



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère 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 de Population et des Organismes

Mémoire de fin d'études

**En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences de la nature et de la
Vie**

Spécialité : Phytothérapie et Santé

Thème :

**Evaluation de quelques activités biologiques de l'huile
essentielle et extrait aqueux d'*Ammoides verticillata* récoltée
dans la région de Tlemcen**

Soutenu le 29 juin 2016

Présenté par :

ASEKENYE Caroline

Devant le jury :

Mme TOUABIA M.MAA/BPO - USDB Président

Mme BENSALA N.MAA/BPO - USDB Examinatrice

Mme BENMANSOUR N.MAA/BPO - USDB Promotrice

Mme AYACHI K.MAA/ PHAR - USDB Co-Promotrice

2015/2016

Remerciement

Tout d'abord je remercie Dieu qui nous a donné la grâce en nous permettant d'achever des choses quoique ce soit.

Ce travail est le fruit d'un travail d'équipe où chaque spécialiste d'un domaine particulier a amendé la partie qui était de sa compétence et a ainsi permis de donner une certaine unité et cohérence à ce travail.

Je tiens à remercier sincèrement :

- *Mme Benmansseur N. et Mme Ayachi K. pour m'encadrer, m'orienter, ma conseiller tout au long de ce travail.*
 - *Les équipes de Centre de Recherche CRD-Saidal (El Harrache), du laboratoire d'hygiène (Blida), du laboratoire d'hôpital Fabor (Blida) et du laboratoire de chimie d'Ecole Nationale Supérieur Agronomique (El Harrache) pour leurs contribution à élaborer la partie expérimentale de ce travail.*
 - *Les enseignants qui nous ont donné les bases de la science, durant les cinq années scolaires.*
 - *Les membres de jury d'avoir bien voulu accepter de faire partie de la commission d'examineur.*
 - *Toute personne qui a participé de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.*
 - ❖ *Mercie encore une fois.*

Liste des tableaux

Tableau I : Classification systématique de <i>l'Ammoidesverticillata</i>	4
Tableau II : Synonymes des noms latin de <i>l'Ammoidesverticillata</i>	5
Tableau III Pourcentages des constituants de l'HE d' <i>Ammoidesverticillata</i> de différents pays.....	7
Tableau IV: Enquête thérapeutique d' <i>Ammoidesverticillata</i>	10
Tableau V: Situation géographique de la région de récolte	12
Tableau VI: Les souches microbiennes testées.....	13
Tableau VII : Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition (DI).....	20
Tableau VIII : Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle d' <i>Ammoidesverticillata</i> de la région de Terny.....	23
Tableau IX: Résultats des tests phytochimiques de la partie aérienne <i>Ammoidesverticillata</i>	26
Tableau X : Les diamètres des zones d'inhibition des souches microbiennes testés vis-à-vis d'HE de <i>l'Ammoidesverticillata</i>	31
Tableau XI : Valeurs des Absorbance (Densité Optique) de substances testées.....	Annexe 3
Tableau XII : Résultats du lot témoin négative/ contrôle(eauphysiologique).....	Annexe 6
Tableau XIII : Résultats du témoin positive/ d'essai de référence (Indométacine)...	Annexe 6
Tableau XIV : Résultats de l'essai (extrait aqueux d' <i>Ammoidesverticillata</i>).....	Annexe 6
Tableau XV : Les % de l'œdème et % de leur réduction de substances testés.....	Annexe 6
Tableau XVI : Généralités sur des souches microbiennes testées.....	Annexe 7
Tableau XVII: L'antibiogramme des souches bactérienne clinique testées : (Registre du laboratoire d'hôpital de Fabor –Blida, 2016)	Annexe 7
Tableau XIII : Liste des abréviations Antibiotique.....	Annexe 7
Tableau XIX : Le matériel non biologique.....	Annexe 11

Liste des figures

- Figure 1** :Influence du poids d'*Ammoides verticillata* sur le rendement en huiles essentielles durant 3H d'extraction selon la méthode Clevenger.....24
- Figure 2**:Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de la vitamine C et de l'extrait de *d'Ammoides verticillata*29
- Figure 3** : IC50 de l'extrait aqueux et de la vitamine C.....30
- Figure 4** :Sensibilité des microbiennes testés vis-à-vis l'huile essentielle de l'*Ammoides verticillata*.....32
- Figure 5** :Evaluation de l'effet anti-inflammatoire (réduction de l'œdème) de substances testées.....37
- Figure 6** :Lecture de la diamètre de la zone d'inhibition d'HE sur l'inoculum.....Annexe 10

Liste des Photos

Photo 1 : Photo de la plante <i>Ammoidesverticillata</i>	3
Photo 2 : Carte géographie de station Terny.....	12
Photo 4 : Photo original(2016) de la plante sèche en bouquet.....	14
Photo 5 : Dispositif d'extraction d'HE de <i>l'Ammoidesverticillata</i>	15
Photo 6 : Tubes d'essai de l'activité antioxydant après 30 minutes dans l'obscurité.....	18
Photo 7 : Diamètres des zones d'inhibition des souches microbiennes par l'huile essentielle de <i>l'Ammoidesverticillata</i>	35
Photo 8 : Matériel animal (souris) utilisé pour l'évaluation de l'activité antiinflammatoire.....	Annexe 5
Photo 9 : Sonde gavage orale de substances testés.....	Annexe 5
Photo 10 : Injection de la solution de carragénine sous l'aponévrose plantaire (intra-plantaire) de la patte arrière gauche d'une souris.....	Annexe 5
Photo 11 : Les pattes gauches et droite des souris de lots reçoivent les substances testés ..	Annexe 5

➤ **Terme médicaux :**

Anti fongique : Détruit les champignons

Antihistaminique : Qui s'oppose aux effets de l'histamine. S'emploie aussi comme substantif. Les antihistaminiques sont utilisés dans le traitement des allergies.

Anti-inflammatoire : Qui s'oppose à la formation ou réduit les gonflements (œdème) et les soulage.

Antimicrobienne : Détruit les microbiennes

Antioxydant : Préviend l'oxydation et altération des tissus

Antiseptique : Qui se rapporte à l'antisepsie. S'utilise aussi comme substantif, ou qui détruit les germes pathogènes, notamment par application externe (s'emploie aussi comme substantif).

Antispasmodique : Qui prévient ou qui combat les spasmes et les convulsions.

Cataplasme : Préparation de consistance d'une bouillie, que l'on appliquait, entre deux lignes, sur une partie du corps pour combattre une inflammation.

Fébrifuge : Fait baisser la fièvre.

Huile essentielle : Liquide obtenue par distillation de substances aromatique de certaines plantes.

Infusion : Préparation des parties de la plante macérée dans l'eau bouillante.

Inhalation : Action de respirer par le nez la vapeur produite par une préparation médicinale bouillante.

Non Stéroïde : Substance chimique d'origine animale ou végétale n'ayant une puissante action hormonale.

Œdème : Rétention de liquide

Photosensible : Sensible aux rayons du soleil

Sédatives : Qui apaise la douleur, qui calme.

