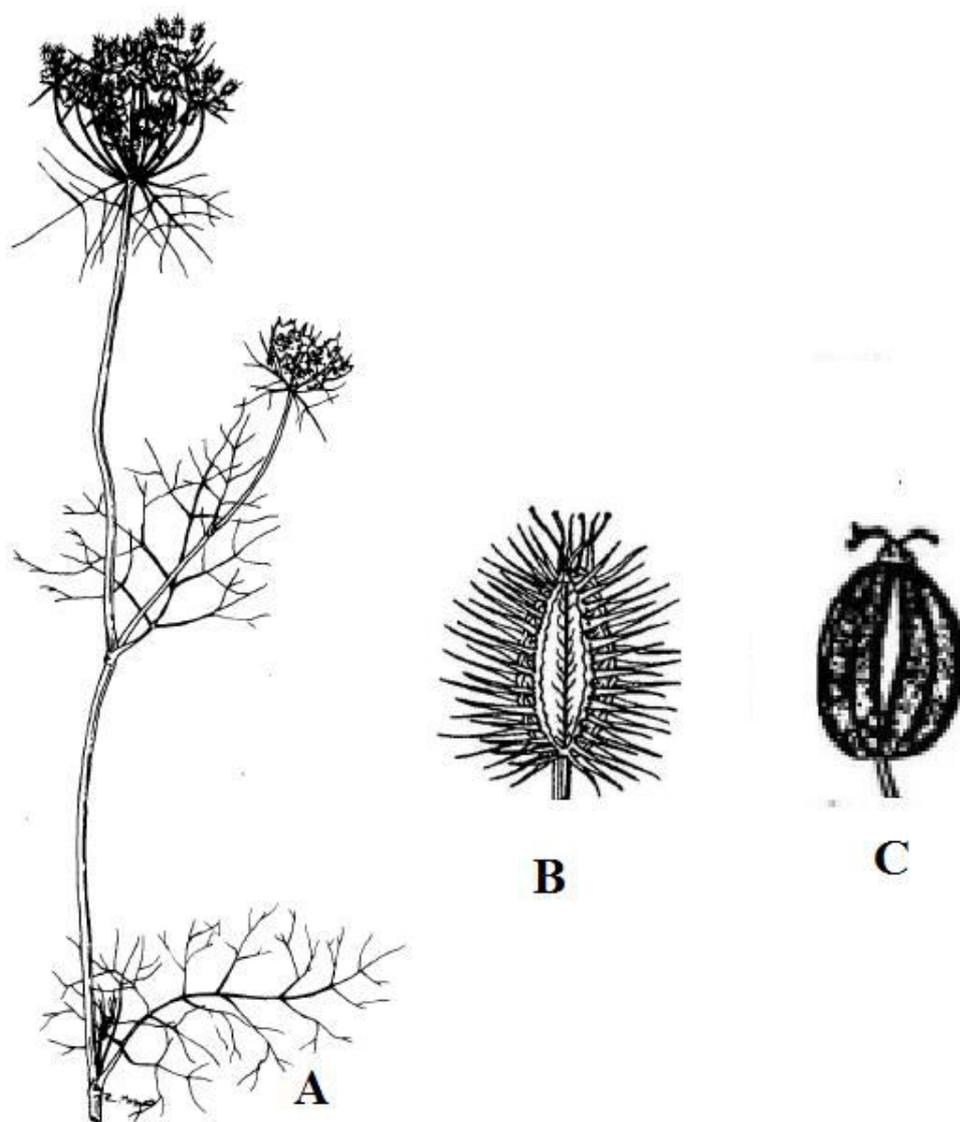


Figure 8 : Schéma représentant ; *D. gracilis* (A), fruit de *D. gracilis* (B) et Fruit de *C. montanum* (C) (Sáenz Laín, 1981).

### III- 1- MATERIEL VEGETAL

Les parties aériennes de *Carum montanum* ont été recueillies à Djebel Megress (situé à une vingtaine de kilomètres au nord-ouest du chef lieu de la wilaya de Sétif), à une altitude de 1500 m au dessus du niveau de la mer. Ensuite, Elles sont débarrassées des impuretés puis séchées à l'ombre à une température ambiante. La cueillette de *Daucus gracilis* a été réalisée à Djebel Felfla (Skikda) à 550 m d'altitude, puis la plante est traitée de la même façon. Les deux espèces ont été identifiées par le professeur Laouer Hocine, directeur du laboratoire de valorisation des substances naturelles biologiques.

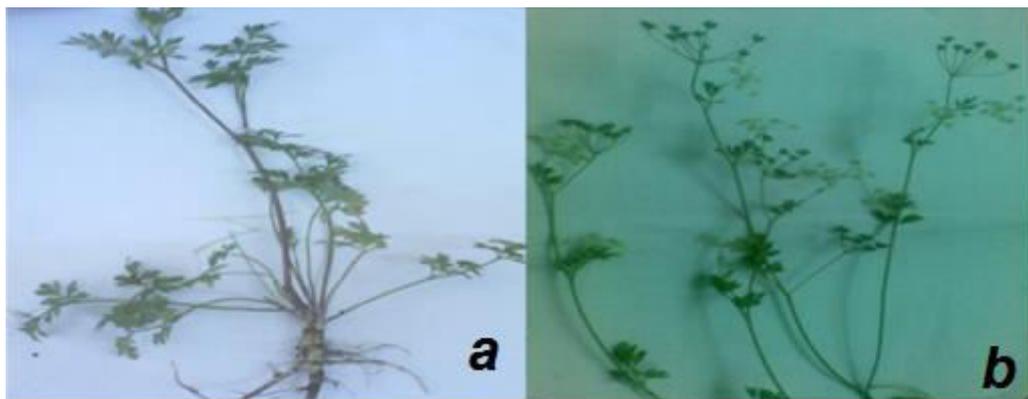


Figure 9 : Photo de *Carum montanum* prise après la cueillette ; a : avant la floraison, b : en floraison.

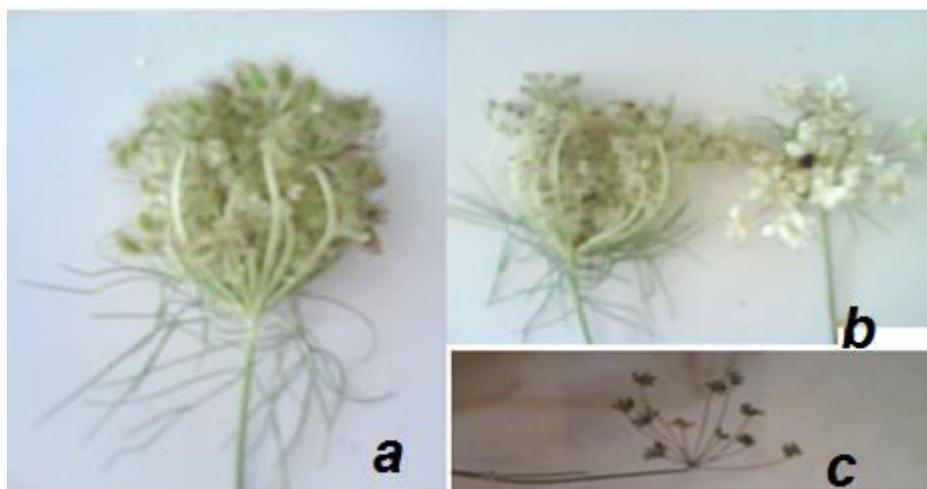


Figure 10 : Photo de *Daucus gracilis* prise après la cueillette; a : avant la floraison, b : pendant la floraison, c : fructification.

### III- 2- MATERIEL DU TESTE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

#### III- 2- 1- SOUCHES MICROBIENNES

L'activité antimicrobienne des HE ainsi que celle des extraits bruts ont été évalué sur 21 souches de référence ; 14 souches de l'American Type Culture Collection (ATCC) et une souche du Netherland Culture Collection of Bacteria (NCCB), 4 souches Collection de l'Institut Pasteur (CIP) ainsi que deux souches provenant de prélèvements fournis par Institut Pasteur de Paris (PV IPP). Quant aux souches fongiques, l'activité a été testé sur *Candida tropicalis* (ATCC 66029) qui

provient du National Museum of Natural History (NMNH) (Paris, France), ainsi que sur *Candida albicans* ATCC 1024, *Aspergillus niger* 2CA936 et *Aspergillus flavus* (Northern Regional Research Laboratory) NRRL 391 (**Tableau 3**).

### III- 2- 2-MILIEUX DE CULTURE

La culture des bactéries est réalisée en utilisant le milieu de culture Mueller-Hinton Agar (MHA) ainsi que d'autres milieux de culture, Bouillon Nutritif (BN) la gélose nutritive (G), Pour la culture des moisissures, le milieu utilisé est celui de Sabouraud Agar. Les milieux proviennent de Fluka et de l'Institut Pasteur d'Alger. Les réactifs chimiques utilisés proviennent de Sigma, Fluka, Merck, Prolabo et de Sanofi Diagnostic.

**Tableau 3 : Souches utilisées dans le test antimicrobien**

Souches microbiennes	Gram Bactéries	Origine	Code
<i>Escherichia coli</i>	-	ATCC	9738
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	ATCC	27853
<i>Escherichia coli</i>	-	ATCC	25922
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	ATCC	13311
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	ATCC	19606
<i>Citrobacter freundii</i>	-	ATCC	8090
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	ATCC	700603
<i>Proteus mirabilis</i>	-	ATCC	35659
<i>Bacillus cereus</i>	+	ATCC	10876
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	ATCC	49452
<i>Lysteria monocytogenes</i>	+	ATCC	15313
<i>Staphylococcus aureus</i> SARM	+	ATCC	43300
<i>Staphylococcus. aureus sub aureus</i>	+	ATCC	6538
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	ATCC	25923
<i>Bacillus subtilis</i>	+	NCCB	1090
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	PV IPP	14C1104
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	PV IPP	13C3104
<i>Staphylococcus epidermitis</i>	+	CIP	10464
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>Saprophyticus</i>	+	CIP	10464
<i>Staphylococcus simulans</i>	+	CIP	8164
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	+	CIP	103584
Souches fongiques			
<i>Candida tropicalis</i>		ATCC	66029
<i>Candida albicans</i>		ATCC	1024
<i>Aspergillus niger</i>		2CA	936
<i>Aspergillus flavus</i>		NRRL	391

ATCC : American Type Culture Collection, NCCB: Netherland Culture Collection of Bacteria, PVIPP: Prélèvements Institut Pasteur de Paris, CIP : Collection de l'Institut Pasteur, NRRL : Northern Regional Research Laboratory.

### III- 3 - EXTRACTIONS DES HE

Les HE sont obtenues par le procédé d'hydrodistillation en utilisant un dispositif d'extraction de type Clevenger (**Figure 11**).

L'hydrodistillation est basée sur l'entraînement des substances volatiles présentes dans les plantes, grâce à la vapeur d'eau. Une quantité, bien déterminée du matériel végétal (coupé en parties très fines), est portée à l'ébullition dans de l'eau distillée pendant 3 heures. Pendant l'ébullition, les cellules végétales s'éclatent et libèrent leurs contenus. La vapeur dégagée, chargée de l'eau et des HE, traverse un réfrigérant et se condensent. Enfin, deux phases se forment et par la différence de densités, les huiles se déposent au dessus de l'eau.

L'HE obtenue est séparée de la phase aqueuse à l'aide d'une aiguille d'une seringue. Les HE obtenues sont conservées dans des flacons opaques fermés hermétiquement à l'abri de la lumière et à une température de 4 à 6 °C. Le rendement est estimé en fonction de la masse totale du végétal sec.

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante traitée. Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$R = (P_{HE}/P_P) \times 100$$

Où : R : rendement en % ; P<sub>P</sub> : poids de la plante en g ; P<sub>HE</sub> : poids de l'huile en g.

### **III- 3- 1- ANALYSE DES HE**

La séparation, ensuite l'identification des constituants des HE ont été réalisées par la chromatographie en phase gazeuse (CPG/FID) et par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/MS) à colonne apolaire. Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un appareil (Agilent 6890N) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) couplé à un détecteur sélectif de masse quadripolaire (Agilent 5973 Network) qui fonctionne en mode impact d'électron à 70 eV. Le gaz chromatographe est équipé de deux colonnes capillaires de silice fondue HP-1(PDMS, de 50 m de longueur par 0.2 mm de diamètre et d'une épaisseur de 0.33 µm).

Les paramètres d'analyse sont les suivants : le gaz vecteur est l'hélium avec un flux de 1ml/min; la température du four a été programmée de 60 à 250°C/min et maintenue fixée pendant 40 min. La température de l'injecteur (mode split, rapport 1/100) est de 250°C. La température du détecteur à ionisation de flamme (FID) a été fixée à 250°C et, dans l'analyseur CG/SM, les températures de la source d'ion et de ligne de transfert sont de 170°C et 280°C respectivement.

Les constituants des HE sont identifiés par comparaison de leurs spectres de masse et leurs indices de rétention (RI) avec ceux des composés purs enregistrés dans la bibliothèque ou avec ceux de la base de données élaborée par le laboratoire à partir de composés authentiques (**Lilios *et al.*, 2007**).

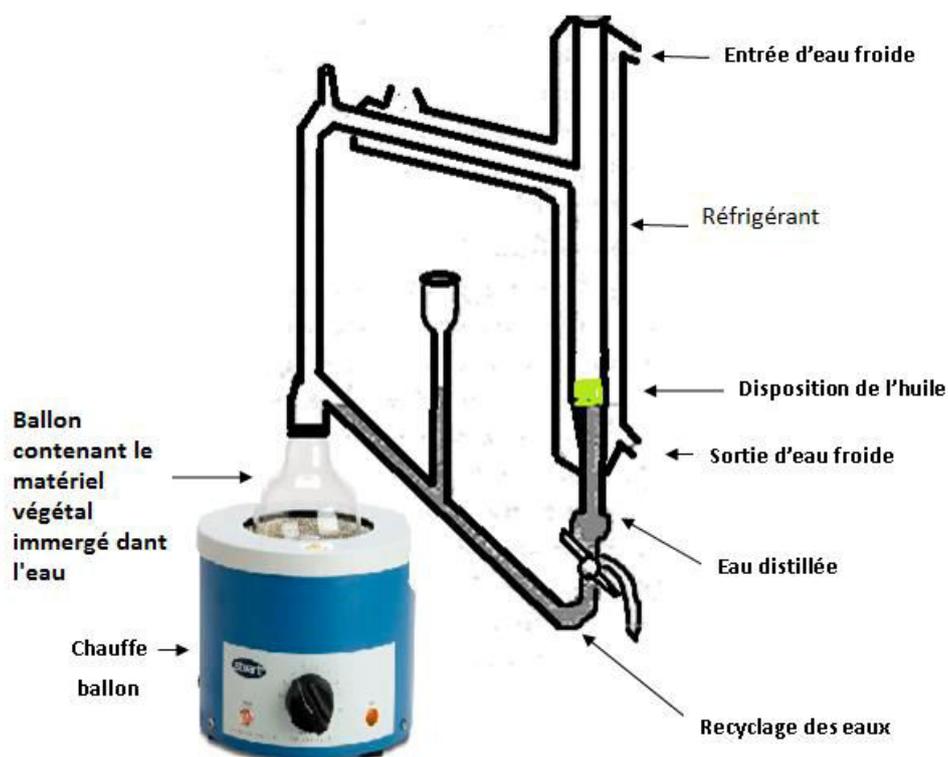


Figure 11 : Montage d'hydrodistillation de type Clevenger

### III- 3- 2- ISOLEMENT DU COMPOSE MAJORITAIRE

Le composé majoritaire apparu dans le profil de GC-MS de l'HE de *C. montanum* est purifié par une chromatographie successive sur colonne sur gel de silice, la phase mobile étant un mélange éther de petrol/diethyl ether, ce composant est ensuite identifié par SM et RMN et comparé avec les données spectrales bibliographiques.

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker WM 200 ou 500 MHz dans CDCl<sub>3</sub>. Les valeurs des déplacements chimiques sont indiquées en référence à la TMS et les constantes de couplage sont données en Hz. Les paramètres de la spectrométrie de masse sont les mêmes que ceux de l'analyse des HE (Laouer *et al.*, 2009).

### III- 4- PREPARATION DES EXTRAITS BRUTS

Les parties aériennes des deux espèces sont broyées et réduites en poudre, ensuite 20g de chaque espèce sont macérées dans 100 ml d'un mélange hydro-alcoolique méthanol/eau (1-10 v/v) à température ambiante pendant 72h. Après filtration par du papier filtre plusieurs fois, le méthanol et l'eau est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un évaporateur rotatif (BÜCHI), permettant ainsi d'obtenir l'extrait brut (Athamena *et al.*, 2010; Sourabie *et al.*, 2010).

#### III- 4- 1- DOSAGE DES COMPOSES POLYPHENOLIQUES

Du moment où les composés polyphénoliques sont toujours impliqués dans les activités biologiques des extraits végétaux bruts, nous avons estimé leur abondance dans nos extraits. La teneur en composés phénoliques des extraits est estimée selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007). Cette méthode est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) phospho-molybdique (MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) de réactif de Folin-Ciocalteu par les

groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleu. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. En fait, 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu est ajouté à 200 µl d'extrait ou la référence (préparé dans le méthanol ou l'eau distillée) avec des dilutions convenables. Après 4 min, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 765 nm. La teneur en polyphénols totaux est estimée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-160 µg/ml) et est exprimée en µg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.

### **III- 5- L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE PAR CONTACT DIRECT**

L'activité antimicrobienne des HE des deux espèces est réalisée selon deux techniques ; la technique de contact direct (méthode de diffusion sur gélose et méthode de dilution) ainsi que par la technique de contact indirect (micro-atmosphères).

#### **III- 5-1- METHODE DE DIFFUSION SUR AGAR**

C'est un criblage préalable qui vise à mettre en évidence une éventuelle activité antimicrobienne sans pour autant la quantifier. Le test est réalisé par la méthode de diffusion sur gélose (ou technique des disques), qui est la même que la technique de l'antibiogramme, mais en substituant les disques d'antibiotiques par des disques imprégnés par de l'HE ou de l'extrait à tester ; ce qu'on appelle l'aromatogramme.

Des testes positifs sont réalisés en parallèle avec les aromatoigrammes et des témoins négatifs qui ne contiennent que du DMSO ont été appliqués. Le choix des antibiotiques pour chaque souche microbienne est basé sur les directives du National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (**Rahal et al., 2008**).

Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h. Après l'incubation, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés autour de chaque disque (**Figure 12**). En ce qui concerne les champignons, des suspensions de cellules fongiques (levures) et de spores sont préparées à partir de cultures pures et jeunes, dans de l'eau physiologique stérile. Ces suspensions servent à ensemercer la gélose Sabouraud. Les géloses sont préparées au préalable dans des boîtes de Petri de 9 cm de diamètre, l'épaisseur de la gélose est de 4 mm. L'ensemencement des milieux se fait par écouvillonnage selon les recommandations de l'OMS (**Rahal et al., 2008**). L'incubation des champignons se fait à une température de 28°C alors que celle des levures se fait à 37°C pendant 48h à 7jours.

Une souche est dite :

- Sensible lorsque la zone d'inhibition est supérieur ou égale à 15mm.
- Limitée lorsque la zone d'inhibition est inférieure à 15mm.

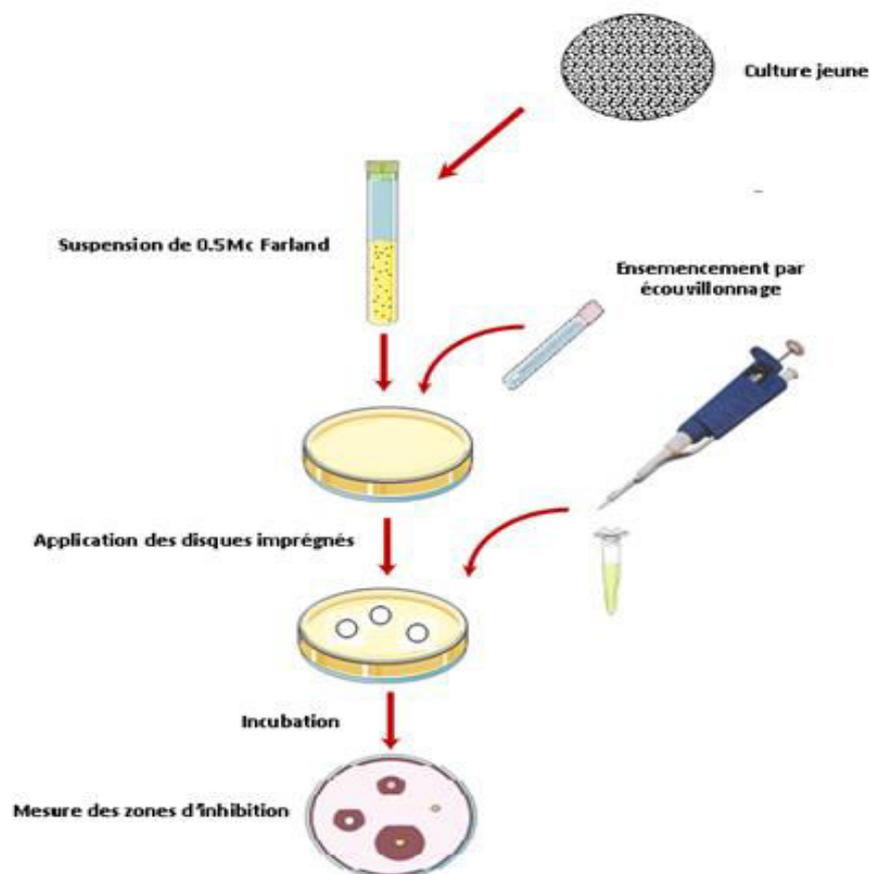
- Résistante ou bien l'extrait n'est pas efficace lorsque la zone d'inhibition est inexistante (**Rouibi et al. 2009**).

### III- 5-1-1- INTERACTIONS ENTRE LES HE ET LA GENTAMICINE

La méthode utilisée dans ce test est celle de **De Araujo et al. (2014)** avec de légères modifications. Les disques de gentamicine sont imprégnés avec 10 µl de la dilution de 50% de l'HE de chaque plantes. Ensuite, ces disques sont déposés sur la gélose ensemencée aux germes qui ont manifesté une sensibilité aux HE. De même, les disques vierges sont imprégnés de 10µl de chaque HE puis déposés sur la gélose ensemencée aux germes qui ont manifesté une sensibilité aux HE.

### III- 5-1-2- DETERMINATION DES CMI

Après la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de l'HE sur une souche sensible (zone d'inhibition  $\geq 15$ mm), on doit quantifier cette activité par plusieurs méthodes en déterminant les CMI (**C**oncentration **M**inimale **I**nhibitrice) des extraits qui correspondent à la plus faible concentration en extrait capable d'inhiber la croissance bactérienne. Cette technique consiste à inoculer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentrations décroissantes en extrait. Après incubation, l'observation de la gamme permet de déterminer les CMI.



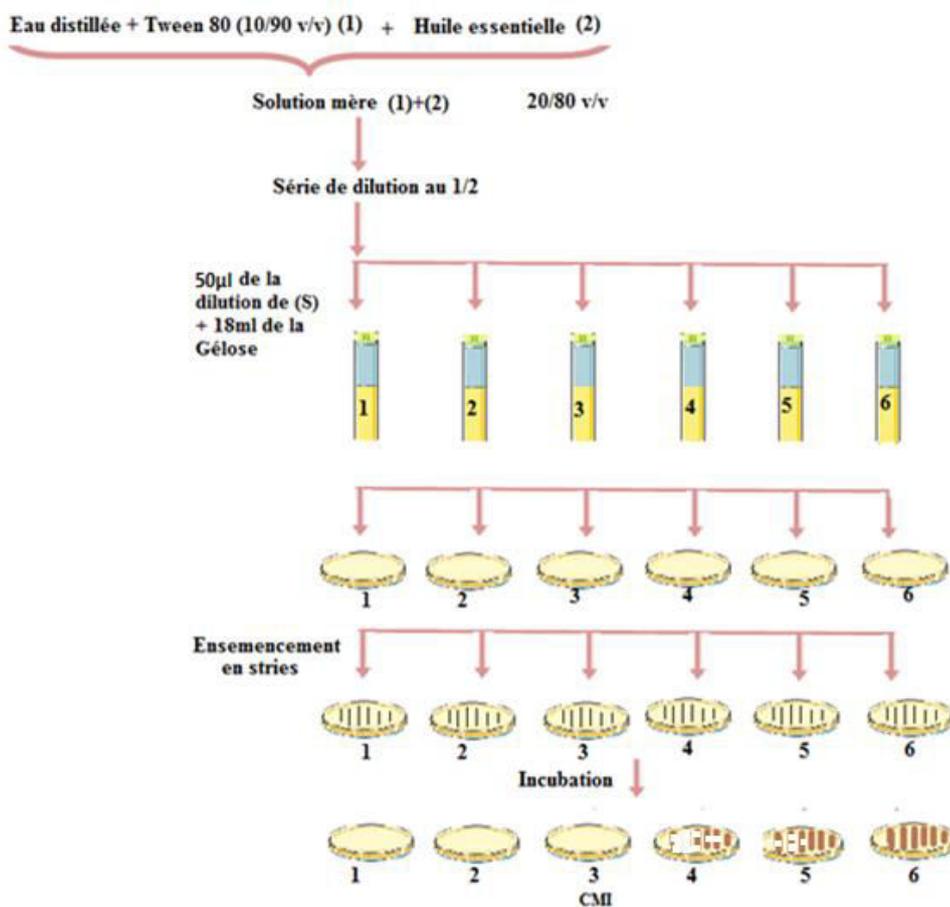
**Figure 12: Technique de diffusion sur gélose par disques**

### III- 5-2- 1-MACRO-DILUTION EN MILIEU SOLIDE

Cette méthode permet la détermination de la CMI à partir d'une gamme de concentration de l'HE dans un milieu de culture gélosé. Une solution stérilisée de Tween<sub>80</sub> à 10 % dans de l'eau

distillée est ajoutée à une quantité d'HE de façon à ce que le rapport HE/Tween soit de 80/20 (v/v). Le mélange est agité pendant 2 à 3 minutes pour disperser l'HE dans la solution mère S. Ensuite, une série de dilutions à base de deux sont faites pour obtenir la gamme de dilutions. Dans des tubes à essais contenant chacun 18 ml de milieu gélosé stérilisé et maintenu en surfusion à 50°C au bain Marie, on ajoute, aseptiquement, 50µl de la solution (S) ou de diverses dilutions (**Figure 13**). Après solidification du milieu, l'inoculation des géloses contenant l'HE ou non (témoin négatifs) est effectuée en surface. L'ensemencement en surface est réalisé à partir d'une suspension microbienne d'une densité de 0.5 Mc Farland (CLSI, 2012 ; Guinoiseau, 2010).

Après l'incubation des bactéries et des levures à 37°C et des moisissures à 27°C, on note pour chaque souche la CMI qui est la plus petite concentration pour laquelle aucun développement n'est visible. La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en HE capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial. Elle définit l'effet bactéricide d'un extrait. Pour la déterminer, la même gamme de concentration, réalisée par cette technique (macro-dilution), est utilisée. Des prélèvements sont effectués dans le tube témoin et dans chacun des tubes dépourvus de culot bactérien puis déposés en stries sur gélose MHA. Les boîtes ensemencées sont incubées 24 heures à 37°C. La CMB est déduite à partir de la première boîte dépourvue de bactéries.



