

République Algérienne démocratique et populaire  
Ministre de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Université de Blida -1-



Faculté des sciences de la nature et de la vie  
Département de biologie des populations et des organismes

## Mémoire de Fin d'Etudes

En vue de l'obtention du  
Diplôme de master en biologie  
Option : phytothérapie et santé

### Thème

**Contribution à l'étude des effets antibactériens,  
antifongique et antioxydant d'*Ammoides  
verticillata* récoltée dans la région de Tlemcen**

Réalisé par :

Mlle Metidji nadjet

Membres du jury :

Madame Takarli S.	Présidente	USDB	MAA
Madame Zarkaoui A.	Examineur	USDB	MAA
Madame Benmansour N.	Promotrice	USDB	MCB

Année universitaire 2016/2017

## ***Remerciements***

*Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire «ANTIBIOTICAL» du groupe SAIDAL de Médéa et du laboratoire de phytopharmacie au niveau du Département d'Agronomie de l'université de Blida.*

*Tout d'abord je tiens surtout à adresser mes remerciements à Mme Benmansoure N. pour m'encadrer, m'orienter, ma conseiller tout au long de ce travail.*

*Je remercie les membres de jury d'avoir accepté de juger ce travail et en être les examinateurs de cette thèse.*

*Je remercie Mr Djazouli d'avoir m'accepté de travailler au sien de Laboratoire de phytopharmacie, au niveau du Département d'Agronomie de l'université de Blida.*

*Je remercie les membres du groupe SAIDAL de Médéa pour leur contribution à élaborer la partie expérimentale de ce travail.*

*Je tiens également à remercier tous mes enseignants.*

*Je remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Un grand merci à tous.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail*

*A Mes chers parents, pour leur endurance et leurs sacrifices sans  
limites*

*A mon fiancé*

*A Mes frères*

*A Tous mes proches*

*A Mes amis*

*A Mes camarades de promotion*

*A Tous mes enseignants*

*Nadjet*

## Glossaire

Selon Larousse 2013

**Analgésique** : substance, d'un médicament qui produit l'analgésie.

**Antihistaminique** : substance qui s'oppose à l'action de l'histamine de l'organisme.

**Antihypertenseur** : protège contre l'augmentation de la tension vasculaire.

**Antipyrétique ou fébrifuge** : substance qui diminue la fièvre.

**Antispasmodique** : médicament qui calme les spasmes (syn. Spasmolytique).

**Bronchodilatateur** : substance provoquant une augmentation du diamètre des bronches, ce qui diminue la gêne respiratoire au cours de l'asthme et de la bronchite.

**Carminatif** : qui a la propriété d'expulser les gaz intestinaux.

**Coliques flatulentes** : douleurs dues à l'accumulation de gaz.

**Diurétique** : substance qui augmente la diurèse et qui peut éventuellement être utilisée contre l'hypertension artérielle ou contre les œdèmes et l'insuffisance cardiaque.

## Résumé

Ce travail vise l'étude des activités biologiques (antimicrobiennes et antioxydantes) des extraits aqueux et de l'huile essentielle *d'Ammoides verticillata* provenant de la région de Terny (wilaya de Tlemcen).

L'extraction des huiles essentielles *d'Ammoides verticillata* (nounkha), par l'hydrodistillation de type Clevenger, a donné un rendement de 3%.

L'examen phytochimique réalisé sur la partie aérienne *d'Ammoides verticillata* a mis en évidence la présence des flavonoïdes, des tanins, des anthocyanes, des coumarines et des terpènes.

Aucune mortalité n'a été signalée chez les souris *Mus musculus* après l'administration de l'extrait aqueux dont la dose varie de 5000 à 50000 mg/kg de poids corporel.

Les résultats de l'activité antioxydante de l'extrait aqueux étudié réalisée par la méthode de DPPH montrent que l'extrait testé possède une activité antioxydante avec une IC50 de 0.020mg/ml, cependant elle est moins efficace que celle de la vitamine C (0.001mg/ml).

L'huile essentielle *d'Ammoides verticillata* présente une forte activité antimicrobienne sur l'ensemble des microorganismes testés. Son activité est plus importante sur le champignon (*Aspergillus brasiliensis*) et sur la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) que sur les bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosae*) avec des diamètres d'inhibition variant entre 15mm et 77mm. Les tests CMI et CMB ont montré que l'huile essentielle possède une activité bactériostatique et une activité bactéricide.

**Mots-clés :** *Ammoides verticillata*, hydrodistillation, extrait aqueux, activité antimicrobienne, activité antioxydante.

## ملخص

هذا العمل هو دراسة الأنشطة البيولوجية (مضاد للميكروبات والمضاد للأكسدة) للمستخلص المائي والزيت العطري لـ *Ammoides verticillata* من منطقة تيغني (تلمسان). تم استخراج الزيوت العطرية لـ *Ammoides verticillata* (نوخة) بالتقطير بالبخار حسب نوع Clevenger، الذي يصل مردوده الى 3%. ولقد أظهر الفحص الكيميائي النباتي أجرى على الجزء الهوائي لـ *Ammoides verticillata* وجود مركبات الفلافونويد والعفص، الانثوسيانين، الكومارين وتربين. لم يتم تسجيل اي وفات الفئران بعد تناولهم من المستخلص المائي ذات جرعة (من 5000-50000 ملغ / كغ من وزن الجسم).

كما تظهر نتائج النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص المائي بطريقة DPPH أن المستخلص المائي له نشاط مضاد للأكسدة ذات IC50 يساوي 0.020 مغ / مل، ولكن أقل فعالية بكثير من فيتامين C (0.001 مغ/مل). الزيوت العطرية لـ *Ammoides verticillata* لها نشاط مضاد للميكروبات عالي على جميع الكائنات الحية الدقيقة التي تم اختبارها. ومع ذلك، نشاطها هو أعلى على فطر (*Aspergillus brasiliensis*) والخميرة (*Saccharomyces cerevisiae*) والبكتيريا (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa*) بأقطار تثبيط التي تختلف بين 15مم و 77مم. وقد أظهرت الاختبارات CMI و CMB أن هذا الزيت العطري يمنع نمو الجراثيم ومبيد للجراثيم.

**كلمات البحث:** *Ammoides verticillata*، تقطير بالبخار، مستخلص مائي، النشاط المضاد للميكروبات، النشاط المضاد للأكسدة.

بالتقطير بالبخار

## Abstract

This work is the study of biological activities (microbial activity, antioxidant activity) of aqueous extract and essential oil of *Ammoides verticillata*, from the station of Terny (Tlemcen).

The extraction of the essential oils of *Ammoides verticillata* (nounkha), by distillation Clevenger type, gave a yield of up to 3%.

The phytochemical examination realized on the aerial part of *Ammoides verticillata* showed the presence of flavonoids, tannins, anthocyanins, coumarins and terpens.

No mortality was reported in *Mus Musculus* mice after administration of the aqueous extract at a dose of 5000 to 50000 mg / kg body weight).

Results of the antioxidant activity of the aqueous extract studied carried out by the method of DPPH show that the tested extract it has antioxidant activity with an IC<sub>50</sub> of 0.020mg / ml, however, it is less effective than that of vitamin C (0.001mg / ml).

The essential oil of *Ammoides verticillata* presents a strong antimicrobial activity on all the microorganisms tested. However, its activity is higher on the fungus (*Aspergillus brasiliensis*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) with inhibition diameters which vary between 15mm and 77mm. The CMI and CMB tests showed that the essential oil possesses both bacteriostatic activity and bactericidal activity.

Keywords: *Ammoides verticillata*, essential oils, aqueous extract, antimicrobial activity, antioxidant activity.

## Liste des figures :

<b>Figure 1 :</b> Carte géographique mondiale de la répartition de l' <i>Ammoides verticillata</i> .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 2.</b> Description d'ombelle de la famille des Apiacées.	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 3 :</b> Photo de la plante <i>Ammoides verticillata</i> .....	14
<b>Figure 4 :</b> Description d' <i>Ammoides verticillata</i> (Desf.) Briq .....	14
<b>Figure 5 :</b> Structure des constituants majeurs d'HE d' <i>Ammoides vesrticillata</i> . .....	16
<b>Figure 6 :</b> Carte géographique de station Terny .....	24
<b>Figure 7 :</b> Photo <b>original (2017)</b> de la plante sèche en bouquet. ....	26
<b>Figure 8.</b> Dispositif d'extraction d'HE de type clevenger .....	27
<b>Figure 9.</b> Gavage de la souris par l'huile essentielle.....	31
<b>Figure 10.</b> Illustration de l'aromatogramme .....	36
<b>Figure 11.</b> Illustration de la méthode de Microatmosphère .....	36
<b>Figure 12.</b> Influence du poids d' <i>Ammoides verticillata</i> sur le rendement en huiles essentielles durant 3h d'extraction selon la méthode Clevenger. ....	38
<b>Figure 13 :</b> Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de la vitamine C et de l'extrait de d' <i>Ammoides verticillata</i> .....	43
<b>Figure 14 :</b> Pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle et de la vitamine C. ....	43
<b>Figure 15:</b> IC50 de l'extrait aqueux et de la vitamine C.....	44
<b>Figure 16 :</b> Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de l' <i>Ammoides verticillata</i>	46
Figure 17. Effet de l'HE sur la croissance des souches microbienne par l'aromatogramme.....	48

## Liste des tableaux :

<b>Tableau 1 :</b> Classification botanique de l' <i>Ammoides verticillata</i> .....	12
<b>Tableau 2 :</b> Pourcentages des constituants de l'HE d' <i>Ammoides verticillata</i> de différents pays.....	15
<b>Tableau 3 :</b> Enquête thérapeutique d' <i>Ammoides verticillata</i> .....	17
<b>Tableau 4 :</b> Situation géographique et bioclimat de la station de Terny.....	24
Tableau 5. Différents composants d' <i>Ammoides verticillata</i> (Desf.) Briq.....	40



**Tableau 6.** Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata*.....49

## **Table des matières**

Résumé

Abstract

Résumé (Arabe)

Liste des abréviations

Glossaire

Liste des figures

Liste des tableaux

**Introduction générale** ..... 10

### **partie I-Synthèse bibliographique**

#### **Chapitre I-Généralité sur *Ammoides verticillata***

I-1-Répartition géographique..... 12

I.1.1 Répartition dans le monde :..... 12

I.1.2 Répartition en Algérie ..... 12

I.2 Systématique de la plante ..... 12

I.3 Description botanique..... 13

I.4 Composition chimique..... 14

I.5 Propriétés et Utilisation ..... 16

I.5.1 Usage culinaire ..... 16

I.5.2 Usage thérapeutique ..... 16

#### **chapitre II-Activités biologiques**

II.1 Activité antimicrobienne ..... 19

II.1.1 Activité antibactérienne..... 19

II.1.2 Activité antifongique ..... 19

II.1.3 Facteurs influençant l'activité antimicrobienne ..... 19

II.2 Activité antioxydante..... 20

II.2.1 Radicaux libres ..... 20

II.2.2 Les antioxydants ..... 21

## Partie II-Etude expérimentale

### **Chapitre I-Matériel et méthodes**

I.1 Matériel utilisé.....	24
I.1.1 Matériel non biologique .....	24
I.1.2 Matériel biologique .....	24
I.2 Méthodes .....	25
I.2.1 Prélèvement des échantillons d' <i>Ammoides verticillata</i> .....	25
I.2.2 Extraction des huiles essentielles .....	26
I.2.3 Préparation d'extrait aqueux.....	28
I.2.4 Screening phytochimique .....	28
I.2.5 Etude de la toxicité aiguë .....	30

### **chapitre II-Résultats et discussion**

II.3	Caractéristiques organoleptiques.....	38
II.4	Extraction des huiles essentielles (HE) par Hydrodistillation .....	38
II.4.1	Détermination de la quantité végétale nécessaire pour l'extraction.....	38
II.5	Screening Phytochimique .....	39
II.6	Etude de la toxicité aiguë.....	41
II.6.1	Activité antioxydante.....	42
II.6.2	Activité antimicrobienne .....	45
A.	Méthode de l'aromatogramme.....	45
<b>Conclusion</b>	.....	<b>50</b>

### **Références bibliographiques**

### **Annexe**

## Introduction générale

De par leur composition chimique, les plantes aromatiques représentent un intérêt économique considérable par leur appartenance aux industries de la parfumerie, des cosmétiques, de l'agroalimentaire et de la pharmacie (**Bruneton, 1999**).

En effet, elles sont douées non seulement de qualités parfumantes et culinaires, mais aussi de vertus médicinales variées grâce aux différents principes actifs qu'elles contiennent : alcaloïdes, flavonoïdes, tannins, saponosides et huiles essentielles. Elles constituent un réservoir inépuisable de remède populaires des plus efficaces et une source naturelle de médicaments les plus utiles (**Beloued, 2001 ; Valnet, 1998**).

Il existe nombreuses maladies contre lesquels les antibiotiques de synthèse deviennent de moins en moins efficaces. Aussi, l'utilisation fréquente d'antibiotiques entraîne chez certains sujets des infections secondaires (Salmonellose, gastroentérite, ect... (**Hostettmann et Marston, 2002**).

Par ailleurs, l'emploi d'additif chimique dans l'industrie alimentaire conduit à la perte de la qualité et de la fiabilité des aliments.

Ainsi, les huiles essentielles utilisées depuis l'antiquité d'une manière empirique comme agents thérapeutique des plus pratiques contre différents maux suscitent de plus en plus

La famille des Apiaceae est l'une des familles les plus riches en huiles essentielles. Elle comprend des légumes (carotte, fenouil, céleri...) et des condiments (carvi, coriandre, cumin, persil...) (**Kanbouche, 2000**).