Stéroïdes : Substance chimique d'origine végétale ou animale ayant une puissante action hormonale.

Terpènes : Molécules souvent présent dans la composition des huiles essentielles

Vasoconstricteur : Réduit le calibre des vaisseaux sanguins.

Vasodilatateur : Augmente le calibre des vaisseaux sanguins

Vasodilatation : Augment le calibre des vaisseaux sanguins

➤ **Termes botanique :**

Akène : Fruit sec à une seule graine et qui ne s'ouvre pas à maturité, ex : la noisette.

Alterne : Qualifie les organes de part et d'autre de la tige ou d'un rameau quand ils ne sont pas en face les uns des autres.

Annuelle : Désignant une plante qui ne vit qu'une saison.

Aromatique : Se dit une plante odorante, à huile essentielle souvent.

Bisannuelle : adjectif désignant une plante vivant pendant deux saisons successives. En général, une plante bisannuelle donne des feuilles en

Endémique : adjectif, qualifie une espèce dont l'aire de répartition est limitée à une région donnée

Essence : Extrait concentré de certaines substances aromatique ou alimentaires obtenue par distillation.

Feuille : organe essentiel d'une plante pour la photosynthèse, la feuille se compose le plus souvent d'un limbe et d'un pétiole

Fleur : organe reproducteur de la plante

Fruit : organe de la plante composé des graines et de leur enveloppe.

Graine : ovule fécondé qui, après dispersion et germination, donne de nouvelles plantes.

Grappe : Inflorescence formée d'un axe portant des fleurs pédicelles, s'épanouissant successivement de la base au sommet.

Herbacé : se dit d'une plante d'une plante non ligneuse (dont la tige n'a pas la consistance du bois), le terme de *plantes herbacées* désignant

Inflorescence : Mode de disposition de la fleur

Ligneux : se dit d'une plante dont la tige a la consistance du bois, grâce à la lignine qu'elle contient.

Ombelle : Inflorescence formée de fleurs pratiquement toutes dans le même plan et portée par des pédicelles partant du même point.

Opposé : Se dit de deux organes insérés en face l'un de l'autre à la même hauteur.

Parties aériennes : Parties d'une plante situées au-dessus du sol

Pivotante : se dit d'une racine très grosse par rapport aux racelles et s'enfonçant verticalement dans le sol pour sa part des plantes non ligneuses dont la partie aérienne meurt après la fructification rosette la première année et fleurit la seconde année.

Spontanée : se dit d'une plante poussant naturellement dans la région où on la rencontre.

Tige : Partie aérienne des végétaux supérieurs, qui porte les feuilles.

Verticille : Ensemble des organes disposés en cercle au même niveau autour d'un axe.

Sommaire

Remerciements	i
Résumé (français)	ii
Abstract (Anglais)	iii
Liste de tableaux	iv
Liste des figures	v
Liste des photos	vi
Introduction générale	1
Chapitre I- Synthèse bibliographique	
A- Généralité sur l'<i>Ammoides verticillata</i>	3
A-1-Description de l' <i>Ammoides verticillata</i>	3
A-2-Systématique de l' <i>Ammoides verticillata</i>	4
A-3-Répartition de l' <i>Ammoides verticillata</i>	6
A-4-Composition chimique de l' <i>Ammoides verticillata</i>	6
A-5-Propriétés et Utilisation de l' <i>Ammoides verticillata</i>	8
Chapitre II-Etude expérimentale	
A-Matériel et Méthodes	11
A-1-Matériel utilisés	11
A-1-1-Matériel non biologique	11
A-1-2-Matériel biologique	11
A-2-Méthodes d'étude expérimentale	14
A-2-1-Traitement de l' <i>Ammoides verticillata</i>	14
A-2-2-Screening phytochimique	16
A-2-3-Evaluation de quelques activités biologiques	17
B-Résultats et Discussion	
B-1-Traitement de l' <i>Ammoides verticillata</i>	23
B-2-Screening phytochimique	25
B-3-Evaluation de quelques activités biologiques	
Conclusion générale et Perspective	
Références bibliographique	
Annexe	

Résumé

Ce travail vise l'étude des activités biologiques (activité microbienne, activité antioxydant et activité antiinflammatoire) des extraits aqueux et de l'huile essentielle d'*Ammoidesverticillata* provenant de la station de Terny -Tlemcen longée par la route national, récoltée pendant le mois de Mars 2016.

Notre travail porte sur l'extraction de l'huile essentielle d'*Ammoidesverticillata* ou *Nounkha*. L'essence étudiée a été isolée par hydrodistillation avec un rendement qui atteint 1.6%.

L'examen phytochimique réalisé sur la partie aérienne *Ammoidesverticillata* a révélé la présence de cinq composés chimiques : les flavonoïdes, les tannins ; les tannins galliques, les tannins catéchiques et les coumarines.

L'extrait aqueux de l'*Ammoidesverticillata* pouvait ramener le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) au diphenylpicrylhydrazine jaune-coloré avec un IC50 de 0.020mg/ml. Il se montre doué avec une activité antioxydant, cependant elle est moins efficace que celle de la vitamine C (0.001mg/ml).

L'huile essentielle de l'*Ammoidesverticillata* présente une forte action antimicrobienne contre les germes-cibles gram- d'origine clinique : *E. coli* (BLSE) (37mm), *E. coli* (39,5 mm) et *Klebsiellapneumoniae* (36.5mm) et surtout vis-à-vis des levures : *Candida albicans* ATCC 10231 (47mm) et *Saccharomyces cerevisie* ATCC 9763 (42 mm) qui se montrent fortement sensibles vis-à-vis de l'action inhibitrice de l'huile essentielle. Cependant l'huile se montre avec une activité moins importante vis-à-vis de la bactérie *P. aeruginosa* (12,5 mm).

L'évaluation de l'activité antiinflammatoire, a montré que l'extrait aqueux de l'*Ammoidesverticillata* (0.5ml) peut induire un taux de réduction d'œdème jusqu'à 50,07 %. Il possède un pouvoir anti-inflammatoire, bien que ce taux soit supérieur à celui du produit de référence (Indométacine) (40,06%).

Mots clés : l'*Ammoidesverticillata*, huiles essentielles, extraits aqueux, et quelques activités biologiques.

Abstract:

This work is on the study of biological activities (microbial activity, antioxidant activity and ant inflammation activity) of aqueous extracts and essential oil of *Ammoidesverticilla*, from the station of Terny -Tlemcen, harvested during the month de march 2016.

Our work is on the extraction of essential oil of *Ammoidesverticillata* or Nounkha. The essence studied has been extracted par hydro-distillation with a yield of 1.6%

The phytochemical exam realized on the aerial parts has shown the presence of five chemical components: the flavonoids, the tannins, the gallic tannins, the catechuic tannins, and the coumarins.