**Figure 13: Technique de macro-dilution sur milieu solide**

### III- 5-2- 2-MACRO-DILUTION EN MILIEU LIQUIDE

Préparer un inoculum standardisé à 0.5 Mc Farland, ensuite le diluer dans un bouillon en vue que, la densité finale soit de  $5 \times 10^5$  UFC/ml. Ajouter 1 ml de l'inoculum ajusté à chaque tube contenant 1 ml d'extrait en série de dilution et mélanger.

Préparer un tube de contrôle positif ne contenant que du bouillon inoculé. La CMI est la concentration minimale d'extrait qui inhibe complètement la croissance des microorganismes dans les tubes, elle est présentée par le premier tube montrant un trouble et elle est détectée par l'œil nu (CLSI, 2012) (Figure 14).

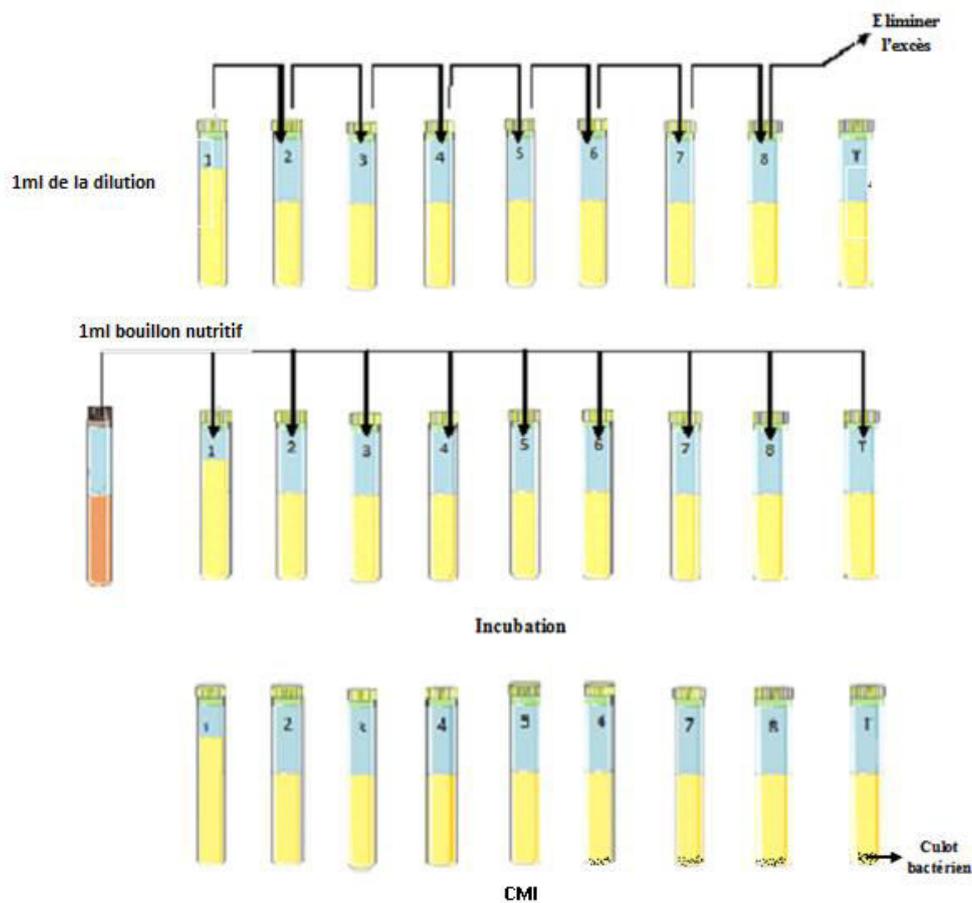


Figure 14: Technique de macro-dilution en milieu liquide

### III- 5-2- 3-MICRO-DILUTION EN MILIEU LIQUIDE

Cette méthode est conçue pour les petits volumes, elle est réalisée en préparant des solutions mères des extraits préparés dans le DMSO. Des séries de dilutions de 1/2 sont faites dans des microplaques de 96 puits. 100 µl de chaque dilution sont transférés dans les puits de la microplaque qui contiennent chacun 100 µl de BNensemencé ayant une densité microbienne de  $10^5$  cellules/ml de cultures jeunes de bactéries. La dernière ligne contenant seulement les dilutions en série de l'échantillon sans micro-organismes est utilisée comme témoin négatif. De l'eau distillée stérile et du milieuensemencé servent de témoin positif.

Incuber les plaques inoculées à 37°C pendant 16 à 20 h, la CMI est la concentration minimale d'extrait qui inhibe complètement la croissance des microorganismes dans les puits de micro-dilution telles que détectées par l'œil nu (CLSI, 2012).

### **III- 5- 3- COURBE DE BACTERICIDIE**

Cette méthode dite Time-kill Assay permet de caractériser l'activité antibactérienne d'une HE au cours du temps. Elle évalue la décroissance en nombre des bactéries, qui sont soumises à une concentration donnée en HE, sur plusieurs heures.

Une suspension standardisée à 0,5 Mc Farland et diluée au 1/20. Un ml de cet inoculum est déposé dans 9 ml de MHB-Tween 80 (0,01% v/v) en absence (témoin de croissance) ou en présence d'une concentration en extrait correspondant à la CMI en milieu liquide. Les suspensions ainsi obtenues contiennent environ  $5.10^5$  cellules/ml et sont maintenues sous agitation à 37°C. 100 µl de suspension sont prélevés à différents temps (0, 2, 4, 6, 8 et 24 heures) afin de procéder à un dénombrement sur gélose MHA après une incubation à 37°C pendant 24 heures. La quantification du nombre de colonies bactériennes est limitée à la valeur seuil de 200 UFC/ml.

Les résultats sont interprétés par une courbe de bactéricidie représentant les intervalles de temps sur l'axe des abscisses et le nombre de survivants sur l'axe des ordonnées (Schwalbe *et al.*, 2007; Guinoiseau, 2010).

### **III- 5- 4- EXPERIENCE DE LA LYE CELLULAIRE**

Cette méthode permet de déterminer une éventuelle action bactériolytique des HE par mesure de l'absorbance à 620 nm. En principe, une bactérie non lysée absorbe à 620 nm, il y aura donc bactériolyse si l'absorbance à 620 nm diminue au cours du temps.

Une suspension bactérienne jeune est standardisée à  $3.10^{10}$  UFC/ml ( $DO_{620} \sim 0.3$ ), déposée dans un tube stérile en absence (contrôle négatif) ou en présence d'HE à deux concentrations, l'une correspondant à la CMI et l'autre à 2 fois la CMI. Les suspensions obtenues sont soumises à agitation. Aux temps 0 s, 30 s, 30 min, 60 min, 90 min et 120 min, elles sont diluées au 1/100 et leur absorbance est mesurée à 620 nm.

Les résultats sont exprimés par le rapport de la  $DO_{620}$  à chaque intervalle de temps par rapport à la  $DO_{620}$  à  $t = 0$  min % (Carson *et al.*, 2002).

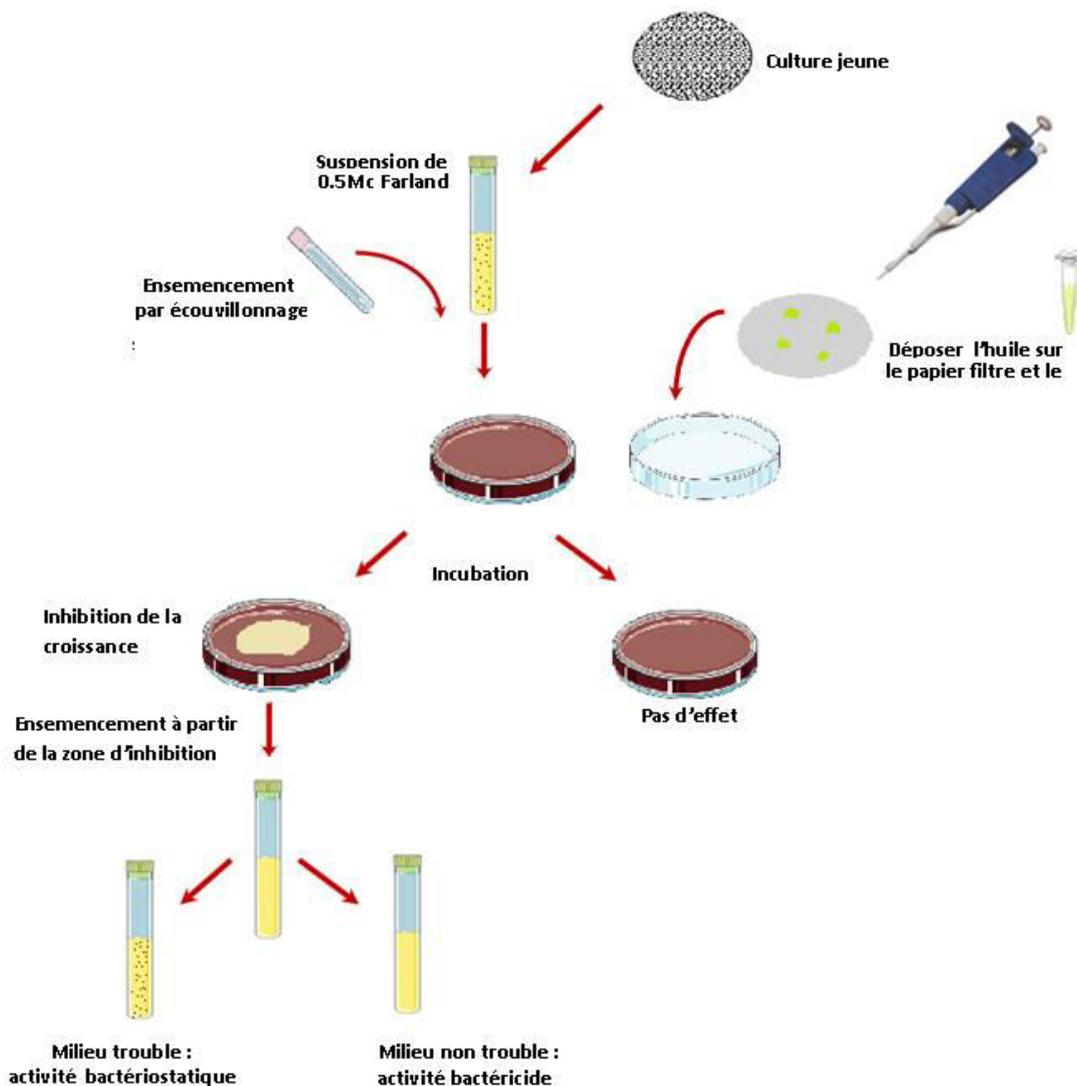
### **III- 6- L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE PAR CONTACT INDIRECT**

Cette technique permet d'exploiter la nature volatile des HE, donc d'étudier l'effet de la phase volatile des HE sur les microorganismes sans contact direct entre les deux. La méthode consiste à déposer un disque de papier filtre (de 9 cm de diamètre) imprégné d'une quantité bien définie de l'HE sous le couvercle d'une boîte de Pétri, sans que l'HE entre en contact direct avec la géloseensemencée. Si la vapeur de l'HE est active contre un microorganisme, sa vapeur induira l'inhibition de la croissance de l'inoculum.

Des boîtes de Pétri contenant du milieu MHA sontensemencées par écouvillonnage à partir d'une suspension bactérienne ou fongique d'une densité de 0.5 Mc Farland, du papier filtre de 9cm de diamètre stérilisé est placé au fond du couvercle de chaque boîte de Pétri. Juste avant la fermeture de la boîte l'huile est déposée à la surface du papier.

Pour chaque huile testée les dépôts sont de 0 (témoin), 10, 20, 40, et 80 µl. Les boîtes sont immédiatement fermées et incubées (**Figure 15**).

La croissance est observée pendant 7 jours. La quantité minimale inhibitrice (QMI) est définie comme la plus petite quantité d'HE pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin.



**Figure 15 : Technique des micro-atmosphères**

### III- 7- ACTIVITE ANTIOXYDANTE

#### III- 7- 1- TEST DU DPPH

##### III- 7- 1-1- DES HUILES ESSENTIELLES ET DES EXTRAITS BRUTS

Le radical DPPH (Diphenyl-2-picrylhydrazyl) absorbe à 517 nm et l'activité antioxydante peut être déterminée en surveillant la diminution de cette absorbance. Après avoir fait une gamme

d'essai pour estimer l'intervalle d'activité des HE et des extraits, on procède aux gammes de concentrations finales, pour cela, différentes concentrations d'une solution méthanolique ou de DMSO d'extraits ou d'huiles respectivement sont mélangées avec 1250µl d'une solution méthanolique du DPPH à 0.004 %. L'absorbance est mesurée à 517 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité (**Figure 16**).

Des antioxydants synthétiques ; la quercetine et le BHT sont utilisés comme témoins positifs. La capacité à piéger le radical DPPH est calculée comme suit :

$$\% \text{ d'activité antioxydante} = [(\text{Abs}_{517} \text{ contrôle} - \text{Abs}_{517} \text{ échantillon}) / \text{Abs}_{517} \text{ contrôle}] \times 100$$

(Singh *et al.*, 2006)

IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice de 50 %), aussi appelée EC<sub>50</sub> (*Efficient concentration 50*), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH, plus la CI<sub>50</sub> est petite plus l'antioxydant a une activité plus importante

Les IC<sub>50</sub> sont calculées à partir des courbes représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des extraits.

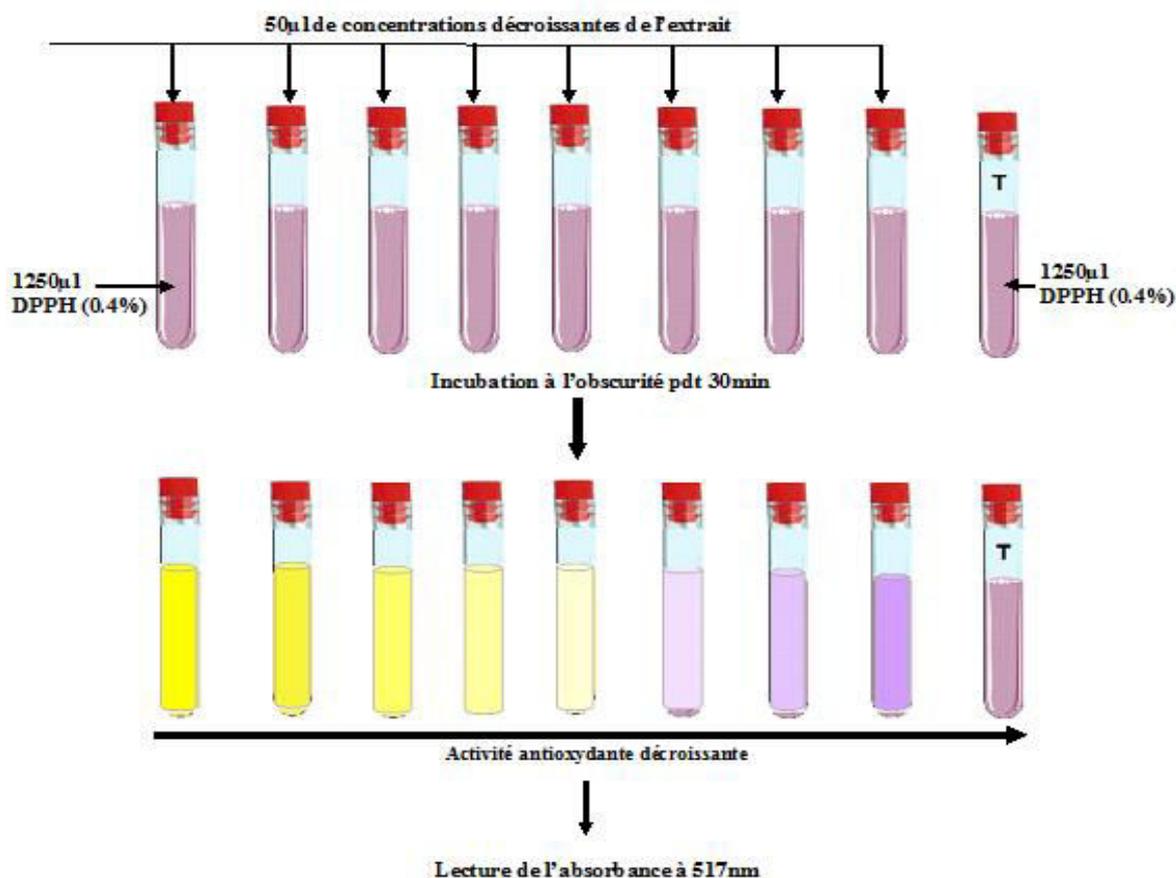
### III- 7- 1-3- EFFET ANTIOXYDANT DES COMBINAISONS

L'effet synergique/antagoniste des associations entre HE et entre extraits bruts a été estimé selon la méthode de **Peyrat-Maillard *et al.* (2001)**. Cette méthode fait intervenir et l'effet mesuré réellement du mélange et l'effet calculé pour chaque individu. Dans notre cas nous avons testé des quantités identiques pour chaque individu.

La détermination de l'activité antioxydante d'un mélange (**EM**) est définie en impliquant l'activité expérimentale du mélange (**AE**) et l'activité calculée (**AC**) exprimée par la somme des activités individuelles (chaque individu à son pourcentage dans le mélange). Elle est exprimée comme suit :

$$\text{EM} = [(\text{AE} - \text{AC}) / \text{AC}] \times 100$$

Une valeur positive définit un effet synergique tandis qu'une valeur négative correspond à un antagonisme.



**Figure 16: Test de l'activité antioxydante**

### III- 7- 2- TEST DU POUVOIR REDUCTEUR

C'est une technique qui permet de mesurer la réduction du  $Fe^{3+}$  (fer ferrique) en  $Fe^{2+}$  (fer ferreux) en présence des extraits à tester. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible. La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de  $Fe^{3+}$  dans le complexe ferricyanide à la forme fer ferreux  $Fe^{2+}$ . Par conséquent,  $Fe^{2+}$  peut être évalué en mesurant l'augmentation de la densité de la couleur verdâtre dans le milieu réactionnel à 700nm (**Bougandoura et Bendimerad, 2013**).

Dans un tube à essai contenant 1 ml de solution d'échantillon sont ajoutés 2.5 ml de tampon phosphate (0.2M, pH 6.6) puis 2.5 ml d'hexacyanoferrate de Potassium [ $K_3Fe(CN)_6$ ] (10g/l). L'ensemble est chauffé à 50°C au bain marie pendant 20 minutes. Un volume de 2.5 ml d'acide trichloracétique (TCA) (100 g/l) est ensuite ajouté et le mélange est centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 minutes. Enfin, 2,5 ml du surnageant sont mélangés avec 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de chlorure ferrique [ $FeCl_3$ ] (1g / l). Un blanc sans échantillon est préparé dans les mêmes conditions. La lecture est mesurée à 700 nm. Le BHT est utilisé pour le contrôle positif (**Bourkhis et al., 2010**), Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Narasimhan et al., 2013; Liu et al., 2011**).

### III- 8- ACTIVITE ANTI-HEMOLYTIQUE

Le principe ici est la stabilisation de la membrane des globules rouges humains par la lyse membranaire induite par l'hypotonie. Le mélange d'essai contient du tampon phosphate de 1ml

[pH 7.4, 0.15 M], 2 ml de solution hyposaline [0.36%], 0.5 ml de la suspension des érythrocytes [10% v/v] avec 0,5 ml d'extraits de plantes et du diclofenac de diverses concentrations (50, 100, 250, 500, 1000, 2000 µg / ml) et de contrôle (eau distillée au lieu de solution hyposaline pour produire l'hémolyse de 100%) ont été incubés à 37 ° C pendant 30 min et centrifugé respectivement. La teneur en hémoglobine dans la suspension a été estimée en utilisant un spectrophotomètre à 560 nm (Nishanthi *et al.*, 2012).

Le pourcentage d'hémolyse des membranes des érythrocytes peut être calculé comme suit:

**% Hémolyse = (densité optique de test échantillon / densité optique de contrôle) X 100**

Le pourcentage de stabilisation de membrane HRBC peut être calculé comme suit: %  
*Protection = 100 - [(densité optique de test échantillon / densité optique de contrôle) x 100]*

### **III- 9- ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE *in vitro***

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* a été évaluée par la méthode de dénaturation des protéines (Alhakmani *et al.*, 2013). Le diclofénac sodique, un puissant anti-inflammatoire est utilisé comme référence. Le mélange réactionnel est constitué de 2 ml des différentes dilutions de l'extrait ou du control et 2.8 ml du tampon phosphate salin (pH 6.4) mélangé avec 2 ml d'albumine d'œuf (frais), ensuite le mélange est incubé à 27°C pendant 15 minutes. La dénaturation est induite en bain marie 70°C pendant 10 min. Après refroidissement, on mesure l'absorbance à 660 nm. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation est calculé comme suit :

$$\% \text{ inhibition} = (\text{At}-\text{Ac}) \times 100/\text{Ac}$$

Ou **At** : est l'absorbance du test, **Ac** : l'absorbance du control.

### **III- 10- ANALYSES STATISTIQUES**

Les valeurs ont été en général exprimées en moyenne ± SD. Les résultats des différents tests sont analysés par le test *t* de *Student* pour les comparaisons simples, et ANOVA uni-variée suivie du test de *Dunnett* et *Tukey* pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les statistiques sont faites par Graphpad Prism 5.

## IV- 1- RESULTATS DES EXTRACTIONS

### IV- 1- 1- LES HUILES ESSENTIELLES

#### IV- 1- 1-1-RENDEMENT

L'huile essentielle de *Carum montanum*, obtenue par hydrodistillation, est de couleur verdâtre, celle de *D. gracilis* est d'une couleur jaune claire et limpide. Les deux HE sont solubles dans le DMSO et dans le méthanol.

Les rendements des extractions sont calculés par rapport au poids sec de la matière sèche des deux espèces végétales selon la formule suivante ;

$$\text{Rendement} = (\text{poids de l'extrait} / \text{poids initial de la poudre végétale}) \times 100$$

L'hydrodistillation de la partie aérienne de *C. montanum* a donné une HE d'un rendement de 1.1 % (w/w) ou 0.99 % (v/w), alors que l'HE de *D. gracilis* est d'un rendement inférieur de celui de *C. montanum* ; 0.56 % (w/w) ou 0.68 % (v/w).

Selon **Sandberg et Corrigan (2004)**, les plantes qui sont riches en HE (jusqu'à 10%) se trouvent dans environ 30% des familles botaniques. Certaines en sont hautement riches ; les Apiacées, les Lamiacées, les Lauracées, les Myrtacées, les Pinacées, les Rutacées et les Zingiberacées. Cependant, le rendement de *C. montanum* est relativement inférieur en le comparant à ceux des espèces du même genre car des travaux antérieurs ont rapporté des valeurs supérieures; *C. copticum* 5.2% (v/w) (**Oroojalian et al., 2010**), *C. copticum* 4.6% (v/w) (**Mohagheghzadeh et al., 2007**), *C. copticum* 2.8% (v/w) (**Khajeh, 2004**) et *C. carvi* 1.46 % (v/w) (**Pitasawat et al., 2007**).

De même pour le rendement de l'espèce *D. gracilis* qui est légèrement inférieur à d'autres espèces du même genre ; les fruits de *D. gingidium* 1.21% (w/w) (**Flamini et al., 2007**), les fruits de *D. carota* L., *cultivar* 0.69% (**Glisic et al., 2007**) et la partie aérienne de *D. carota* 0.6% (**Gonny et al., 2004**).

Cependant, des taux inférieurs ont été obtenus chez des espèces du même genre ; les feuilles de *D. gingidium* 0.04% (w/w) (**Flamini et al., 2007**), *D. carota* L. var. *sativa* tiges et feuilles, racines, 0,07% et 0.01 % (v/w) respectivement (**Yin et al., 2006**). *D. crinitus* 0.3% (w/w) (**Lanfranchi et al., 2010**), les fleurs de *D. carota* L. var. *sativa* 0.27% (v/w) (**Yin et al., 2006**).

D'après **Fellah et al. (2006)**, les variations dans le rendement peuvent être attribuées à la technique d'extraction, à la période de la cueillette de la matière végétale (l'influence du cycle végétatif) et à l'origine de la plante; par exemple, le rendement de *Salvia officinalis* (Maroc) de deux régions différentes a donné deux rendements différents 2,55% et 1,80% (w/w). La teneur en HE provenant d'une espèce peut dépendre du sol, du climat, de l'ensoleillement, de la technique de séchage et de stockage (**Sandberg et Corrigan, 2004; Naghdi Badi et al., 2004**).

Dans l'étude de **Staniszewska et Kula (2005)**, la plus forte concentration d'huile dans les parties de la plante de la carotte sauvage (*Daucus carota* L. ssp. *carota*) a été observée en ombelles matures (1.06% v/w). Les ombelles fleuries contenaient 0.65% (v/w) et le reste de la partie aérienne contenait seulement 0.09% (v/w).

La technique d'extraction joue, également, un rôle important dans le taux de rendement en HE. Ainsi, Une extraction au carbone supercritique a donné un rendement de *C. copticum* allant jusqu'à 5.8% (w/w) et celui par hydrodistillation 2.8% (v/w) (**Khajeh et al., 2004**). Aussi dans le cas des fruits de *D. carota* L., *cultivar* le rendement le plus élevé (1,17%) a été obtenu par le carbone supercritique alors que celui obtenu par hydrodistillation est de 0.69% (**Glisic et al., 2007**). **Zheljzakov et al., (2013)**, ajoutent que le temps d'extraction influence, également, le rendement.

Il semble, en fait, que la teneur maximale en huile est obtenue quand toutes les fleurs ont atteint leur pleine maturité, parce que les calices contiennent le plus grand nombre de glandes sécrétrices par unité de surface (**Rahman et al., 1999**).

Selon **Bakkali et al., (2008)**, afin d'obtenir des HE de composition constante, elles doivent être extraites dans les mêmes conditions à partir du même organe de la plante qui a été de plus en plus sur le même sol, sous le même climat et a été récolté dans la même saison.

Le **tableau 4** montre les variations des rendements en fonction différent paramètres dans la même famille botanique (les Apiacées) et parfois dans la même espèce.

#### IV- 1-1-2- ETUDE PHYTOCHIMIQUE DES HE

##### ❖ *C. montanum*

L'analyse des HE par chromatographie en phase gaz couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) a permis d'identifier plus de **94.4%** des constituants de l'HE de *C. montanum*, représentés par **43** constituants dont le composant majeur (non identifié au départ) est le **Nothoapiole** à un pourcentage remarquable de **62.8%** (**Tableau 2**).