L'Algérie par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales y poussent spontanément. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. Leurs propriétés dues notamment à la fraction d'huile essentielle, peuvent être mises à profit pour traiter les infections microbiennes.

A cet effet et dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, on s'est intéressé aux espèces de famille des ombellifères qui est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et extraite à forte pouvoir antimicrobien.

Notre intérêt s'est porté à l'étude de « *Ammoides verticillata* » plante médicinale et aromatique très utilisée en médecine traditionnelle et comme condiment alimentaire par la population locale. En l'occurrence, l'espèce *Ammoides verticillata* que nous étudions pour les objectifs et les raisons suivant :

- Identification des composants chimique de l'extrais aqueux de la plante étudiée par le screening phytochimique.
- Extraction des huiles essentielles de la partie aérienne de la plante par hydrodistillation.
- Etude sur de la toxicité aiguë de l'extrais aqueux
- Evaluation de l'activité antioxydant de l'extrait aqueux vis-à-vis des radicaux libres en utilisant la méthode de DPPH.
- Evaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro* de l'HE.

Par conséquent, notre travail exposé dans ce mémoire est organisé en deux grandes parties :

- La première partie aborde la synthèse bibliographique qui regroupe deux chapitres :
  1. Généralité sur l'*Ammoides verticillata*
  2. Les activités biologiques
- La seconde partie définit l'étude expérimentale qui inclut deux chapitres :
  1. Matériel et méthode
  2. Résultats et discussion

## I-1-Répartition géographique

### A-Répartition dans le monde

Dans le monde, On peut trouver l'*Ammoides verticillata* dans le Nord d'Asie, en Turquie, en Inde, en Iran, en Pakistan et en Afghanistan. Elle pousse spontanément en Afrique du Nord ; en Ethiopie et en Egypte. Elle s'étend également dans la région méditerranéenne. Cependant, les Indous et les Perse pour son pouvoir remarquable antimicrobien (**Abdelouahid et Bekhechi, 2004**).

### B-Répartition en Algérie

C'est une espèce Algérienne endémique. D'après **Quezel et Santa (1963)**, l'*Ammoides verticillata* est une plante médicinale Algérienne poussant dans la région de Tlemcen (l'Nord-ouest d'Algérie) et dans la région d'Adrar (le Sud-ouest d'Algérie). Selon **Bouazza et al., (2004)** ces régions sont caractérisées par des sols calcaires. D'après **Ayache (2007)** cette plante est abondante dans les champs, les pelouses ou dans les forêts et/ ou sur les altitudes montagneuses d'environ 1190m d'hauteur.

## I-2-Systématique de la plante

*Ammoides verticillata* appartient à la famille des *Apiacées*. C'est une famille très abondante, elle comprend plus de 3000 espèces avec 55 genres représentés en Algérie (**Quezel et Santa, 1963**). Il est à noter que certains auteurs la confondent avec la plante *Ammi visnaga*, plante sauvage qui elle aussi appartient à la famille des *Apiaceae* (**Chériti et al., 1995**).

Le genre *Ammoides* comprend deux espèces : *Ammoides verticillata* (plante annuelle) et *Ammoides atlantica* (plante bisannuelle).

*Ammoides* (ou *Ptychotis*) *verticillata* (Desf.) Briq. est classée selon la clé de détermination botanique, d'après (**Quezel et Senta, 1963**) (**Tableau 1**) :

**Tableau 1** : Classification botanique de l'*Ammoides verticillata*

Embranchement	Phanérogames
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones

Sous classe	Dialypétales
Série	Calciflores
Ordre	Apiales
Famille	Apiacées
Genre	Ammoides ou Ptychotis
Espèce	<i>Ammoides verticillata</i>

### I-3-Description botanique

La plante *Ammoides verticillata* (Desf.) Briq. est appelée populairement Nounkha tire son origine de la déformation du nom perse « Nankhah » qui provient de son utilisation en Iran comme aromate dans le pain (Nan et Khah signifiant respectivement pain et goût) (Baytopet et Sitiupinar, 1986). Elle est appelée en français Faux Ammi fluet. (Benoît et al., 2016).

*Ammoïdes verticillata* est une plante très odorante, elle est fortement aromatique et piquante, son odeur (semble au thymol) est très agréable mais très diffusible et intense ; fortement balsamique, persistante même après la dessiccation (Daïne et Mostefaï, 1998). Elle a une odeur et un goût qui rappelle beaucoup celui du thym.

*Ammoides verticillata* (Nounkha) est une plante herbacée annuelle, grêle glaucescente et mesurant en moyenne d'environ 9cm à 40cm de hauteur. Sa tige est dressée, striée et à nombreux rameaux étalés. Ses feuilles pétiolées sont s'arrangées de deux façons. Les feuilles inférieures possèdent de 3 à 5 segments très rapprochées, étroit et trifide et les postérieures sont découpées en lanières capillaires paraissant verticillées voire (Figure 2) et (figure 3) (Merad, 1973).

Ses fleurs sont en inflorescence de couleur blanche ; sont regroupées en petite ombelles, et elles sont composées de 8 à 15 rayons capillaires très inégaux. (Belouad, 1998). Elle est caractérisée par un cycle dynamique tardif allant de mois de mai au mois de juillet. Les fruits sont des diakènes, gris brunâtres, petits de longueur inférieure à 1 mm, côtelés de forme ovoïde et sont recouverts de poils épais. Ses grains sont petits, ovales, striées, courbées et gris-vert. Ses racines sont aussi grêles et pivotantes. Les grains une fois mûres sont récoltés, séchées et battues.



Figure 1 : Photo de la plante *Ammoides verticillata* (Vincent, 2009).

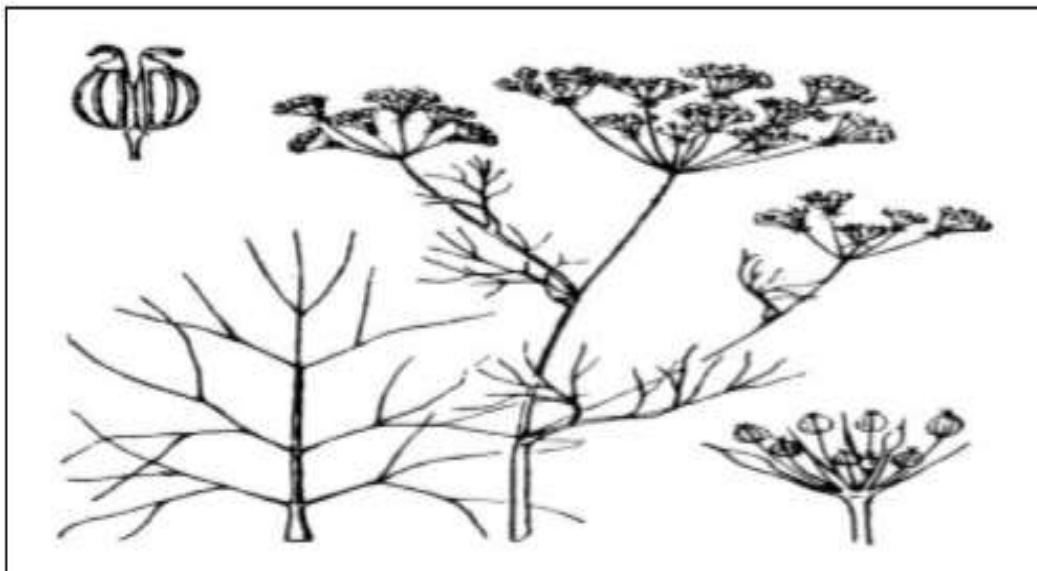


Figure 2 : Description d'*Ammoides verticillata* (Desf.) Briq (Benoît, 2012).

#### I-4-Composition chimique

Beaucoup de travaux chromatographiques CPG/SM sont réalisés sur les HE d'*Ammoides verticillata* dans plusieurs pays dans le monde. L'analyse chromatographique montre que l'essence d'*Ammoides verticillata* est constituée de monoterpènes : Linalol, Thymol,  $\gamma$ -Terpinène, Limonène, p-Cymène,  $\alpha$ -Terpinène. L'identification du produit majoritaire (le thymol) a été identifiée par la spectroscopie sous toutes ses formes (Tableau 2).

Selon la littérature, l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* présente deux chemotypes phénoliques : le thymol et le carvacrol. L'étude réalisée sur l'HE a permis de mettre en évidence un troisième chemotype : l'isothymol. (Kambouche et El Abeb, 2003) (Figure 4).

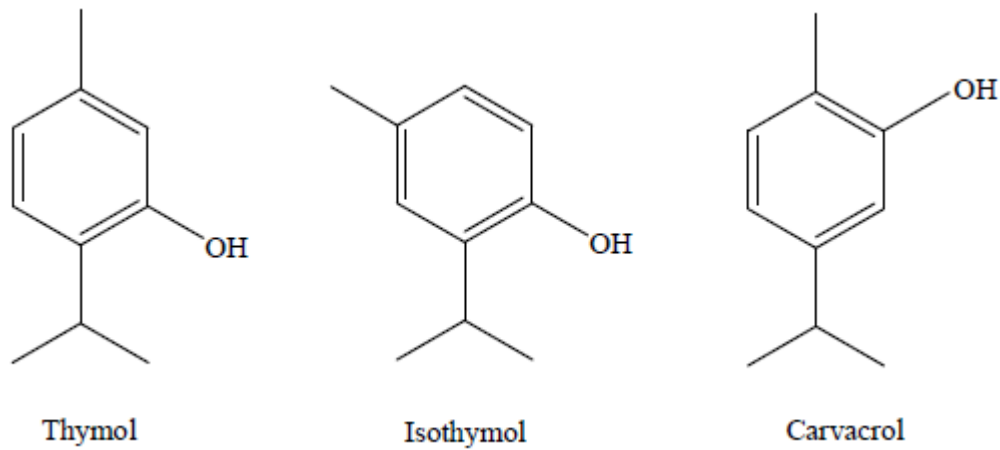
La variation du pourcentage des constituants observée est probablement due à l'influence de plusieurs facteurs comme : l'origine géographique, les conditions climatiques, le mode d'extraction.

**Tableau 2** : Pourcentages des constituants de l'HE d'*Ammoides verticillata* de différents pays. (Balbaa et al., 1973 ; Chalva et Monguzzi, 1993 ; Berhane, 1981 ; Ishwar et al., 1963 et Haskar, 1959).

Pays Constituants	Egypte	Turquie	Ethiopie	Inde	Algérie
$\alpha$ - pinène					0.62
Camphène	-	t	-	0.31	
$\beta$ - pinène	3.30	3.31	0.51	0.08	0.16
3-carène	0.50	t	-	0.17	
Myrcène	0.10	0.56	1.00	0.13	0.40
$\alpha$ - terpinène	-	t	10.00	-	
Limonène	0.20	2.08	-	-	11.99
$\beta$ - phellandrène	-	0.18	11.00	-	
$\gamma$ - terpinène	24.50	11.86	-	2.51	6.79
p-cymène	24.00	15.57	-	37.83	14.08
sabibène	-	-	-	-	0.13
terpinène4-ol	-	1.13	0.10	-	0.79
$\alpha$ -terpinéol	-	0.19	0.10	-	0.08
$\alpha$ - thujène	-	-	-	-	0.08
isothymol	-	-	-	-	51.20
thymol	41.00	61.31	-	55.70	12.96
carvarol	1.00	0.6	69	-	0.25
m-cymène	-	-	-	-	t
terpinolène	-	-	-	-	0.09
linalool	-	-	-	-	t
p-menth- èneilol	-	-	-	-	t
citronellal	-	-	-	-	0.30
méthylthymol	-	-	-	-	0.60
méthicarvacrol					

(t) : trace ; (-) : résultats négative





**Figure 3 :** Structure des constituants majeurs d'HE d'*Ammoides vesrticillata*.

### I-5-Propriétés et Utilisation

La plante Nounkha et son HE extrait par entraînement à la vapeur d'eau ou par d'autres méthodes s'utilisent en alimentation, en médecine et dans divers industries.

#### I-5-1-Usage culinaire

C'est une épice utilisée en Inde, surtout dans les plats végétariens. On peut notamment l'utiliser dans des hors-d'œuvre, dans des plats de haricots, ainsi que pour l'assaisonnement des sauces et des potages. D'une manière générale en Asie, elle est surtout utilisée comme aromate dans les préparations culinaires (légumes cuits, pains, ainsi que dans les pâtisseries). (Denissew, 1993)

En Ethiopie, les fruits servent à l'aromatization du pain et à la préparation de boisson alcoolisée locales surnommées Katikala. En Algérie les feuilles et les fleurs sont utilisées comme condiment dans les préparations culinaires comme par exemple : la soupe d'escargot (Ashraf et Orooj, 2006).

#### I-5-2-Usage thérapeutique

La plante *Ammoides verticillata* est largement utilisée pour prévenir et guérir diverses maladies. Un nombre élevé de propriétés médicinales et thérapeutiques des différentes parties de la plante a été décrit. Elle est surtout utilisée pour soigner les problèmes gastriques. Ainsi, les graines de la plante montrent plusieurs effets thérapeutiques à savoir : diurétique, analgésique, carminatif, anti-diarrhétrique, antihistaminique, fébrifuge, vermifuge, et anti-asthmatique. (Avesina, 1985).

A titre indicatif, nous exposons dans ce qui suit quelques exemples de la mise en évidence de ses multiples et nombreuses propriétés.

Ainsi, des expériences effectuées par Kalpana et al. (2001) ont permis de montrer l'influence de diverses épices entre autres *Ammoides verticillata* sur la sécrétion des acides biliaires. On note une

augmentation de la sécrétion des acides biliaires chez de jeunes rats ; ce qui explique l'action stimulante digestive de cette épice.