The extract aqueous could bring the stable free radical 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) to diphenylpicrylhydrazine, yellow color with IC₅₀ of 0.020mg/ml. It shows itself with an antioxidant activity, however, it is less efficace than that of vitamin C (0.001mg/ml)

The essential oils of *Ammoidesverticillata* presents a strong antibacterial action against gram – and gram + targeted germs of clinical origin: *E. coli* (BLSE) (37mm), *E. coli* (39.5mm) and *Klebsiellapneumonia* (36.5mm). However, this action is mostly against the yeasts germs of reference: *Candida albicans* (ATCC 10231 (47mm) and *Saccharomycescerevisie* ATCC 9763 (42mm) that has been strongly inhibited by the essential oil. However, the oil shows a less activity against the bacteria *P. aeruginosa* (12.5mm).

The evaluation of the ant inflammation activity has shown that the aqueous extract of *Ammoidesverticillata* (0.5ml) can reduce the edema by 50.07%. It possess an intiinflammation power, even greater than that of the product of reference (Indometacine) (40.06%).

Key word: *Ammoidesverticillata*, essential oil, aqueous extract and some biological activities

Introduction générale

De par leur composition chimique, les plantes aromatique 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 différent principes actifs qu'elles contiennent : alcaloïdes, flavonoïdes, tannins, saponosides et huiles essentielles. Elles constituent un réservoir inépuisable de remèdes populaires des plus efficaces et une source naturelle de médicaments les plus utiles. **(Beloued (2001) et Valnet(1998).**

Il existe nombreuse maladies contre lesquels les antibiotiques de synthèse deviennent de moins en moins efficaces. Aussi, l'utilisation fréquente d'antibiotiques entraine chez certains sujets des infections secondaires (Salmonellose, gastroentérite, etc.)**(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. L'intérêt des scientifiques font objet d'étude active dans le monde pour leur emploi possible pour la préservation des aliments contre l'oxydation comme remèdes contre les infections.

La famille des Apiaceae est l'une des familles les plus riches en huiles essentielles. Elle comprend des légumes (Carotte, fenouil, cèleri,,) 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 microbienne.

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

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

- Le test screening chimique de l'extrait aqueux de la partie aérienne.
- L'évaluation de l'activité antiinflammatoire *in vivo* de l'extrait aqueux
- L'évaluation de l'activité antioxydant d'extrait aqueux vis-à-vis des radicaux libres en utilisant la méthode de DPPH ;
- L'extraction des huiles essentielles
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro* de l'huile essentielle

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

- Le premier chapitre aborde la synthèse bibliographique qui regroupe :
 - A-La généralité sur l'*Ammoidesverticillata*
 - B-Les activités biologiques
- Le second chapitre définit l'étude expérimentale qui inclut :
 - A-Matériel et méthode
 - B-Résultats et Discussion

A-1-Description botanique de l'*Ammoidesverticillata*

Ammoidesverticillata(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. (Benoit et Bock, 2016).



Photo 1 : Photo de la plante *Ammoidesverticillata*(Vincent Lejeune, 2009)

Ses fleurs sont en inflorescence de couleur blanche sont regroupées en petite ombelles, composées de 8 à 15 rayons capillaires très inégaux. (Benoit et Bock, 2016). 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. Recouvert de poils épais. Ses grains petits, ovales, striées, courbées et gris-vert. Ses racines sont aussi grêles et pivotantes. Les grains une fois mûres sont récoltés, séchés et battus.

Ammoidesverticillata est une plante très odorante, elle est fortement aromatique et piquante, son odeur (semble authymol) est très agréable mais très diffusible et intense ; fortement balsamique, persistante même après la dessiccation (Benoit et Bock, 2016). Elle est odeur est caractéristique du thymol et un goût qui rappelle beaucoup celui du thym.

A-2-Systématique de la plante

Ammoidesverticillata appartient à la famille des Apiacées. C'est une famille trèsabondante elle comprend plus de 3000 espèces avec 55genres représentés en Algérie.Le genre Ammoides comprend deux espèces :*Ammoidesverticillata*(plante annuelle) et *Ammoidesatlantica*(plante bisannuelle)D'après **Benoit et al., (2016)** l'*Ammoidesverticillata*aété classée suivant le **tableau I** :

Tableau I : Classification systématique de l'*Ammoidesverticillata*. (**Benoit et al., 2016**)

Cladus	Plantae
Cadus	Plasmodesmophytes
Cladus	Embryophytes
Cladus	Stomatophytes
Cladus	Hemitracheophytes
Cladus	Tracheophytes
Cladus	Euphyllophytes
Cladus	Spermatophytes
Cladus	Angiospermes
Cladus	Dicotylédones Vraies
Cladus	Dicotyledones vraies superieures
Cladus	Asteriodes
Cladus	Campanulides
Ordre	Apiales
Famille	Apiacées
Genre	Ammoides
Espèce	<i>Ammoidesverticillata</i>

Certains chercheurs botaniques ont donnés les noms différents en latin (Basionymes) pour cette plante. Elles sont regroupées dans le **tableau II**.

Tableau II : Basionymes de l'*Ammoides verticillata* (Desf.) Briq. (**Benoit et al., 2016**).

<i>Ammoides pusilla</i> (Brot.) B reistr.
<i>Seseli verticillata</i> Desf.
<i>Seseli ammoides</i> L.
<i>Carum ammoides</i> (L.) Ball
<i>Petroselinum ammoides</i> (L.) Rchb.f.
<i>Ptychotis ammoides</i> (L.) W.D.J. Kocck
<i>Apium ammios</i> (Caruel)
<i>Seseli corsicum</i> (Link)
<i>Ptychitis verticillata</i> (Duby)
<i>Corum ammoides</i> (L.) Benth. et Hook. f. ex Arcang.

La plante est assez rare mais elle est aussi endémique dans certaines différentes régions dont elle est appelée par des noms vernaculaires ou vulgaires propres à chaque région.

- En Arabe (Algérie) : Nounkha/ Nûnkha, Ajowan/Ajawain/Ajwan (**Merrad, 1973**), Nanoukha (Trabut, 1935), Taleb El Koubs (**Abdelouahid, 2004**).

- Au Maroc : Nunkha (**Sijelmassi, 1991**).

- En France : Ajowan (**Wehmer, 1931 et Afnor, 1992**), Faux Ammi Fuet, Cerfeuil.

- En Angleterre : carom seed, False Parsely, Cerfolium.

- En Inde : Kamun al-muluki, Nakhwah, Nahwah, thym des Indes.

- En Allemagne : Adiowan, cumin éthiopien.

- En Espagne : Ammoides, Tarraguillo.

La plante *Ammoides verticillata* appelée populairement *Nounkha*. Elle tire son origine de la déformation du nom perse « Nankhah » qui provient de son utilisation en Iran comme arôme dans le pain (Nan et Khah signifiant respectivement pain et goût. (**Seddik, 2010**).

A-3-Répartition géographique.

A-3-1-Répartition dans le monde :

Dans le monde, on peut la trouver 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 principaux cultivateurs sont les Indous et les Perse pour son pouvoir remarquable antimicrobien (**Bekhechi et Abdelouahid, 2004**).