En plus du nothoapiole, deux autres composés à des pourcentages loins d'être comparés à ce dernier, mais quand même assez présents dans l'analyse chimique ; le **Dillapiole** à **8.5 %** et l' **$\alpha$ -Humulène** à **7.1%**. La composition de cette HE ressemble qualitativement en grande partie à celle de l'HE de *C. bulbocastanum* où le dillapiole représentait 44.6%, et le nothoapiole 8.3% (**Kapoor et al., 2010**). L'HE de *Carum* présente une composition particulière et différente de la majorité des autres HE, les phénylpropanoïdes dominant à un taux élevé (71.9%) (**Figure 17**), ce qui n'est pas le cas général dans les HE; selon **Cowan (1999)**, les HE sont composées de terpènes (20.7% de terpènes dans notre huile) et le reste est constitué de composés aromatiques et de constituants aliphatiques. Dans un cas similaire au notre, l'HE de la carotte sauvage *D. carota* est composée de 45.0% de phénylpropanoïdes (**Gonny et al., 2004**). Quoique **Raut et Karuppayil (2014)** confirment la présence des phénylpropanoïdes plus fréquemment chez les Apiacées.

D'après **Garnero (1996)**, Il n'est pas rare de reconnaître certaines HE qui sont très riches en un constituant donné. C'est le cas de l'HE de bois de rose du Brésil riche en linalol et celui des HE de citronnelle riche en citral, des HE de badiane, d'anis vert et de fenouil riches en *trans*-anéthole, de l'HE d'*Eucalyptus globulus* riche en 1,8-cinéole, etc. Ainsi, l'HE de *C. copticum* est constituée, en partie majeure, d'un monoterpénoïde qui est le  $\gamma$ -terpinéol à un pourcentage de 55.75% (**Baby et**

*al.*, 2012). L'huile des écorces de racines de *Securidaca longepedunculata*, est constituée, à plus de 90%, de salicylate de méthyle (Nébié *et al.*, 2004).

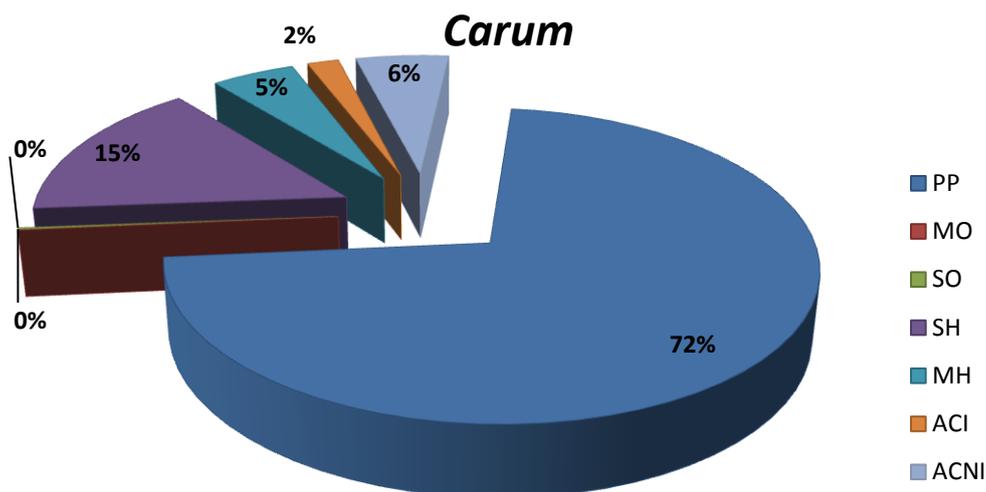
Cependant, dans l'ensemble, les HE peuvent contenir environ 20-60 composants à de très différentes concentrations et peuvent être caractérisées par deux ou trois composants majoritaires à des concentrations assez élevées (20-70 %) par rapport à d'autres composants présents sous forme de traces (Bakkali *et al.* 2008).

Paramètre Espèces	Technique d'extraction	Cycle végétatif	Durée d'extraction	Organe utilisé	Origine	Rendement	Référence
<i>C. montanum</i>	Hydrodistillation	Différentes périodes	3 h	Partie aérienne	Sétif	0.99 (v/w)	<b>Présent travail</b>
<i>C. copticum</i>	Hydro		4 h	Graine	Iran	5.2% (v/w)	<b>Oroojalian et al., 2010</b>
<i>C. carvi</i>	Distillation à la vapeur				Thailand	1.46 % (v/w)	<b>Pitasawat et al., 2007</b>
<i>C. copticum</i>	Hydrodistillation		4 h	Fruit	Iran	4.6% (v/w)	<b>Mohagheghzadeh et al., 2007</b>
<i>C. copticum</i>	Hydrodistillation CO <sub>2</sub> supercritique		4 h		Iran	2.8% de 1.0 à 5.8% (w/w)	<b>Khajeh, 2004</b>
<i>C. nigrum</i>	Distillation à la vapeur			Graines	Inde		<b>Padmashree et al., 2007</b>
<i>D. gracilis</i>	Hydrodistillation	Différentes périodes	3 h	Partie aérienne	Skikda	0.58% (v/w)	<b>Présent travail</b>
<i>D. carota</i>	Distillation à la vapeur	Fin de floraison	6h	Partie aérienne	Corse	0.6%	<b>Gonny et al., 2004</b>
<i>D. crinitus</i>	Hydrodistillation	Différentes périodes	3 h	Partie aérienne	Sétif	0.3% (w/w)	<b>Lanfranchi et al., 2010</b>
<i>D. gingidium</i>	Hydrodistillation		2h	Fruits Feuille	Italie	1.21% 0.04% (w/w)	<b>Flamini et al., 2007</b>
<i>D. carota</i>	Hydrodistillation		6h	Fleurs Tige et Feuille Racines	Chine	0.27% 0,07% 0.01 % (v/w)	<b>Yin et al., 2006</b>
<i>D. carota</i>	CO <sub>2</sub> supercritique Hydrodistillation			Fruit	Serbie	1,17% 0.69%	<b>Glisic et al., 2007</b>
<i>Daucus carota</i>	Hydrodistillation		5h	Ombellemature ombelle fleurie Herbe		1.06% 0.65% 0.09% (v/w)	<b>Staniszewska et Kula, 2005</b>
<i>D. sahariensis</i>	Hydrodistillation	Floraison Développement de la plante Floraison- fructification		Feuilles et Fleur		0.27% 0.63% 0.68%	<b>Flamini et al, 2013</b>

**Tableau 5 : composition chimique de l'HE de *Carum montanum* par CPG/SM.**

N°	Constituant	%	IR
1	Z-hex-3-enol	0.1	833
2	$\alpha$ -thujene	0.1	923
3	$\beta$ -pinene	0.1	969
4	$\alpha$ -terpinene	0.1	1009
5	undecane	0.1	1100
6	tridecane	0.1	1300
7	$\alpha$ -copaene	0.1	1374
8	$\alpha$ -muurolene	0.1	1490
9	$\alpha$ -bisabolene	0.1	1499
10	osthole	0.1	2069
11	sabinene	0.2	964
12	z- $\beta$ -ocimene	0.2	1026
13	terpinolene	0.2	1078
14	$\beta$ -elemene	0.2	1385
15	$\alpha$ -selinene	0.2	1486
16	elemicine	0.2	1516
17	e-caryophyllene oxide	0.2	1562
18	para-cymene	0.3	1011
19	ylangene	0.4	1468
20	myristicine	0.4	1483
21	$\beta$ -bourbonene	0.5	1379
22	$\alpha$ -farnesene	0.5	1495
23	e-hex-2-enal	0.6	823
24	limonene	0.6	1020
25	$\beta$ -sesquiphellandrene	0.6	1512
26	e- $\beta$ -ocimene	0.7	1037
27	$\gamma$ -terpinene	0.8	1048
28	$\alpha$ -bergamotene	0.8	1430
29	$\alpha$ -pinene	0.9	930
30	myrcene	0.9	981
31	thymol	0.9	1266
32	germacrene-d	2.2	1471
33	$\beta$ -caryophyllene	2.5	1413
34	<b>nothoapiole</b>	<b>62.8</b>	1738
35	<b><math>\alpha</math>-humulene</b>	<b>7.1</b>	1446
36	<b>dillapiole</b>	<b>8.5</b>	1589
37	hexanal	t	772
38	heptanal	t	875
39	nonanal	t	1081
40	terpinen-4-ol	t	1136
41	methyl thymyl ether	t	1224
42	carvacrol	t	1275
43	apiole	t	1640
<b>Total identifié</b>		<b>94.4</b>	

IR : indice de rétention, t : traces



**Figure 17 : Pourcentages des différentes familles chimiques dans l'HE de *C. montanum***

PP : phénylpropanoïdes, MO : monoterpènes oxygénés, MH : monoterpènes hydrocarbonés, SO : sesquiterpènes oxygénés, SH : sesquiterpènes hydrocarbonés, ACI : autres composés identifiés, ACNI : autres composés non identifiés.

#### ❖ *D. gracilis*

L'analyse de l'huile de *D. gracilis* a révélé 49 constituants représentant plus de 94.8 % du total (**Tableau 6**). L'elemicine est le constituant majeur avec un pourcentage de 35.3 % de l'huile. L'acétate de géranyl est également présent à un pourcentage élevé 26.8 % et après vient le cedr-8(15)-en-9-a-ol à 8.3 %. Il semble que l'acétate de géranyl est un constituant commun des espèces de *D. carota* subsp. *gummifer* provenant de deux pays méditerranéens, c'est le composé majeur aux pourcentages de 37% dans l'HE de l'espèce du Portugal et de 51.7 à 76.9% chez l'espèce de l'Espagne (**Valente et al., 2015**). **Maxia et al., (2009)**, ont fait l'analyse de deux HE de *Daucus carota* L. subsp *carota* et ils ont aussi trouvé l'acétate de géranyl à 15% chez l'espèce provenant du Portugal, tandis que chez celle de l'Italie ce composé ne figure pas. Ils ont trouvé, également, l'elemicin à 6.3% et 6.4% avec des taux très bas de phénylpropanoïdes; 0.3% et 9.7%.

L'HE de *D. gracilis* est représentée en grande partie par les phénylpropanoïdes, comme celle de *C. montanum*, à 35,6% mais pas au même niveau (**Figure 18**), ce qui corrobore d'autres études sur le même genre ; l'HE des fruits de *D. carota* ssp. *maximus* provenant de l'Egypte est constituée principalement de phénylpropanoïdes à 56,84% (**Saad et al., 1995**) et *D. carota* de Corse à 45.0% (**Gonny et al., 2004**).

Selon **Saad et al. (1995)**, la présence des phénylpropanoïdes dans les HE à des quantités appréciables, est d'une grande importance dans les interactions insectes-plantes car ils sont connus comme stimulants de ponte sur les feuilles pour la mouche de la rouille de la carotte.

En faisant la comparaison entre la composition chimique des deux HE, on constate que la différence essentielle se voit dans le pourcentage des phénylpropanoïdes, où la différence atteint le

double,. Si non, le reste des groupes chimiques sont présents à des taux très proches. D'ailleurs, on peut même recenser 13 constituants en commun entre ces deux huiles essentielles.

**Tableau 6 : Composition chimique de l'HE de *Daucus gracilis* par CPG/SM**

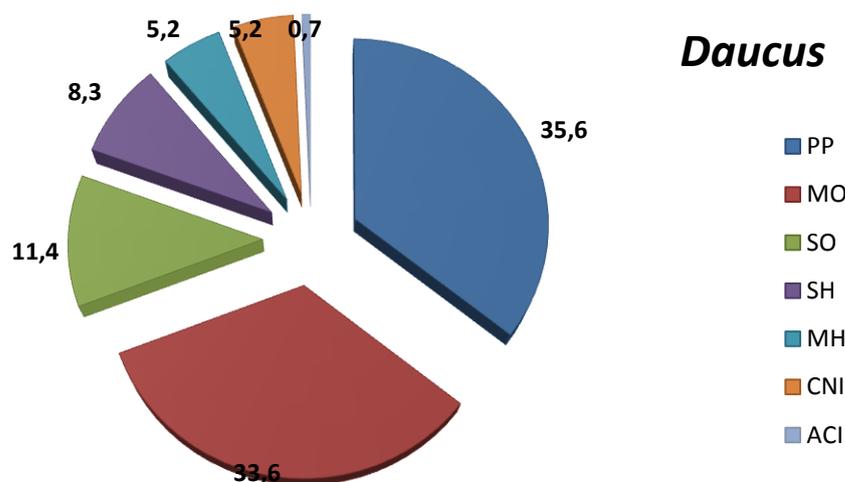
N°	Constituant	%	IR
1	$\alpha$ -pinene	0.1	937
2	neral	0.1	1240
3	(Z)-isoelemicin	0.1	1571
4	$\alpha$ -phellandrene	0.2	1006
5	$\gamma$ -terpinene	0.2	1062
6	geranial	0.2	1272
7	valencene	0.2	1493
8	germacrene B	0.2	1554
9	dillapiole	0.2	1623
10	selin-11-en-4-a-ol	0.2	1655
11	<i>p</i> -cymene	0.3	1027
12	terpinolene	0.3	1090
13	$\alpha$ -terpineol	0.3	1191
14	$\alpha$ -longipinene	0.3	1352
15	$\alpha$ -terpinene	0.4	1019
16	d-elemene	0.4	1340
17	myrcene	0.5	989
18	(E)-b-ocimene	0.5	1052
19	(Z)-b-ocimene	0.6	1041
20	juniper camphor	0.6	1693
21	limonene	0.7	1032
22	$\alpha$ -humulene	0.7	1456
23	humulene epoxide II	0.7	1608
24	$\beta$ -vetivene	1.0	1530
25	$\gamma$ -curcumene	1.1	1480
26	$\beta$ -himachalene	1.2	1501
27	$\beta$ -pinene	1.4	977
28	linalool	1.5	1101
29	Cubenol	1.6	1645
30	geranyl acetate	<b>26.8</b>	1384
31	$\beta$ -bisabolene	3.2	1509
32	elemicin	<b>35.3</b>	1557
33	geraniol	4.7	1257
34	cedr-8(15)-en-9-a-ol	8.3	1643
35	heptanal	tr	902
36	camphene	tr	951
37	benzaldehyde	tr	968
38	6-methyl-5-hepten-2-one	tr	987
39	1,8-cineole	tr	1035
40	phenylacetaldehyde	tr	1045
41	nonanal	tr	1103
42	trans-pinocarveol	tr	1141
43	(E)-2-nonenal	tr	1162
44	pinocarvone	tr	1168
45	4-terpineol	tr	1179
46	<i>cis</i> -carveol	tr	1231
47	isobornyl acétate	tr	1287

### Suite du tableau 6 de la Composition chimique de l'HE de *Daucus gracilis* par CPG/SM

N°	Constituant	%	IR
48	neryl acetate	tr	1368
49	$\beta$ -elemene	tr	1392
<b>Total identifié</b>		<b>Plus de 94.8 %</b>	

IR : indice de rétention, t : traces

Du moment que dans cette étude, les deux espèces ont été traitées de la même manière et dans les mêmes conditions, on peut attribuer de telles différences de compositions, qualitatives et quantitatives, à la différence génétique des genres (taxons).

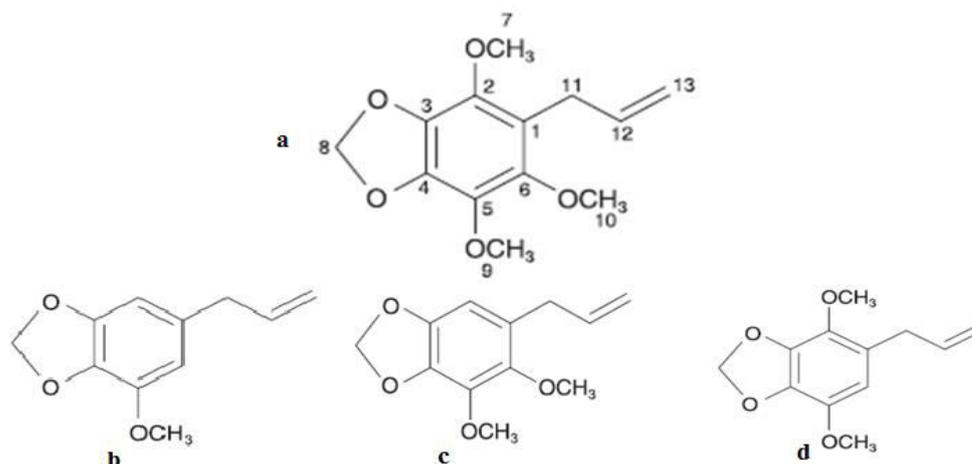


**Figure 18 : Pourcentages des différentes familles chimiques dans l'HE de *D. gracilis***

PP : phénylpropanoïdes, MO : monoterpènes oxygénés, MH : monoterpènes hydrocarbonés, SO : sesquiterpènes oxygénés, SH : sesquiterpènes hydrocarbonés, ACI : autres composés identifiés, ACNI : autres composés non identifiés.

#### IV- 1-1- 3- EXTRACTION DU NOTHOAPIOLE

Le composé majoritaire de l'HE de *C. montanum* a été identifié par chromatographies successives sur colonne. Ensuite, ce composé a été isolé sous sa forme pure et identifié comme le **Nothoapiole (NA)** (Figure 19.a) par SM et RMN en comparant son spectre avec les données spectrales décrites dans la littérature.



**Figure 19: Structures chimiques : Nothoapiole (a), Myristicine (b), Apiol (c) et Anethapiole (d)**

Ce phénylpropanoïde hautement oxygéné est structurellement liées à la Myristicine (b), l'Apiole (c) et l'Anethapiole (d), qui sont largement répandues dans de nombreuses espèces végétales, mais le Nothoapiole est, généralement, beaucoup moins fréquent que ces composés. Le Nothoapiole a été, également, identifié, par **Singh et al. (2006)**, dans l'HE de *C. nigrum* et dans son oléorésine, chez *Carum bulbocastanum* (**Kapoor et al., 2010**) ainsi que dans d'autres espèces végétales: *Perilla frutescens* (**Ito et al., 1999**), *Pimpinella serbica* (**Ivanic et al., 1983**), *Molopospermum peloponnesiacum* (**Kubeczka et Ulmann, 1983**), *Peucedanum pauciradiatum* (**Bagirov et al., 1982**) et *Nothosmyrniium japonicum* (**Saiki et al., 1970**), *Pleurospermum angelicoides* (**Mathela et al., 2015**) et dans l'algue brune *Spatoglossum variable* par **Rahman et al. (1999)**. Cependant, aucune de ces espèces n'en contient un pourcentage si élevé comme *C. montanum*.

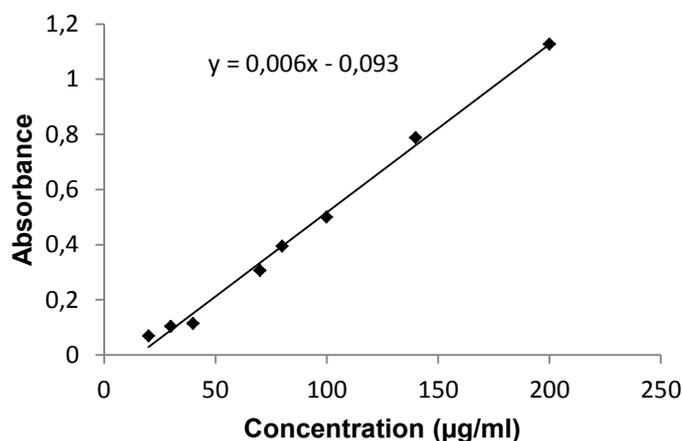
#### IV- 1- 2- LES EXTRAITS BRUTS

##### IV- 1- 2- 1- RENDEMENT

Les rendements des extraits bruts, contenant les biomolécules totaux, obtenus par macération hydro-alcoolique de la poudre sèche des deux plantes ont été de : 3,77 % pour *C. montanum* et 3,74 % pour *D. gracilis*. Les deux extraits sont de couleur marron foncé, solubles dans le DMSO et dans le méthanol. Ces deux rendements présentent des valeurs très proches, c'est probablement dues au fait que les deux espèces végétales appartiennent à la même famille botanique (Apiacées). Cela peut être du, également à l'utilisation de la même technique d'extraction dans les mêmes conditions expérimentales. Ces deux valeurs se situent dans la moyenne par rapport à celles obtenues par **Bendahou et al., (2008)** où l'extraction hydro-alcoolique des feuilles et des tiges de *D. crinitus* a donné des valeurs de 6.1% et 2.5 % respectivement.

##### IV- 1- 2- 1- DOSAGE DES POLYPHENOLS

La teneur en polyphénols totaux est estimée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-160 µg/ml). Les valeurs sont exprimées en µg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.



**Droite d'étalonnage de l'acide gallique**

Le dosage des polyphénols dans les deux extraits montre que l'extrait brut de *D. gracilis* est le plus riche en polyphénols suivi par celui de *C. montanum*  $149.05 \pm 3.33$  et  $101.50 \pm 5.33$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  respectivement (**Tableau 7**). Ces teneurs sont considérables par rapport à la majorité des espèces des mêmes genres.

**Tableau 7 : Dosage des polyphénols totaux dans les extraits bruts**

Quantités des Polyphénols exprimées en $\mu\text{g}$ d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait	
<i>C. montanum</i>	$101.5 \pm 5.33$
<i>D. gracilis</i>	$149.05 \pm 3.33$

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures  $n=2 \pm \text{SD}$

Ces quantités sont, également, proches de celle trouvée par **Zahin et al. (2010)**, dans l'extrait des fruits de *C. copticum* ; 119.2 mg/g et celles de (**Bendiabdellah et al., 2012**) dans l'extrait de *D. crinitus* ; 130.19  $\mu\text{g}/\text{mg}$ .

Les quantités estimées, des polyphénols totaux, dans les extraits de l'espèce la plus étudiée du genre *Carum* ; *C. carvi* étaient très basses. On a estimée cette quantité dans l'extrait méthanolique de *C. carvi* provenant de l'Australie à 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$  (**Polovka et Suhaj, 2010**), celle dans l'extrait méthanolique de *C. carvi* du Himalaya à 45.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  (**Xavier et al., 2011**) et 50.20  $\mu\text{g}/\text{mg}$  dans l'extrait de *C. carvi* provenant de l'Inde (**Thippeswamy et al., 2013**). L'extrait de *C. nigrum* ne contenait que 3,065 $\mu\text{g}/\text{mg}$  de polyphénols (**Padmashree et al., 2007**). Des études antérieures ont montré que la quantité des composés phénoliques dans les plantes dépend des facteurs biologiques (génotype, organe en question), ainsi qu'édaphiques, et environnementaux (température, salinité, stress hydrique et l'intensité lumineuse) (**Ksouri et al., 2008**).

## IV- 2 - ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

### IV- 2-1- TEST DE DIFFUSION SUR GELOSE

#### IV- 2-1-1- LES HUILES ESSENTIELLES

Pour mettre en évidence une éventuelle activité antimicrobienne, on a commencé par l'évaluation qualitative des effets des deux HE, en procédant par la technique de diffusion sur gélose ; une technique facile à mettre en œuvre et donne des résultats rapides. En plus, cette technique est recommandée avant toute procédure de quantification.

Les résultats obtenus par l'application des HE (**Tableau 8**), montrent que ces dernières sont actives à des pourcentages différents. Selon **Rouibi et al., (2009)**, une souche est dite:

- Sensible lorsque la zone d'inhibition est supérieur ou égale à 15mm.
- Limitée lorsque la zone d'inhibition est inférieure à 15mm.
- Résistante lorsque la zone d'inhibition est inexistante.

En adoptant cette classification on peut dire que l'HE de *C. montanum* est active sur 16% des souches testées et complètement inactive contre 42% de ces souches. Pour l'HE de *D. gracilis*, 33% des souches sont sensibles alors que 33% des souches se sont parues complètement résistantes. On constate que, pour les deux HE, l'activité manifestée n'est pas sélective que ce soit selon le Gram ou bien au sein du même genre où nous avons constaté des diamètres d'inhibition qui vont de la résistance jusqu'à quelques mm comme chez le genre *Staphylococcus* (de 0 à 26 mm). **Belaiche (1978)**, rend cette non-sélectivité l'immense variété de la composition des HE, cette dernière ne permet pas de définir de spectre particulier à chaque huile ni même de les classer en adoptant le critère d'activité classique Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>

La sensibilité des différentes bactéries envers les HE, extraites des espèces du genre *Carum* a été rapporté par plusieurs auteurs ; *C. carvi* (**De martino et al., 2009 ; Fang et al., 2010 ; Seidler-Lozykowska et al., 2013**), *C. copticum* (**Dashti-Rahmatabadi et al., 2007 ; Rezaei Kahkha et al., 2014**).

L'espèce *B. cereus* était sensible à l'HE de *C. montanum* (16mm), ce qui était le cas de l'HE de *C. carvi* qui a agit d'une façon très forte sur la même souche (**De martino et al., 2009**), mais *S. aureus* sensible à cette huile a été moyennement sensible à l'HE de *C. carvi*, provenant de 17 régions différentes (**Seidler-Lozykowska et al., 2013**).

L'activité des HE extraites du genre *Daucus* ont été largement exploité chez ses différentes espèces et les souches de *S. aureus* ont été les plus sensibles. **Lanfranchi et al., (2010)** ont mis en évidence cette activité sur *E. coli* (15 mm) et *S. aureus* (22mm) par l'HE *D. crinitus*. *S. aureus* est aussi très sensible à l'HE de *D. crinitus* (28 mm) mais *B. cereus* et *E. coli* en sont résistantes (**Bendiabdellah et al., 2012**). L'HE de *D. syrticus* est aussi active sur *B. cereus* (**Abd Alla et al., 2013**). D'après **Valente et al. (2015)**, l'activité antimicrobienne de l'HE de *D. carota* subsp. *Gummifer* serait due à la présence du géranyl acétate, rappelant que ce même constituant est présent dans l'HE de *D. gracilis* à **26.8%**. En plus du géranyl acétate, l' $\alpha$ -pinène, l' $\alpha$ -terpinéol, le géraniol, le limonène, le myrcène, le néral, le  $\alpha$ -phellandrene, le géraniol, le dillapiol, le  $\alpha$ -terpinéol, le linalool, le 1,8-cinéol et le p-cymène, sont des molécules à potentiel antibactérien selon **Duke (2015)**.

En général, les phénylpropanoïdes, peuvent être à l'origine de l'activité antibactérienne car ils ont été isolés, auparavant, à partir d'une espèce connue pour exercer une action protectrice contre les agents phyto-pathogènes (les bactéries et les champignons) **Da Silveira et al., (2014)**.

Enfin, il est à noter que le diamètre d'inhibition n'est pas une mesure directe de l'activité antimicrobienne des HE car les différents constituants ne diffusent pas tous de la même manière dans le milieu gélosé (**Hulin et al., 1998**).