Des études menées sur des cochons ont révélées l'effet antitussif de cette plante (**Boskabady et al., 2005**) De même, les activités antihypertensives, antispasmodiques,... , bronhodilateurs (**Gilani et al., 2005**) et antihistaminiques ont été mises en évidence. Aussi, **Dashti et al., (2007)** ont démontré que l'extrait éthanolique des fruits de la plante a un effet analgésique sur les souris.

Son huile essentielle a montré des caractéristiques antimycotoxigéniques (**Rasooli et al., 2008**) et des propriétés anti-stress (**Ashraf et Orooj, 2006**).

En Ethiopie, ses graines mélangées au poivre rouge ont un effet antipyrétique (**Getahum, 1976**). Par ailleurs ses feuilles sont employées dans le traitement des douleurs stomatiques et pour l'avortement (**Jansen, 1992**).

En Inde, la plante est d'un usage fréquent dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique dans la confection de produits de beauté. En effet, ses graines entrent dans la fabrication de médicaments connus sous le nom d'ayurvédique dans le traitement des troubles digestifs, des coliques flatulentes et des diarrhées (**Watson, 1992**).

Ses fruits, en Turquie s'utilisent comme agent antimicrobien, en médecine traditionnelle, on leurs reconnaît les effets galactagogue et stomachique.

Il est à noter que cette plante est méconnue dans la flore médicinale algérienne (**Mahmoudi, 1990**). Néanmoins, en médecine traditionnelle la partie aérienne de la plante sèche est préconisée sous forme de décoction contre la grippe et la fièvre et sous forme d'infusion comme boisson fraîche associée avec des tranches de citron, en saison chaude, pour éviter toute infection et particulièrement contre la fièvre typhoïde.

L'enquête thérapeutique de **Felidj et al. (2010)**, réalisée auprès des herboristes et des gens campagne de la région de Tlemcen, confirme les avancements des chercheurs précédent. Les informations qu'il a pu recueillir sont résumées dans le **Tableau 3**.

**Tableau 3** : Enquête thérapeutique d'*Ammoides verticillata* (**Felidj et al., 2010**)

Parties utilisées	Indications	Mode d'emploi
Plante entière	Fièvre	Inhalation
	Rhumes et gripes	Inhalation/infusion citronnée
	Problèmes respiratoire	Inhalation ou infusion
	Infections rénaux	Infusion
	Parasites intestinales	Infusion ou poudre miellée

	Cycles douloureux Antispasmodique Laxatif Migraines et Sinusites Boisson rafraîchissante	Infusion Infusion Infusion
Feuilles	Condiment culinaire  Abscesses et Furoncles	Sauces Soupes Conservateur d'aliment confit (antifongique) Cataplasme
Racines	Diurétique	Décoction miellée

## I.1 Activité antimicrobienne

De nombreux auteurs ont rapporté que les extraits d'herbes ont des composés chimiques capables d'avoir une activité antimicrobienne (**Dorante et al., 2000**). Les constituants des huiles essentielles sont actifs contre une large gamme de bactéries, des levures et des champignons.

### I.1.1 Activité antibactérienne

Les huiles essentielles les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent aux labiacées : origan, thym, clou, girofle, sauge, romarin. Elles sont des plantes aromatiques à huile essentielle riche en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol (**Bulleti et al., 2004**).

Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le carvacrol est le plus actif. Il est reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire dans les boissons et dans d'autres préparations.

Le thymol et l'eugénol sont utilisés dans le produit cosmétique et alimentaire. Ces composés ont un effet antibactérien contre un large spectre de bactéries ; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocystigene*, *Clostridia sp.* et *Helicobacter pylori* (**Pauli, 2006**).

### I.1.2 Activité antifongique

Le pouvoir antifongique des HE des plantes aromatiques a été mis en évidence par de nombreux auteurs contre les moisissures allergisantes (**Billerbeck et al., 2002 ; Koba et al., 2004 ; Ouraini et al., 2005**) et contre les dermatophytes et les champignons pathogènes et opportunistes tels que *Candida albicans* (levure), *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* (**Teixeira, 2005**).

Des travaux similaires ont été réalisés par **Mohammedi (2006)** sur l'HE de *Cistus lanadiferus* contre sept moisissures ; *Rhizopus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichodema* et *Aspergillus flavus* (**Omidbeygi et al., 2007**). Ils ont démontrés que les HE du thym, de la sarriette et de clou de girofle présentent une activité antifongique « *in vitro* » contre l'*Aspergillus flavus*. Les HE d'*Eucalyptus saligna* et d'*Eucalyptus camalduiensis* ont montrés une effet fongistatique vis-à-vis du *Phaeoramularia angolensis* (**Jaset-dongmo et al., 2008**).

### I.1.3 Facteurs influençant l'activité antimicrobienne

Plusieurs paramètres influent l'évaluation de l'activité antimicrobienne des HE ou leur composés actifs tel que ; la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne, l'effet de la matrice biologique, le type et la structure moléculaires des constituant actifs, la dose ajoutée et type des microorganismes ciblés (**Malecky, 2007**).

La grande disponibilité des nutriments dans les aliments, comparés aux milieux du laboratoire, peut permettre aux bactéries de réparer les détériorations des cellules plus rapidement (Gill *et al.*, 2002). Non seulement les propriétés intrinsèques des aliments (protéines, matière grasse, eau, antioxydants, pH, sel, la présence d'antioxydants, des conservateurs et autres additifs) ainsi que les propriétés extrinsèques (température, emballage sous vide, gaz, air, les caractéristiques des microorganismes) peuvent aussi avoir une influence sur la sensibilité bactérienne (Tassou *et al.*, 1995).

Généralement la susceptibilité des bactéries à l'effet antimicrobien des huiles essentielles augmente avec la diminution du pH dans la matrice alimentaire, de la température de conservation et du taux d'oxygène à l'intérieur d'emballage (Skandamis et Nychas, 2000).

A pH faible l'hydrophobicité d'une huile essentielle augmente, ce qui le rend capable de se dissoudre plus facilement dans les lipides membranaire de la cellule de la bactérie ciblée (Mejlholm et Dalgaard, 2002). Par ailleurs, la présence de matières grasses et/ou des protéines dans les aliments réduit la disponibilité des molécules actives. L'HE se dissout dans la phase lipidique de l'aliment, il y aura relativement d'HE disponible pour agir sur les bactéries.

Par contre les glucides dans l'aliment ne semblent pas protéger les bactéries de l'action des HE autant que les lipides et les protéines (Burt, 2004).

## I.2 Activité antioxydante

### I.2.1 Radicaux libres

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant la matière organique. Mais nos cellules convertissent une partie de cet oxygène en métabolites toxiques : les radicaux libres organiques.

Les radicaux libres ne sont pas toujours néfastes. En fait, ils permettent au corps de contrôler la tonicité des muscles lisses, de combattre les inflammations et de lutter contre les bactéries. Cependant, l'opération bénéfique des radicaux libre dépend d'un équilibre délicat qui peut être détruit par de nombreux facteurs, notamment les polluants présents dans l'air que nous respirons et l'eau et les aliments que nous consommons (Desheemaeker, 2014).

Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques sont les suivants : Anion su peroxyde, Radical hydroxyle, Monoxyde d'azote, Peroxyde d'hydrogène, Acide hypochlorique, oxygène singulier ; Peroxynitrite, Radical alcoxy et Radical peroxy (Bartosez, 2003 ; Jadot, 1994).

En effet, la toxicité des espèces oxygénées réactives n'est pas nécessairement corrélée avec leur réactivité, dans plusieurs cas des espèces peu réactives peuvent être à l'origine d'une grande toxicité en raison de leur demie vie longue qui leur permet de se diffuser et gagner des locations sensibles ou elles peuvent interagir et causer des dommages à longue distance de leurs sites de production (Kohen et Nyska, 2002). Les radicaux libres sont principalement produits par des sources endogènes, telles que les chaînes de transport d'électron, les peroxyosomes et le système de cytochrome P-450.

## I.2.2 Les antioxydants

Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant / antioxydant afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme.

Les antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt certain dans la conservation des denrées comestibles, ils pourraient s'avérer utiles dans la prophylaxie et le traitement des maladies dans lesquels le stress oxydant est incriminé.

Les risques et les effets néfastes des antioxydants synthétiques utilisés comme additifs alimentaires ont été questionnés au cours des dernières années et la nécessité de les substituer par des antioxydants naturels, issus de plantes médicinales, est apparente.

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des espèces oxygénées réactives est assuré par des systèmes d'antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène. La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques (le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase) ; (Piquet et Hebuterne, 2007 ; Smythies, 1998) et en systèmes non enzymatiques. Ce groupe de systèmes antioxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine et l'acide lipoïque (Shahidi, 1997).

### I.2.2.1 Antioxydants naturels

#### A. Flavonoïdes

Ils sont présents dans la plupart des plantes, les flavonoïdes sont des pigments poly phénoliques qui sont responsable dans la plupart des colorations des fleurs et des fruits. Ils possèdent de nombreuses vertus thérapeutiques. Ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation. Certains ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antivirales, d'autres ont des effets protecteurs sur le foie.

Des flavonoïdes comme l'héspéridine et la rutine, présentes dans plusieurs plantes, dont le Sarrasin et le Citronnier, renforcent les parois capillaires et préviennent l'infiltration dans les tissus voisins.

L'activité antioxydante des flavonoïdes et des composés phénoliques est déterminée par la position et le degré d'hydroxylation (Lecerf et Ragot, 2006).

#### B. Tanins

Toutes les plantes en contiennent à des degrés différents. Ce sont des composés polyphénoliques qui permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections.

Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus souples, comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure.

Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (**Smythies, 1998**).

### **Coumarines**

Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Les conditions structurales requises pour l'activité antiperoxydante des coumarines sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes (**Madhavi et al., 1996**).

### **Phénols**

Il existe une très grande variété de phénols, de composés simples comme l'acide salicylique, molécule donnant par synthèse l'aspirine, à des substances plus complexes comme les composés phénoliques auxquels sont rattachés les glucosides. Les phénols sont anti-inflammatoires et antiseptiques. On suppose que les plantes, en les produisant, cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes phytophages. Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales.

Parmi les dérivés phénoliques, le resvératrol est le composé qui est le plus étudié. En effet, ce stilbène, isolé du raisin possède effectivement de fortes propriétés antioxydantes (**Packer et al., 1999**).

### **Xanthones**

Les xanthones possèdent des propriétés pharmacologiques (activité antimicrobienne et inhibition de la monoamine-oxydase).

La manguiférine est une xanthone qui possède la propriété d'inhibition envers la peroxydation des lipides, ainsi que des propriétés de capteurs de radicaux libres contre les anions super oxydes (**Panglossi, 2006**).

## **Introduction**

Durant notre stage pratique nous avons évalué l'activité biologique de l'huile essentielle et de l'extrait aqueux de la plante *Ammoides verticillata* poussant à l'état spontané dans la région de Tlemcen. Notre stage pratique s'est étalé sur une période de 4 mois : mois de février jusqu'au mois de Mai 2016. Les différentes expérimentations ont été effectuées au niveau de :

- Laboratoire de phytopharmacie, au niveau du Département d'Agronomie de l'université de Blida (réaliser l'extraction des huiles essentielles de la plante).
- Laboratoire de Pharmaco-toxico CRD Saidal de Médéa (effectuer les activités pharmacologiques).
- Laboratoire de microbiologie CRD Saidal de Médéa (réaliser les activités microbiologiques).

L'objectif de cette étude se base sur :

- L'extraction de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* par la méthode Clevenger.
- Détermination la toxicité aiguë de l'HE d'*Ammoides verticillata*.
- L'évaluation des activités biologiques de la plante : activités antimicrobiennes de l'huile essentielle et activité antioxydantes de l'extrait aqueux de la plante.



## I.1 Matériel utilisé

### I.1.1 Matériel non biologique

Le matériel utilisé durant notre expérimentation : Verrerie, Réactifs et les appareils (annexe 1)

### I.1.2 Matériel biologique

#### I.1.2.1 Matériel végétal

Notre étude porte sur la plante d'*Ammoides verticillata*, provenant de la station de Terny située à 12km du Sud de la ville de Tlemcen longée par la route national, durant le mois de Mars 2016. Cette station est située sur les hauts plateaux nord des monts de Tlemcen (**Figure 6**). La plante a été authentifiée au niveau du département de botanique d'Institut National d'Agronomie d'Alger.



**Figure 1** : Carte géographique de station Terny (Google Earth, 2014).

La situation géographique et bioclimat de la station de Terny est donnée par le (**Tbleau 4.**)

**Tableau 4** : Situation géographique et bioclimat de la station de Terny

Station	localisation	Bioclimat	Altitude	latitude	longitude

Terny	Monts de tlemcen	Semi-aride, tempéré	1055	34°,44'	Ouest, 1°21'
-------	------------------	---------------------	------	---------	--------------

### I.1.2.2 Microorganismes

Afin d'étudier le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles *d'Ammoides verticillata*, nous avons utilisé 07 souches microbiennes de référence voire **Annexe 2**.

### I.1.2.3 Animaux

A fin de déterminer la toxicité aiguë d'*Ammoides verticillata* (Desf.) Briq. Nous avons utilisé les souris issues de l'élevage de l'animalerie du laboratoire de pharmacotoxicologie du CRD SAILAL de Médéa (**Annexe 3**), sur des souris ayant des caractères suivantes :

- **Genre :** *Mus*
- **Espèce :** *Mus musculus*
- **Race :** albinos
- **Sexe :** mâle, femelle
- **Poids :** 18 à 20g
- **Alimentation :** granulées
- **Boisson :** eau de robinet
- **Conditions d'hébergement :** Les souris sont placées dans un local contrôlé. La température est comprise entre 20°C à 24°C, la photopériode est de 10 heures par jour, le taux d'humidité est de l'ordre de 50%.