A-3-2-Répartition en Algérie :

C'est une espèce Algérienne endémique. D'après Quezel et Santa, l'*Ammoidesverticillata* est une plante médicinale Algérienne poussant dans la région de Tlemcen (Nord d'Ouest d'Algérie) et dans la région d'Adrar (Sud d'Ouest d'Algérie). Selon **Dahmani (1997), Bouzza et al (2001) et Ayach (2007)** ces régions sont caractérisées par des sols calcaires. La plante est abondante dans les champs, les pelouses ou dans les forêts et/ ou sur les altitudes montagneuse d'environ 1190m d'hauteur.

A-4-Composition chimique

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

La composition chimique d'HE varie d'une région à l'autre. Cette variation est notée surtout pour le pourcentage des principaux constituants majoritaires (thymol, carvacrol).

Selon la littérature, l'huile essentielle d'*Ammoidesverticillata* 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..**) (**Annexe 14**).

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, ...etc.

Tableau III : Pourcentages des constituants de l'HE d'*Ammoidesverticillata* de différents pays.(Balbaa et *al.*, 1973 ;Chalva et Monguzzi, 1993 ; Berhane, 1981 ; Ishwar et *al.*, 1963 et Haskar, 1959, in Seddik, 2010)

Pays Constituants	Egypte. (Balbaa et <i>al.</i> , 1973)	Turquie (Chialva et Munguzzi, 1993)	Ethiopie (Berhane, 1981)	Inde (Ishwar et <i>al.</i> , 1963)	Inde (Ishwar et <i>al.</i> , 1963)	Algérie (Bargara et Haskar, 1959)
α - pinène	8	32	6.30	83	1.28	62
Camphène	-	t	-	23	0.31	-
β - pinène	3.30	3.31	0.51	61	0.08	16
3-carène	0.50	t	-	23	0.17	-
Myrcène	0.10	0.56	1.00	13	0.13	40
α -terpinène	-	t	10.00	-	-	-
Limonène	0.20	2.08	-	-	-	1.89
β -phellandrène	-	0.18	11.00	-	-	-
γ -terpinène	24.50	11.86	-	122	2.51	79
p-cymène	24.00	15.57	-	1.67	37.83	1.08
sabibène	-	-	-	-	-	13
terpinène4-ol	-	1.13	0.10	-	-	79
α -terpinéol	-	0.19	0.10	-	-	08
α -thujène	-	-	-	-	-	08
isothymol	-	-	-	-	-	1.20
thymol	41.00	-	-	3.80	55.70	2.96
carvarol	1.00	-	69	-	-	25
m-cymène	-	-	-	-	-	t
terpinolène	-	-	-	-	-	09
linalool	-	-	-	-	-	t
p-menth-èneilol	-	-	-	-	-	t
citronellal	-	-	-	-	-	t
méthylthymol	-	-	-	-	-	0.30
méthicarvacrol	-	-	-	-	-	0.6

A-5-Propriétés et Utilisation de l'*Ammoidesverticillata* :

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.

A-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'aromatisation 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)

A-5-2-Usage thérapeutique

La plante *Ammoidesverticillata* 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-diarrhétic, 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 *A.v.* 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 antihypertensive, antispasmodique, ... et bronchodilatateur (Gilani et al., 2005) et antihistaminique ont été mises en évidence. Aussi, Dashti-Rahmatabadi et al. ont démontré que l'extrait éthanolique des fruits de la plante a un effet analgésique sur les souris (Dashti et al., 2007)

Son huile essentielle a montré des caractéristiques *antimycotoxigénique*(**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 (**Mamoudi,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 IV**

Tableau IV : Enquête thérapeutique d'*Ammoidesverticillata*(**Felidj et al., 2010**)

Parties utilisées	Indications	Mode d'emploi
Plante entière	Fièvre	Inhalation
	Rhumes et gripes	Inhalation/infusion
	Problèmes respiratoire	citronnée
	Infections rénaux	Inhalation ou infusion
	Parasites intestinales	Infusion
	Cycles douloureux	Infusion ou poudre
	Antispasmodique	miellée
	Laxatif	Infusion
	Migraines et Sinusites	Infusion
	Boisson rafraîchissante	Infusion
Feuilles	Condiment culinaire	Sauces
		Soupes
		Conservateur d'aliment confit (antifongique)
	Abcès et Furoncles	Cataplasme
Racines	Diurétique	Décoction miellé

Introduction

Durant notre stage pratique nous avons évalué quelques activités biologiques 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 3 mois : mois de Mars jusqu'au mois de Mai 2016. Les différentes expérimentations ont été effectuées au niveau de :

- Laboratoire de substances naturelles au CRD Saidal –El Harrach (réaliser l'extraction de l'huile essentielle de la plante)
- Laboratoire de Pharmaco-toxico CRD Saidal EL Harrach (effectuer l'activité antiinflammatoire)
- Laboratoire de microbiologie. CRD Saidal EL Harrach (réaliser l'activité antimicrobienne)
- Laboratoire d'Hygiène (établissement Public de Santé) et laboratoire de microbiologie de l'Hôpital FABOR situés dans la wilaya de Blida (prélèvement et l'isolement des bactéries d'origine clinique).

L'objectif de cette étude se base sur :

- ✓ L'analyse phytochimique de l'extrait aqueux d'*Ammoides verticillata*.
- ✓ L'extraction de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* par la méthode Clevenger
- ✓ Et l'évaluation de quelques activités biologiques de la plante : activités antimicrobiennes de l'huile essentielle et activités anti-inflammatoires et anti-oxydant de l'extrait aqueux de la plante.

A-1- Matériel utilisé

A-1-1- Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé durant notre expérimentation : Verrerie, Réactifs et les appareils (annexe 11 et annexe 12)

A-1-2- Matériel biologique

A-1-2-1-Matériel végétal

Notre étude porte sur la plante d'*Ammoides verticillata*, (**photo 4**) provenant de la station de Terny située à 12km du Sud de la ville de Tlemcen longée par la route national. Cette station est située sur les hauts plateaux nord des monts de Tlemcen (**photo 3**). La plante a été authentifiée au niveau du département de botanique d'Institut National d'Agronomie.