**Tableau 8 : diamètres d'inhibition des HE en mm**

Souches bactériennes	Pourcentage dans le DMSO			T+
	50 %	20 %	10 %	
<b><i>C. montanum</i></b>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	-	-	-	08G
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	08 ± 0.00	07,5 ± 0.7	07,5 ± 0.7	22G
<i>Salmonella typhimurium</i> ( ATCC 13311)	11 ± 0.00	08 ± 0.00	-	20G
<i>Acinetobacter baumannii</i> (ATCC 19606)	11 ± 0.00	08 ± 0.00	-	20G
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	13 ± 0.00	12 ± 0.00	10 ± 0.00	31G
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603)	20 ± 0.00	↓	-	25G
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 10876)	16 ± 0.00	14 ± 0.00	11 ± 0.00	19G
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 49452)	12 ± 0.00	07 ± 0.00	-	20G
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 15313)	-	-	-	19G
<i>Citrobacter freundii</i> (ATCC 8090 )	-	-	-	18G
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 35659)	08 ± 2.8	07 ± 0.00	-	26G
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 9738)	-	nt	nt	12 AMP
<i>Enterococcus faecalis</i> (14C1104)	-	nt	nt	32 AMP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (13C3104)	-	nt	nt	30 AMP
<i>Staphylococcus aureus sub aureus</i> (ATCC6538)	09	nt	nt	33 AMP
<i>Staphylococcus epidermitis</i> (CIP 10464)	14	nt	nt	62 AMP
<i>Staphylococcus saprophyticus subsp. Saprophyticus</i> (CIP 10464)	-	nt	nt	40 AMP
<i>Staphylococcus simulans</i> (CIP 81.64)	26	nt	nt	32 AMP
<i>Staphylococcus lugdunensis</i> (CIP 103584)	06	nt	nt	09 AMP
<b><i>D. gracilis</i></b>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	12 ± 0.00	11 ± 0.00	12 ± 0.00	08G
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	13.5 ± 2.12	-	-	20G
<i>Acinetobacter baumannii</i> (ATCC 19606)	19.75 ± 2.47	09 ± 0.00	08 ± 0.00	20G
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	13 ± 2.08	11 ± 2.12	10 ± 1.73	31G
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 10876)	17 ± 4.04	16 ± 4.72	11 ± 1.15	19G
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 15313)	-	-	-	19G
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 35659)	15 ± 0.00	13 ± 0.00	12 ± 0.00	26G
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 43300)	-	-	-	nt
<i>Bacillus subtilis</i> (NCCB 1090)	-	-	-	nt

**G : gentamicine, AMP : ampicilline, nt : non testée, ↓ : zone moins dense, - : pas d'activité. n=3± SD**

Concernant l'antibiogramme et d'après **Rahal et al., (2008)**, le domaine de sensibilité de la majorité des souches qu'on a testé vis-à-vis de la gentamicine (10µg) et de l'ampicilline (30 µg) se situe au delà de 15mm, ce qui signifie que ces souches sont toutes sensibles aux deux antibiotiques.

Quoi qu'il en soit, il est intéressant de noter que la plupart des molécules issues des plantes ont une activité antimicrobienne inférieure à celle des antibiotiques communs envers les bactéries et les champignons (**Hemaiswary et al., 2008**). Notant que la nature des activités observées par les HE sont toutes bactériostatiques.

#### IV- 2-1-2- LE NOTHOAPIOLE

La présence d'un composé (le Nothoapiole) en masse (62.8 %) dans l'HE de *C. montanum* nous a conduit à tester son effet seul et à le comparer avec l'effet de l'HE entière afin de savoir si l'activité de l'HE peut être attribuée à lui seul. Pour cela, la même technique a été adaptée ; la technique de diffusion sur gélose.

Les résultats obtenus (**Tableau 9**), montrent que *E. coli* est restée complètement résistante comme avec l'HE entière. Cependant, l'inhibition des souches sensibles à l'huile entière s'est diminuée voire disparue (*S. lugdunensis*), malgré l'application de 10 µl du composé pur.

Bien qu'il a été rapporté que les phénylpropanoïdes forment un groupe majeur de produits naturels avec un spectre large d'activités biologiques y compris des activités cytotoxiques et anti-tumoraux (**Ma et al., 2013**), le Nothoapiole s'est montré modérément actif dans notre étude. Cela peut être expliqué par deux hypothèses ; ou bien le Nothoapiole n'a pas du tout un effet antimicrobien, ou bien il n'agit qu'en association synergique avec d'autres composés de l'HE pour donner une certaine activité. La première hypothèse est renforcée par le fait de l'inactivité totale du nothoapiole sur *E. coli* (ATCC 9738) ainsi que la chute remarquable des zones d'inhibition chez le reste des souches testées. Selon **Belaiche (1979)**, il a été démontré que le pouvoir global des HE entières est incomparablement plus grand que celui des composants pris isolément.

**Tableau 9 : Diamètres d'inhibition en mm du Nothoapiole et de l'huile de *Carum* entière**

Dilution	Concentrations dans le DMSO HE				NA 10 µl	T+ (AMP)
	1	1/2	1/4	1/8		
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 9738)	-	-	-	-	-	12
<i>Staphylococcus aureus sub sp. aureus</i>	11	09	-	-	10	33
<i>Staphylococcus epidermitis</i> (CIP 10464)	16	14	10	07	08	62
<i>Staphylococcus simulans</i> (CIP 8164)	28	26	17	15	08	32
<i>Staphylococcus lugdunensis</i> (CIP 103584)	12	-	-	-	-	09
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 66029)	14	12	11	10	10	-

Nt : non testé, AMP : ampicilline, - : pas d'activité

D'autre part, **Bakkali et al. (2008)** préfèrent la notion de synergie entre les composants d'une HE, même ceux présents à de faibles quantités car il est possible que l'activité des principaux composants soit modulée par d'autres molécules mineures. Il semble que c'est le cas de nos HE car

des molécules composantes de l'HE de *C. montanum* ont été testées individuellement et ont manifesté des effets antibactériens sur différentes souches; le dillapiole, l' $\alpha$ -pinene, le  $\alpha$ -thujene, le myrcene, le terpinen-4-ol, thymol, le carvacrol et le hexanal selon la base ethnobotanique de **Duke (2015)**. Mis à part le dillapiole (8.5%), les autres molécules se trouvent en traces (0.1-0.9%).

En outre, il est probable que plusieurs composés des HE jouent un rôle dans la pénétration cellulaire et la fixation sur les parois et les membranes cellulaires. En ce sens, à des fins biologiques, il est plus informatif d'étudier une huile entière plutôt que de certains de ses composants parce que le concept de synergie apparaît plus significatif. Certaines études ont conclu que les HE entières ont une activité antibactérienne supérieure à celle des composants principaux mixte ce qui suggère que les composants mineurs sont critiques pour l'activité et peuvent avoir un effet synergique (**Burt, 2004**).

#### **IV- 2-1-3- EFFET SUR LES CHAMPIGNONS**

Les HE des deux plantes étudiées étaient complètement inactives sur la souche d'*A. flavus*. Alors que la souche d'*A. niger*, exposée aux mêmes concentrations d'HE était sensible à la première lecture, c'est-à-dire après 48h d'incubation (**Tableau 10**). Cependant, on a constaté que les spores ensemencées au début de l'expérience ont germé à partir du 15<sup>ème</sup> au 20<sup>ème</sup> jour, donnant lieu à l'apparition de nombreuses colonies fongiques d'*A. niger*. Les espèces de *Candida* sont les plus sensibles aux deux HE. Ce résultat est similaire à celui observé par **Basilico et Basilico (1999)**, lors de l'étude des effets des HE sur *A. ochraceus*, ils ont constaté que l'effet de l'HE de Basilic était initialement complètement efficace, mais après 7 jours, L'HE est devenue inactive et a permis la

#### **Tableau 10: Effet des HE sur les champignons**

croissance du mycélium. De son côté, L'HE d'origan était complètement efficace jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour, ensuite l'inhibition de la croissance fongique est devenue partielle après le 21<sup>ème</sup> jour. De même, l'extrait de l'origan testé par **Koci Tanackov et al. (2012)**, a provoqué une absence ou un retard dans la germination des spores des espèces d'*Aspergillus*. Le retardement de l'effet des deux HE sur *A. niger* peut être attribué au fait que ces huiles ont, toutes les deux, manifesté au début de l'incubation une activité fongistatique, ce qui a empêché la germination des spores. Au delà du 20<sup>ème</sup> jour, les HE se sont évaporées du fait de leur nature volatile, ce qui a permis aux spores de germer et de donner un nouveau mycélium. L'activité antifongique des HE de *Carum* a été signalée auparavant par *C. carvi* et *C. copticum* (**Fang et al., 2010 ; Rezaei Kahkha et al., 2014**). La croissance des dermatophytes et le développement de leurs spores sont facilement inhibés par les HE riches en phénylpropanoïdes et les alcools sesquiterpéniques monocycliques. Les HE possèdent également une activité inhibitrice sur le cycle cellulaire de *C. albicans* du moment que le géraniol et l'acétate de géranyle sont signalés à bloquer *C. albicans* dans la phase S du cycle cellulaire (**Raut et Karuppayil, 2014**). **Duke,**

Souches fongiques	Pourcentage de l'HE dans le			T*	
	DMSO 50 %	20 %	10 %	NY	MCZ
<i>C. montanum</i>					
<i>Aspergillus niger</i> 2CA936	-	-	-	-	10
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 391	-	-	-	22.50	30
<i>Candida albicans</i> ATCC 1024	37 ± 3.35	19 ± 6.02	09 ± 3.05	30.00	26
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 66029)	12 ± 0	-	-	-	-
<i>D. gracilis</i>					
<i>Aspergillus niger</i> 2CA936	-	-	-	-	10
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 391	08.6 ± 1.15	-	-	22.50	30
<i>Candida albicans</i> ATCC 1024	20 ± 7.5	10 ± 00	09 ± 1.73	30.00	26

NY : Nystatine, MCZ : Muconazole, - : pas de developpement, n=3±SD.

(2015) recense le thymol, l' $\alpha$ -pinène et le myrcène, le  $\beta$ -pinene, le thymol, le  $\gamma$ -terpinene et le myrcene parmi les molécules antifongique chez le genre *Carum* et l'elemicin (présent à 35%), le terpinolène parmi les molécules fongicides chez le genre *Daucus*.

Les résultats obtenus par l'HE de *D. gracilis* sont en accord avec plusieurs études faites sur le même genre ; *A. niger* et *C. albicans* sont aussi inhibées à (17mm) et (25-30 mm), respectivement, par l'HE de *D. crinitus* (Lanfranchi *et al.*, 2010 ; Bendiabdellah *et al.*, 2013). L'HE de *D. carota* L. subsp *carota*, a manifesté une activité remarquable sur une panoplie de souches fongiques. Cette HE de deux provenances, à savoir le Portugal et l'Italie, était active sur *A. niger* (10  $\mu$ l/ml), *A. flavus* (20  $\mu$ l/ml) et *C. albicans* (10-20 $\mu$ l/ml) avec des différentes CMI (Maxia *et al.*, 2009).

En fait la difficulté des études sur les HE, due à leur volatilité, s'ajoute au fait que les moisissures présentent des difficultés supplémentaires de mutations et de croissance lente par rapport aux bactéries.

Les HE et les extraits végétaux agissent de manières différentes. Les études microscopiques ont montré qu'il peut y avoir des déformations des hyphes avec l'apparition fréquente des fragmentations, des épaisissements et des désorganisations des organes reproductifs (vésicules irrégulières, apparition de métules élargies), la perte totale du cytoplasme des hyphes, des cellules appauvries des organites, la lyse des hyphes, l'amincissement des parois cellulaires, le décollement de la membrane cellulaire de la paroi cellulaire et la destruction des organites cellulaires (Koci Tanackov *et al.*, 2012).

#### IV- 2-1-4-LES EXTRAITS BRUTS

Les extraits bruts ont été peu actifs sur quelques souches avec des diamètres d'inhibition variant entre 7 et 9.5 mm à la concentration de 70 mg/ml. Cette activité demeure toujours plus faible que celle montrée par les antibiotiques.

D'après la littérature, les extraits bruts possèdent, en général, une activité antimicrobienne significative, par exemple, l'extrait phénolique de *C. carvi* testé sur *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* et *S. typhimurium* est trouvé actif avec une inhibition significative de la croissance bactérienne. Les résultats ont montré que l'inhibition de *B. cereus* et *S. aureus* était supérieure par rapport à *E. coli* et *S. typhimurium* (Thippeswamy *et al.*, 2013). L'extrait méthanolique de *D. crinitus* était très active sur la souche de *B. cereus* à la concentration de 40 mg/ml en plus de *S. aureus*, *E. coli* et *C. albicans* (Bendahou *et al.*, 2010).

Les sites et le nombre de groupes hydroxyle sur le groupe phénol peuvent être lié à leur toxicité sur les micro-organismes. Certains auteurs ont constaté que plus les phénols sont oxydés plus leur activité inhibitrice augmente. Les mécanismes responsables de la toxicité pour les micro-organismes par les composés phénoliques comprennent l'inhibition des enzymes (Cowan, 1999). Les composés phénoliques perturbent la membrane cellulaire résultant en l'inhibition des propriétés fonctionnelles de la cellule, et éventuellement causent la fuite du contenu interne de la cellule. Les mécanismes d'action peuvent se rapporter à la capacité des composés phénoliques de modifier la perméabilité cellulaire, endommager les membranes cytoplasmiques, interférer avec le système de production de l'énergie cellulaire (ATP), et de perturber la force motrice de protons. La perméabilité perturbée de la membrane cytoplasmique peut entraîner la mort cellulaire (Calo *et al.*, 2015).

**Tableau 11 : Activité antimicrobiennes des extraits bruts (diamètres en mm)**

Souches microbiennes	<i>C. montanum</i>	<i>D. gracilis</i>	T <sup>+</sup> (g)
<i>B. cereus</i> (ATCC 10876)	07± 00	09.5 ± 0.70	19
<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 15313)	08 ± 00	08 ± 00	19
<i>P. aeruginosa</i>	07 ± 00	08 ± 00	20
<i>C. freundii</i> (ATCC 8090 )	07± 00	07± 00	20
<i>A. flavus</i> NRRL 391	08 ± 00	-	nt

- : pas d'activité, G : gentamicine, nt : non testé, n=3±SD.

#### IV-2-1-5- MISE EN EVIDENCE DES INTERACTIONS ENTRE LES HE ET LA GENTAMICINE

Pour contourner le problème de la résistance croissante des microorganismes aux antibiotiques, de nouvelles stratégies antimicrobiennes sont mises en œuvre. Parmi ces stratégies, il y'a la poly-chimiothérapie qui utilise des associations de deux ou de plusieurs agents antimicrobiens. Dans ce contexte, nous avons essayé de mettre en évidence l'effet synergique ou antagoniste des HE avec un antibiotique ; la gentamicine, ainsi qu'entre les deux HE sur les souches qui se sont révélées sensibles après le premier criblage par la méthode des disques. Les résultats obtenus montrent que

pour la combinaison de l'HE de *C. montanum* avec la gentamicine a provoqué l'augmentation du diamètre d'inhibition chez *B. cereus* seulement, alors que chez *K. pneumoniae* l'inhibition a diminué. L'association de l'HE de *D. gracilis* avec la gentamicine a induit une augmentation des diamètres d'inhibition pour les deux souches de *B. cereus* et *P. mirabilis*.

Concernant l'activité du mélange des deux HE, nous avons remarqué que l'inhibition a diminué (**Figure 20**). Selon le document édité par l'EUCAST (2000) concernant la terminologie relative aux méthodes pour la détermination de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens, les interactions entre deux molécules sont définies par :

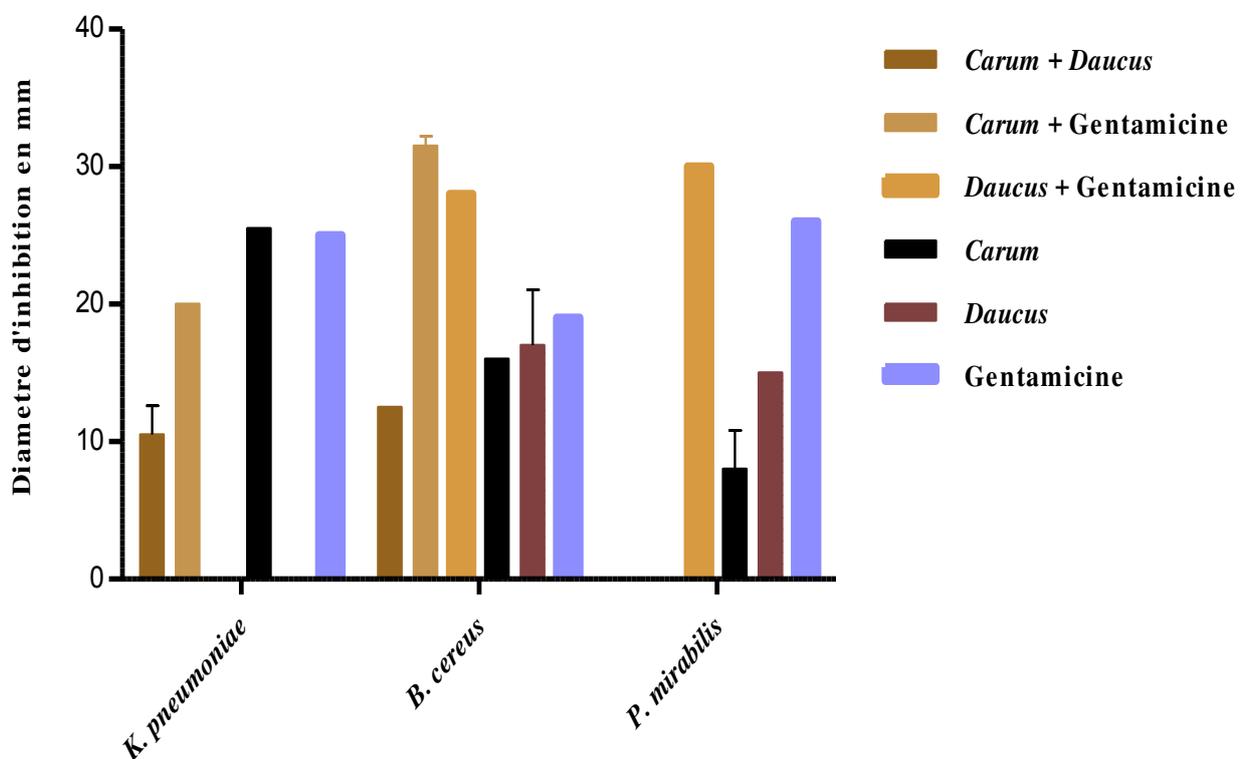
- **L'indifférence** ; l'effet d'une combinaison est égal à l'effet du composant le plus actif.
- **L'additivité** ; une combinaison dans laquelle l'effet est égal à celui de la somme des effets des composants individuels.
- **La synergie** ; si l'effet de la combinaison est supérieur à l'additivité des effets des composants testés individuellement.
- **L'antagonisme** ; si l'effet de la combinaison est réduit en comparaison avec l'effet de la substance individuelle la plus active.

En se basant sur cette classification, on peut déduire que toutes les combinaisons testées présentent l'effet antagoniste. Les interactions entre les composés antimicrobiens peuvent modifier l'efficacité et peuvent entraîner une concurrence pour les sites des cibles. Si des constituants d'un ou de plusieurs extraits sont en mesure d'affecter plusieurs cibles d'une manière agoniste, un effet multi-cible de synergie se produit. Alternativement, l'interaction entre les différents composés peut conduire à des changements dans la conformation structurale, résultant ainsi en la réduction de l'activité inhibitrice appelée antagonisme (**D'Arrigo et al., 2010**). D'après **Hemaiswarya et al. (2008)**, le nombre de composés naturels qui agit en synergie avec les drogues synthétiques à l'égard des espèces fongiques est minime. Cela pourrait être dû aux connaissances limitées des mécanismes d'action des médicaments contre ces organismes. Donc, la recherche devrait être orientée dans cette direction pour identifier plus de composés naturels qui présentent un comportement synergique.

Des études antérieures ont traité la possibilité d'application de mélanges HE-HE et HE-antibiotique. D'après **Hemaiswarya et al. (2008)**, les métabolites secondaires des plantes sont de bonnes sources de combinaisons thérapeutiques, il existe un large éventail de composés phytochimiques qui agissent contre la multi-résistance des bactéries, par exemple ; Les HE de *Melaleuca leucodendron* et *Ocimum gratissimum*, aux composés majoritaires le 1,8 cinéol, le linalol, le  $\alpha$ -terpinéol et le terpinen-4-ol, utilisées avec l'Ampicilline, la Kanamycine, l'acide fusidique et la Rifocine étaient synergiques contre *S. aureus*.

Dans l'étude de **Rosato et al. (2007)**, l'HE de *Pelargonium graveolens* (qui contenait le citronellol et le géraniol comme constituants majeurs) mélangée à la Norfloxacine a montré un effet synergique sur *B. cereus* et sur *S. aureus*. Cependant, aucun effet synergique n'a été observé avec *B. subtilis* et *E. coli*. La combinaison Norfloxacine soit avec le géraniol, le Triacetine ou le citronellol, testée sur *B. cereus* et *S. aureus*. *B. cereus*, était moins sensible que la combinaison Norfloxacine – HE entière.

L'effet antagoniste survient, probablement, quand l'une des molécules en combinaison (extrait ou antibiotique) annule l'effet de l'autre molécule ou bien quand il y'a neutralisation réciproque entre les deux molécules en même temps, ce qui donne un effet nul de cette combinaison ; c'est le cas de la combinaison des deux HE sur *P. mirabilis* qui a donné un diamètre nul. Les mécanismes produisant l'antagonisme sont moins connus, bien qu'ils impliquent des combinaisons d'agents bactéricides et bactériostatiques par l'utilisation de composés qui agissent sur la même cible du micro-organisme et sur les interactions entre les composés chimiques (interactions directes ou indirectes). Par exemple, les hydrocarbures mono-terpéniques comme le c-terpinène et le p-cymène produisent des effets antagonistes en réduisant la solubilité aqueuse des terpènes et, par conséquent, la disponibilité des composants actifs (**Goni et al., 2009**).



**Figure 20 : Mise en évidence des interactions entre les deux HE et entre chaque HE et la Gentamicine**

Toutefois, les résultats des différentes études ne peuvent être comparés parce que la concentration de l'huile, en molécules chimiques, est variable et dépend de nombreux facteurs, y compris le chémotype de la plante, sa récolte et les conditions de son stockage. Les résultats des différentes études indépendantes menées dans ce domaine pourraient différer en raison de ces variables incontrôlables et pas vraiment en termes d'activité antibactérienne réelle (**Rosato et al. 2007**).

#### **IV- 2- 2- DETERMINATION DES CMI**

La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des agents antimicrobiens constitue l'étape de l'évaluation quantitative de l'activité antimicrobienne sur laquelle se base les prescriptions médicales. Au niveau de notre étude c'est une approche quantitative qui nous renseigne sur le niveau d'efficacité des HE testées. Quoiqu'en réalité la CMI des extraits végétaux *in vitro* est loin d'être comparée à celle *in vivo* à cause des différents paramètres pharmacocinétiques au niveau des êtres vivants. Les CMI ne sont évaluées que sur les souches sensibles aux HE c'est-à-dire celles qui ont donné des diamètres d'inhibition égales ou supérieurs à 15mm (**Figure 21**).

##### **IV- 2- 2- 1-MACRO-DILUTION EN MILIEU SOLIDE**

L'inhibition en milieu gélosé est survenue dans la plus grande concentration testée c'est-à-dire la valeur de 35.05 µg/ml dans le cas de la gamme de *C. montanum* et 17.15 µg/ml pour la gamme de l'HE de *D. gracilis*.

En effet, la valeur de la CMI ne peut pas être déterminée avec précision du fait qu'on test des concentrations espacées. Cependant, on peut dire que la CMI se situe dans un intervalle où la valeur minimale est supérieure à la plus grande concentration où il y a eu le développement bactérien et inférieure ou égale à la plus petite concentration où il y a eu une absence totale de développement bactérien. La différence observée dans les valeurs de la CMI ne peut pas être considérée comme une différence significative de l'activité en raison des variations connues habituellement et observées dans ces techniques, même en utilisant des méthodes standardisées (**Berahou et al., 2007**). A titre d'exemple, en comparant la technique de micro-dilution avec celle de l'E-test, **Mayrhofer et al. (2008)** ont trouvé des valeurs différentes des CMI, ils ont conclu que ce phénomène peut être expliqué par la forte fréquence des mutations spontanées et par la perte de l'activité des agents antimicrobiens instables pendant l'incubation, ce qui peut entraîner des concentrations inhibitrices que pourrait favoriser l'émergence de souches résistantes.

##### **IV- 2- 2-2- MACRO-DILUTION EN MILIEU LIQUIDE**

L'exposition des souches sensibles à une série de concentrations croissantes en HE a montré que *B. cereus* est la souche la plus sensible à l'HE de *C. montanum* avec une CMI de 55.5 µg/ml. Ensuite, vient *K. pneumoniae* avec une CMI de 111 µg/ml. Pour l'huile de *D. gracilis*, il est clair qu'elle est beaucoup moins active quantitativement sur les deux souches testées.

#### IV- 2- 2- 3-MICRO-DILUTION EN MILIEU LIQUIDE

Les valeurs des CMI obtenues par la technique de micro-dilution sont plus petites par rapport à celles obtenues par la méthode de macro-dilution. Avec l'HE de *C. montanum*, *B. cereus* est inhibée à 4.86 µg/ml et *K. pneumoniae* à 19.43 µg/ml. L'HE de *D. gracilis*, de sa part, a donné des CMI de 57.05 µg/ml pour *B. cereus* et 114.1 pour la souche de *P. mirabilis*. Ces valeurs sont très petites par rapport à celles obtenues de l'espèce *D. crinitus* par **Lanfranchi et al., (2010)** sur *S. aureus* ;  $2.5 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ .

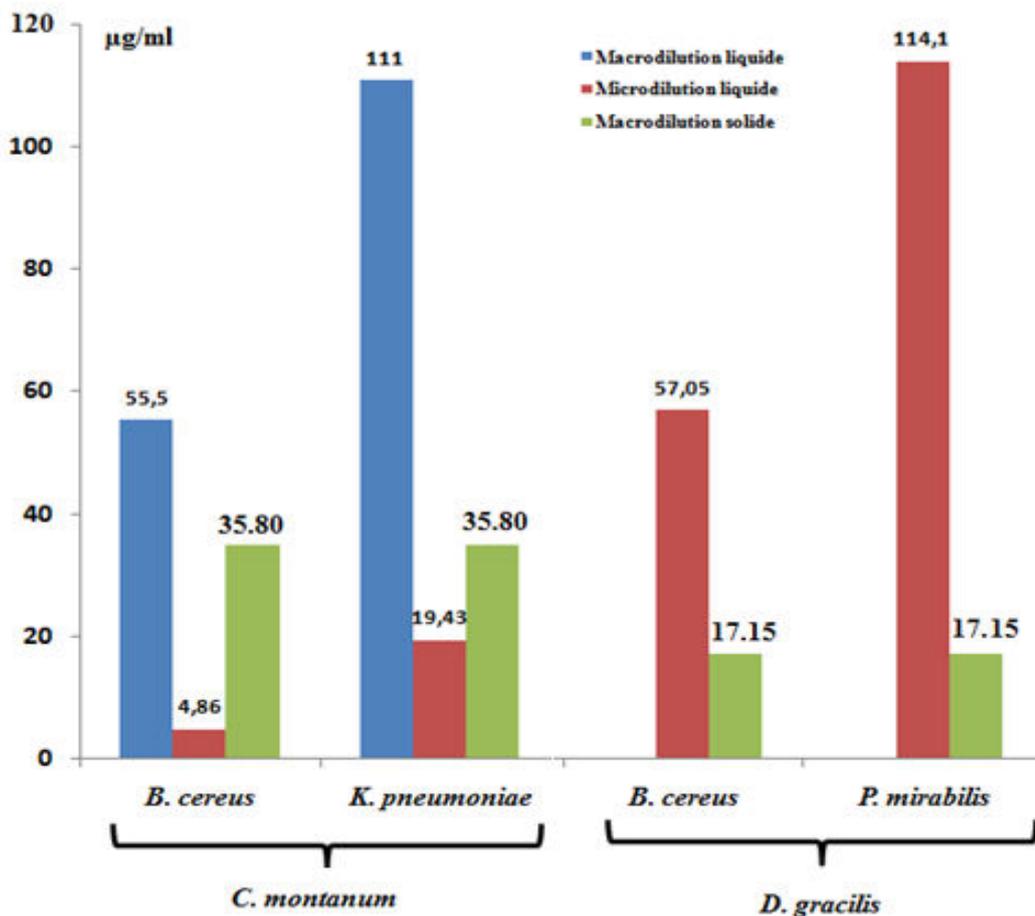


Figure 21: détermination des CMI des huiles essentielles sur les souches sensibles

D'après le CLSI (2012), les CMI issues de la micro-dilution pour les bacilles à Gram<sup>-</sup> sont les mêmes ou inférieures que celles issues de la macro-dilution, c'est le cas de *K. pneumoniae* où les valeurs des CMI sont de 19,43µg/ml et 111µg/ml par micro-dilution et par macro-dilution respectivement. En testant la sensibilité de plusieurs souches *vis à vis des antibiotiques*, **Luber et al. (2003)** ont conclu que la méthode de micro-dilution semble être une méthode simple et fiable pour la détermination des CMI et qu'elle peut offrir une alternative intéressante à la technique de dilution en gélose ou à l'E-test.

En fait, le choix de la méthode à appliquer se fait selon les avantages et les inconvénients de chacune. La micro-dilution est économique en matériel ainsi qu'en extraits mais délicate, la

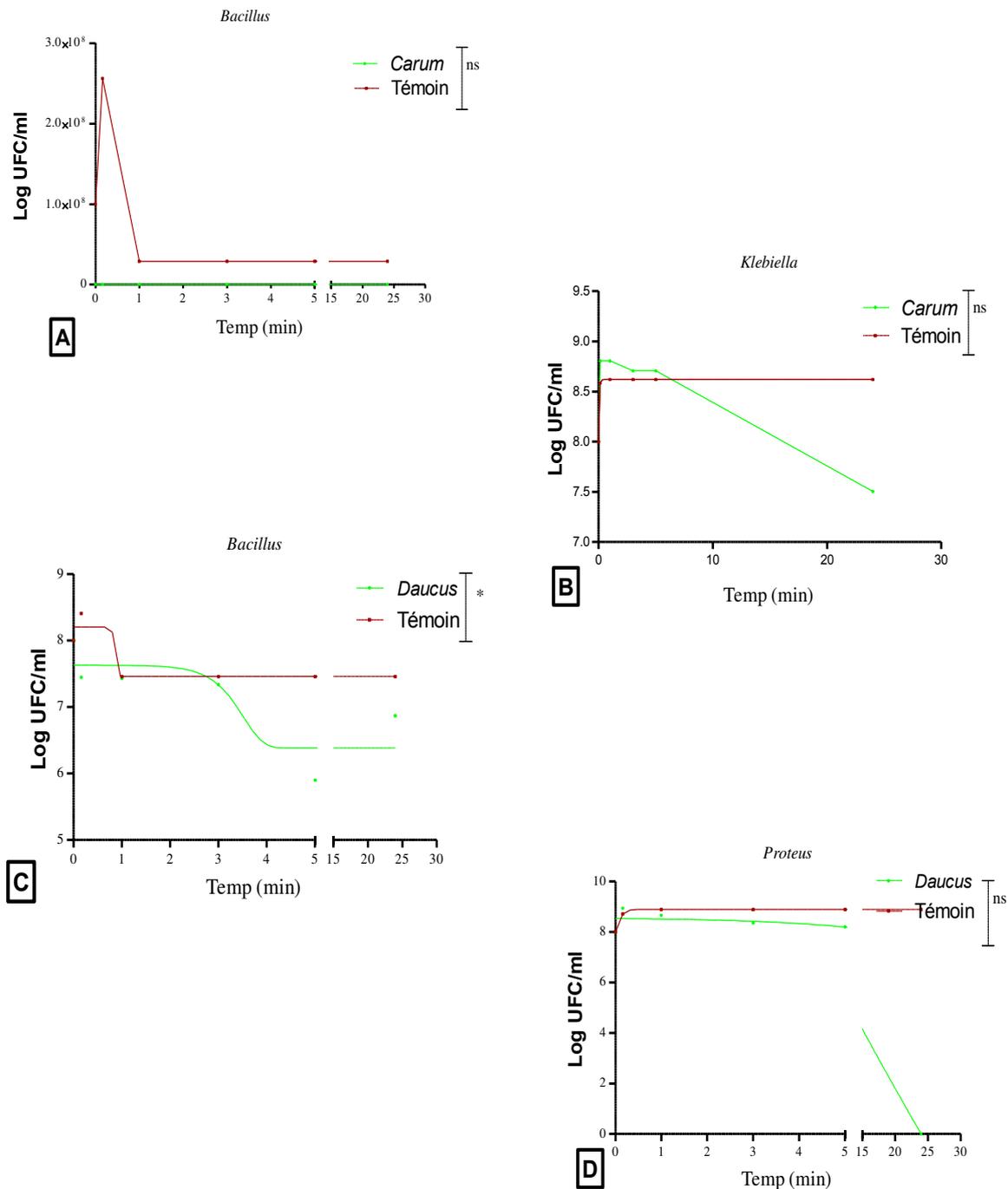
macro-dilution facile dans l'interprétation mais nécessite des quantités de l'extrait. La macro-dilution en gélose est rapide et économique et permet de tester plusieurs souches à la fois et les contaminations peuvent être directement reconnues mais nécessite de grandes quantités d'extraits. Pour les CMB, on ne peut pas les déterminer du moment que les effets observés sont, tous, bactériostatiques.

#### IV- 2- 3- DYNAMIQUE D'ACTION DES HE

La croissance bactérienne des souches sensibles exposées aux HE testées, est mesurée sur une période de 24 heures. Les taux de bactéricidie, générés sont déterminés par mesure de la décroissance bactérienne au cours de la même période. Les courbes de mort cellulaire, obtenues pour des concentrations en HE égales à la CMI, et la courbe de croissance des populations témoins sont présentées dans la **figure 22**. Les souches témoins présentent une courbe de croissance ordinaire avec une phase exponentielle pendant les 10 premières minutes. La phase stationnaire survient à partir d'une heure pour *B. cereus* et après trois heures pour *P. mirabilis*.

Pour les souches, traitées avec des concentrations équivalentes aux CMI, leurs nombres chutent de manière continue. Cependant, le seuil de détection ( $10^2$  UFC/ml) n'est atteint qu'avec la souche de *P. mirabilis* exposée à l'HE de *D. gracilis*. La souche de *B. cereus*, exposée aux HE aux concentrations équivalentes à leurs CMI, a réagit de manière semblable vis-à-vis des deux HE. D'abord, le nombre des UFC a diminué d'une façon lente ; jusqu'à la 5<sup>ème</sup> heure, ensuite la diminution continue, pour l'HE de *Carum* jusqu'à la 24<sup>ème</sup> heure, alors que la même souche exposée à l'HE de *Daucus* a manifesté une augmentation inattendue. L'effet de la même HE sur la population de *K. pneumoniae* n'est pas observé pendant toutes les 5 premières heures, cet effet n'est remarqué qu'après 15 heures où il y'a eu une diminution du nombre des UFC par rapport au nombre initial. *P. mirabilis*, mise en suspension avec l'HE de *D. gracilis*, était la souche la plus affectée au cours du temps en montrant au début une indifférence à l'HE traduite par une phase de développement pendant les 10 premières minutes. Ensuite, il y a eu une diminution continue pour atteindre le seuil de détection après les 24 heures.

On constate que l'activité des HE à l'encontre des bactéries testées perdure au cours du temps. Cette activité commence lentement jusqu'à peu près la cinquième heure, ensuite il y a une diminution rapide aboutissant aux faibles concentrations, sans pour autant arriver à l'absence totale de formes viables des bactéries. Cependant, cette diminution n'est significative statistiquement qu'avec la souche *Bacillus* soumise à l'HE de *Daucus* ( $P \leq 0.05$ ). Cela peut être expliqué du fait que les deux HE sont bactériostatiques et non pas bactéricides, comme il a été rapporté auparavant. Malgré l'agitation continue du milieu réactionnel, il y a toujours le problème de miscibilité de ces derniers, ce qui partage le milieu donnant lieu au développement bactérien loin des micelles des HE.



**Figure 22 : Courbes de la mort cellulaire des cellules bactériennes au cour du temps**  
**A : *B. cereus* avec l'HE de Carum, B : *K. pneumoniae* avec l'HE de Carum, C : *Bacillus* avec l'huile de l'HE de Daucus, D : *P. mirabilis* avec l'HE de Daucus.**

En effet, l'activité des HE diffère selon la phase de croissance, l'action est plus faible durant la phase stationnaire où la bactérie est en état de repos, en phase de déclin l'activité augmente.

La différence des activités, des deux HE sur *B. cereus*, suggère que ces dernières agissent soit sur des cibles cellulaires distinctes, soit sur les mêmes cibles mais que les molécules actives n'ont pas la même efficacité. Ces résultats ont montré que le temps de traitement et la concentration de l'HE avaient une grande influence sur l'effet antibactérien.

#### IV- 2- 4- EXPERIENCE DE LA LYSE CELLULAIRE

Cette expérience nous renseigne si l'HE agit sur la membrane cellulaire induisant ainsi la lyse. C'est l'un des mécanismes fréquents provoqués par les agents antimicrobiens. Les résultats obtenus sont représentés par des courbes montrant le pourcentage relatif de l'absorbance des suspensions bactériennes en fonction du temps (**Figure 23**).

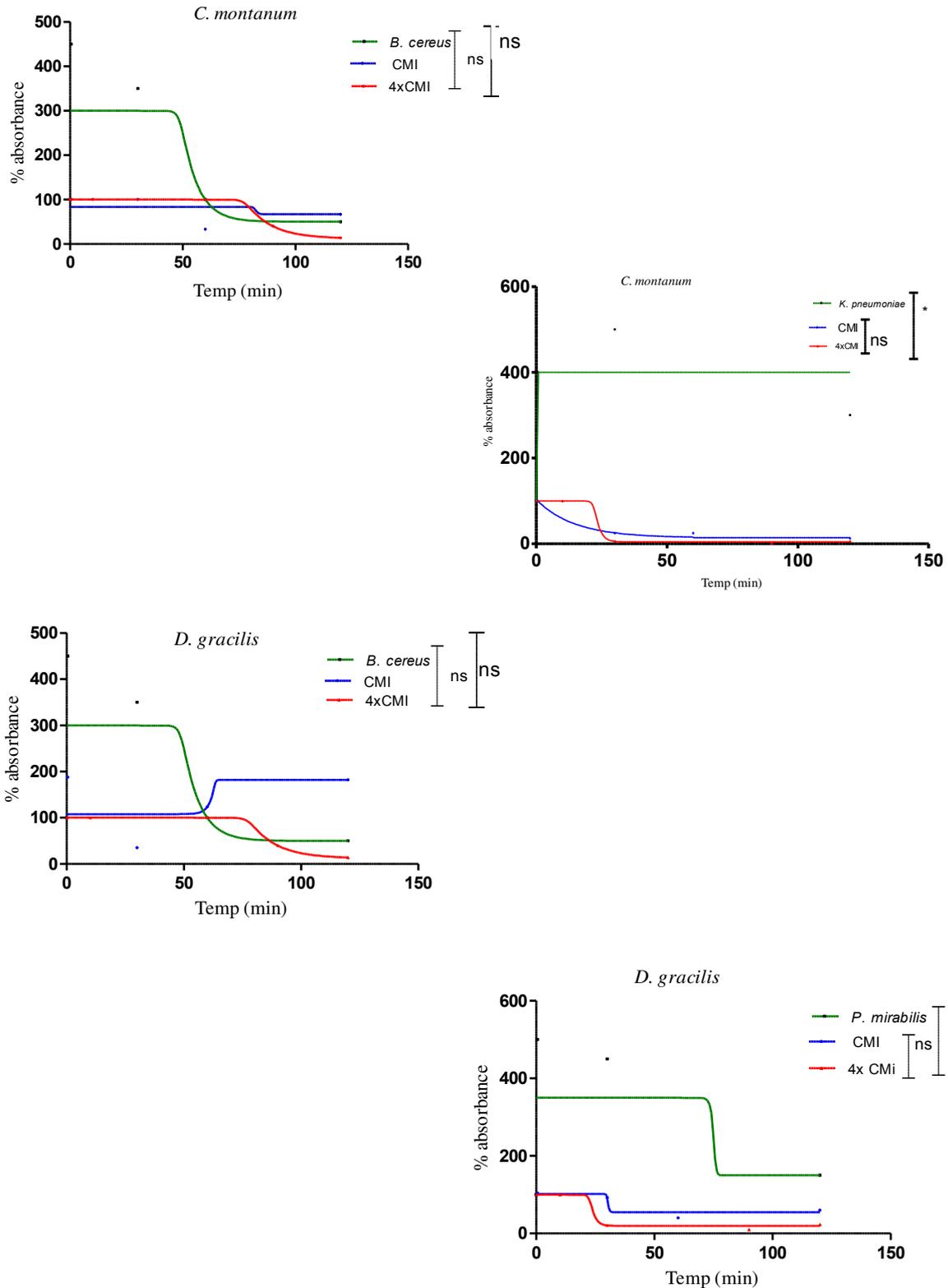
La diminution en absorbance est expliquée par un taux de lyse cellulaire car, seules les cellules vivantes absorbent à la longueur d'onde de 620 nm, ce qui n'est pas le cas pour les cellules lysées.

Les mesures des absorbances sont effectuées pendant 2 heures, à différents intervalles. Les absorbances relatives correspondant aux souches témoins représentent une augmentation atteignant plus de 400% témoignant la croissance ordinaire des bactéries dans la phase exponentielle. Ensuite, une chute d'absorbance apparaît suivant la phase stationnaire. Chaque souche présente une absorbance différente après 1 heure et demi d'incubation, cela dépend du cycle de vie de chaque souche.

Lors de l'exposition des bactéries à des concentrations correspondantes aux CMI, les valeurs des absorbances relatives ont diminué de 100% à des valeurs inférieures mais différentes ; 66.7% (*B. cereus* avec *C. montanum*), 12.5% (*K. pneumoniae* avec *C. montanum*), 35.3% (*B. cereus* avec *D. gracilis*), et 40% (*P. mirabilis* avec *D. gracilis*). Seul le deuxième cas où il y a eu une diminution continue jusqu'à la fin de l'expérience. Dans les trois autres cas, nous avons constaté qu'après une certaine chute d'absorbance, cette dernière augmente de nouveau.

L'incubation des souches avec des concentrations correspondantes à 4 fois la CMI, n'a pas donné de différences significatives ( $P \leq 0.01$ ) en pourcentages d'absorbances.

Les monoterpènes ou les sesquiterpènes hydrocarbonés et leurs dérivés oxygénés manifestent une activité antimicrobienne potentielle (**Bajpai et al., 2012**). Les interactions avec les structures hydrophobes de la bactérie jouent un rôle clé dans l'effet antimicrobien de ces molécules (**Carson et al., 2002**).



**Figure 23 : Le pourcentage de la lyse bactérienne en fonction du temps**  
 ns : non significatif,  $p \leq 0.05$

Les bactéries sont moins sensibles dans la phase stationnaire que dans la phase exponentielle. Puisque les agents antimicrobiens qui agissent sur le processus de synthèse ont souvent de petits effets dans la phase stationnaire, ces résultats suggèrent que la cible principale de l'HE n'est pas la synthèse des macromolécules (Carson *et al.*, 2002). La repousse observée avec

certaines souches (*Bacillus*) peut être dû à la nature labile des composés des HE (Petersen *et al.*, 2007).

La pénétration de composés actifs des plantes dans la membrane cytoplasmique est susceptible d'avoir un effet profond sur la propriété physique de la bicouche phospholipidique. Cette modification pourrait interférer avec les processus de transport trans-membranaire entraînant des changements dans la sécrétion de protéines associés à la virulence bactérienne dans le milieu environnant (De Souza *et al.*, 2010).

Quelques agents antimicrobiens causent de grosses altérations à la membrane plasmique provoquant ainsi la lyse complète de la cellule. Les enzymes auto lytiques induiront la lyse. Bien que l'activation des enzymes auto lytiques peuvent être responsables de cet effet, la lyse peut également être due à l'affaiblissement de la paroi de la cellule et la rupture ultérieure de la membrane cytoplasmique due à la pression osmotique (plutôt que d'une action spécifique sur la membrane) (Carson *et al.*, 2002).

L'HE de *D. gracilis* est active sur plus de souches (*B. cereus* et *P. mirabilis*) mais avec

#### IV- 2- 5- TECHNIQUE DES MICRO-ATMOSPHERES

La phase vapeur des HE semble être moins efficace. Les quantités minimales inhibitrices (QMI) varient de 30 µl à 80 µl. La fraction volatile de l'HE de *C. montanum* est complètement inactive sur *K. pneumoniae* qui est résistante même à la quantité de 80 µl, mais très active sur *B. cereus* avec une QMI de 20 µl seulement.

des QMI plus considérables (80 et 70µl respectivement). Dans une autre étude, l'HE de *D. carota*, sous sa forme vapeur, s'est avérée inactive sur *S. aureus*, *S. enteritidis*; et *P. aeruginosa* (Kloucek *et al.*, 2012).

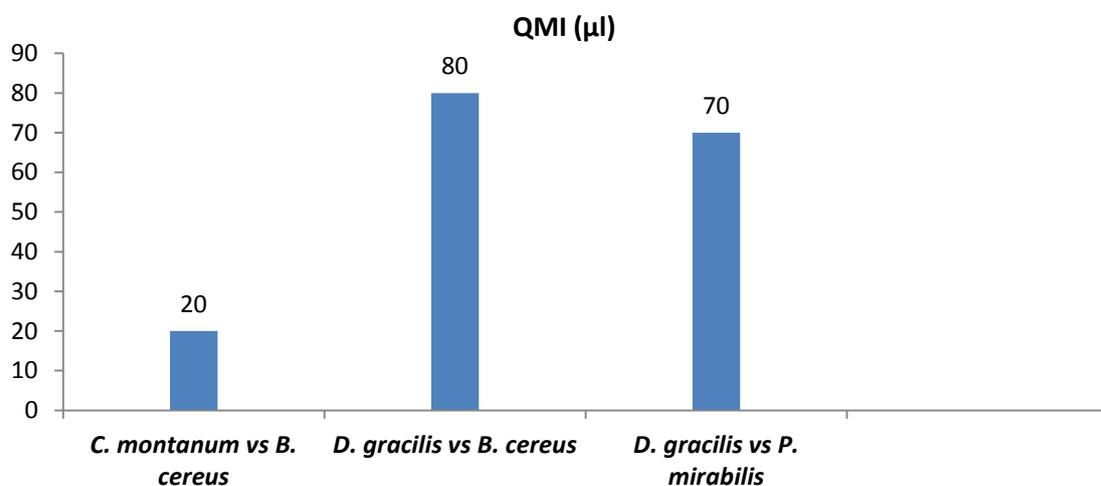


Figure 24 : Détermination des valeurs des QMI des huiles essentielles

Actuellement, il y'a plusieurs tentatives de tester le pouvoir inhibiteur de la phase volatile des HE car les techniques de contact direct font face à plusieurs inconvénients en raison de leur haute hydrophobie et de la volatilité des HE. Dans la diffusion, les composants des HE sont distribués dans l'agar selon leur affinité avec l'eau, et dans les procédés de dilution leur basse solubilité doit être surmonté par l'addition d'émulsifiants ou des solvants (tel que le Tween 80, le DMSO, l'éthanol), qui peuvent modifier leur l'activité (**Nedorostova et al., 2009**), et les composants volatils actifs sont susceptibles d'être évaporé, conjointement avec le solvant de dispersion. De même **Goñi et al. (2009)**, **Bae et al., (2015)**, ont rapporté que l'utilisation d'HE dans la conservation des aliments peut être limitée, étant donné que les concentrations élevées changent leurs propriétés organoleptiques et que la phase vapeur est plus efficace que la phase liquide. De ce fait, l'utilisation des HE en phase vapeur pourraient être très efficace contre les agents pathogènes et les bactéries d'altération à des concentrations plus faibles que la phase liquide, provoquant ainsi des effets néfastes minimaux sur les propriétés organoleptiques des aliments. **Tyagi et al. (2010)**, ajoutent que la forme vapeur se prête à une technologie récente et prometteuse en incorporant l'HE dans les matériaux d'emballage (emballage actif) plutôt que dans la matière alimentaire elle-même.

#### IV- 3 - ACTIVITE ANTI-OXYDANTE

Le pouvoir antioxydant a été évalué par deux méthodes différentes : le test au DPPH, et la mesure du pouvoir réducteur du Fer qui sert d'un indicateur significatif de l'activité antioxydante potentielle des composés (**Bougandoura et Bendimered, 2012 ; Narasimhan et al. 2013**).

##### IV- 3 -1- TEST DU DPPH

##### IV- 3 -1- 1-HUILES ESSENTIELLES

Les résultats de l'activité antioxydante à la fois des HE et des extraits bruts sont présentés avec les molécules de référence (le BHT, la Rutine et la Quercetine) par les courbes représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations (**Figure 25**).

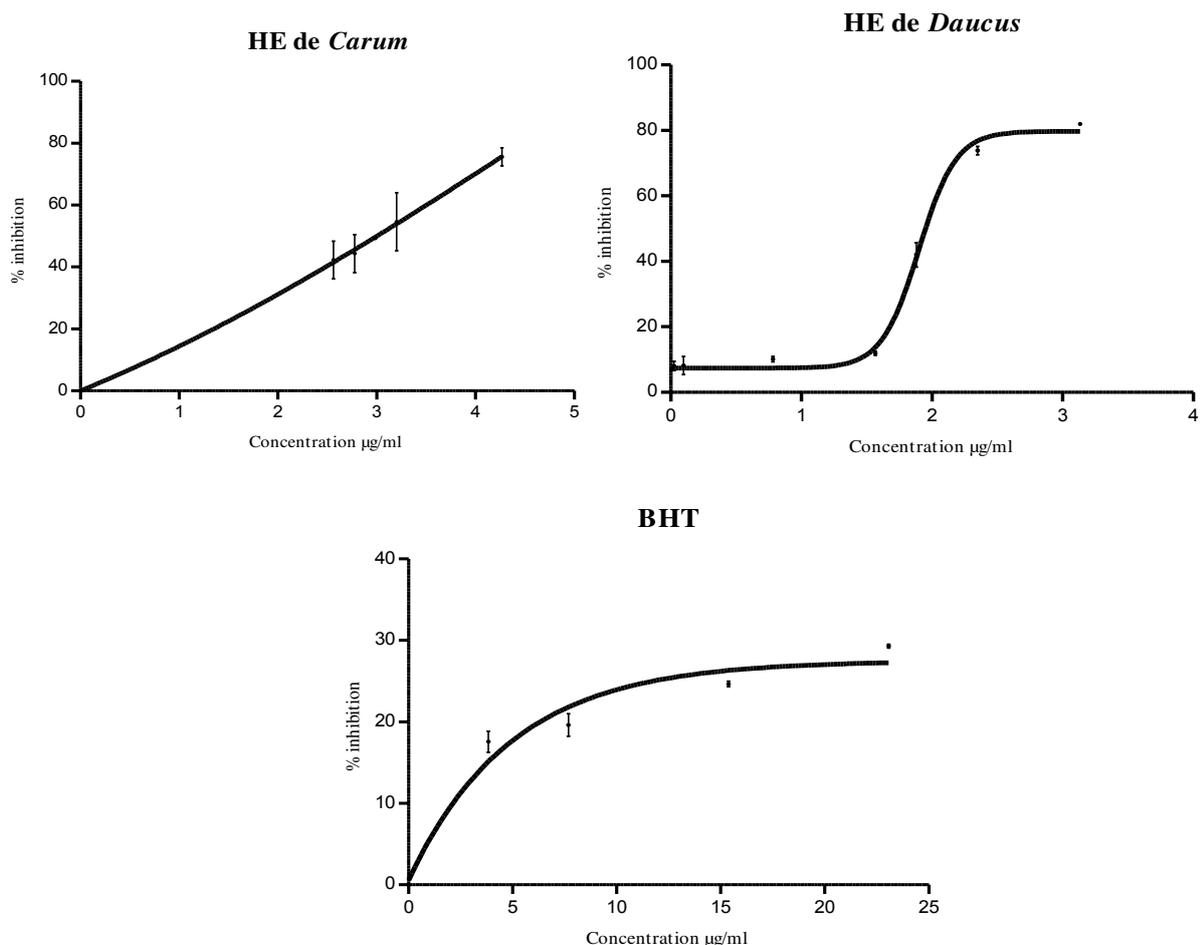
Il est clair que l'effet antioxydant des HE est dose-dépendant. L'augmentation de la concentration en HE de *Carum* a fait augmenter le pourcentage d'inhibition. Pour l'HE de *Daucus* l'activité est restée légère jusqu'à peu près 1.5 µg/ml ou il y a eu une augmentation remarquable.

**Tableau 12 : Valeurs des activités antioxydantes des deux HE**

	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
<b>HE</b>		
<i>C. montanum</i>	0.001	1.09 ± 0.37
<i>D. gracilis</i>	0.002	2.36 ± 0.2
<b>BHT</b>	0.087	87.26 ± 0.001

NB : n=3±SD

Les valeurs des IC<sub>50</sub> (**Tableau 12**) montrent que les HE de *C. montanum* et de *D. gracilis* sont les plus actives avec les IC<sub>50</sub> les plus basses, ces valeurs sont très faibles en les comparant avec celle du BHT (0.087 mg / ml) c'est le cas de *C. bulbocastanum* (**Kapoor et al., 2010**). Elles sont, également très loin d'être comparées avec celle obtenue par l'huile de *D. crinitus* avec une IC<sub>50</sub> > 1mg/ml (**Lanfranchi et al., 2010**). Selon **Bouzouita et al., (2008)**, de nombreux travaux, sur les activités antioxydantes des HE d'une grande variété de plantes aromatiques, montrent que ces propriétés sont en relation avec leur composition chimique, Il est difficile d'attribuer ces activités à un seul composé puisque un effet de synergie entre les différents composés peut avoir lieu. Certains composés volatils d'HE possèdent également le potentiel de conserver les aliments. Un certain nombre d'études sur les activités antioxydantes des HE de diverses plantes aromatiques ont indiqué que l'HE d'Origan, riche en Thymol et en Carvacrol, a un effet antioxydant considérable sur le procédé de l'oxydation (**Kulisic et al. 2004**). Cependant **Kapoor et al., (2010)**, attribuent cette activité, entre autre, au Nothoapiole présent parmi les constituants majeurs de l'HE de *C. bulbocastanum*.