## I.2 Méthodes

### I.2.1 Prélèvement des échantillons d'*Ammoides verticillata*

Nous avons procédé à un échantillonnage subjectif. Nous avons choisi les parcelles après une prospection de la région d'étude puis nous avons coupé systématiquement tous les pieds *d'Ammoides verticillata* sains, bien fournis et non pâturés qui se trouvent à l'intérieur de la parcelle.

Ainsi, dans la station de Terny, la distribution spatiale des pieds *d'Ammoides verticillata* est homogène. Le nombre de pieds *d'Ammoides verticillata* à l'intérieur de 1 m<sup>2</sup> varie de 1 à 3 pieds.

Nous avons donc récolté 1 échantillon (un échantillon correspondant à 100 pieds) sur un terrain de 10 x 10 m<sup>2</sup> durant le mois de Mars 2017.

Après récolte, les échantillons sont mis dans des sacs bien aérés, puis étalés sur du papier à l'ombre et à l'abri de l'humidité, à la température ambiante, jusqu'à ce qu'ils deviennent complètement secs. Par la suite, nous avons effectué des extractions des huiles essentielles (HE) et des extraits aqueux (**Figure 7**).



**Figure 2 :** Photo original (2017) de la plante sèche en bouquet.

### **I.2.2 Extraction des huiles essentielles**

Dans ce travail, la méthode d'extraction utilisée est d'hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger (**Figure 8**). Nous préférons cette méthode non seulement pour son optimalité pour le rendement en HE mais aussi à cause des plusieurs paramètres tels que la quantité du matériel végétal, l'état du matériel végétal, la quantité d'eau introduite, la durée de l'extraction de l'huile essentielle.

#### **A. Protocol expérimental**

Une masse bien pesée (g) de la plante sèche et éventuellement broyée, est introduit dans un ballon d'un litre en verre à 3 cols, imprégné d'eau distillée, placé au-dessus d'un chauffe ballon et surmonté d'une colonne en verre, celui-ci est relié à un réfrigérant qui communique directement à une ampoule à décanter pour la récupération du distillat. L'ampoule est reliée au ballon par un tuyau en plastique qui permet le retour de l'eau évaporée et condensée au ballon. La durée moyenne de l'extraction est d'environ 3 heures. On a réalisé 3 extractions d'HE de 4 pesés : 50g, 80g, 100g et 200g.

Après décantation, l'huile essentielle est récupérée par aspiration à l'aide d'une pipette-pasteur et est conservée dans des tubes en verre fermé hermétiquement à l'abri de la lumière et à une température entre 4 et 6°C.



**Figure 3.** Dispositif d'extraction d'HE de type clevenger  
(photo originale, 2017).

**B. Calcul du rendement :**

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse sèche du matériel végétal à traiter (**Carré, 1953**).

Le rendement, exprimé en pourcentage, est calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{Rd = m/m_0 \times 100}$$

Avec :

Rd : rendement en H.E exprimée en pourcentage ;

m : masse en gramme de l'H.E ;

$m_0$  : masse en gramme de la matière végétale sèche.

### I.2.3 Préparation d'extrait aqueux

#### But :

Extraction des substances bioactives contenues dans la partie aérienne de l'*Ammoides verticillata*

#### Protocol expérimentale :

La préparation de l'extrait aqueux de 10% de notre plante est réalisée par additionnement de 10g de poudre de la partie aérienne de la plante à 100ml d'eau distillée bouillit, puis laissée 30 minutes en infusion avec agitation de temps en temps. L'extrait aqueux obtenu est ensuite centrifugé à 1000 tours/min pendant 10 min pour se débarrasser des débris de plante puis filtré sur papier filtre de type wattman N=°5. Le filtrat est ensuite mis dans des petits flacons en verre (Ljubuncic et al., 2005).

### I.2.4 Screening phytochimique

#### But :

Identification des substances bioactives contenues dans la partie aérienne de l'*Ammoides verticillata* basée sur les réactions colorimétriques et de précipitation par différents réactifs.

Selon Harborne (1983), en fonction de la turbidité, de la coloration du milieu et de l'intensité du précipité, les résultats phytochimiques sont classés comme suite : Réaction très positive (+++), Réaction moyennement positive (++) , Réaction faiblement positive (+), Réaction négative ou absence de la substance (-).

#### A. Flavonoïdes :

Mettre 10g de la poudre sèche dans 150 ml d'HCl (la solution d'HCl concentré à 37% est diluée à 1%) et macérer le tout pendant 24h, filtrer et procéder au test suivant : Prendre 10 ml du filtrat (le macérât) et ajouter 5ml du NH<sub>4</sub>OH concentré (30%) (Le milieu devient basique).

Le résultat est positif par l'apparition d'une couleur jaune dans la partie supérieure du tube à essai (Okmu, 2005).

**B. Tannins :**

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant à 5ml d'extrait aqueux de 10%, et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl<sub>3</sub> dilué à 1 % (1 gr dans 100 ml d'eau distillé).

L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleu-vert indique la présence des tanins (**Trease et al., 1978**).

**C. Anthocyanine :**

Prendre 5ml d'extrait de 10% mélangé avec 4 ml d'hydroxyle d'ammoniac (NH<sub>4</sub>OH) concentré (30%).

L'apparition d'une coloration rouge indique la présence des anthocyanines (**Gherib, 1988**).

**D. Glucosides :**

Mélanger 2 grammes de poudre de plante avec quelques gouttes d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentré (96%).

Le résultat est positif par l'apparition d'une couleur rouge-bleue (**Gherib, 1988**).

**E. Coumarines :**

Prendre 1gramme de poudre de plante mélangé avec 5ml d'éther éthylique puis agiter et filtrer. Mettre le filtrat sous l'UV à 365nm.

L'observation d'une couleur bleue indique la présence des coumarines (**Gherib, 1988**).

**F. Terpènes :**

Prendre 5ml d'extrait de 10% mélangé avec 5ml d'acide phosphomolybdique (5g dans 100ml d'eau distillé) et 5ml d'acide sulfurique concentré (96%) (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (**Gherib, 1988**).

L'obtention d'une couleur bleue indique la présence des terpènes.

**G. Saponosides :**

Prendre 2ml d'extrait aqueux de 10% et ajouter 2 ml d'une solution d'acétate de plomb (0,3gr dans 5ml d'eau distillée).

La précipitation du dépôt blanc indique la présence des Saponosides (**Gherib, 1988**).

## H. Alcaloïde :

Faire macérer 5g de poudre végétale humectée avec l'ammoniaque  $\frac{1}{2}$  pendant 24h dans 50ml d'un mélange éther / chlorhydrique (3/1). Le filtrat est épuisé par l'acide chlorhydrique 2N.

Des réactions de précipitation sont effectuées sur la solution chlorhydrique en présence des alcaloïdes.

Les réactif dragendroff donne une précipitée rouge (**Gherib, 1988**).

## I.2.5 Etude de la toxicité aiguë

### But :

A fin de vérifier tout éventuel risque de toxicité de l'extrait aqueux d'*Ammoides verticillata*, il était nécessaire de réaliser des essais de toxicité, pour cela nous avons testé, sur les souris, différentes concentrations de l'HE.

### A. Préparations des doses et des lots de souris

#### A.1. Préparation de l'extrait aqueux

30g de poudre de la partie aérienne *Ammoides verticillata* mélangée dans 150 millilitres d'eau distillée, sont soumises à une décoction pendant 45 minutes. La mixture a été d'abord essorée dans un carré de tissu propre, filtrée successivement deux fois sur du coton hydrophile puis sur papier Wattman 5mm. Le volume du filtrat a été évaporé au rotavapor puis à l'étuve à 60°C. La concentration de l'extrait final *Ammoides verticillata* était de 1g/ml. L'extrait a été conservé au réfrigérateur dans un bocal stérile en verre hermétiquement fermé.

#### A.2. Doses évaluées

A partir de la solution mère (1000mg/ml), des dilutions successives sont préparées au 1/2, 1/4, 1/8 et au 1/10. Après avoir soumis les animaux à un jeûne de 12 heures, la solution mère (1000mg/ml) et les différentes dilutions ont été administré, par gavage, à l'aide d'une canule d'intubation comportant un embout légèrement recourbé (**Figure 9**). Le gavage a été fait avec un volume de 1ml pour 20 grammes de poids corporel. La dose d'extrait à administrer est ensuite exprimée en mg/kg de poids corporel. Dans l'ensemble, des volumes (ml) ont été administrés aux animaux, en fonction de leur poids corporel. Les différentes concentrations obtenues (mg/ml) correspondent aux doses respectives de 50000 ; 25000 ; 12500 ; 6250 et 5000 mg/kg de poids corporel.





**Figure 4.** Gavage de la souris par l'huile essentielle.

### **A.3. Conditionnement et constitution des lots de souris pour l'évaluation de la toxicité aiguë**

Pour mener cette étude de la toxicité aiguë, 12 souris (*Mus musculus*) de race SWISS ont été utilisées (mâles et femelles) âgés de 08 semaines. Les animaux en provenance du CRD d'El Harrach, étaient âgés de 4 à 6 semaine pesaient environ avec un poids  $20 \pm 0.7$  grammes de poids corporel. Les souris mâles et femelles préalablement séparées ont été placées dans des cages plastiques aérées. Les 18 souris mâles et femelles ont été acclimatées aux conditions de l'animalerie pendant sept jours avant le traitement et nourris à partir des granulés. Avant traitement, les animaux ont été soumis à un jeûne de 12 heures. Ils ont été répartis en six lots de 03 souris de la façon suivante :

- lot 01 : souris témoins ont reçu 0,5ml de solution physiologique NaCl (0,9%) (Groupe de contrôle)
- lot 02 : souris traitées avec l'extrait à 150 mg/kg de poids corporel.
- lot 03 : souris traitées avec l'extrait à 75 mg/kg de poids corporel.
- lot 04 : souris traitées avec l'extrait à 50 mg/kg de poids corporel.
- lot 05 : souris traitées avec l'extrait à 37.5 mg/kg de poids corporel.
- lot 06 : souris traitées avec l'extrait à 30 mg/kg de poids corporel.

### **B. Observation des troubles symptomatiques**

Après le gavage de l'extrait, les animaux sont replacés dans leurs cages métalliques où ils pouvaient avoir accès aux granulés à nouveau. Ils ont été observés aussitôt puis toutes les



30 minutes, pendant huit heures, le premier jour et une fois par jour, durant 48 heures. Pendant cette période, les troubles symptomatiques (agitation, manque d'appétit, difficultés motrices et dyspnée) ont été notés, chez les animaux des lots constitués

## C. Evaluation des paramètres toxicologiques

### C.1. détermination de la DMT et de la DL100

Après administration de l'extrait aqueux aux différentes concentrations, les animaux morts étaient comptés dans chaque lot, durant 48 heures. Cette expérimentation sur la toxicité aiguë a été conduite dans le but de déterminer les paramètres toxicologiques que sont la dose létale 50% (DL50), dose qui tue 50% des animaux, la dose létale 100% (DL100), dose qui tue tous les animaux et la dose maximale tolérée (DMT) qui représente la dose maximale qui ne tue aucun animal lorsque l'extrait ou l'huile est administré.

### C.2. Détermination de la dose létale 50% (DL50)

La dose létale 50% (DL50) a été déterminée à partir de la formule de **Karber et Berhens (1935)**. Elle se calcule de la façon suivante :

$$DL50 = DL100 - \Sigma (a \times b)/n$$

DL50 : Dose létale 50% ; DL100 : Dose létale 100% ; a : moyenne de la somme des morts entre deux doses successives ; b : différence entre deux doses successives ; n : moyenne du nombre d'animaux utilisés par lot

### I.2.6 Evaluation de l'activité antioxydante (in vitro)

#### But :

Evaluer la capacité de l'extrait aqueux d'*Ammoides verticillata* (Desf.) Briq., à piéger les radicaux libres à l'aide d'un composé synthétique de radicaux libres DPPH.

#### Principe :

La capacité anti-oxydante peut être aussi mesurée en utilisant des radicaux libres plus stables. Le radical 1, 1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre très stable à l'état cristallin et en solution, de coloration violette. Par cette méthode, on considère que l'activité antioxydante n'est autre que la capacité des antioxydants d'agir comme piègeur des radicaux libres. Ils agissent en transférant un atome d'hydrogène ce qui conduit à la disparition du DPPH au cours de la réaction et à un changement de coloration (jaune) dans la solution initiale (**Brand-Williams et al., 1995**).

#### Protocol expérimentale :

1ml de chaque concentration de l'extrait aqueux, sont ajoutés à 1,5 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,04 mg/ml) (4mg de DPPH dans 100ml de méthanol).

En parallèle, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 1.5ml de méthanol avec 1,5 ml de la solution méthanolique de DPPH.

La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc (1.5ml de méthanol avec 1.5ml d'eau distillée) à l'aide d'un spectrophotomètre UV à longueur d'onde de 517nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

### **Détermination du pourcentage d'inhibition :**

L'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I%) est calculée de la manière suivante :

$$I \% = ([A \text{ blanc} - A \text{ échantillon}] / A \text{ blanc}) * 100$$

Avec :

A blanc : Absorbance du blanc (contenant tous les réactifs excepté le composé d'essai,

A échantillon : Absorbance du composé d'essai.

La cinétique des réactions de l'extrait aqueux et de l'acide ascorbique avec le DPPH, a été inscrite à chaque concentration examinée. Les concentrations en extrait aqueux et en acide ascorbique, en fonction des pourcentages du DPPH inhibés, ont été tracées à la fin de la réaction afin d'obtenir l'index IC50. Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH initiale de 50 % (**Sharififar et al., 2007**). Il est inversement lié à la capacité antioxydante.