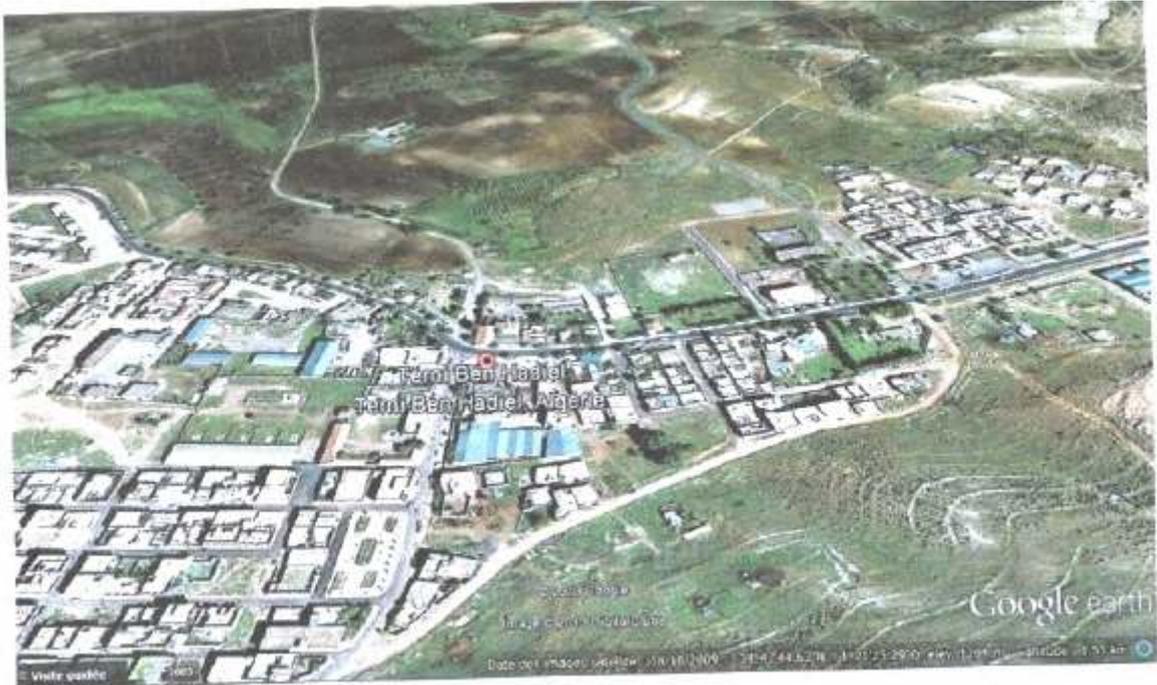


Photo 2 : Carte géographique de station Terny (Google Earth, 2014).

La situation géographique et bioclimat de la station de Terny est donnée par le tableau V.

Tableau V : Situation géographique et bioclimat de la station de terny.

Station	localisation	Bioclimat	Altitude	latitude	longitude
Terny	Monts de tlemcen	Semi-aride, tempéré doux	1055	34°,44' Est	Ouest, 1°21'

A-1-2-2-Bactéries

Afin d'étudier le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*, nous avons utilisé 02 souches de référence et des souches bactériennes d'origine clinique.

Les Souches de référence sont obtenues par le laboratoire de Microbiologie d'Institut Pasteur d'Alger, sont en tout 02souches :

Les souches bactériennes d'origine clinique sont isolées à partir de trois produits pathologiques différents(urines, pus et selles). Les prélèvements sont effectués sur des patients internes hospitalisés et des patients externes dans des différents services de l'Hôpital Fabor de la wilaya de Blida(**Tableau VI**).

Tableau VI : Souches microbiennes testés.

7 Souches bactériennes d'origine clinique.
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Streptococcus feacalis</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Escherichia coli (BLSE)</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Bacillus spp</i>
2 Souches lévuriennes de référence.
<i>Saccharomyces cerevisie</i> ATTC 9763
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231

A-1-2-3-Animaux :

Afin d'étudier l'activité anti-inflammatoire d'*Ammoides vertivillata*. Nous avons utilisé les souris issues de l'élevage de l'animalerie du laboratoire de pharmacotoxicologie du CRD SAIDAL. Ces souris présentent les caractères suivants :

- Souris Albinos de race NMRI (Naval Médical Research Institute).
- Sexe : male, femelle
- Nombre : 18
- Poids : 19g à 23g
- Alimentation : Granulés « O.N.A.B »
- 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%. (Annexe 5)(Photo 4).

A-2- Méthodes d'étude expérimentale

A-2-1-Traitement de l'*Ammoides verticillata*.

a-Récolte

Nous avons procédé à un échantillonnage subjectif. Nous sommes choisis 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 m² 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 m² durant le mois de Mars 2016.

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 (**photo 4**)



Photo 4 :Photo original(2016) de la plante *Ammoides verticillata* (sèche en bouquet).

b-Extraction d'HE de l'*Ammoides verticillata*

Dans ce travail, la méthode d'extraction utilisée est d'hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger (Clevenger, 1928). 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.

Protocole 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.

Après décantation, l'huile essentielle est récupérée 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.



Photo 5: Dispositif d'extraction d'HE par l'appareil de Clevenger.

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 traitée (Carré, 1953. In : Bekhechi, 2002).

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

$$Rd = m/m_0 \times 100$$

Avec :

Rd : rendement en H.E exprimée en pourcentage ;

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

m₀ : masse en gramme de la matière végétale sèche.

A-2-3-Screening phytochimique

But : Identification des substances bioactives contenues dans la partie aérienne de *l'Artémisia judaïca L.* basée sur les réactions colorimétriques et de précipitation par différents réactifs.

Principe :

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 louche (+), Réaction négative (-).

✓ Préparation d'extrait aqueux

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

Protocol :

La préparation de l'extrait aqueux de 10% de notre plante est réalisée par additionnement de 10g de poudre de la partie aérienne 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 minutes pour se débarrasser des débris de plantes puis filtré sur le papier filtre de type wattman N°3. Le filtrat est ensuite mis dans des petits flacons en verre (**Ljubuncic et al., 2005**).

a-Flavonoïdes :

La présence ou l'absence des flavonoïdes dans un extrait peut être mise en évidence par un test simple et rapide : test au magnésium (**Karumi et al., 2004**). On met quelques gouttes de HCl concentré (2N) et 0,5 g de Mg dans 5 ml de l'extrait méthanolique. On laisse agir 3 minutes. L'apparition de la couleur orange ou rouge indique la présence des flavonoïdes.

b-Tannins :

On mélange 1ml d'extrait aqueux de 10% avec 1ml d'eau distillée et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl₃ diluée 10 %. Le test est considéré positif par l'apparition d'une coloration

verte foncée ou bleu-vert (**Bidie et al., 2011**).

c-Tannins galéniques :

A15ml de l'infusé, ajouter 2g d'acétate de Sodium, après ajouter aussi quelques gouttes de FeCl₃ à 5%. La coloration bleue foncée indique la présence des tannins galliques.

d-Tannins catéchiques :

A15ml de l'infusé, ajouter 7ml réactif de Stiasny, la coloration rouge indique la présence des tannins catéchiques. (Voir la préparation de réactif de Stiasny dans annexe 1)

e- Quinones libres

2g de la poudre + 2ml d'acide chlorhydrique (97%) : contact pendant 3 heures dans de chloroforme ; après la filtration, ajouter d'ammoniaque 0.5.

La présence des quinones libres est montrée par la coloration rouge.

f-Coumarines :

Mettre 2g de poudre dans 20ml d'éthanol absolu. Bouillir pendant 15 minutes à reflux puis refroidir et filtrer. Ajouter 10 gouttes de KOH et quelques gouttes de HCl concentré (37%) dilué à (10%) dans 2 à 3 ml de filtrat dilué dans l'éthanol (10%) (**Bidie et al., 2011**). Le test est considéré positif par l'apparition d'une couleur rouge.

A-2-4-Evaluation de quelques activités biologiques

a-Activité antioxydant d'extrait aqueux d'*Artemisia verticillata* (in vitro)

Principe :

Pour évaluer l'activité anti-oxydante d'*Artemisia judaïca L.*, nous avons utilisé la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) selon le protocole décrit par (**Sanchez-Moreno et al., 1998**).