**Figure 25 : Courbes de l'activité antioxydante des HE comparée à celle de la référence, NB : Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n= 3).**

#### IV- 3 -1- 2-EXTRAITS BRUTS

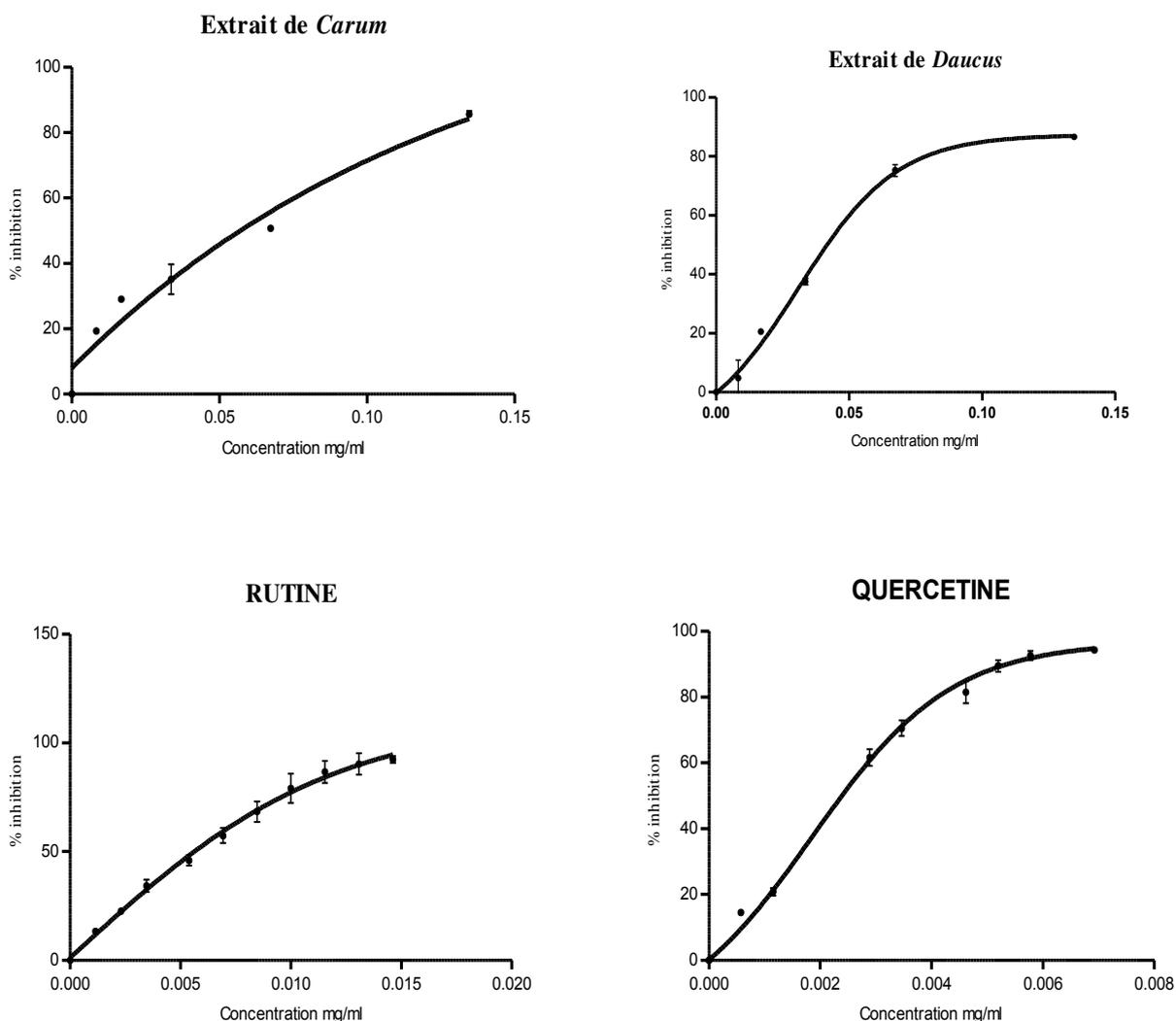
Un rapport directement proportionnel est constaté entre les concentrations des extraits bruts et l'activité antioxydante de ces derniers ce qui est observé aussi chez les références (**Figure 26**). Contrairement aux HE, les deux valeurs des IC<sub>50</sub> (0.06 mg/ ml) sont supérieures à celles de références. Ces résultats sont très en accord avec ceux obtenus par **Bendiabdellah et al., (2012)** par l'extrait méthanolique de *D. crinitus* (0.068 mg/ml) malgré leurs différentes compositions chimiques.

**Tableau 13 : Valeurs des activités antioxydantes des deux extraits bruts (Eb),  
Chaque valeur représente la moyenne ± SD**

	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
<b>Eb</b>		
<i>C. montanum</i>	0.065	65.04 ± 0.00
<i>D. gracilis</i>	0.060	60.09± 0.00
Quercetine	0.002	2.56 ± 0.00
Rutine	0.005	5.82 ± 0.00

Ces valeurs sont très bonnes par rapport à celles obtenues par **Thippeswamy et al., (2013)** pour l'extrait phénolique de *C. carvi* (IC<sub>50</sub> : 2.7 mg/ml) et l'extrait éthanolique de *C. nigrum* (IC<sub>50</sub> : 14 mg/ml), où l'activité antioxydante est toujours dose-dépendante (**Padmashree et al., 2007; Fang et al., 2010**). L'extrait de *Daucus carota* L. ssp. *sativus* a présenté également une activité antioxydante considérable (**Algarra et al., 2014**), mais l'IC<sub>50</sub> de l'extrait méthanolique de cette espèce (provenant de l'Inde) étaient plus grandes 1.9 mg/ml (**Ramesh et al., 2011**) et 22.17 mg/ml (**Shyamala et Jamuna, 2010**). Cependant, l'extrait méthanolique de *C. carvi* provenant du Himalaya a présenté une activité plus forte que celles de nos extraits avec une IC<sub>50</sub> de 0.0069 mg/ml (**Xavier et al., 2011**).

L'effet antioxydant est dû, d'après **Kulisic et al. (2004)**, à la présence de groupes hydroxyles dans leurs structures chimiques, Plusieurs composés non volatils tels que le Carnosol, la Quercétine, l'acide caféique et l'acide rosmarinique sont bien connus pour être de bons capteurs de radicaux libres.



**NB :** Chaque valeur représente la moyenne (n=3) ± SD

**Figure 26 : Courbes de l'activité antioxydante des extraits bruts et des références**

#### IV- 3 -1- 3-EFFET ANTIOXYDANT DES COMBINAISONS

L'effet antioxydant des mélanges (ME) des HE et ceux des extraits bruts son calculés selon la formule suivante :

$$EM= [(AE - AC)/ AC] \times 100$$

Les valeurs de l'activité antioxydante réelle (expérimentale), des mélanges des HE et des mélanges des extraits bruts, sont présentées avec les molécules de référence (le BHT, la Rutine et la Quercetine) par les courbes représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations (**Figure 27**).

#### IV- 3 -1- 3-1-HUILES ESSENTIELLES

Le mélange des deux HE a donné une IC<sub>50</sub> de 0.002 mg/ml et celui des extraits bruts 0.18 mg/ml (**Tableau 14**).

Malgré que l'activité, calculée directement du mélange à partir de la courbe, des deux HE (0.002mg/ml) est très basse par rapport à l'IC<sub>50</sub> du BHT (0.087 mg/ml), cette activité est considérée antagoniste du moment que la somme des deux activités individuelles (0.003 mg/ml) est plus grande de la valeur réelle mesurée directement, cet antagonisme est traduit par la valeur négative de -33.

Du fait que les HE des plantes médicinales sont des mélanges complexes, cela représente un potentiel pour le développement d'interactions synergiques, additives ou antagonistes. **Ngakegni-Limbili (2012)** attribue cet antagonisme antioxydant observé par les combinaisons des HE des différentes parties (graines et coques) du fruit du genre *Aframom* à l'environnement physico-chimique des molécules antioxydantes présentes dans les HE (en particulier, à celui des composés phénoliques), à des endo-interactions entre des composés de chaque HE et à des exo-interactions avec les différentes HE (**Ngakegni-Limbili, 2012**).

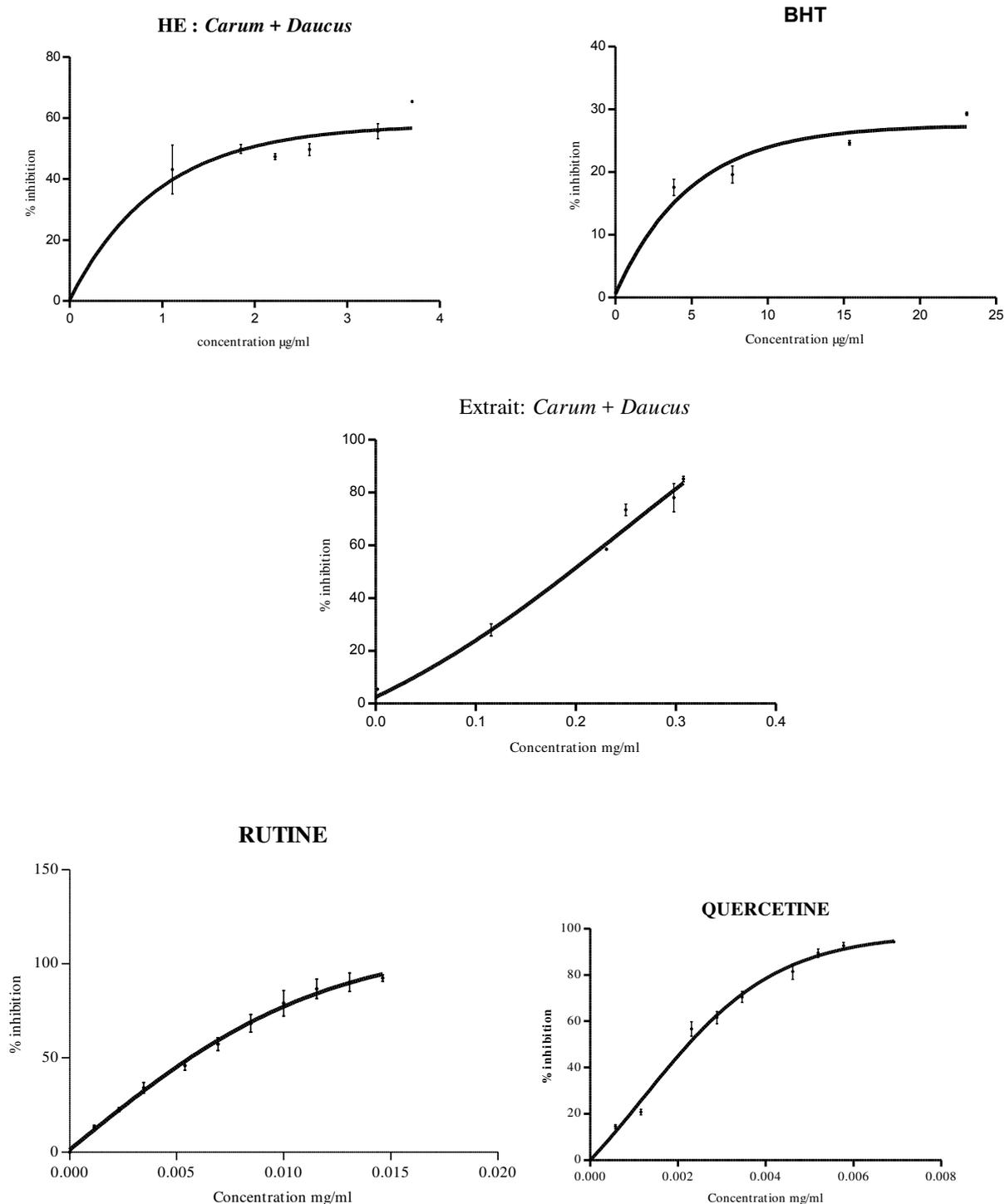
#### IV- 3 -1- 3-2-EXTRAITS BRUTS

Les extraits bruts, moins actifs individuellement, apparaissent plus actifs en combinaison en donnant une valeur supérieure à 1 lors de l'application de la relation de **Peyrat-Maillard (2001)** (**Tableau 14**), cela s'explique du fait que la somme des deux activités individuelles est plus grande que la valeur réelle mesurée à partir de la courbe de régression (0.18 mg/ml). Ça veut dire qu'il y a un effet synergique entre les deux extraits bruts.

**Tableau 14 : Valeurs des IC<sub>50</sub> des combinaisons des HE et des combinaisons des extraits bruts en mg/ml.**

	IC <sub>50</sub> AE	IC <sub>50</sub> AC	AM
Mélange des HE	0.002 ± 0.00	0.003	-33.3 a
Mélange des extraits	0.18 ± 0.001	0.125	44 s

AE : activité expérimentale, AC : activité calculée, AM : activité du mélange, a : antagonisme, s : synergie



**Figure 27 : Effet antioxydant des combinaisons des HE et des combinaisons des Extraits bruts comparées aux références. NB : Chaque valeur représente la moyenne (n=3) ± SD**

#### IV- 3 -2- TEST DU POUVOIR REDUCTEUR

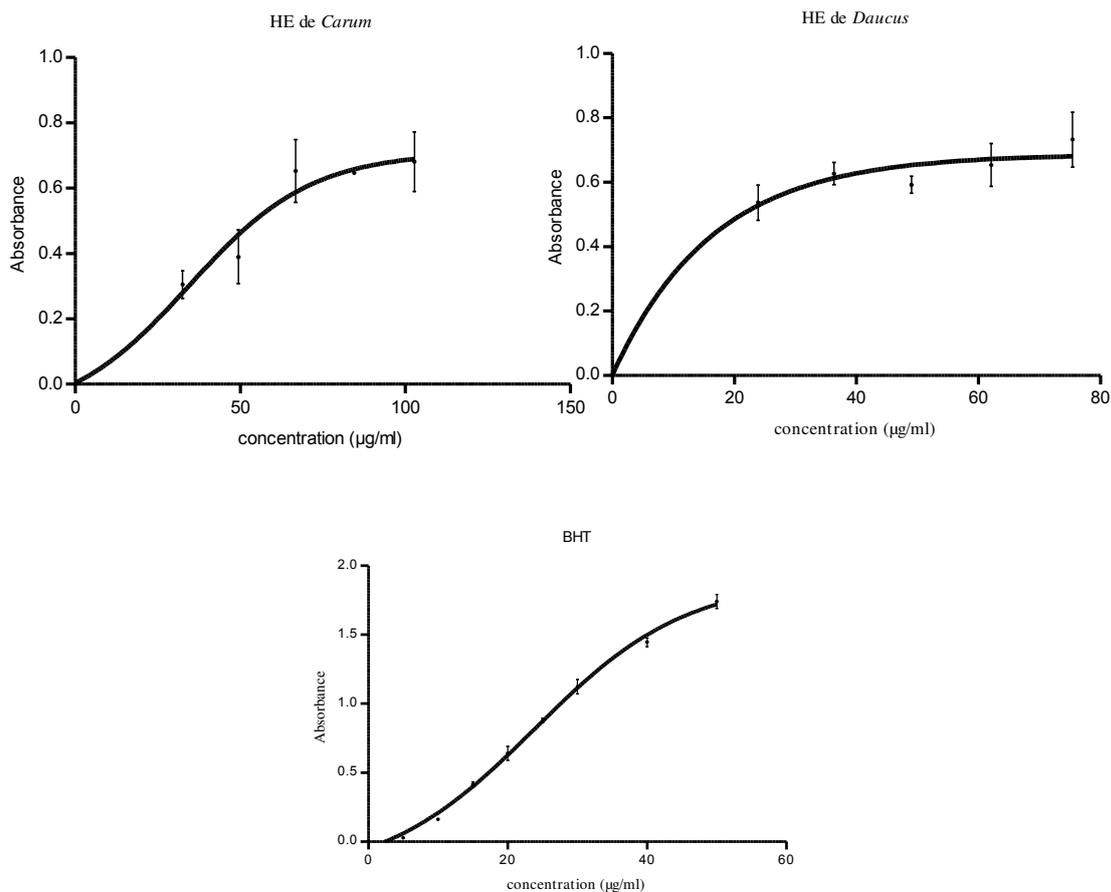
##### IV- 3 -2-1- HUILES ESSENTIELLES

La figure 28 montre les changements des absorbances en fonction des concentrations croissantes en HE. On peut constater que le pouvoir réducteur de l'HE de *C. montanum* est concentration dépendant, avec une augmentation qui n'est pas tout à fait régulière ; dans l'intervalle

allant de 49,47  $\mu\text{g/ml}$  à 84,57 $\mu\text{g/ml}$ , le pouvoir réducteur n'augmente que légèrement. Celui de l'HE de *D. gracilis* est dose dépendant jusqu'à la concentration de 75,44 $\mu\text{g/ml}$ , ensuite survient une chute d'absorbance. Le pouvoir du BHT est nettement supérieur à ceux des deux HE.

D'autres espèces testées de *Carum* ont, également, présenté des pouvoirs réducteurs intéressants ; L'HE de *C. nigrum*, *C. bulbocastanum* ont montré un pouvoir réducteur très élevé en comparaison avec le BHT (Singh *et al.*, 2006; Kapoor *et al.*, 2010). Quoiqu'on ne peut pas attribuer cette activité à une substance bien précise, certaines sont réputées d'être antioxydantes telles que le  $\gamma$ -terpinène et le myrcène chez le genre *Carum* et le  $\gamma$ -terpinène, le myrcène et le terpinolène chez le genre *Daucus* (Duke, 2015).

En général, le potentiel antioxydant d'une l'HE peut être du à la présence de divers types de composés. En outre, l'activité antioxydante pourrait être le résultat des effets synergiques de deux ou de plusieurs composés et la plupart des composés antioxydants naturels travaillent souvent en synergie les uns avec les autres pour produire un large éventail de propriétés antioxydantes qui créent un effet de défense du système contre les radicaux libres (Kapoor *et al.*, 2010).



**Figure 28 : Pouvoir réducteur des HE comparé avec celui du BHT.**

NB : Chaque valeur représente la moyenne (n=3)  $\pm$  SD

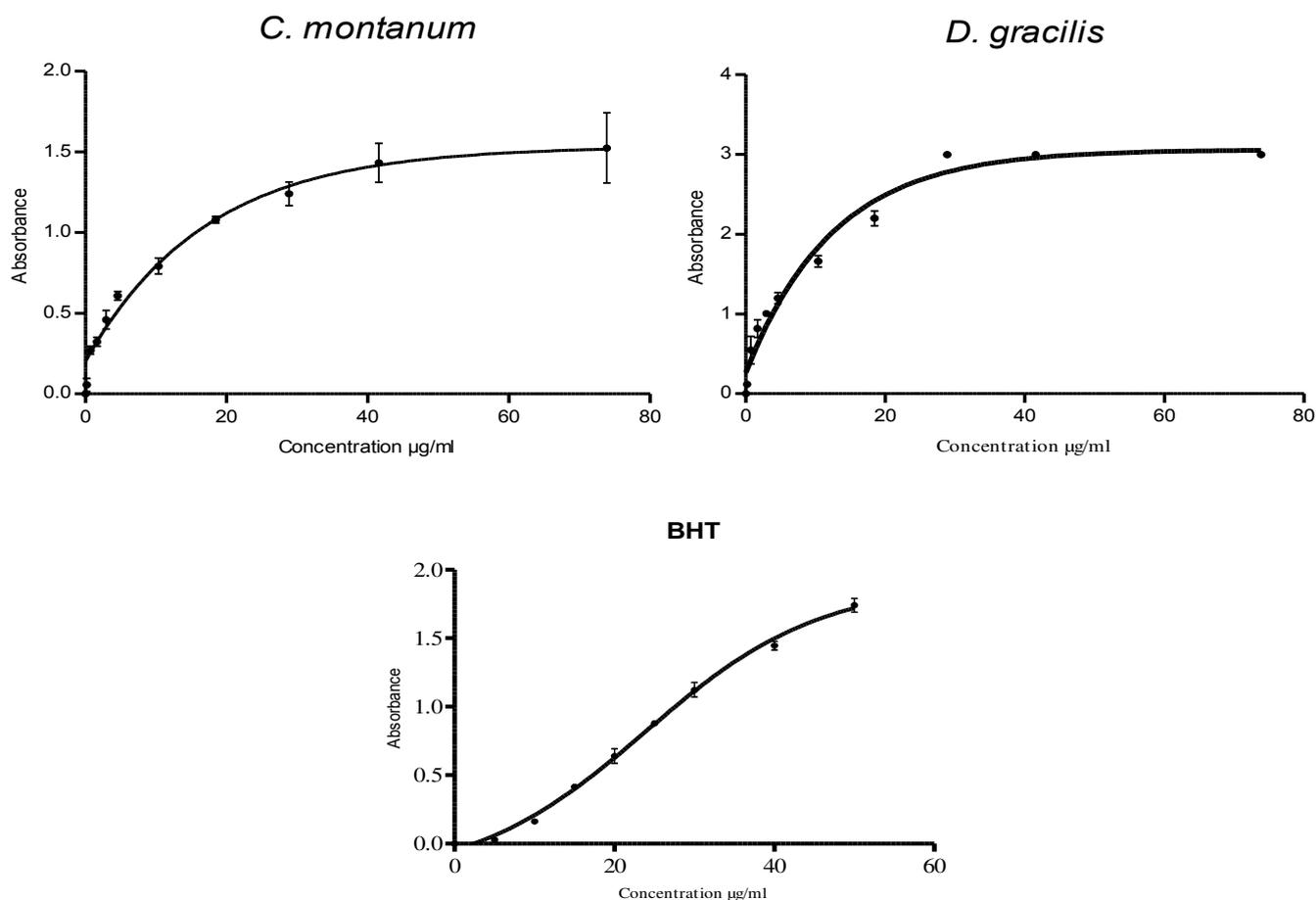
#### IV- 3 -2- 2-EXTRAIT BRUTS

La même technique est utilisée pour estimer le pouvoir réducteur des deux extraits bruts comparé à celui du BHT. Les extraits révèlent un pouvoir parfaitement dose dépendant ; une

augmentation en concentration des extraits dans le mélange réactionnel provoque une croissance en absorbance (**Figure 29**). Le pouvoir réducteur de l'extrait de *D. gracilis* continu à augmenter jusqu'à ce qu'il atteigne un plateau à la concentration de 28,86 µg/ml.

Contrairement aux HE, les deux extraits présentent des pouvoirs réducteurs plus importants que celui du standard (BHT). Ces résultats corroborent avec ceux de **Thippeswamy et al. (2013)** où le pouvoir réducteur de l'extrait phénolique de *C. carvi* a été déterminé en comparaison avec le BHT, ce pouvoir augmente en fonction de la concentration. L'extrait phénolique a montré un excellent pouvoir supérieur à celui du BHT. L'extrait de *Daucus carota* L. ssp. *sativus* a montré, également, un pouvoir réducteur considérable (**Algarra et al., 2014 ; Shyamala et Jamuna, 2010**), ainsi que l'extrait de la partie aérienne de *D. aureus* (**Djabo et al., 2013 ; Ramesh et al., 2011**). Cependant, **Xavier et al., (2011)** ont trouvé que l'extrait de *C. carvi* provenant du Himalaya est le moins actif, parmi plusieurs espèces testées, par rapport à l'acide ascorbique, utilisé comme référence.

Les propriétés réductrices sont généralement associées à la présence des agents réducteurs capables de passer leurs électrons aux ROS et de les éliminer ce qui rompt la chaîne de radicaux libres en donnant un atome d'hydrogène. Les réducteurs réagissent également avec certains précurseurs du peroxyde, empêchant ainsi la formation de ce dernier (**Liu et al., 2011**). Les composants dotés d'un pouvoir réducteur sont des donneurs d'électrons et peuvent réduire les intermédiaires oxydés du processus de la réaction de peroxydation des lipides, donc ils peuvent agir comme des antioxydants primaires ou secondaires (**Narasimhan et al., 2013**).



**Figure 29 : Pouvoir réducteur des extraits bruts comparé à celui du BHT du BHT.**

NB : Chaque valeur représente la moyenne (n=3) ± SD

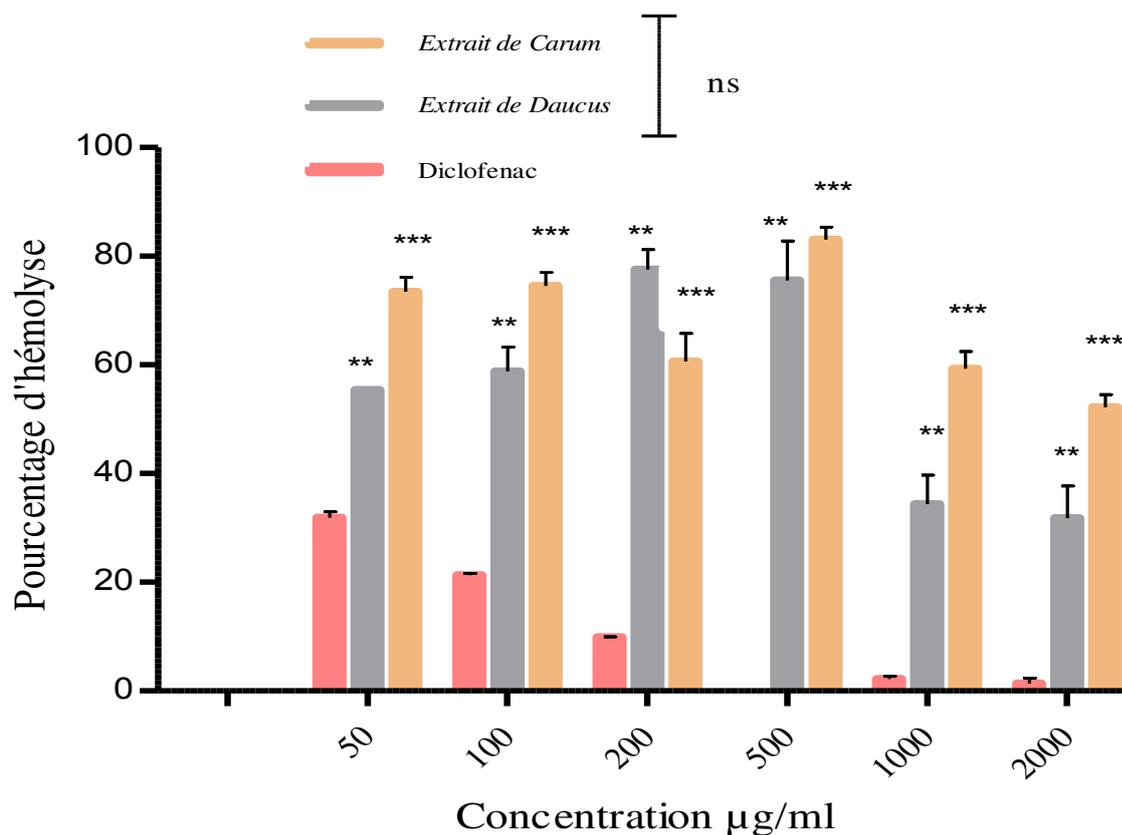
#### IV- 4 - ACTIVITE ANTI-HEMOLYTIQUE

Cette approche nous permet de connaître l'effet positif ou négatif de nos extraits sur le système anti-radicalaire des hématies.