### **I.2.7 Activité antimicrobienne**

L'étude de l'activité antimicrobienne d'huile essentielle *d'Ammoides verticillata* (Desf.) Briq. sur les micro-organismes testés a été évaluée par la méthode de l'aromatogramme et la méthode de microatmosphère. La sensibilité des souches se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des disques.

#### **I.2.7.1 Activité antibactérienne**

### **Préparation du milieu de culture :**

Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu Soja Triptona Agar (STA) préparé comme suit :

Dissoudre 40g de STA dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis auto-claver pendant 15 minutes à 121°C et finalement couler le milieu dans les boîtes de Pétri.

### **Préparation de l'inoculum :**

Il est indispensable d'utiliser des cultures jeunes, leur réactivation se fait comme suit :

Un Prélèvement de la souche à partir du milieu de conservation à l'aide d'un écouvillon stérile, on l'a ensemencé dans milieu Soja Triptona Agar (STA), La durée de l'incubation est de 24 heures à une température de 37°C.

Nous préparons la suspension de chaque souche séparément en prélevant à l'aide d'un écouvillon stérile des colonies. Elles sont déposées dans un tube contenant 3ml l'eau physiologique.

### **Ensemencement :**

Les suspensions bactériennes sont ensemencées sur des boîtes contenant 13.5ml du milieu Soja Triptona Agar (STA)

Tremper un écouvillon stérile dans la suspension qui nous avons préparé.

Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée de la boîte de Pétri, en stries serrées, en tournant la boîte de Pétri de 60° à chaque fois.

Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de boîte pétri.

### **A. Méthode de l'aromatogramme (technique en milieu solide)**

#### **Principe :**

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale appelée antibiogramme ou méthode de disques ou méthode par diffusion en milieu gélosé. La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de la

zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance testée, plus il est petit plus la bactérie est résistante. Le diamètre de ces zones d'inhibition est proportionnel à l'activité bactériostatique de l'HE sur le germe testé. On peut exprimer cette activité soit en indiquant directement le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre, soit en traduisant en croix le degré d'activité (**Figure 10**) (**Guerin et Carret, 1999**).

#### **Protocole expérimentale :**

A l'aide d'une pince flambée au Bec Bensen, on dépose 1 disque stérile de 9 mm de diamètre, imprégnés avec l'HE à la surface du milieu STA. Les boîtes sont incubées 37°C pendant 24H.

#### **La lecture :**

Elle se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des HE, (**Ponce et al., 2003**).

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14mm.
- Assez sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19mm.
- Très sensible (+++) : diamètre > 20mm.

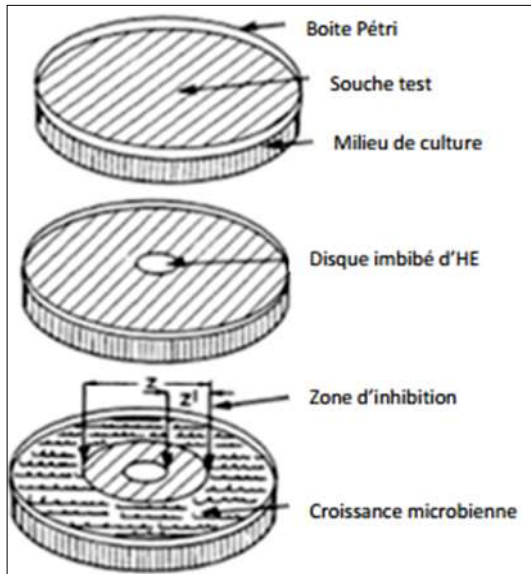
#### **B. Méthode de microatmosphère (technique en phase vapeur)**

##### **But :**

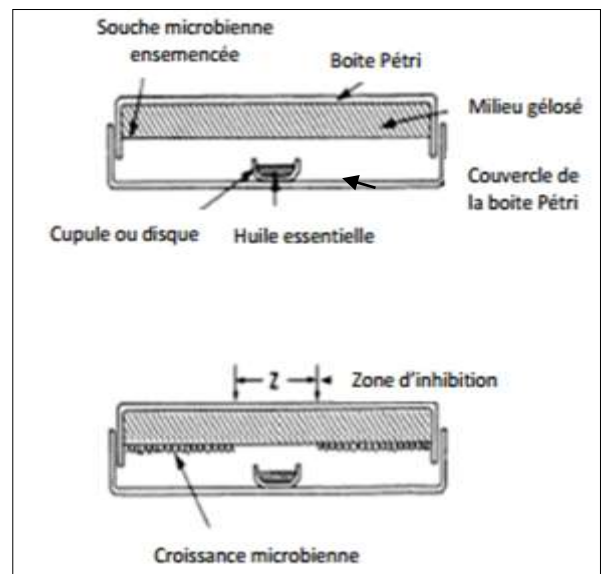
Le but de cette méthode est d'exploiter les propriétés bactéricides de la phase volatile des huiles essentielles.

##### **Principe :**

Dérivée de la méthode précédente le procédé est techniquement proche de celui des aromagrammes. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné. Dans cette technique, le disque est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé (**Figure 11**) (**Pibiri, 2006**).



**Figure 5.** Illustration de l'aromatogramme (Zaika, 1988).



**Figure 6.** Illustration de la méthode de Microatmosphère (Zaika, 1988).

### I.2.7.2 Activité antifongique

Les mêmes opérations sont effectuées avec les souches des champignons, mais dans ce cas le milieu de culture utilisé est le milieu SDA. Les champignons sont activés pendant 48h dans des boîtes de Pétrie à une température de 28°C avant le test, après incubation l'inoculum des champignons est préparé et l'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri coulés qui contient du SDA.

#### Préparation du milieu de culture :

Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu Sabouraud Dextrose Agar (SDA) préparé comme suit :

Dissoudre 60g de SDA dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis auto-claver pendant 30 minutes à 121°C et finalement couler le milieu dans les boîtes de Pétri.

### I.2.7.3 Détermination de la concentration minimale d'inhibition (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) par Méthode de contact direct

#### But :

Évaluer les concentrations minimales inhibitrices. Elle consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent antimicrobienne, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme. L'efficacité de l'HE testée est évaluée par la mesure de deux concentrations. La concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB). Ces concentrations nous permettent de connaître la nature de l'activité antimicrobienne de l'HE : bactériostatique ou bactéricide.

**Principe :**

La méthode du contact direct, basée sur l'utilisation sous forme d'émulsion de ces produits non miscibles à l'eau, nous avons ainsi déterminé les CMI et les CMB, et nous avons utilisé les mêmes milieux cités précédemment.

La CMI est la plus faible concentration d'huile essentielle inhibant toute croissance microbienne.

La CMB correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Elle définit l'effet bactéricide d'une huile essentielle.

**Préparation de l'inoculum :**

L'inoculum bactérien et fongique est préparé de la même manière que précédemment

**Préparation des dilutions d'HE dans le milieu de culture :**

2,5 ml de tween 80 (c'est une polysorbate, hydrophile qui oriente les émulsions dans le sens "huile dans l'eau", autrement dit qui disperse la phase huileuse dans la phase aqueuse de manière obtenir une émulsion du type HE) sont ajoutés à 90 ml d'eau distillée. L'ensemble est stérilisé à 120 °C pendant 15 mn (solution A). On prépare ensuite une solution mère contenant 9 ml de la solution (A) et 1 ml d'HE que l'on agite fortement en utilisant le vortex pour une bonne dispersion de l'HE. A partir de cette dernière, on prépare des dilutions successives avec de l'eau distillée. On obtient ainsi différentes concentrations en HE ( $10^{-1}$  à  $10^{-5}$ ).

Dans des boîtes de Pétri on ajoute 13,5 ml du milieu de culture à 1,5 ml de la solution mère et à 1,5 ml des diverses dilutions. On obtient ainsi des concentrations en HE dans le milieu de culture de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$ .

La boîte témoin contenant 13.5 ml du milieu de culture et 1,5 ml de la solution A.

Les boîtes de pétri à essai et la boîte témoin sont bien agités.

**Etape d'ensemencement :**

A la surface du milieu contenant les différentes dilutions d'HE, on ensemence les bactéries ou la levure par écouvillonnage. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pour les bactéries pendant 24h et à 30°C pour les champignons pendant 48H.

La lecture de la CMI est la plus faible concentration d'huile essentielle inhibant toute croissance microbienne.

La lecture de CMB est la plus faible concentration d'huile essentielle nécessaire pour détruire l'inoculum initial après incubation en conditions standards pendant 7 jours, dans ce cas les microorganismes ne sont plus visibles.

### I.3 Caractéristiques organoleptiques

L'huile essentielle *Ammoides verticillata* présente un aspect liquide, de couleur jaune claire (**Annexe 3**) et elle est caractérisée par une forte odeur piquante.

### I.4 Extraction des huiles essentielles (HE) par Hydrodistillation

#### I.4.1 Détermination de la quantité végétale nécessaire pour l'extraction

Le rendement en huile essentielle a été calculé en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante.

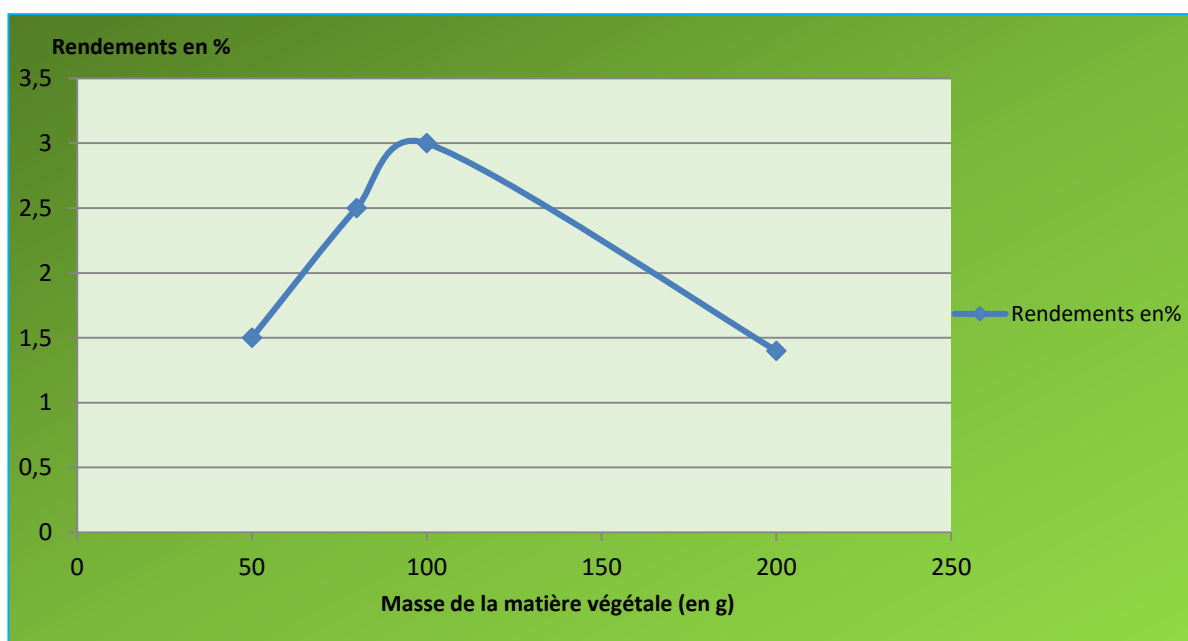
D'après les résultats donnés par la **Figure 12**, le rendement en huile essentielle varie en fonction de la masse de la matière végétale. Il atteint son maximum avec 100 g de la plante sèche avec un rendement d'environ 3%. Ce rendement diminue rapidement jusqu'à environ 1,4% pour 200 g de la plante sèche puis décroît lentement.

Ces variations de rendement sont probablement liées au degré de tassement non approprié (insuffisant ou excessif) qui impose à la vapeur d'emprunter des chemins préférentiels.

De ce fait, à certains endroits, la vapeur n'entre pas en contact avec la matière végétale et en conséquence le rendement diminue. Nous avons le poids idéal pour l'extraction des huiles essentielles c'est 100g de matière végétale.

L'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* a été obtenue avec un rendement relativement moyen (3% sur la base du poids sec). Ce rendement est probablement dû aux facteurs suivants :

- Aux précipitations et aux températures élevées durant l'année 2016 dans la région de Terny.
- Au degré d'aridité de la région de Terny (il est de type semi-aride).



**Figure 7.** Influence du poids d'*Ammoides verticillata* sur le rendement en huiles essentielles durant 3h d'extraction selon la méthode Clevenger.

Certaines différences de rendement ont été observées dans les échantillons d'*Ammoides verticillata* de différentes origines : Algérie (4.41%) (**Kambouche et Abed, 2003**), Maroc (2%) (**El Ouariachi et al., 2011**), Iran (2.8% à partir de la plante) (**Khajeh et al., 2004**) et Iran (4,6% à partir des fleurs) (**Mohagheghzadeh et al., 2007**),

La différence en rendement entre d'*Ammoides verticillata* de différentes provenances peut être attribuée à de nombreux facteurs : origine géographique, stade de croissance, conditions pédoclimatiques et édaphiques de la région, technique d'extraction et l'état de la matière végétale (**Fellah et Romdhane, 2006**).

Par ailleurs, Cette interprétation fut avancée par **Bendahou et al., (2007)** qui préconisent que l'étude complète des HE doit passer par la prise en compte des facteurs édaphiques et pour l'obtention d'un meilleur rendement, il est nécessaire de :

- Choisir un étage bioclimatique semi-aride, tempéré doux.
- Le sol doit être limoneux-argileux-sableux à texture équilibrée ou argilo-siliceux.
- Procéder à l'extraction des huiles essentielles par la méthode d'hydrodistillation.