La capacité antioxydant est mesurée en utilisant des radicaux libres plus stables. Le radical 2, 2-diphényl-1-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 antioxydant 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 (BrandWilliams et *al.*, 1995)

Mode opératoire :

Dans des 5 tubes à essais, nous avons introduit 100 μ l de chaque dilution et 2 ml de la solution méthanoïque de DPPH. En parallèle, deux témoins sont préparés, un témoin négatif composé de 100 μ l de méthanol + 2 ml de la solution de DPPH et un témoin positif, composé de l'acide ascorbique.

✓ Préparation de dilutions :

Pour 0.1 : solution mère contenant 100 μ l d'extrait aqueux.

Pour 0.01 : nous avons prélevé 10 μ l de la solution mère à laquelle nous avons rajouté 100 μ l de solution méthanol (dilution 1).

Pour 0.001 : De la dernière, nous avons prélevé 10 μ l à laquelle nous avons rajouté 100 μ l de solution méthanol (dilution 2).

Les mêmes procédés sont suivis jusqu'àPour 0.00001 : (dilution 5) pour le témoin négatif (DPPH) et le témoin positif (Vitamine C).

Les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 min. La lecture a été effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.



Photo 6: Tubes d'essai de l'activité antioxydant après 30 minutes dans l'obscurité

La concentration d'inhibition des radicaux libre (I) exprimé en pourcentage est calculée selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition du radical (I\%)} = [\text{Abs c} - \text{Abs e} / \text{Abs}_{\text{contrôle}}] \times 100.$$

Avec :

Abs c : Absorbance du contrôle (solution de méthanol et DPPH)

Abs e : Absorbance du témoin d'échantillon (soit l'extrait soit la vitamine C)

IC50

IC50 (concentration inhibitrice de 50 %), aussi appelée EC50 (*Efficient concentration 50*), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH. Il est inversement lié à la capacité anti-oxydante.

Les IC50 sont calculées graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testées (Torres *et al.*, 2006).

b-Activité antimicrobienne d'huile essentielle de l'*Ammoides verticillata* (in vitro)

i-Préparation de l'inoculum

• l'inoculum bactérien

Une colonie bien isolée du germe à étudier est prélevée à partir d'une culture bactérienne pure en boîte de Pétri, puis introduite dans un tube à hémolyse contenant 1 ml de bouillon nutritif. A partir de la suspension obtenue, des dilutions sont faites de façon à obtenir une culture dense de densité équivalente au standard 0,5 de Mac Farland (108 UFC.ml⁻¹: la suspension contenant de 10⁶ à 10⁷ bactéries/ml).

• l'inoculum levurien

A partir d'une culture pure, on prélève une colonie bien isolée de *la levure* que l'on ensemence sur un milieu Sabouraud liquide incubé à 30°C pendant 18 h. On effectue ensuite des dilutions jusqu'à l'obtention de 10⁵ cellules/ml.

ii- Confrontation HE-Bactéries et HE-Levure

• Ensemencement par inondation

1 ml de l'inoculum bactérien ou de la levure est déposé, puis étalé sur le milieu Mueller-Hinton ou Sabouraud respectivement. On aspire l'excès du liquide puis on laisse sécher la boîte pendant 15 mn à 35°C.

• Dépôt de disques imprégnés d'HE et incubation

On dépose 1 disque stérile de papier Wattman n°3, de 6 mm de diamètre, imprégnés avec l'HE d'*Ammoides verticillata* à la surface du milieu Mueller-Hinton ou gélose Sabouraud. Les disques sont disposés de telle manière que les zones d'inhibition ne se chevauchent pas.

Les diamètres des zones d'inhibition (mm) ont été mesurés, y compris le diamètre des disques. Cette mesure est transcrite dans différents symboles proportionnels à l'activité (**tableau VII**) (Ponce *et al.*, 2003 ; Biyiti *et al.*, 2004). Tous les tests ont été effectués en triple. L'imipénème(10 µg); et la Vancomycine(30 µg)ont servi de témoins positifs.

Tableau VII: Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition (DI)

Inhibition	Transcription	Sensibilité
D<8mm	-	Résistante
9mm≥D≤14mm	+	Sensible
15mm≥D≤19mm	++	Assez sensible
D≥20mm	+++	Très sensible

c-Activité antiinflammatoire d'extrait aqueux de l'*Ammoides verticillata* (in vivo)

(Par méthode du test de Levy :)

Le principe :

Dans cet méthode, l'injection de la carragénine sous l'aponévrose plantaire (intra plantaire) de la patte gauche de la souris provoque une réaction inflammatoire donc un œdème : ce qui

engendre une différence de poids entre les pattes gauches et droites ainsi qui peut être réduit par un produit anti-inflammatoire (l'extrait aqueux de l'*Ammoides verticillate*). (Culot, 1972)

Il se base sur des étapes qu'on doit suivre pour contrôler l'activité anti-inflammatoire par voie orale du produit à tester (l'extrait aqueux de l'*Ammoides verticillata*)

Il permet de comparer la réduction de l'œdème plantaire après administration de doses égales du produit anti-inflammatoire à tester et du produit de référence correspondant - Indométacine 200mg.

Mode opératoire :

Pour réaliser ce test il faut suivre les étapes suivantes :

- La veille du test, les souris sont mises à jeun.

Il existe 3 lots des 6 souris chacun :

- ❖ Lot témoin négative / essai du contrôle : les souris reçoivent l'eau physiologique
- ❖ Lot essai d'extrait aqueux à tester : les souris reçoivent l'infusé de l'*Ammoides verticillata*
- ❖ Lot essai du référence / témoin positive : les souris reçoivent l'Indométacine

Le jour du test

Au temps T_0 :

On administre aux trois lots de souris les substances suivantes par sonde gavage (orale) :

- ❖ Lot témoin négative : chaque souris reçoit 0.5 ml d'eau physiologique.
- ❖ Lot d'essai d'extrait aqueux : chaque souris reçoit 0.5 ml du produit à tester l'infusé de l'*Ammoides verticillata* à la dose active bibliographique.
- ❖ Lot témoin positive : chaque souris reçoit 0.5 ml du produit de référence (indométacine ; 200mg) à la même dose active. (Photo 9) (Annexe 5)

Au temps $T_0 + 30$ mn :

On injecte la solution de la carragénine sous l'aponévrose plantaire (intra-plantaire de la patte arrière gauche sous un volume de 0.025 ml à tous les animaux mis en expérience. (Photo10) (Annexe 5)

Au temps $T_0 + 4$ heures :

On sacrifie les animaux par rupture de la nuque. Immédiatement, on coupe les pattes postérieures à hauteur de l'articulation et on les pèse sur une balance analytique. (Photo 11 Annexe 5)

Méthode de calcul du pourcentage de réduction des œdèmes :

- Les poids moyens de l'œdème (poids pattes gauche – poids pattes droite) sont calculés pour chaque lot.
- Le pourcentage d'augmentation des poids de la patte (% œdème) est calculé par la formule suivante :

$$\%d'œdème = \frac{\text{Moyenne des poids de la patte gauche} - \text{moyenne des poids de la patte droite}}{\text{Moyenne des poids de la patte droite}} \times 100$$

- Le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport en témoins est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = \frac{\% \text{ de l'œdème témoin} - \% \text{ de l'œdème essai}}{\% \text{ de l'œdème témoin}} \times 100$$

(Le témoin négatif est avec l'eau physiologique)

B-1-Traitement de l'*Ammoides verticillata*

a-l'extraction d'huile essentielle

Les caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle *Ammoides verticillata* obtenue par hydro distillation sont représentées dans le **tableau VIII**.