L'activité anti-hémolytique (protection des érythrocytes) des extraits est testée sur les érythrocytes humains, elle est ensuite comparée à celle du diclofenac sodique, réputé d'être un bon anti-hémolytiques à des concentrations non toxiques (**Figure 30**).

L'extrait de *D. gracilis* présente une activité importante de stabilisation membranaire proche de celle du diclofenac sodique et son efficacité est dose-dépendante, il a montré l'inhibition maximale de 78.7% à la concentration de 1000µg/ml et le diclofenac a montré l'inhibition maximale de 98.66% à la même concentration.

Les érythrocytes sont considérés comme la cible majeure pour les radicaux libres en raison de la présence à la fois de hautes concentrations membranaires d'acides gras polyinsaturés et le transport de l'oxygène associé aux molécules d'hémoglobine qui sont des promoteurs puissants des espèces réactives à l'oxygène (**Ebrahimzadeh et al., 2010**). Il semble que la teneur élevée en phénols totaux dans l'extrait conduit à une activité anti-hémolytique puissante (**Ebrahimzadeh et al., 2010**).

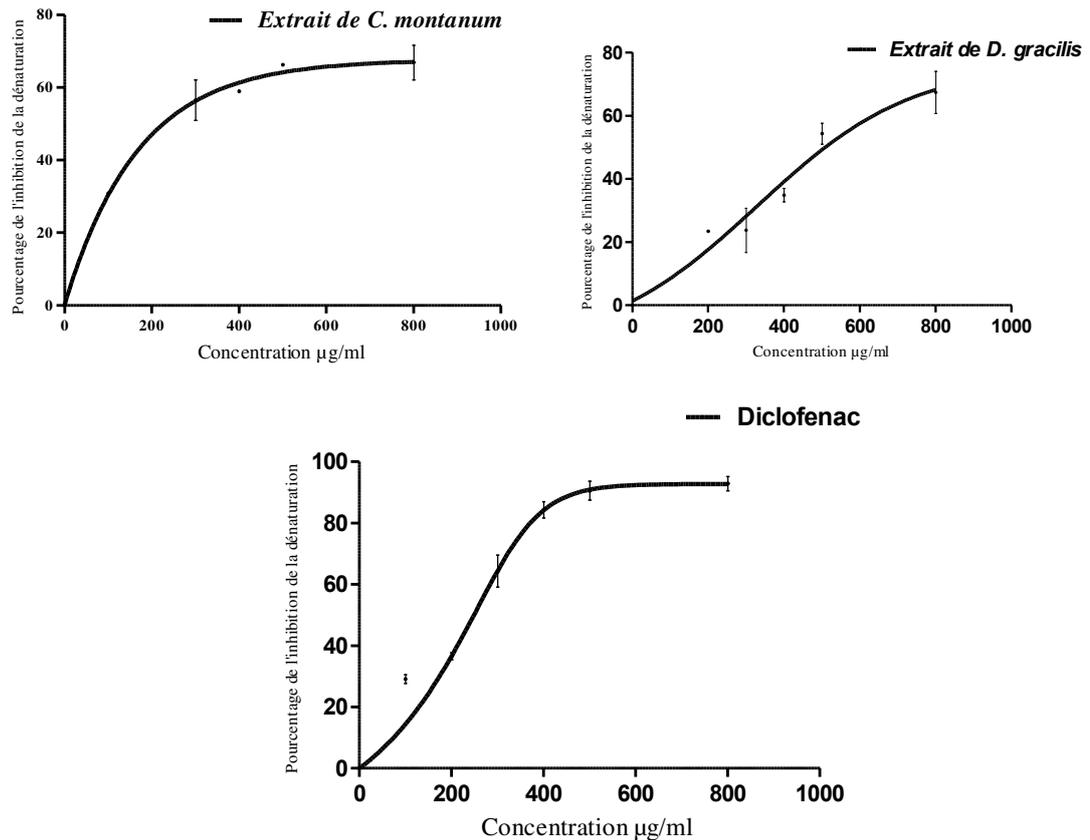


**Figure 30 : Activité anti-hémolytique des extraits bruts en fonction des concentrations des extraits**

**NB** : Chaque valeur représente la moyenne (n=3) ± SEM. La comparaison est faite contre le Diclofénac et entre les deux extraits \*\*\*:  $p \leq 0.01$

#### IV- 5 - ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* peut être liée à la dénaturation des protéines. Le pourcentage de l'inhibition de la dénaturation est comparé à celui du diclofénac (**Figure 31**). L'inhibition de la dénaturation est directement liée à la concentration de l'extrait. Le diclofénac est légèrement plus actif avec une  $IC_{50}$  de 218,67 µg/ml suivi par *Carum* ( $IC_{50}$  298,12 µg/ml ensuite *Daucus* avec une  $IC_{50}$  de 554,07 µg/ml. La comparaison des extraits avec le diclofénac montre que la différence entre les activités est non significative à 95 %.



**Figure 31 : Activité anti-inflammatoire des extraits bruts**

**NB :** Chaque valeur représente la moyenne (n=3) ± SEM

Les extraits d'autres espèces de *Carum* et de *Daucus* se sont montrés également anti-inflammatoires ; l'espèce *C. copticum* est douée d'activité anti-inflammatoire (Balaji *et al.*, 2012) ainsi que ses grains (Dashti-Rahmatabadi *et al.*, 2007; Zahin *et al.*, 2010). Les polyphénols semblent être responsables de cette activité ; en étudiant l'effet anti-inflammatoire de la propolis, Valenzuela-Barra *et al.* (2015) ont attribué cet effet à la présence des polyphénols en pourcentages considérables.

Les infections bactériennes provoquent une augmentation du nombre de neutrophiles, ce qui produit un effet oxydatif au niveau du site de l'invasion microbienne. Les érythrocytes ont été utilisés comme modèle pour étudier les interactions médicaments-membranes cellulaires. Les anti-inflammatoires stabilisent les érythrocytes contre le stress hémolytique induit par l'hypotonie ce qui empêche la libération de l'hémoglobine. Cette activité de stabilisation membranaire des érythrocytes est utilisée *in vitro* pour évaluer l'activité anti-inflammatoire de divers composés. La membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomale et sa stabilisation implique que l'extrait peut aussi bien stabiliser la membrane lysosomale, ce qui est important pour limiter la réponse inflammatoire en empêchant la libération des constituants lysosomaux des neutrophiles activés tels que les protéases bactériennes et qui provoquent en outre l'inflammation des tissus et des lésions (Kumar *et al.*, 2013).

## V- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La phytothérapie et l'aromathérapie ont été, depuis toujours, le premier refuge biomédical des populations contre les affections médicales. Jusqu'à présent les plantes médicinales n'ont pas cessé de l'être. Mais les grands progrès de la médecine moderne ont fait dévier un petit peu les tendances thérapeutiques vers les molécules de synthèse et surtout les antibiotiques. De ce fait, plusieurs maladies sont apparues lors de l'usage abusif de ces molécules y compris le phénomène de résistance microbienne. Les chercheurs se sont trouvés, alors, obligés de tourner de nouveaux aux vertus multiples de la nature pour prévenir ces phénomènes et pour trouver de nouvelles substances d'origines naturelles dotées d'activité biologiques intéressantes aux moindres risques pour la santé.

Notre travail s'est inscrit dans ce contexte par l'évaluation des activités biologiques de deux plantes locales de la famille des Apiacées; *C. montanum* et *D. gracilis*. Ces deux espèces n'ont pas été étudiées auparavant.

Pour évaluer ces activités on a d'abord commencé par l'analyse chimique des extraits. Les analyses des HE par CPG-MS ont montré l'existence du Nothoapiole (62.8 %), le Dillapiole (8.5 %) et l' $\alpha$ -humulène (7.1%) comme constituants majoritaires de l'HE de *Carum*. L'élémicine (35.3 %) et l'acétate de géranyl sont également présents à des pourcentages élevés (26.8 %) dans l'huile de *Daucus*. Le dosage des polyphénols dans les extraits bruts a montré que les deux plantes en contiennent des quantités considérables 101.5 pour *Carum* et 149.05 $\mu$ g d'acide gallique par mg d'extrait pour *Daucus*.

Les deux HE ainsi que le Nothoapiole ont montré des activités antimicrobiennes modérées et statiques sur les souches testées mais leur efficacité s'est atténuée en association avec la gentamicine. Néanmoins, on ne peut pas attribuer cette activité à un composé bien déterminé pour ne pas exclure la contribution des autres composés

Les souches sensibles ; *B. cereus*, *K. pneumoniae* et *P. mirabilis*, ont fait l'objet d'une étude antibactérienne approfondie par la détermination de leurs CMI par trois méthodes ;

L'HE de *Carum* a été plus active que celle de *D. gracilis* que ce soit du point de vu qualitatif ou quantitatif. *B. cereus* est la plus sensible avec l'HE de *Carum* par les plus petites CMI ; 55.5, 4.86  $\mu$ g/ml par macrodilution et 35.80  $\mu$ g/ml macrodilution solide avec la meilleure CMI enregistrée 4.86  $\mu$ g/ml de l'HE de *Carum* sur *B. cereus*. *P. mirabilis* a été la moins sensible à la CMI de 114.1  $\mu$ g/ml de l'HE de *Daucus*.

La décroissance bactérienne, au cours du temps de populations bactériennes traitées avec les HE n'était pas significative sauf pour *B. cereus* traitée par l'HE de *Daucus*. Alors que l'expérience de la lyse cellulaire a montré qu'il y a une légère différence en incubant ces souches avec des concentrations égales aux CMI et à 4xCMI ce qui suggère que les HE agissent, entre autre,

sur la membrane plasmique des souches de *K. pneumoniae* et *P. mirabilis* alors que celle de *B. cereus* n'était pas altérée.

L'application de la phase vapeur a montré, également, que l'HE de *Carum* est plus active sur *B. cereus* à la QMI de 20µl mais complètement inactive sur *K. pneumoniae*. En revanche, l'HE de *Daucus* est active sur *B. cereus* et *P. mirabilis* à des QMI de 80 et 70 µl respectivement.

Les extraits bruts des deux plantes se sont montrés presque inactifs sur la totalité des souches microbiennes testées malgré leur richesse en polyphénols, réputés d'être des antimicrobiens par excellence. En général l'activité antimicrobienne de nos extraits peut être classée comme suit ; Gentamicine > HE de *Carum* > HE de *Daucus* > Eb de *Daucus* > Eb de *Carum*.

Les HE et les extraits bruts des plantes testées par la méthode du DPPH et celle du pouvoir réducteur ont montré des activités antioxydantes importantes. Des IC<sub>50</sub> très intéressantes ont été obtenues par les HE et leur combinaison par la technique du DPPH. Les Eb aussi ont été effectifs mais pas au même niveau des HE. On peut classer cette activité ainsi ; HE de *Carum* > Mélange des HE > HE de *Daucus* > Quercetine > Rutine > Eb de *Daucus* > Eb de *Carum* > BHT > Mélange des Eb. Les résultats de la technique du pouvoir réducteur ont montré le contraire car les Eb et leur combinaison ont été plus actifs que les HE selon l'ordre suivant ; Eb de *Daucus* > BHT > Eb de *Carum* > HE de *Daucus* > HE de *Carum*. Ces deux activités demeurent concentration dépendants et peuvent être attribuées aux molécules phénoliques exerçant le rôle de récepteurs d'électrons.

En plus de l'effet antimicrobien et l'effet antioxydant, nous avons estimé le pouvoir protecteur des érythrocytes et l'inhibition de la dénaturation protéique, lié au processus de l'inflammation. Les extraits des deux plantes ont montré un pouvoir protecteur des érythrocytes. L'extrait de *Daucus* a été le plus protecteur. Mais de toute façon, ce pouvoir a été inférieur à celui du diclofénac ce qui conditionne leur utilisation dans la voie circulatoire à de grandes concentrations.

Les deux extraits ont manifesté, également, un effet anti-dénaturant qui n'est pas significativement différent du Diclofénac ( $P \leq 0.05$ ). Dans ce test l'extrait de *Carum* a été plus actif que celui de *Daucus* avec la plus grande activité par le Diclofénac.

Pour terminer, on peut dire que les extraits de *Carum* et de *Daucus* sont doués d'activités biologiques à des taux très similaires probablement du fait que les deux espèces font partie de la même famille botanique. Ces résultats peuvent être approfondis ultérieurement par :

- L'étude *in vivo* de ces activités.
- L'étude de la cytotoxicité des extraits des plantes étudiées afin de déterminer s'ils peuvent être utilisés en pharmacologie.
- Tester d'autres activités biologiques ; insecticide, anticancéreuse, antiparasitaire...etc.

- Abd Alla F.M.,** Abdelshafeek K.A., El-soll A.M. and Elsayed W.M. 2013. Volatile Oils, Lipid Constitutes and the Antimicrobial Activity of *Daucus syrticus* Growing in Libya. *Journal of the Arab Society for Medical Research*. 8: 96-103.
- Algarra M.,** Fernandes A., Mateus N., Freitas V., Esteves da Silva J.G.C. and Casado. 2014. Anthocyanin Profile and Antioxidant Capacity of Black Carrots *Daucus carota* L. ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef. from Cuevas Bajas, Spain. *Journal of Food Composition and Analysis*. 33 71-76.
- Alhakmani F.,** Kumar S. and Alam Khan S. 2013. Estimation of Total Phenolic Content, In-Vitro Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Flowers of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 3 (8): 623-627.
- Athamena S.,** Chalghem I., Kassah-Laouar A., Laroui S. et Khebri S. 2010. Activité Antioxydante et Antimicrobienne d'Extraits De *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Science Journal*. 11(1) : 69-81.
- Baby C.,** Gopal K. and Mohammed A. 2012. Composition of Volatile oil of *Carum copticum* Benth. and Hook Fruits. *International Research Journal of Pharmacy*. 3 (7):131-132.
- Bae Y.M.,** Yoon J.H., Hyun J.E. and Lee S.Y. 2015. Preservative Effectiveness Of Essential Oils in Vapor Phase Combined with Modified Atmosphere Packaging Against Spoilage Bacteria on Fresh Cabbage. *Food Control*. 51: 307-313.
- Bagirov V.Y.,** Belyi M.B., Rasulov F.A., Ismailov N.M. 1982. Aromatic Compounds of *Peucedanum pauciradiatum*. *Chemistry of Natural Compounds*. 1: 127-129.
- Bajpai V.K.,** Sharma A. and Baek K. 2013. Antibacterial Mode of Action of *Cudrania tricuspidata* Fruit Essential Oil, Affecting Membrane Permeability and Surface Characteristics of Food-Borne Pathogens. *Food Control*. 32: 582-590.
- Bakkali F.,** Averbeck S., Averbeck D. and Idaomar M. 2008. Biological Effects of Essential Oils, A Review. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 446-475.
- Balaji G.,** Chalamaiah M., Ramesh B. and Amarnath Reddy Y. 2012. Antidiarrhoeal Activity of Ethanol and Aqueous Extracts of *Carum copticum* Seeds in Experimental Rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2 (2): S1151-S1155.
- Bamoniri A.,** Abdolrasoul H. Ebrahimabadi, Mazoochi A., Behpour M. Kashi, F.J. and Batooli H. 2010. Antioxidant and Antimicrobial Activity Evaluation and Essential Oil Analysis of *Semenovia tragioides* Boiss. From Iran. *Food Chemistry*. 122: 553-558.
- Baser K.H.C and Buchbauer G.** 2010. Handbook of Essential Oils; Science, Technology and Applications. Ed. Taylor and Francis Group.
- Basílico M.Z. and Basílico J.C.** 1999. Inhibitory Effects of Some Spice Essential Oils On *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 Growth and Ochratoxin A Production. *Letters in Applied Microbiology*. 29 (4) : 238-241.
- Belaiche P.** 1979. Traité De Phytothérapie et d'Aromathérapie. Tome 1 ; L'Aromatogramme. Ed. Maloine.
- Bendahou M.,** Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., Desjobert J.M., Bernardini A.F. and Costa J. 2008. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential Oil and Extract Obtained By Microwave Extraction: Comparison with Hydrodistillation. *Food Chemistry*. 106:132-139.
- Bendiabdellah A.,** Dib M.A., Meliani N., Djabou N., Allali H. and Tabti B. 2012. Preliminary Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Solvent Extracts From *Daucus crinitus* Desf., from Algeria . *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 02 (07): 92 - 95.

- Bendiabdellah A.**, Dib M.A., Meliani N., Muselli A., Djabou N., Tabti B. and Costa J. 2013. Antibacterial Activity of *Daucus crinitus* Essential Oils along the Vegetative Life of the Plant. *Journal of Chemistry*. 01-07.
- Berahou A.**, Auhmanib A., Fdil N., Benharref A., Jana M. and Gadhi C.A. 2007. Antibacterial Activity of *Quercus ilex* Bark's Extracts. *Journal of Ethnopharmacology* .112: 426-429.
- Bertrand X.**, Costa Y., et Pina P. 2005. Surveillance de La Résistance Bactérienne Aux Antibiotiques dans Les Bactériémies : Données de L'observatoire National De L'épidémiologie de La Résistance Bactérienne Aux Antibiotiques (ONERBA) 1998-2003. *Médecine et maladies infectieuses*. 35 : 329-334.
- Bougandoura N. et Bendimerad N.** 2013. Evaluation De L'activité Antioxydante des Extraits Aqueux Et Méthanolique De *Satureja calamintha ssp.Nepeta* (L.) Briq. *Nature et Technologie*. 14 - 19.
- Bourkhiss M.**, Hnach M., Paolini J., Costa J., Farah A. and Satrani B. 2010. Propriétés Antioxydantes Et Anti-Inflammatoires Des Huiles Essentielles des Différentes Parties de *Tetraclinis articulata* (VAHL). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. 79 : 141-154.
- Bouzouita N.**, Kachouri F., Ben Halima M., et Chaabouni M.M. 2008. Composition Chimique et Activités Antioxydante, Antimicrobienne et Insecticide de L'huile Essentielle de *Juniperus phoenicea*. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*. 10: 119-125.
- Bruneton J.** 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. 3<sup>ème</sup> édition. Ed. TEC et DOC, Paris.
- Burt S.** 2004. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods; A Review. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 223- 253.
- Calo J.R.**, Crandall P.G., O'Bryan C.A. and Ricke S.C. 2015. Essential Oils as Antimicrobials in Food Systems - A review. *Food Control*. 54: 111-119.
- Carson C.F.** Mee B.J. and Riley T.V. 2002. Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1914-1920.
- Cowan M. M.** 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical microbiology reviews*. 12 (4): 564-582.
- Cloete T.E.** 2003. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation* 51:277- 282.
- CLSI.** 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard. Ninth Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI document M07-A9.
- Crouzet J.** 1998. Arômes Alimentaires. Techniques de l'Ingénieur, Traité Génie Des Procédés. Doc F 4-100 : 1-18.
- D'Arrigo M.**, Ginestra G, Mandalari G., Furneri P.M. and Bisignano G. 2010. Synergism and Post Antibiotic Effect of Tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Phytomedicine*. 17: 317-322.
- Da Silveira e Sá R.**, Andrade L.N., Oliveira R.D.R.B. and De Sousa D.P. 2014. A Review on Anti-Inflammatory Activity of Phenylpropanoids Found in Essential Oils. *Molecules*. 19:1459-1480.
- Dashti-Rahmatabadi M.H.**, Hejazian S.H., Morshedi A. and Rafati A. 2007. The Analgesic Effect of *Carum copticum* Extract and Morphine on Phasic Pain In Mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 109: 226-228.
- De Araújo A.A.**, Soares L.A.L., Ferreira M.R.A., Neto M.S.A.N., da Silva G.R., de Araújo R.F., and al. 2014. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic

- and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. *Journal of Ethnopharmacology*. 156 : 88-96.
- De Martino L.** De Feo V., Fratianni F. and Nazzaro F. 2009. Chemistry , Antioxidant, Antibacterial and Antifungal Activities of Volatile Oils and Their Components. *Natural Products Communications*. 4: 1741-1750.
- De Souza E.L.**, De Barros J.C., De Oliveira C.E.V., Da Conceição M.L. 2010. Influence of *Origanum vulgare* L. Essential Oil on Enterotoxin Production, Membrane Permeability and Surface Characteristics of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*. 137: 308-311.
- Djabo N.**, Meliani N., Dib M.A., Bendiabdellah A., Allali H. and Tabti B. 2013. Preliminary Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Solvent Extracts from *Daucus aureus* Desf. from Algeria. *International Journal of Traditional and Herbal Medicine*. 1(1):2.
- Duke J.** <http://www.ars-grin.gov/duke/>. 2015. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases. Agricultural Research Service of the US Department of Agriculture.
- Ebrahimzadeh M.A.**, Nabavi S.M., Nabavi S.F., Eslami B. and Rahmani Z. 2010. Antioxidant and Antihaemolytic Activities of the Leaves of *Kefe cumin* (*Laser trilobum* L) *Umbelliferae*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 9 (5): 441-449
- EUCAST. 2000.** European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Terminology Relating To Methods for the Determination of Susceptibility of Bacteria To Antimicrobial Agents. Document E. Def 1.2.
- Euro+Med.** 2013. Euro+Med PlantBase. The information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. Published on the Internet <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/>.
- Fang R.**, Jiang C.H., Wang X.Y., Zhang H.M., Liu Z.L., Zhou L., Du S.S. and Deng Z.W. 2010. Insecticidal Activity of Essential Oil of *Carum Carvi* Fruits from China and Its Main Components against Two Grain Storage Insects. *Molecules*. 15: 9391-9402.
- Fellah S.**, Romdhane M. and Abderraba M. 2006. Extraction Et Etude Des Huiles Essentielles de *la Salvia officinalis*.L Cueillie Dans Deux Regions Differentes De La Tunisie. *Journal de la société Algérienne de Chimie*. 16 (2) : 193-202.
- Flamini G.**, Cioni P.L., Maccioni S. and Baldini R. 2007. Composition of The Essential Oil of *Daucus gingidium* L. ssp. *Gingidium*. *Food Chemistry*. 103 (4): 1237-1240,
- Franco D.**, Sineiro J., Rubilar M., Sánchez M., Jerez M., Pinelo M., Costoya N. and Núñez M.J. 2008. *Electronic Journal of environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 7 (8): 3210-3216.
- Flamini G.**, Smaili T., Zellaoui A., Gherraf N. and Cioni P.L. 2013. Effect of Growth Stage on Essential-Oil Yield and Composition of *Daucus sahariensis*. 10 (11) : 2014-2020.
- Garnero J.** 1996. Huiles essentielles. Techniques de l'Ingénieur ; Traité Constantes Physico-chimiques. vol. papier n°: K2. Dossier : K345:1-39.
- Ghestem A.**, Seguin E., Paris M. et Orecchioni A.M. 2001. Le Préparateur En Pharmacie, Dossier 2, Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie, Homéopathie. Ed. TEC et DOC.
- Glisic S.B.**, Mistic D.R., Stamenic M.D., Zizovic I.T., Asanin R.M. and Skala D.U. 2007. Supercritical Carbon Dioxide Extraction Of Carrot Fruit Essential Oil: Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Food Chemistry*. 105 (1): 346-352,
- Gonçalves E.M.**, Pinheiro J., Abreu M., Brandão T.R. and Silva C.L.M. 2010. Carrot (*Daucus carota* L.) Peroxidase Inactivation, Phenolic Content and Physical Changes Kinetics Due To Blanching. *Journal of Food Engineering*. 97: 574-581.

- Gonny M.,** Bradesi P. and Casanova J. 2004. Identification Of The Components of The Essential Oil From Wild Corsican *Daucus carota* L. Using <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy. *Flavour Fragrance Journal*. 19: 424-433.
- Goñi P.,** López P., Sánchez C., Gómez-Lus R., Becerril R. and Nerín C. 2009. Antimicrobial Activity In The Vapor Phase Of A Combination of Cinnamon and Clove Essential Oils. *Food Chemistry*. 116: 982-989.
- Guillemot D.** et Leclercq R. 2005. Impact De L'exposition Des Populations Sur Le Risque De Résistance Bactérienne. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 35 : S212-S220.
- Guinoiseau E.** 2010. Molécules Antibactériennes Issues D'huiles Essentielles : Séparation, Identification Et Mode D'action. Thèse Présentée Pour L'obtention Du Grade De Docteur De L'université De Corse.
- Hancock R.E.W.** 2005. Mechanisms of Action of Newer Antibiotics For Gram-Positive Pathogens. *The LANCET Infectious Diseases*. 5 (4): 209-218.
- Hemaiswarya S.,** Kruthiventi A.K. and Doble M. 2008. Synergism Between Natural Products and Antibiotics Against Infectious Diseases. *Phytomedicine*. 15: 639-652.
- Hulin V.,** Mathot A.G., Mafart P. et Dufossé L. 1998. Les Propriétés Antimicrobiennes Des Huiles Essentielles et Composés D'aromes. *Sciences des aliments*. 18: 563-582.
- Ito M.,** Toyoda M., Yuba A. and Honda G. 1999. Genetic Analysis of Nothoapiol Formation In *Perilla frutescens*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 22: 598-601.
- Ivanic R.,** Savin K. and Robinson F.V. 1983. Essential Oil from *Pimpinella serbica* Fruits. *Planta Medica*. 48: 60-61.
- Iserin P.** 2001. Encyclopédie Des Plantes Médicinales, Identification, Préparation Et Soins. Ed. Larousse.
- Kapoor I.P.,** Singh B., Singh G., De Heluani C.S., De Lampasona M.P. and Catalan C.A. 2010. Chemistry and Antioxidant Activity of Essential Oil and Oleoresins of Black Caraway (*Carum bulbocastanum*) fruits: Part 69. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90(3):385-90.
- Khajeh M.,** Yamini Y., Sefidkon F. and Bahramifar N. 2004. Comparison of Essential Oil Composition of *Carum copticum* Obtained By Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Hydrodistillation Methods. *Food Chemistry*. 86: 587-591.
- Khalfallah A.,** labed A., semra Z., Ai kaki B. Kabouche A., 2011. Antibacterial Activity and Chemical Composition of The Essential Oil of *Ammi visnaga* L. (Apiaceae) from Constantine, Algeria. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 1 :( 3) 302-305.
- Kloucek P.,** Smid J., Frankova A., Kokoska L., Valterova I. and Pavela R. 2012. Fast Screening Method For Assessment of Antimicrobial Activity of Essential Oils In Vapor Phase. *Food Research International*. 47:161-165.
- Kocic-Tanackov S.,** Dimic G., Levic J., TanackovI, Tepic A. and Vujicic B. 2012. Effects of Onion (*Allium cepa* L.) and Garlic (*Allium sativum* L.) Essential Oils on the *Aspergillus versicolor* Growth and Sterigmatocystin Production. *International Journal of Food Science*. 77: M 278-M 284.
- Ksouri R.,** Megdiche W., Falleh H., Trabelsi N., Boulaaba M., Smaoui A. and Abdelly C. 2008. Influence of Biological, Environmental and Technical Factors On Phenolic Content and Antioxidant Activities of Tunisian Halophytes. *Comptes Rendus Biologies*. 331: 865- 873.
- Kubeczka K.H. and Ullmann I.** 1983. Essential Oils of Apiaceae (*Umbelliferae*); 9 Chemotypes of *Molopospermum peloponnesiacum* (L.) Koch. *Zeitschrift fuer Naturforsch C: Journal of Biosciences*. 38C: 189-193.
- Kumar B.S.A.,** Saran G.S., Mouna A. and Kumar C.N. 2013. *In vitro* Antiinflammatory Activity of *Tankana churna*. *Food and Feed Research*. 40 (1): 17-20.