## I.5 Screening Phytochimique

La mise en évidence des différentes classes des métabolites secondaires constituant une plante, nous permet d'avoir une bonne idée sur ses activités pharmacologiques. Pour cela nous avons réalisé les tests phytochimiques sur différents extraits préparés à partir de la partie aérienne de la plante *Ammoides verticillata* en utilisant des solvants de polarité différente et des réactifs spécifiques de révélation.

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de notre plante. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette.

Selon **Harborne (1983)**, ces tests sont en relation avec l'intensité du précipité, la turbidité et la coloration ; ce qui détermine la proportionnelle de la quantité et de la substance recherchée.

Ainsi :

- Une réaction franchement positive est représentée par : +++
- Une réaction moyennement positive est représentée par : ++
- Une réaction faiblement positive est représentée par : +
- L'absence de la substance est représenté par : -.

Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur la partie aérienne *Ammoides verticillata* sont résumés dans le **Tableau 5**.

L'examen phytochimique réalisé sur la partie aérienne *Ammoides verticillata*. a révélé la richesse de l'extrait en composés phénoliques : les flavonoïdes, les tannins ; les anthocyanes et les coumarines et en terpènes. Cependant, nous observons l'absence des glucosides, saponosides et alcaloïdes dans notre extrait.









Les familles chimiques détectées dans notre étude viennent de confirmer les travaux antérieurs d'**El-Hilary (2007)** de **Bougendoura (2011)** et d'**Oumessaad et al. (2013)** sur les tests phytochimiques de l'extrait aqueux de l'*Ammoides verticillata* qui ont certifié la











présence des tannins, des anthocyanes, des coumarines, des terpènes et surtout des flavonoïdes en quantité importante

La présence dans notre plante une quantité élevée des tannins et justifié par des travaux déjà réalisés par **Oumessaad et al. (2012)**. De plus L'existence des tannins explique la forme ligneuse de cet arbuste.

Tableau 5. Différents composants d'*Ammoides verticillata* (Desf.) Briq.

Composés	résultats	Avant	Après
Flavonoïdes	+++		
Tannins	+++		
Anthocyanines	+		
Glucosides	-		

Coumarines	++		➔	
Terpènes	++		➔	
Saponosides	-		➔	
Alcaloïdes	-		➔	

(-) : réaction négative, (+) : réaction positive, (++) : réaction moyennement positive, (+++) : réaction fortement positive.

## I.6 Etude de la toxicité aiguë

### Signes cliniques notés après gavage de l'Huile essentielle

Quelques instants après gavage de l'extrait *Ammoides verticillata*, une courte période d'agitation de 3 minutes a été suivie de somnolence et d'étirement. Une vingtaine de minutes plus tard, tous les animaux ont repris leur habitude normale. Des modifications relatives à

l'aspect général des souris (pilosité, peau, état des yeux, des oreilles et de la bouche) n'ont pas été observées durant ces deux jours d'observations.

Par ailleurs, aucune mortalité chez les souris n'a été signalée après l'administration de l'extrait d'*Ammoides verticillata* à des doses allant de 5000 à 50000 mg/kg de poids corporel.

### I.6.1 Activité antioxydante

L'activité antioxydante est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques de l'extrait aqueux. En présence d'un radical libre DPPH, l'atome H est transféré sur ce dernier donc transformé en une molécule stable DPPH, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité d'antioxydant donneur d'hydrogène (Masuda et al., 1999 ; Villano et al., 2007).

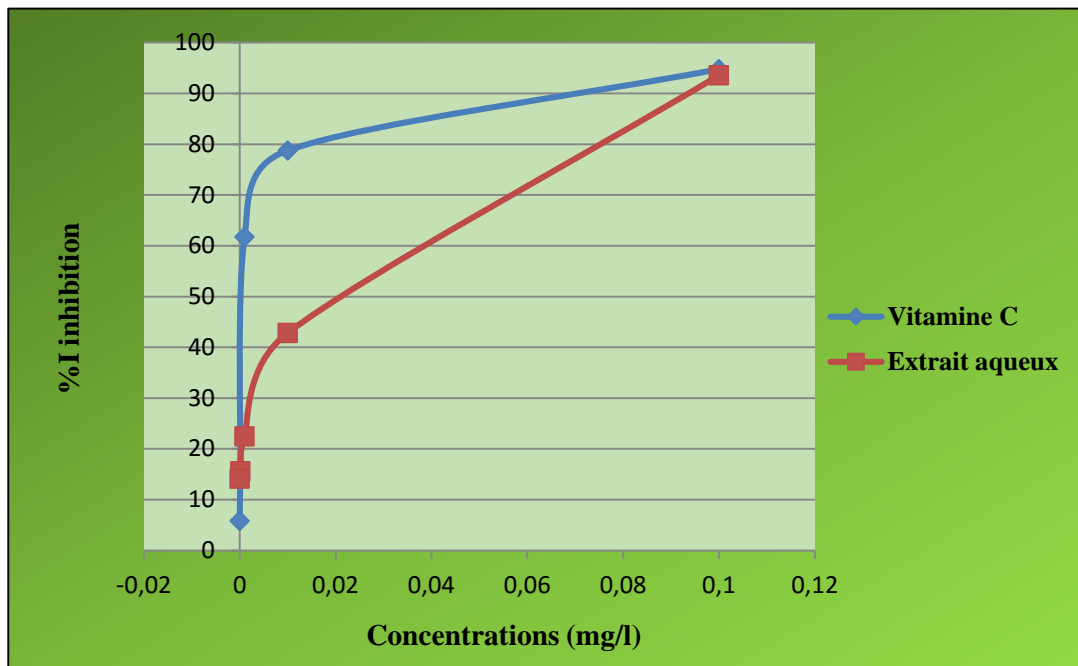
Le DPPH présente une coloration violette sombre mais lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes sa couleur vire vers le jaune pâle, le virage vers cette coloration et l'intensité de cette coloration dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance anti-radicalaire (Rolland, 2004).

#### I.6.1.1 Détermination du pourcentage d'inhibition

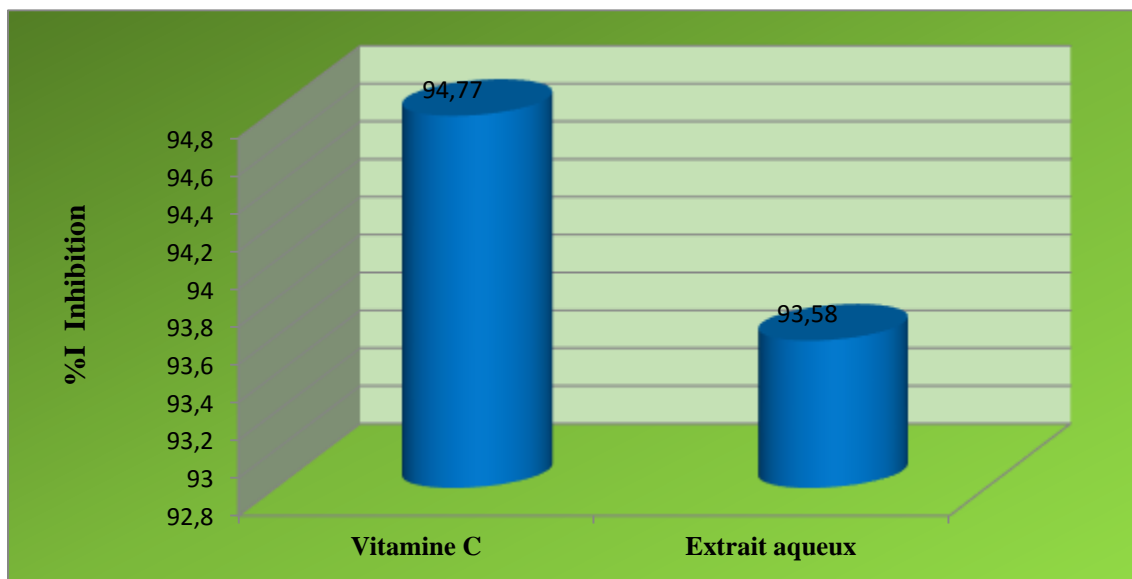
Les résultats obtenus lors du test de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH (2,2- Diphenyl-2-picrylhydrazyl) sont enregistrés dans la **Figure 13**.

Nous constatons que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour le produit de contrôle acide ascorbique (vitamine C) ou pour l'extrait aqueux de l'*Ammoides verticillata*.

On note que l'efficacité antioxydante augmente avec la concentration de l'extrait aqueux. Cependant, le pourcentage d'inhibition du radical libre pour l'extrait est légèrement inférieur à celui de l'acide ascorbique pour toutes les concentrations utilisées. Pour une concentration de 100mg/ml, l'extrait aqueux de l'*Ammoides verticillata* a révélé un pourcentage d'inhibition de DPPH de 93.58% tandis que celui de la vitamine C est de 94.77% (**Figure 14**).



**Figure 8 :** Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de la vitamine C et de l'extrait de d'*Ammoides verticillata*.

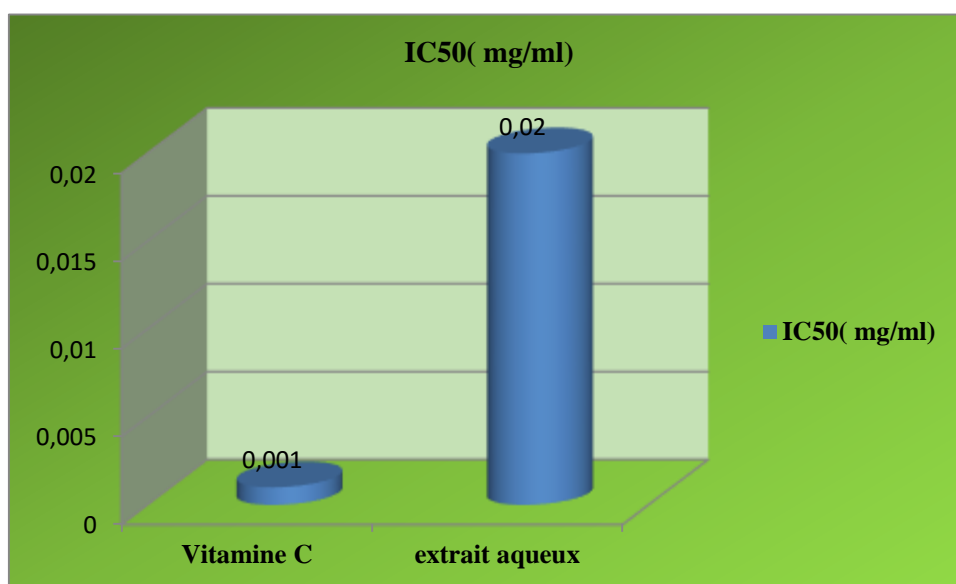


**Figure 9 :** Pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle et de la vitamine C.

#### 1.6.1.2 Détermination d'IC50

L'IC50 est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé. Elle exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'extrait aqueux et de l'acide ascorbique sont indiquées dans la **Figure 15**



**Figure 10:** IC<sub>50</sub> de l'extrait aqueux et de la vitamine C.

L'extrait aqueux de l'*Ammoides verticillata* pouvait ramener le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) au diphenylpicrylhydrazine jaune-coloré avec un IC<sub>50</sub> de 0.020mg/ml. Il exhibe une activité antioxydante inférieure à celle de la vitamine C (0.001mg/ml) (**Figure 15**).

Suivant les résultats trouvés, il s'avère que l'extrait aqueux de l'*Ammoides verticillata* possède une activité antioxydante, mais elle est moins efficace que celle de la vitamine C.

Par ailleurs, en comparant le IC<sub>50</sub> de notre extrait (IC<sub>50</sub>=0.020mg/ml) avec celui de huile essentielle de l'*Ammoides verticillata* (IC<sub>50</sub> de 0.10mg/ml) étudiée par **Merzougui et Tadjji (2012)**, notre extrait se dévoile avec un pouvoir antioxydant plus important que celui l'huile essentielle. Cependant **Azza et al. (2011)**, ont décelé un effet antioxydant remarquable (IC<sub>50</sub>=0.007mg/ml) des extraits organiques d'une autre espèce de même genre *Ammoides atlantica*, toutefois les résultats des IC<sub>50</sub> sont réalisés avec d'autres méthodes d'activité antioxydantes.

D'autre part, Il avère que cette activité antioxydante est liée à la présence des composés phénoliques dans les extraits et les huiles essentielles. Ils sont connus comme de puissants antioxydants (**Shahidi et Wanasundara, 1992**) et comme des réducteurs des radicaux libres (**Villano et al., 2007**). De plus, Les composés phénoliques sont des constituants très importants dans les extraits et leur capacité de balayage des radicaux libres est due à leurs groupes d'hydroxyles (**Hanato et al., 1989**).

## I.6.2 Activité antimicrobienne

### A. Méthode de l'aromatogramme

Nous avons eu recours à l'aromatogramme qui est une méthode biologique efficace pour déterminer directement l'effet antimicrobien de l'huile essentielle de l'*Ammoides verticillata* sur les micro-organismes testés.

Pour cela la sensibilité des souches testées est estimée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition dans les deux sens perpendiculaires autour des disques imprégnés de l'huile essentielle de l'*Ammoides verticillata*.

Les diamètres des zones d'inhibition (mm) ont été mesurés, y compris le diamètre des disques.