Tableau VIII : Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* de la région de Terny

Origine	Aspect	Couleur	Odeur et saveur
<i>Huile essentielle d'Ammoides verticillata</i>	Liquide	Jaune claire	Fortement piquante

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 1**, 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 1.6%. 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 (1.60% sur la base du poids sec). Ce rendement est probablement dû aux facteurs suivants :

- Aux précipitations et aux températures élevées durant l'année 2015 dans la région de Terny.
- Au degré d'aridité de la région de Terny (il est de type semi-aride).

Certaines différences de rendement ont été observées dans les échantillons d'*Ammoides verticillata* de différentes origines : Algérie (4.41%) (**Kambouche et EL 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.

B-2-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.

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 (**Oumessaad et al., 2012)** 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 IX**.

L'examen phytochimique réalisé sur la partie aérienne *Ammoides verticillata* a révélé la présence de six familles chimiques : les flavonoïdes, les tannins ; les tannins galliques, les tannins catéchiques les anthocyanes et les coumarines, Cependant, nous observons l'absence des quinones libres dans notre extrait. Les flavonoïdes, les tannins galliques se présentent en quantité plus importante par rapport à d'autres familles chimiques.

Tableau IX : Résultats des tests phytochimiques de la partie aérienne *Ammoides verticillata*

Substances recherchées	Résultats	Photos
Anthocyanes	Coloration bleue ++	

Tannins

Coloration bleue
noire

++



Tannins galliques

Coloration bleue
foncé

+++



Tannins catéchiques

Coloration rouge

+



Quinones libres

Coloration rouge

-

Absence de
coloration

Coumarines

Coloration bleue

++



Flavonoïdes

Coloration rouge

+++



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 *Ammoides verticillata* qui ont certifié la présence des tannins, des anthocyanes, des coumarines 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.

B-3-Evaluation de quelques activités biologiques

a-Activité antioxydant d'extrait aqueux de l'*Ammoides verticillata* (*in vitro*)

L'activité antioxydante est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques de l'huile essentielle. 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-Détermination du pourcentage d'inhibition

Les résultats obtenus lors du test de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH (2,2- Diphenyl-1-picrylhydrazyl) sont enregistrés dans **la figure 2**. (Voir les Densités Optique (DO) dans le **tableau XII** Annexe 3)

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 *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 0.1mg/ml, l'extrait aqueux de *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 2**).

Figure 2 : Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de la vitamine C et de l'extrait de *d'Ammoides verticillata*

ii- 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'IC50 de l'extrait aqueux et de l'acide ascorbique sont indiquées dans la **figure 3**.

L'extrait aqueux de *Ammoides verticillata* pouvait ramener le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) au diphenylpicrylhydrazine jaune-coloré avec un IC50 de 0.020mg/ml. Il exhibe une activité antioxydante inférieure à celle de la vitamine C (0.001/ml) (**figure 3**)

Figure 3 : IC50 de l'extrait aqueux et de la vitamine C

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

Par ailleurs, en comparant le IC50 de notre extrait (IC50=0.020mg/ml) avec celui de huile essentielle de *Ammoides verticillata* (IC50 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 (IC50=0.007mg/ml) des extraits organiques d'une autre espèce de même genre *Ammoides atlantica*, toutefois les résultats des IC50 sont réalisés avec d'autres méthodes d'activité antioxydants.

D'autre part, Il avère que cette activité antioxydant 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**).

b-Activité antimicrobienne d'huile essentielle d'*Ammoides verticillat* sur des souches testées

Nous avons eu recours à l'antibiogramme qui est une méthode biologique efficace pour déterminer directement l'effet antimicrobien de l'huile essentielle de *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 *Ammoides verticillata*.

Les résultats des expériences de nos tests sur la croissance des bactéries, et des levures vis-à-vis de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata* sont reproduits sur **le tableau X** et sur **la figure 4**.

Tableau X : Les diamètres des zones d'inhibition des souches microbiennes testés vis-à-vis d'HE de *Ammoides verticillata*.

Souche bactérien d'origine clinique	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	39.0
<i>Streptococcus feacaux</i>	33.0
<i>Escherichia coli</i>	39,5
<i>Escherichia coli (BLSE)</i>	37.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	36,5
<i>Bacillus spp</i>	34.0
Souches lévurien de références	
<i>Saccharomyces cerevisie</i> ATTC 9763	47.0
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	42.0

Selon **Ponce et al. (2003)** et **Biyiti et al. (2004)**, les huiles essentielles sont considérées comme actives si elles produisent des diamètres d'inhibition supérieurs ou égaux à 20 mm. De ce fait, l'huile essentielle de l'*Ammoides verticillata* présente une forte action antibactérienne contre les germes-cibles gram- d'origine clinique: *E. coli* (BLSE), *E. coli* et *Klebsiella pneumonia* qui se montrent fortement sensibles vis-à-vis de l'action inhibitrice de l'huile avec des diamètres d'inhibitions respectifs : 37mm, 39,5 mm et 36.5 mm. Cependant l'huile se montre douée avec une activité moins importante vis-à-vis de la bactérie *P. aeruginosa* (12,5 mm).