- Kulisic T.**, Radonic A., Katalinic V. and Milos M. 2004. Use of Different Methods For Testing Antioxidative Activity Of Oregano Essential Oil. *Food Chemistry*. 85: 633-640.
- Laouer H.**, El Kolli M., Prado S. and Baldovini N. 2009. An Antibacterial and Antifungal Phenylpropanoid from *Carum montanum* (Coss. et Dur.) Benth. et Hook. *Phytotherapy Research*. 23(12): 1726-1730.
- Lanfranchi D.**, Laouer H., El Kolli M., Prado S., Maulay-Bailly C. and Baldovini N. 2010. Bioactive Phenylpropanoids from *Daucus crinitus* Desf. from Algeria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (4): 2174- 2179.
- Lawton B.P.** 2007. Parsleys, Fennels, and Queen Anne's Lace, Herbs and Ornamentals from the Umbel Family. Ed. Timber Press, Inc. Pp: 9-35.
- Li H.**, Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F. and Jiang Y. 2007. Evaluation of Antioxidant Capacity and Total Phenolic Content of Different Fractions of Selected Microalgae. *Food Chemistry*. 102:771-776.
- Liolios C.**, Laouer H., Boulaacheb N., Gortzi O. and Chinou I. 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Algerian *Phlomis bovei* De Noé sub sp. *Bovei*. *Molecules*. 12: 8.
- Liu D.M.**, Sheng J.W., Qi H.M., Zhang W.F., Han C.M. and Xin X.L. 2011. Antioxidant Activity of Polysaccharides Extracted From *Athyrium multidentatum* (Doll) Ching. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(14): 3061-3066.
- Luber P.**, Genschow E.E., Wagner J., and Hahn H. 2003. Comparison of Broth Microdilution, E-Test and Agar Dilution Methods For Antibiotic Susceptibility Testing For *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(3): 1062-1068.
- Ma X.**, Liang J., Zheng C., Hu C., Zhao X., Rahman K. and Qin L. 2013. Phenylpropanoids from *Podocarpium podocarpum*. *Pharmaceutical Biology*. 51(8): 1021-1025.
- Mathela C.S.**, Joshi R.K., Bisht B.S. and Joshi S.C. 2015. Nothoapiole and  $\alpha$ -Asarone Rich Essential Oils from Himalayan *Pleurospermum angelicoides* Benth. *Records of Natural Products*. 9 (4): 546-552.
- Maxia A.**, Marongiu B., Piras A., Porcedda S., Tuveri E., Gonçalves M.J., Cavaleiro C. and Salgueiro L. 2009. Chemical Characterization and Biological Activity of Essential Oils From *Daucus carota* L. subsp. *carota* Growing Wild On The Mediterranean Coast and On The Atlantic Coast. *Fitoterapia*. 80: 57-61.
- Mayrhofer S.**, Domig K.J., Mair C., Zitz U., Huys G. and Kneifel W. 2008. Comparison of Broth Microdilution, Etest, and Agar Disk Diffusion Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Lactobacillus acidophilus* Group Members. *Applied and Environmental Microbiology*. 3745-3748.
- Mohagheghzadeh A.**, Faridi P. and Ghasemi Y. 2007. *Carum copticum* Benth. and Hook. Essential Oil Chemotypes. *Food Chemistry*. 100: 1217-1219.
- Mohammedi Z.** and Atik F. 2012. Pouvoir Antifongique et Antioxydant De L'huile Essentielle de *Lavandula stoechas* L. *Nature et Technologie*. 06 : 34- 39.
- Naghdi Badi H.**, Yazdani D., Mohammad Ali S. and Nazari F. 2004. Effects of Spacing and Harvesting Time on Herbage Yield and Quality/Quantity of Oil In Thyme *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*. 19: 231-236.
- Narasimhan M.K.**, Pavithra S.K, Krishnan V. Chandrasekaran M. 2013. *In vitro* Analysis of Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activity of *Enteromorpha antenna*, *Enteromorpha linza* and *Gracilaria corticata* Extracts. *Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 8: 151-159.
- Nedorostova L.**, Kloucek P., Kokoska L., Stolcova M. and Pulkrabek J. 2009. Antimicrobial Properties of Selected Essential Oils In Vapor Phase Against Food Borne Bacteria. *Food Control*. 157-160.

- Nébié R.H.C.**, Yaméogo R.T., Bélanger A. et Sib F.S. 2004. Salicylate de Méthyle, Constituant Unique De L'huile Essentielle De L'écorce Des Racines de *Securidaca longepedunculata* du Burkina Faso. *Comptes Rendus Chimie*. 7 : 1003-1006.
- Németh E.** Caraway: the Genus *Carum*. 2006. Ed. University of Horticulture and Food Industry. Switzerland. 1-13.
- Ngakegni-Limbili A.C.** 2012. Etude de Synergie Des Effets Chimiques Et Biologiques Des Lipides De Réserves Et Des Huiles Essentielles Des Fruits Et Graines Saisonniers De La Sous-Région Afrique Centrale. Thèse de Doctorat de L'université de Toulouse Délivré par : Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Nishanthi M.**, Aanandhi M.V., Raj K.A. and Vijayakumar B. 2012. Evaluation of *In-Vitro* Anti-Inflammatory Activity of Methanolic Leaf Extract of *Vigna radiata (L.)* Wileze. *International Journal of Pharmacological Screening Methods*. 2 (2):88-91.
- OMS.** 2000. Organisation Mondiale de la Santé, Principes Méthodologiques Généraux et l'Evaluation Relative à La Médecine Traditionnelle.
- Oroojalian F.**, Kasra-Kermanshahi R., Azizi M. and Bassami M.R. 2010. Phytochemical Composition of the Essential Oils from Three *Apiaceae* Species and Their Antibacterial Effects On Food-Borne Pathogens. *Food Chemistry*. 120 :765-770,
- Osmothèque**, le Conservatoire International des Parfums, 2015. osmotheque@wanadoo.fr.
- Padmashree A.**, Roopa N., Semwal A.D., Sharma G.K., Agathian G. and Bawa A.S. 2007. Star-anise (*Illicium verum*) and Black Caraway (*Carum nigrum*) as Natural Antioxidants. *Food Chemistry*. 104: 59-66.
- Pagès J.M.**, et Garnotel E. 2003. Perméabilité membranaire et résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram-négatif. Dossier scientifique, résistance aux antibiotiques: aspect technique. *Revue Française des Laboratoires*. vol. 2003 (352), 57-63.
- Patrick G.L.** 2003. Chimie Pharmaceutique. 2<sup>o</sup> édition. Ed. De boeck.
- Petersen P.J.**, Jones C.H. and Bradford P.A. 2007. In Vitro Antibacterial Activities of Tigecycline and Comparative Agents by Time-Kill Kinetic Studies in Fresh Mueller-Hinton Broth. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 59: 347-349.
- Peyrat-Maillard M.N.**, Bonnely S., Rondini L. and Berset C. 2001. Effect of Vitamin E and Vitamin C on the Antioxidant Activity of Malt Rootlets Extracts. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*. 34: 176-182.
- Pitasawat B.** Champakaew D., Choochote W., Jitpakdi A., Chaithong U., Kanjanapothi D., Rattanachanpichai E., Tippawangkosol P., Riyong D., Tuetun B. and Chaiyasit D. 2007. Aromatic Plant-Derived Essential Oil: An Alternative Larvicide for Mosquito Control. *Fitoterapia*. 78: 205-210.
- Polovka M and Suhaj M.** 2010. Detection of Caraway and Bay Leaves Irradiation Based on Their Extracts' Antioxidant Properties Evaluation. *Food Chemistry*. 119: 391-401.
- Prescott L.M.**, Harley J.P. et Klein D.A. 2003. Microbiologie. 2<sup>ème</sup> édition, Ed. De Boeck,
- Quezel P.** et Santa S. 1963. Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques et Méridionales, Tome II. Ed. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.
- Quincampoix J.C.** et Mainardi I.L. 2001. Mécanismes de Résistance des Cocci à Gram Positif. *Réanimation*. 10 : 267-75.
- Rahal K.** 2008. Standardisation de L'antibiogramme eEn Médecine Humaine a l'Echelle Nationale Selon les Recommandations de l'OMS, 5<sup>ème</sup> édition. Ed. Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière.
- Rahman A.**, Choudhary M.I., Hayat .S, Khan A.M., Ahmad A., Malik S. 1999. Spatozoate and Varninasterol from the Brown Alga *Spatoglossum variable*. *Phytochemistry*. 52: 495-499.

- Ramesh C.K.**, Raghu K.L., Jamuna K.S., Joyce G.S., Mala R.S.V. and Vijay Avin B.R. 2011. Comparative Evaluation of Antioxidant Property in Methanol Extracts of Some Common Vegetables of India. *Annals of Biological Research*. 2 (2) : 86-94.
- Raut J.S. and Karuppaiyl S.M.** 2014. A Status Review on the Medicinal Properties of Essential Oils. *Industrial Crops and Products*. 62: 250-264.
- Rezaei Kahkha M.R., Amanloo S. and Kaykhaii M. 2014. Antiaflatoxic Activity of *Carum copticum* Essential Oil. *Environmental Chemistry Letters*. 12: 231-234
- Rosato A.**, Vitali C., De Laurentis N., Armenise D. and Milillo M.A. 2007. Antibacterial Effect of Some Essential Oils Administered Alone or in Combination with Norfloxacin. *Phytomedicine*. 14: 727-732.
- Rouibi A.**, Saidi F., Benfares R., Cherif H., Luca E., Boutoumi H. 2009. Identification et Effet Antiseptique des Huiles Essentielles des Deux Espèces Xerophytes *Cassia acutifolia* et *Cassia Obovata*. *Agricultura - Știință și practică*. 3-4:71-72.
- Saad H.E.A.**, El-Sharkawy S.H. and Halim A.F. 1995. Essential Oils of *Daucus carota* ssp. *Maximus*. *Pharmaceutics Acta Helvetiae*. 70: 79-84.
- Saens Lain C.** 1981. Research on *Daucus* L. (UMBELLIFERAE), *Anales Jardín Botánico de Madrid*. 37 (2): 481-533,
- Saiki Y.**, Okamoto M., Ueno A., Uchida M., Fukushima S. 1970. Gas-chromatographic studies on natural volatile oils. VIII. Essential oils of Chinese medicines 'Gaoben'. *Yakugaku zasshi journal of the Pharmaceutical Society of Japan* . 90: 344-351.
- Sandberg and F. and Corrigan D.** 2004. Natural Remedies; Their Origins and Uses. Ed. Taylor and Francis e-Library.
- Sarker S. D.**, Latif Z. and Gray A.I. 2006. Natural Products Isolation. Ed. Humana Press, New Jersey. Second edition.
- Schwalbe R.**, Steele-Moore L. and Goodwin A.C. 2007. Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. Ed. Taylor and Francis Group.
- Seidler-Lozykowska K.**, Kedzia B., Karpinska E. and Bocianowski J. 2013. Microbiological Activity of Caraway (*Carum carvi* L.) Essential Oil Obtained from Different Origin. *Acta Scientiarum Agronomy*. 35(4): 495-500.
- Shahidi F. and Naczki M.** 2006. Phenolics in Food and Nutraceuticals. Ed. Taylor & Francis, Shyamala B.N. and Jamuna P. 2010. Nutritional Content and Antioxidant Properties of Pulp Waste from *Daucus carota* and *Beta vulgaris*. *Malaysian Journal of Nutrition*. 16(3): 397-408.
- Singh G.**, Marimuthu P., De Heluani C.S., and Catalan C.A.N. 2006. Antioxidant and Biocidal Activities of *Carum nigrum* (seed) Essential Oil, Oleoresin, and Their Selected Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 174-181.
- Sourabie T.S.**, Nikiema J.B., Lega I, Nacoulma O.G. et Guissou I.P. 2010. Etude *In Vitro* de l'Activité Antibactérienne d'Extraits d'une Plante de la Pharmacopée Burkinabé: Cas d'*Argemone mexicana* L. (Papaveraceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 4(6): 2009-2016.
- Staniszewska M.**, Kula J., Wiczorkiewicz M. and Kusewicz D. 2005. Essential Oils of Wild and Cultivated Carrots - the Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Journal of essential oil research*. 17 (5): 579-583.
- Svoboda K.P. and T.G. Svoboda.** 2000. Secretory Structures of Aromatic and Medicinal Plants; A Review and Atlas of Micrographs. Ed. Microscopix Publications UK.
- Teixeira da Silva J.** 2004. Mining the Essential Oils of the Anthemideae. *African Journal of Biotechnology*. 3 (12): 706-720.
- Thippeswamy N.B.**, Naidu K.A., and Achur R.N. 2013. Antioxidant and Antibacterial Properties of Phenolic Extract from *Carum carvi* L. *Journal of Pharmacy Research*. 7: 352-357.

- Tyagi A.K. and Malik A.** 2010. Antimicrobial Action of Essential Oil Vapours and Negative Air Ions against *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Food Microbiology*. 143: 205-210.
- Valente J.,** Zuzarte M., Resende R., Goncalves M.J., Cavaleiro C., Pereira C.F., Cruz M.T. and Salgueiro L. 2015. *Daucus carota* subsp. *gummifer* Essential Oil as a Natural Source of Antifungal and Anti-inflammatory Drugs. *Industrial Crops and Products* . 65:361-366.
- Valenzuela-Barra G.,** Castro C., Figueroa C., Barriga A., Silva X., Heras B., Hortelano S. and Delporte C. 2015. Anti-inflammatory Activity and Phenolic Profile of Propolis from Two Locations in Region Metropolitana de Santiago, Chile. *Journal of Ethnopharmacology*. 168: 37-44.
- Xavier J.R.,** Bajbaip K., Muthiahp M., Dhar P., Kumar J., Chaurasia O.P., Srivastava R., Singh B.S. 2011. Trans-Himalayan Phytofoods - A Rich Source of Antioxidants. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*. 33 (1) 21-26
- Yala D.,** Merad A.S., Mohamedi D., et Ouar Korich M.N. 2001. Classification et Mode d'Action des Antibiotiques. *Médecine du Maghreb*. n°91,
- Yin W.,** Ze-Li X., Hong-jun L., Xiang-ying M., Yong-li B. and Yu-xin L. 2006. Components of Essential Oils in Different Parts of *Daucus carota L. var. sativa* Hoffm. *Chemical Research in Chinese Universities*. 22 (3): 328-334.
- Walsh F.M.** and Amyes S.G.B. 2004. Microbiology and Drug Resistance Mechanisms of Fully Resistant Pathogens. *Current Opinion in Microbiology*. 7: 439-444.
- Zahin M.,** Ahmad I. and Aqil F. 2010. Antioxidant and Antimutagenic Activity of *Carum copticum* Fruit Extracts. *Toxicology in Vitro*. 24(4): 1243-1249.
- Zheljazkov V.D.,** Cantrell C.L., Astakie T. and Jeliaskova E. 2013. Distillation Time Effect of Lavender Essential Oil Yield and Composition. *Journal of Oleo Science*. 62: (4) 195-199.

## **Annexe I : Composition des milieux de culture**

### **MH gélosé :**

-Infusion de viande de bœuf déshydraté.....	300g
-Hydrolysate de caséine.....	17.5 g
-Amidon de maïs.....	1.5 g
-Agar Agar.....	13 g
-Eau distillée qsp.....	1000 ml

### **Sabouraud simple**

-Peptone Chapoteau.....	10 g
-Gélose .....	20 g
-Glucose.....	20 g
-Eau distillée.....	1000 ml

### **Bouillon nutritif**

-Peptone.....	5 g
-Extrait de viande.....	1 g
-Extrait de levure.....	2 g
-Chlorure de Sodium.....	5 g
-Eau distillée.....	1000 ml

**Annexe II : Echantillon de *C. montanum***



Echantillon de *C. montanum* appelée aussi *Selinopsis montana* , provenant de l'Algérie, conservé depuis 1861 dans l'Université de Coimbra en Portugal.

**Annexe III : Echantillon de *D. gracilis***



Echantillon de *D. gracilis*, provenant de l'Algérie, conservé depuis 1861 dans l'Université de Coimbra en Portugal.

## الملخص

تميل البحوث التي أجريت مؤخرا إلى استغلال الموارد البيولوجية الطبيعية بسبب خصائصها المفيدة لصحة الإنسان وذلك من أجل الوقاية من المشاكل المرتبطة بالاستخدام المفرط للمواد الصناعية. لهذا الغرض، تمت دراسة نوعين نباتيين من العائلة الخيمية؛ *Carum montanum*، من ولاية سطيف، و *Daucus gracilis* من ولاية سيكدة، تم الحصول على الزيوت الأساسية للأجزاء الهوائية للنباتين عن طريق التقطير المائي باستخدام جهاز الاستخلاص من نوع Clevenger، أما المستخلصات الخام فقد تم الحصول عليها عن طريق النقع في محلول مائي كحولي (ميثانول/ماء). تم إجراء التحليل الكيميائي للزيوت الأساسية بتقنية كروماتوغرافيا الطور الغازي المرفقة بمطيافية الكتلة كما تمت تنقية المركب الأساسي لزيت *C. montanum* بواسطة كروماتوغرافيا متسلسلة على عمود هلام السيليكا. تم تقدير المحتوى الإجمالي للمستخلصات الخام من عديدات الفينول الكلية بطريقة Folin-Ciocalteu. كما قدرت النشاطية ضد ميكروبية للمستخلصات نوعيا على 25 سلالة ميكروبية عن طريق تقنية الانتشار على الوسط الصلب، ثم كميا من خلال ثلاث طرق لتحديد التركيز الأدنى المثبط. بعد ذلك، خضعت البكتيريا التي أبدت حساسية للزيوت لاختبار موت الخلايا عبر الوقت ودراسة تأثيرها على انحلال الخلية البكتيرية. في موازاة ذلك، تم اختبار النشاطية المضادة للأكسدة لكل من الزيوت والمستخلصات الخام وكذلك مزيج كل منهما عن طريق تقنياتي ال DPPH والقدرة الإرجاعية. بالإضافة، قمنا بدراسة قدرة المستخلصات على حماية كريات الدم الحمراء وحماية البروتينات من التمسح. يتميز التركيب الكيميائي لكل الزيتين بوجود نسب عالية من مركبات الفينيل بروبانويد. وجد أن زيت *C. montanum* يحتوي أساسا على ال Nothoapiole (62.8%)، ال Dillapiole (8.5%) وال  $\alpha$ -Humulène (7.1%). أما زيت *D. gracilis* فيكون أساسا من ال Elemicine (35.3%) وال Geranylacetat (26.8%). كما بينت معايرة المستخلصات الخام وجود نسب كبيرة من عديدات الفينول قدرت ب 101.5 مكغ/مغ في مستخلص *C. montanum* و 149.05 مكغ/مغ في مستخلص *D. gracilis*. امتدت النشاطية ضد ميكروبية للمستخلصات من المقاومة للحساسية، فيما اختلفت قيم التراكيز الدنيا المثبطة حسب السلالة المدروسة والطريقة المستعملة. تبين من الدراسة أن بكتيريا *B. cereus* هي الأكثر حساسية لزيت *C. montanum* بتركيز 4.86 مكغ/مغ بتقنية التخفيف المصغر في وسط سائل، 55.5 مكغ/مغ بتقنية التخفيف العادي في وسط سائل و 17.15 مكغ/مغ بتقنية التخفيف العادي في وسط صلب مع زيت *D. gracilis*. لم تكن الزيوت الأساسية ذات تأثير يذكر عبر الزمن، كما لم تؤثر على الغشاء البلازمي لبكتيريا *B. cereus* غير أنها أثرت قليلا على أغشية كل من *K. pneumoniae* و *P. mirabilis*. تملك كل من الزيوت والمستخلصات لنبات *C. montanum* و *D. gracilis* خصائص إزاحة جذر DPPH بنسب قدرت ب 0.002، 0.001، 0.065 و 0.06 مكغ/مغ على الترتيب. أظهرت المستخلصات خصائص حماية الكريات الحمراء من الانحلال وخصائص حماية البروتينات من التمسح (298,12 مكغ/مغ عند *Carum* و 554,07 مكغ/مغ عند *Daucus*)، بينما تبقى هذه النسب أقل من تلك المسجلة لدى المادة المعيارية في المختام، نستنتج أن هاتين البنتين تمتلك خصائص بيولوجية مثيرة للاهتمام تختلف حسب السلالة المدروسة والتقنية المستخدمة.

## Résumé

Les recherches récentes tendent à exploiter les ressources biologiques naturelles en raison de leurs vertus bénéfiques pour la santé humaine afin qu'on puisse contourner les problèmes liés à l'usage abusifs des substances synthétiques. Pour cet objectif, deux espèces appartenant à la famille des Apiacées; *Carum montanum*, provenant de Sétif, et *Daucus gracilis*, provenant de Skikda, ont fait l'objet de cette étude. Les HE de chaque plante ont été obtenu par hydrodistillation de leurs parties aériennes en utilisant un appareil d'extraction de type Clevenger et les extraits bruts ont été obtenus par macération hydroalcoolique méthanol/eau. L'analyse des HE a été faite par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/MS) et le Nothoapiole a été purifié par chromatographie successive sur colonne de gel de silice. Le dosage des polyphénols totaux des Eb a été réalisé suivant la méthode de Folin-Ciocalteu. L'activité antimicrobienne des HE et des Eb a été estimée qualitativement sur 25 souches microbiennes par la technique de diffusion sur gélose, ensuite quantifiée par trois méthodes pour déterminer les CMI correspondantes. Les souches sensibles ont fait l'objet de d'étude de bactéricidie et de lyse cellulaire. En parallèle, les effets antioxydants des HE et des Eb ainsi que ceux de leurs combinaisons ont été testé par la technique du DPPH et celle du pouvoir réducteur. Les Eb ont été testé pour évaluer leurs activités antihémolytiques et antidénaturantes. Les deux HE sont caractérisées par la présence des phénylpropanoïdes. L'HE de *C. montanum* contient principalement le Nothoapiole (62.8%), le Dillapiole (8.5 %) et l' $\alpha$ -Humulène (7.1%). Alors que celles de *D. gracilis* contient majoritairement l'Elemicine (35.3 %) et l'Acétate de géranyl (26.8 %). Les deux extraits sont très riches en polyphénols totaux ; *C. montanum* 101.50  $\mu\text{g}/\text{mg}$  et *D. gracilis* 149.05. Le criblage antimicrobien a montré une activité des HE et des extraits allant de la résistance à la sensibilité sur l'ensemble des souches testées. Les CMI des HE diffèrent en fonction du germe et en fonction de la méthode utilisée. La souche de *B. cereus* est la plus sensible avec des CMI de l'HE de *C. montanum* de 4.86  $\mu\text{g}/\text{ml}$  par microdilution liquide, 55.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  par macrodilution liquide et de 17.15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  par macrodilution solide avec l'HE de *D. gracilis*. L'action des HE au cours du temps n'est pas trop prononcée. Les HE agissent modérément sur la membrane plasmique de *K. pneumoniae* et celle de *P. mirabilis* mais celle de *B. cereus* n'est pas du tout affectée. Les HE et les extraits de *C. montanum* et de *D. gracilis* présentent une activité antiradicalaire très importante en utilisant le test de piégeage du radical DPPH ;  $\text{IC}_{50}$  = 0.001, 0.002, 0.065 et 0.06 mg/ml respectivement. Ils ont montré également des pouvoirs réducteurs dose dépendants. Les extraits des deux plantes possèdent des activités antihémolytiques et antidénaturante des protéines ( $\text{IC}_{50}$  de *Carum* 298,12  $\mu\text{g}/\text{ml}$  et *Daucus* 554,07  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inférieures à celles des références. En conclusion, ces plantes possèdent des effets biologiques intéressants qui varient en fonction de la souche testée et de technique utilisée.

## Abstract

Recent researches tend to exploit natural biological resources because of their beneficial properties for human health to overcome the problems associated with the improper use of synthetic substances. For this purpose, two species belonging to the family of Apiaceae; *Carum montanum*, from Setif, and *Daucus gracilis* from Skikda, were the subject of this study. Essential oils (EO) of each plant were obtained by steam distillation of their aerial parts using a Clevenger type extraction apparatus and the crude extracts (CEs) were obtained by hydroalcoholic maceration (methanol/water). The analysis of EOs was made by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) and the Nothoapiole was purified by successive chromatography on a silica gel column. The determination of total polyphenols in CEs was performed according to the method of Folin-Ciocalteu. The antimicrobial activity of EOs and CEs were estimated qualitatively on 25 microbial strains by the agar diffusion method, and then quantified by three methods for determining the corresponding MICs. The action of EOs on susceptible strains was tested by the time kill assay and bacterial lysis experience. In parallel, the antioxidant effects of EOs and CEs as well as their combinations were tested by the technique of DPPH and reducing power assay. CEs were tested to assess their antihemolytic and protein denaturing activities. Both of EOs are characterized by the presence of phenylpropanoids. The EO of *C. montanum* contains mainly Nothoapiole (62.8%), the Dillapiole (8.5%) and the  $\alpha$ -Humulene (7.1%). While *D. gracilis*'s EO contains predominantly the Elemicin (35.3%) and the Geranyl acetate (26.8%). Both of extracts are rich in total polyphenols; *C. montanum* 101.50 and *D. gracilis* 149.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The antimicrobial screening showed an activity of EOs and extracts from the resistance to susceptibility on all strains tested. The MICs of EOs are different depending on the bacterial strain and the method used. *B. cereus* is most susceptible strain with MIC of *C. montanum*'s EO of 4.86  $\mu\text{g}/\text{ml}$  by liquid microdilution, 55.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  by liquid macrodilution and 17.15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of *D. gracilis*'s EO by solid macrodilution. The action of EOs over time is not too pronounced. EOs act moderately on the cytoplasmic membrane of *K. pneumoniae* and *P. mirabilis* but *B. cereus*'s membrane is not at all affected. EOs and extracts of *C. montanum* and *D. gracilis* have a very important antioxidant activity by DPPH radical scavenging test;  $\text{IC}_{50}$  = 0.001, 0.002, 0.065 and 0.06 mg/ml respectively. They also showed dose-dependent reducing powers. The extracts of the two plants have antihemolytic and protein denaturing activities of ( $\text{IC}_{50}$  for *Carum* 298.12  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 554.07  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for *Daucus*) lower than those of references. In conclusion, these plants possess interesting biological effects that vary according to the tested strain and the technique used.