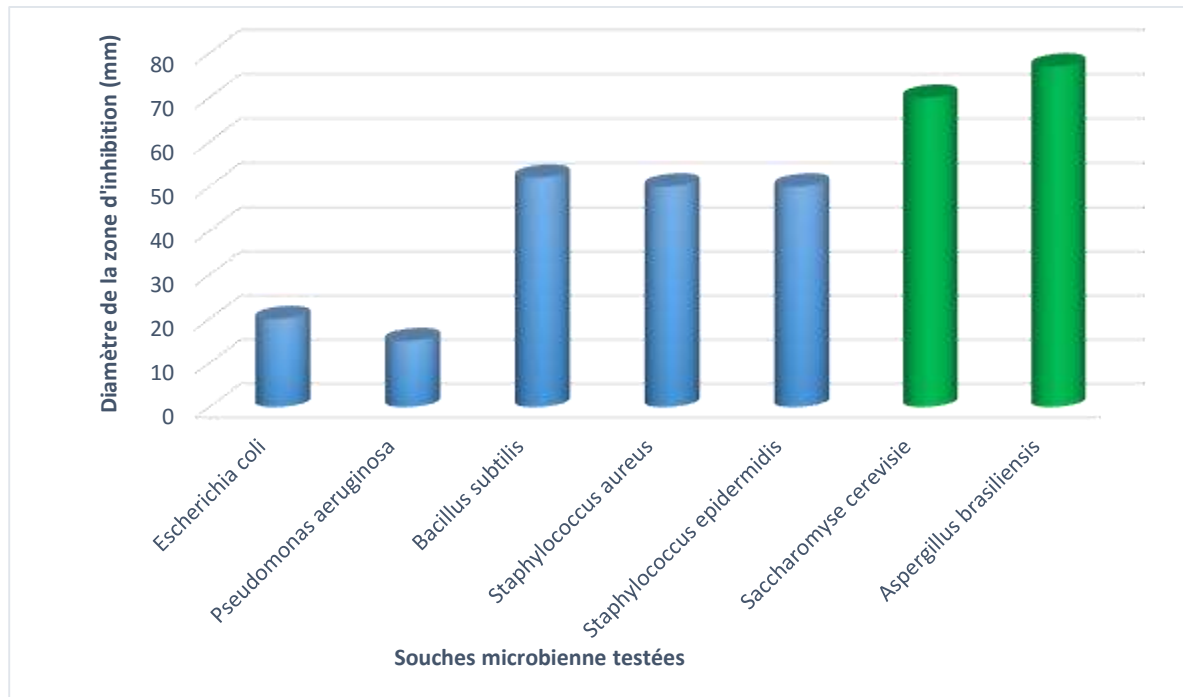
Les résultats des expériences de nos tests sur la croissance des bactéries, de champignon et de levure vis-à-vis de l'huile essentielle de l'*Ammoides verticillata* sont reproduits sur le **Tableau 3 (annexe 4)** et sur la **Figure 16**.

Selon **Ponce et al. (2003)**, les huiles essentielles sont considérées comme actives si elles produisent des diamètres d'inhibition supérieurs ou égaux à 20mm. De ce fait, l'huile essentielle de l'*Ammoides verticillata* présente une forte action antibactérienne contre bactéries gram+ : les *Bacillus subtilis*, les *Staphylococcus aureus* et les *Streptococcus epidermidis* qui s'avèrent énormément sensibles à l'action inhibitrice de l'huile avec des diamètres d'inhibitions respectifs : 52mm, 50mm et 50mm.

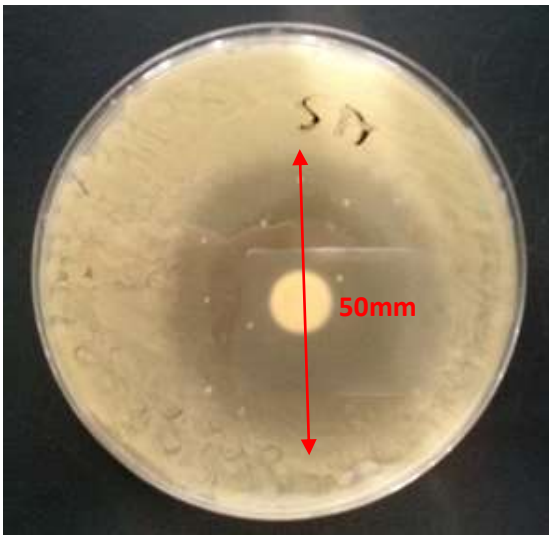
L'huile essentielle de l'*Ammoides verticillata* présente en plus une forte activité contre les germes-cibles gram- : *Escherichia coli* et qui se montre fortement sensible vis-à-vis de l'action inhibitrice de l'huile avec des diamètres d'inhibitions 20mm. Cependant l'huile se montre douée avec une activité moins importante vis-à-vis de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (15mm).

Le champignon *Aspergillus brasiliensis* et la levure *Saccharomyces cerevisie* se montrent également très sensibles vis-à-vis du pouvoir inhibiteur très important de L'huile essentielle de l'*Ammoides verticillata* puisqu'elles sont inhibées avec des diamètres d'inhibition respectifs : 77mm et 70mm (**Figure 17**).

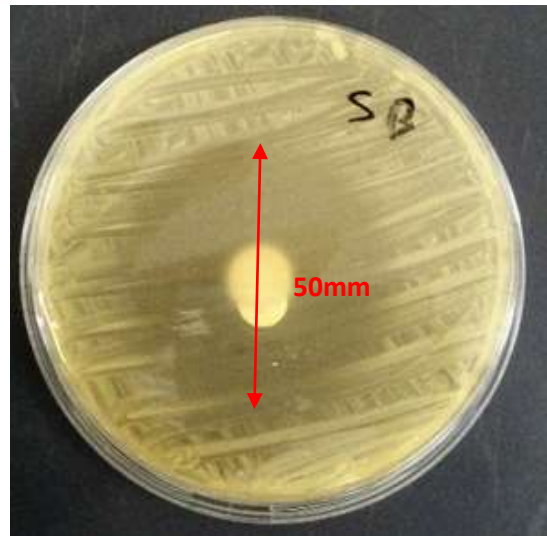
La présente étude a montré que les bactéries à Gram+ sont les plus sensibles vis-à-vis de l'action inhibitrice de l'HE alors que les bactéries à Gram- ont présenté une résistance par rapport aux bactéries Gram+ notamment l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. Ce résultat est en accord avec de nombreuses études effectuées sur d'autres espèces végétales (**Saïdana et al., 2008**). Cette bactérie est par ailleurs connue pour sa résistance à de nombreux antibiotiques, de plus elle est pathogène opportuniste chez les personnes immunodéprimées ou elle est responsable des infections nosocomiales fréquentes et graves chez les malades.



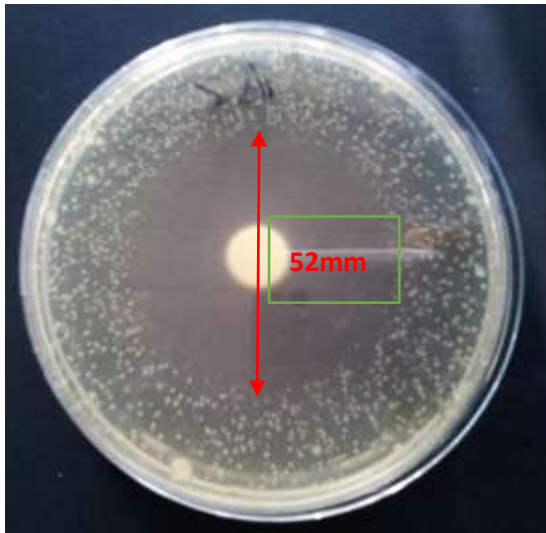
**Figure 11** : Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de l'*Ammoides verticillata* vis-à-vis des microorganismes.



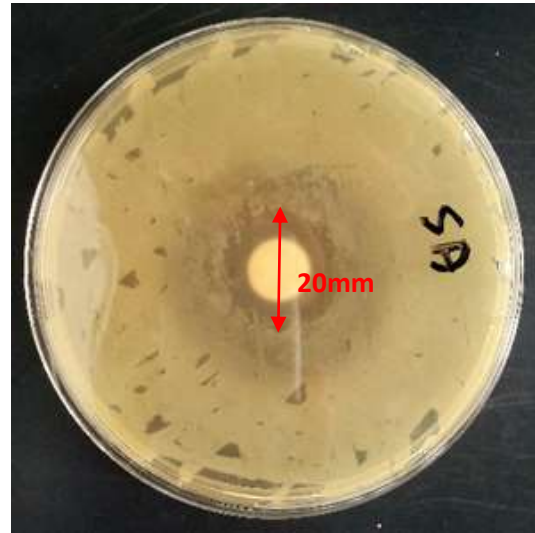
*Staphylococcus aureus*



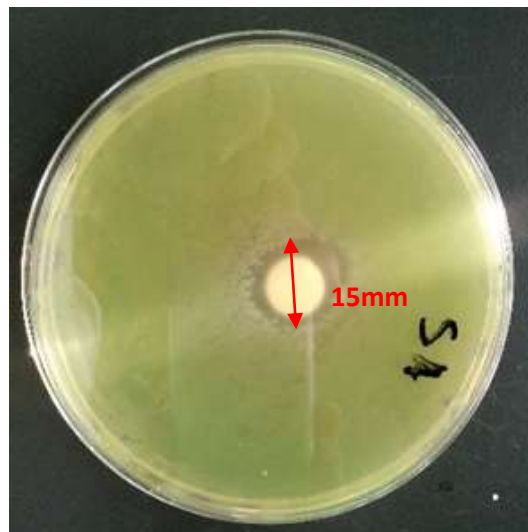
*Staphylococcus epidermidis*



*Bacillus subtilis*



*Escherichia coli*





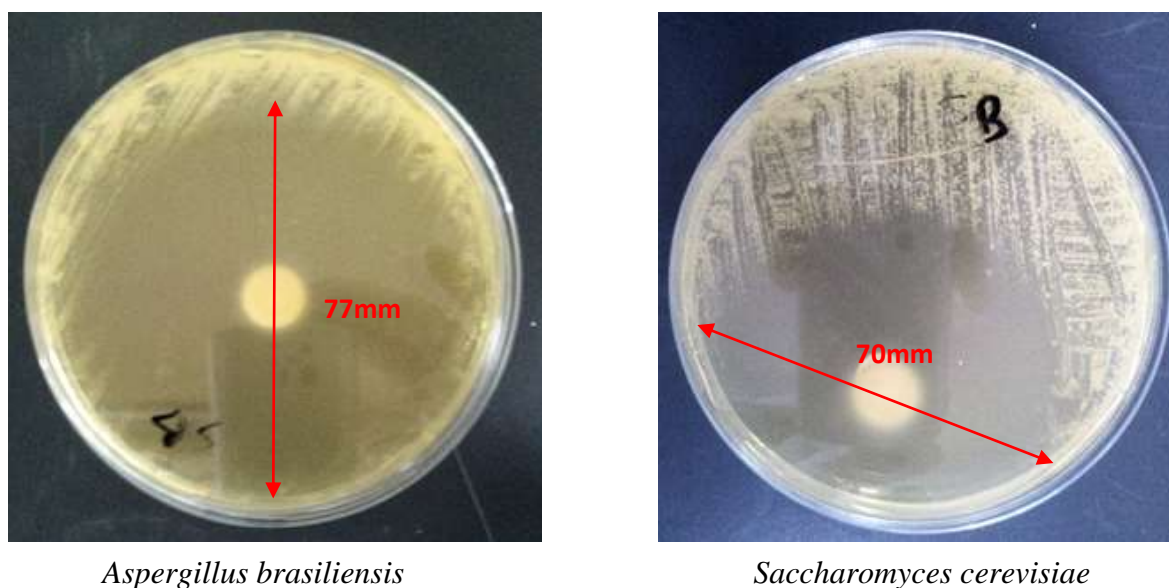
*Pseudomonas aeruginosa**Aspergillus brasiliensis**Saccharomyces cerevisiae*

Figure 12. Effet de l'HE sur la croissance des souches microbienne par l'aromatogramme.

**B. Méthode de microatmosphère**

Le tableau 4 (Annexe 4) montre que tous les microorganismes testés (bactéries, champignon et levure) présentent une sensibilité totale et complète vis-à-vis de l'HE de cette plante. Ceci implique que l'*Ammoides verticillata* possède des composés phénoliques dotés d'un grand pouvoir antiseptique. Alors, lors de l'incubation des germes et au bout d'un certain temps de latence (18h et 24h), il se produit une évaporation des substances volatils et de ce fait les colonies microbiennes situés sur l'air d'évaporation de l'essence disparaissent. Donc l'HE possède un pouvoir bactéricide et fongicide.

**1.6.2.1 Détermination de la concentration minimale d'inhibition (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) par Méthode de contact direct**

Des tests de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) ont été réalisés afin de préciser le caractère bactériostatique ou bactéricide de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata*.

Les résultats des CMI d'huile essentielle sur les bactéries sont rapportés dans le **Tableau 7**.

**Tableau 6.** Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata*.

Souches microbiennes	Témoins	Dilutions					
		SM	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	+	+	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	-	-	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	+	-	-	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-	-	+	+	+	+

+ : croissance microbienne ; - : pas de croissance microbienne.

Les valeurs de CMI obtenus, ont montré que l'huile essentielle possède pouvoir inhibiteur important sur les bactéries (gram+ et gram-), sur le champignon (*Aspergillus brasiliensis*) et sur la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) avec des CMIs de 10<sup>-1</sup>, sauf la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est inhibée avec une CMI inférieur à celle les autres microorganismes.

Les observations effectuées sur la croissance microbienne testées à différentes concentrations de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* sont représentées dans (**Annexe 5**).

Les valeurs de CMI et de CMB sont respectivement égales pour toutes les souches testées (**Tableau 6**) et **Tableau 5 (Annexe 6)**.

Le rapport CMB/CMI permet de définir le caractère bactériostatique ou bactéricide d'une huile essentielle. Lorsque ce rapport est inférieur à 4, l'huile est considérée comme bactéricide.

Les rapports CMB/CMI de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* sont égaux à 1.

L'huile essentielle de la plante étudiée semble donc exercer à la fois une action bactériostatique et une action bactéricide contre les bactéries Grams+ et les bactéries Grams -, le champignon (*Aspergillus brasiliensis*) et la levure (*Saccharomyces cerevisiae*).

## Conclusion

L'idée directrice de notre étude a consisté à extraire l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* dite Nounkha provenant de la région de Terny (Wilaya de Tlemcen), à déterminer ses propriétés physicochimiques, à évaluer *in vitro* ses propriétés antimicrobiennes vis-à-vis de différentes espèces microbiennes, ainsi que son activité antioxydante.

L'hydrodistillation, méthode de choix pour l'extraction des huiles essentielles nous a permis de montrer que la plante Nounkha est trais riche en HE. Le rendement estimé est de 3%.

L'examen phytochimique réalisé sur la partie aérienne d'*Ammoides verticillata* a révélé la présence des compos chimiques surtout les flavonoïdes et les tannins.

L'étude toxicologique sur les souris (*Mus musculus*) a montré que l'extrait d'*Ammoides verticillata* n'est pas toxique à des doses allant de 5000 à 50000 mg/kg de poids corporel.

Les testes d'activité biologique, réalisé *in vitro*, ont permis d'évaluer la présence des zones d'inhibitions importantes indiquant que HE. a une activité biologique sur tous les microorganismes testés. Ces expériences révèlent une grande sensibilité du champignon *Aspergillus brasiliensis* et la levure *Saccharomyces cerevisiae* vis-à-vis de l'HE par rapport aux autres germes testés.

Les tests de CMI et CMB ont dévoilé que l'HE possède à la fois un effet bactériostatique et un effet bactéricide (la relation CMB/CMI= 1).

Et enfin on conclut que cette espèce végétale n'a pas fait l'objet de beaucoup d'études, pour cette raison, il sera intéressant de se focaliser sur l'étude de la variabilité de la composition chimique par l'application conjointe des techniques chromatographiques (CCM, CLHP et CG/MS) et des méthodes spectroscopiques en tenant compte l'âge de la plante, de la période et du lieu de récolte, etc...

Ceci va permettre d'observer les différents changements sur les plans qualitatifs et quantitatifs des HE afin d'estimer à quelles conditions ou à quelle période ces huiles essentielles pourraient avoir une activité intéressante.

## Références bibliographiques

- Abdelouahid, D.E., Bekhchi, C., Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* (Núnkha). Rev, Biologie et santé, 2004, p.1-10
- Avesina, A., Law in medicine. A Sharafkandi, translator, vol. 2, second ed. Soroush Press, Teheran, 1985, 187.
- Baytopet T., Sitiupinar N., Characteristics of Nanahan cultivated in Anatolia an dits volatile oil. J. Fac. Pharm. Istanbul, 1986, 22: p.73-76
- Belouad, A. étymologie des noms de plantes du bassin méditerranéen. Ed. OPU, Alger, 1998.
- Benoit B. (2012) -Nomenclature de la flore de la France. Rev Tela Botanica BDNFF v 4.02.
- Benoît B. et *al.*, Référentiel des trachéophytes de France métropolitaine version 3.02, 26 janvier 2016
- Benoît B., Nomenclature de la Flore de France, Rev. Tela Botanica BDNFF v4.02, 2011
- Burt S, 2004.Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods review. Int J Food Microbiol, 94, 223-253.
- Chériti A., Rouissat A., Sekkoum K., Balansard G., Plantes de la Pharmacopée traditionnelle dans la région d'El Bayadh (Algérie). Fitoterapia (6), 1995, p.66-528
- Coste H., Flahault C. Flore Description et illustrée de la France de la Corse et des contrées limitrophes, Tome II, Paris, Librairie scientifique et technique, 1998
- Daine, E.A.et Moustefai, M. (1998), Contribution à l'étude du pouvoir antimicrobien de l'HE d'*Ammoïdes verticillata* (Nounkha) de la région de Tlemcen et comparaison avec l'effet antiseptique du thymol et des antibiotiques. Mémoire d'ingénieur d'état, Université Aboubakr belkaid Tlemcene, Département de biologie.
- Dashti-Rahmatabadi, M. H., Hejazian S. H., Morshedi A., Rafati A., Journal of Ethnopharmacology, 2007, 109,226.
- Denissew, S. A., J. Essent. Oil Res., Sept/Oct. 1993, 5, 466.
- El Ouariachi E., Tomi P., Bouyanzer A., Hammouti B., Desjobert J –M., Costa J., Paolini J., Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotis verticillata* from Morocco.Rev, Food and Chemical Toxicology 49, 2011, p.533–536
- Felidj M., Bouazza M., Ferouani T., Note sur le cortège floristique et l'intérêt de la plante médicinale *Ammoïdes pussila*(*verticillata*) dans le Parc national des Monts de Tlemcen (Algérie occidentale), Geo-Eco-Trop., 2010, 34 : p.147-154
- Fellah M, Romdhane MA. 2006. Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis*.L cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. Journal de la société algérienne de chimie, 16(2), 193-202.
- Getahum, A., « Some common medicinal and poisonons plants used in Ethiopian folk medicine », Addis Ababa University, 1976.

- Gherib A., Travaux pratiques de chimie thérapeutique diagnose des médicaments, Office des publications universitaires, 1988, 105
- Gilani, A.H., Jabeen, Q. , Ghayur, M.N. , Janbaz, K.H. , Akhtar, M.S., Journal of Ethnopharmacology, 2005, 98, 127.
- Gilani, A.H., Shah, A.J., Ghyur, M.N., Majeed, K., Pharmacological basis for the use of turmeric in gastrointestinal and espiratory disorders. Life Science 76, 3089-3105. 2005.
- Guerin-Fauble V., Carret G., L'antibiogramme, principes, méthodologie, intérêt et limites, Journées Nationales GTV- INRA, 1999, p.5-12
- Hanato T, Edamatsu R, Hiramatsu R, Mori A, Fugita Y, Yasuhara T. 1989 Effect of the interaction of tannin with co-existing substances VI. Effect of tannins and related polyohhcnols on superoxidc anion radical. Chem Pharm.Bull, 37, 2016-2021.
- Harborne JB, 1983. Phytochemical Methods. Chapman and Hall, London, 288.
- Jansen, P.C.M., « Spices condiments and medicinal plants in Ethiopia, their taxonomy and agricultural significance », Centre for Agri.Pubbl. and documentation, Wageningen, 1981.
- Kambouche N. & El-Abed D. (2003). Composition of the volatile oil from the aerial parts of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague from Oran (Algeria). Journal of Essential Oil Research, 15: 10-11.
- Kambouche, N., El Abed, D., «Composition of the volatile oil from the aerial parts of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague from Oran (Algeria) », J.Essent. oil.Res., Janvier / Février 2003, 15, 39.
- Karber C, Brehrens B. 1935. Wiesind Reihenversuche fur biologische Auswertungen am Zweckmässigsten Anzuordnen. Arch Exp Path Pharm, 177, 379-388.
- Khajeh, M., Yamini, Y., Sefidkon, F., Bahramifar, N., Food Chemistry, 2004, 86, 587.
- Ljubuncic P., Song H., Cogan U. and Azaizeh H. B. A., The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *pistacia lentiscus* in experimental liver disease, Journal of ethnopharmacology, 2005, p.198-204
- Mahmoudi, Y., «Les plantes médicinales dans le jardin prophétique », Palais du livre, Algérie, 1990.
- Merad R. (1973). Contribution à l'étude qualitative et quantitative de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* (Nounkha) de la région de Tlemcen et de son pouvoir antimicrobien. Mémoire d'Ingériorat, Institut de Biologie, Université de Tlemcen.
- Mohagheghzadeh, A., Faridi, P., Ghasemi, Y., Food Chemistry, 2007, 100, 1217.
- Pan, Y., Wang, K., Huang, S., Wang, H., Mu, X., He, C., Ji, X., Zhang, J., Huang, F., Antioxydantactivity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel, Food Chemistry, 2008, Vol.106; pp 1264-1270
- Pauli A. 2006. "Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils." Medicinal Research Reviews, 26, 223-268.

Annexe 1



Balance analytique



Écouvillon



Disques de Papier wattman



Bec bunsen



Autoclave



Spectrophotomètre UV-visible



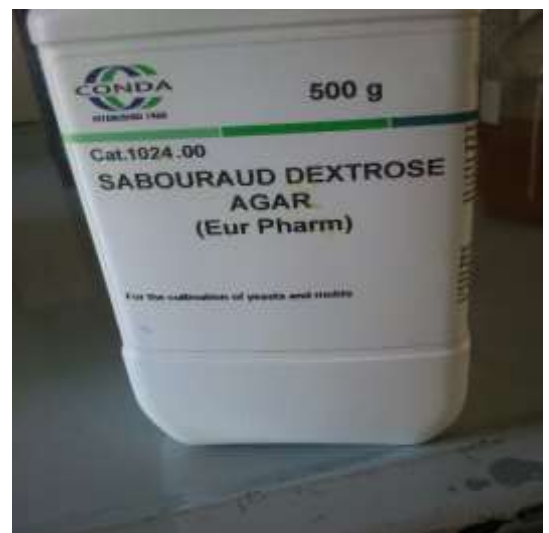
Bain marie



Papiers filtres de type wattman



Boîtes de pétri



Milieu SDA.



Milieu STA

**Figure 1 : Matériel non biologique****Tableau 1 : Matériel non biologique**

<b>Verreries</b>	<b>Appareils</b>	<b>Milieu de culture et réactifs</b>
Ballon	Agitateur	DPPH
Flacons	Balance analytique	Vitamine C
Entonnoir	Bec bunsen	STA
Béchers	Etuve	SDA
Burette	Clevenger	Eau distillé
Tubes é essai	Chauffe ballon	Eau de javel
Boites de pétri	Spectrophotomètre (UV-visible)	Tween 80
Seringue fiolle		Méthanol



## Annexe 2

Tableau 2 : Souches microbiennes testées.

	Souches bactériennes	Références
Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8759
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
	<b>Champignon</b>	<b>Référence</b>
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404
	<b>Levure</b>	<b>Référence</b>
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763

## Principales caractéristiques des souches testées

- *Bacillus subtilis*

C'est un bacille à Gram positif de la famille des Bacillaceae, mobile, aérobic strict. Il vit sur divers substrats organiques (les poussières, le sol, le lait, l'eau, ... et les plantes sèches). Il appartient au genre *Bacillus*. Il n'est pas considéré comme pathogène pour l'homme, mais il peut contaminer des aliments et peut exceptionnellement provoquer des intoxications alimentaires (Michiko et al., 1998).

- *Escherichia coli*

*Escherichia coli* est un bacille mobile à Gram négatif qui appartient à la famille des Enterobacteriaceae. C'est un hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'homme. C'est un germe le plus fréquemment responsable d'infections urinaires. Cette bactérie est aussi à l'origine de septicémies, de méningites chez le nourrisson ainsi que de manifestations intestinales telles que les diarrhées (Evans, et al., 2007).

- *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas* est un genre bactérien composé de bacilles mobiles, à Gram négatif, aérobies stricts. Il comporte un nombre important d'espèces. L'espèce la plus fréquemment responsable d'infections humaines est *Pseudomonas aeruginosa* ou bacille pyocyanique. L'une de ses caractéristiques principales est la production d'un pigment bleu ou pyocyanine. C'est une bactérie très répandue dans la nature. Elle vit normalement à l'état saprophyte dans

---

l'eau et le sol ou sur les végétaux. Elle fait partie de la flore commensale de l'homme. Elle est responsable de redoutables infections hospitalières ou nosocomiales surtout chez les malades affaiblis aux défenses diminuées ou ayant une affection sévère (cancer, diabète, brûlures,...) (Meyer, et al., 1993).

- ***Staphylococcus***

Le genre *Staphylococcus* est une coque à Gram positif appartenant à la famille des *Staphylococcus* immobiles, caractérisés par leurs groupements rappelant celui des grains d'une grappe de raisins. C'est un germe ubiquitaire, retrouvé dans le sol, l'air et l'eau. Il est aussi un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme. Il est retrouvé chez 15 à 30% des individus sains au niveau de leurs fosses nasales. *Staphylococcus aureus* possède un pouvoir pathogène. Il est susceptible de sécréter différentes toxines et des enzymes qui entraînent des liaisons suppuratives et nécrotiques (Singh, et al., 2007). Aussi *Staphylococcus epidermidis* est un agent de plus en plus fréquent d'infections nosocomiales (Botton, 1990).

Annexe 3



Figure 2 : Souris *Mus musculus*.



Figure 3 : Huile essentielle d'*Ammoides verticillata*.

## Annexe 4

Tableau 3. Diamètres des zones d'inhibition des microorganismes testés.

	Souches microbiennes	Diamètres des zones d'inhibition (en mm)	Sensibilité
Bactérie de Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	50	Très sensible
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	50	Très sensible
	<i>Bacillus subtilis</i>	52	Très sensible
Bactérie de Gram -	<i>Escherichia coli</i>	20	Assez sensible
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	Très sensible
Champignon	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	77	Très sensible
Levure	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	70	Très sensible

Tableau 4 : Effet antimicrobienne de la phase volatile des huiles essentielles sur les microorganismes testés.

	Souches microbiennes	Sensibilité
Bactérie de Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	-
Bactérie de Gram -	<i>Escherichia coli</i>	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Champignon	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	-
Levure	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-

(-) : absence totale.

**Tableau 5.** Les concentrations minimales bactéricides (CMB) pour l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata*.

Souches microbiennes	Témoins	Dilutions					
		SM	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	+	+	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	-	-	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	+	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-	-	+	+	+	+

+ : croissance microbienne ; - : pas de croissance microbienne.