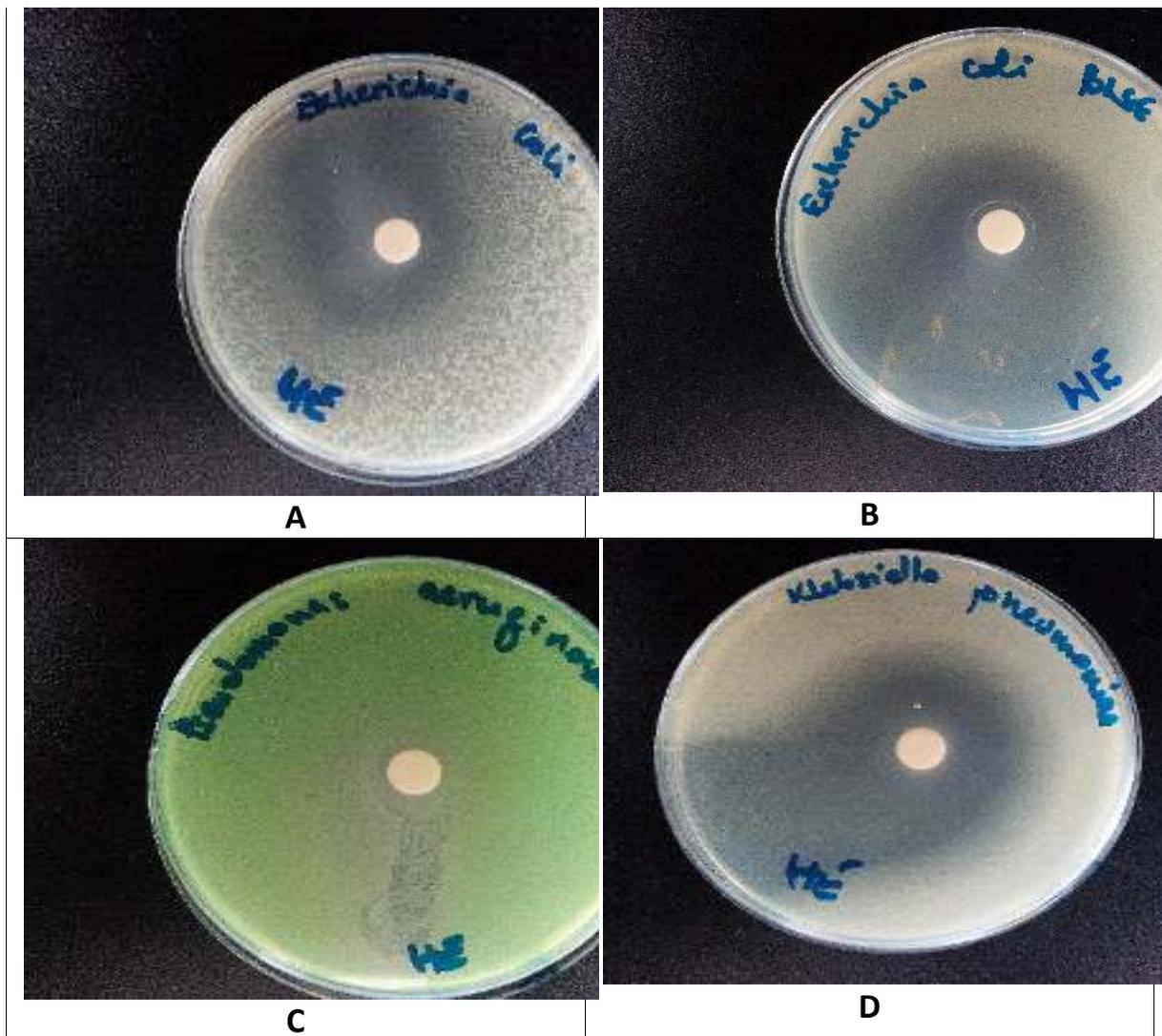
L'huile essentielle de l'*Ammoides verticillata* présente en plus une forte activité contre les bactéries gram+ : les *Staphylococcus aureus*, les *Streptococcus fécaux* et les *Bacillus spp* qui s'avèrent énormément sensibles à l'action inhibitrice de l'huile avec des diamètres d'inhibitions respectifs : 39mm, 33 mm et 34 mm.

Les levures : *Candida albicans* ATCC 10231 et *Saccharomyces cerevisie* ATCC1823 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 : 47mm et 42 mm.

La présente étude a montré que l'activité antibactérienne de l'huile volatile a été plus prononcée contre les bactéries Gram- que la bactérie *P. 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 4 : Sensibilité des microbiennes testés vis-à-vis l'huile essentielle de *Ammoides verticillata*.

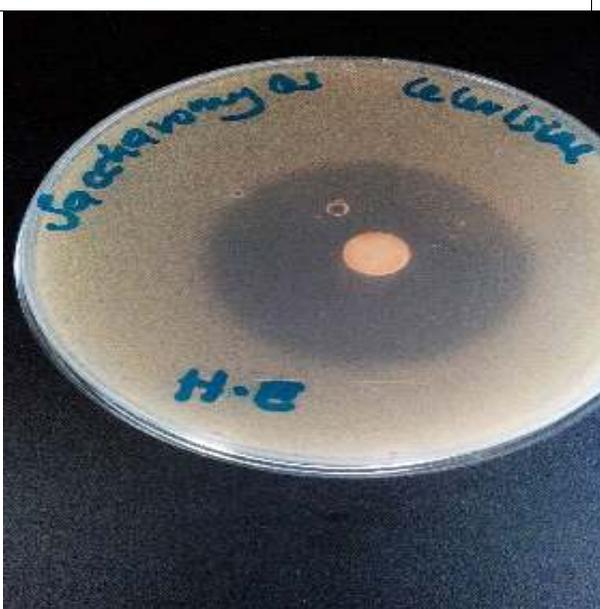




E



F



G



H



I

A: *Escherichia coli*, **B:** *Escherichia coli* (BLSE), **C:** *Pseudomonas aeruginosa*

D: *Klebsiella pneumoniae*, **E:** *Staphylococcus aureus*, **F:** *Streptococcus faecium*

G: *Saccharomyces cerevisiae*, **H:** *Candida albicans*, **I:** *Bacillus spp.*

Photo 7 : Diamètres des zones d'inhibition des souches microbiennes par l'huile essentielle de *Ammoides verticillata*

L'activité antibactérienne des huiles essentielles ainsi que leur mode d'action sont directement influencés par la nature et la proportion de leurs constituants qui entrent dans leur composition. Les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antibactérienne observée (Dormans et Deans, 2000 ; Kalemba et Kunicka, 2003). Donc le pouvoir inhibiteur important de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata* contre les germes-cibles pouvaient être attribués à la teneur élevée en Tymol et en carvacrol déjà citée par plusieurs travaux (Balbaa et al., 1973, Chialva et Monguzzi, 1993, Berhane, 1981 et Ishwar et al., 1963). Ces composés aromatiques phénoliques, en effet, sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes (Gharavi et al., 2007).

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle peut être expliquée par le caractère lipophile des mono terpènes contenus dans l'huile essentielle. Les mono terpènes agissent en perturbant la membrane cytoplasmique microbienne, ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire (Sikkema et al., 1994). Ces

modifications entraînent une fuite d'ions et des composés intracellulaires (**Carson et al., 2002; Ultee et al., 2002**). Si la perte de matériel est trop importante à la survie de la bactérie, cela entraîne la mort cellulaire.

L'huile essentielle de *Ammoides verticillata* possède une forte activité antibactérienne contre les bactéries d'origine clinique et surtout vis-à-vis des levures. Des observations similaires au sujet des extraits et des huiles essentielles provenant de la même espèce ont également été rapportés par plusieurs chercheurs **Abdelouachic et Bekhechi (2004)** et **Seddik (2010)**.

c- Activité antiinflammatoire d'extrait aqueux de l'*Ammoides verticillata* (in vivo)

Les résultats de l'activité antiinflammatoire des 3 produits : témoin négatif (Eau physiologique), témoin positif (Indométacine) et Extrait aqueux de l'*Ammoides verticillata* (substance à étudier) sont données par les tableaux XII, XIII, XIV, XV (Annexe 6) et sont illustrés par la **figure 5**.

Figure 5 : Evaluation de l'effet anti-inflammatoire (réduction de l'œdème) de substances testées.

Nous remarquons que l'extrait aqueux de l'espèce *Ammoides verticillata* a donné un pourcentage de la réduction de l'inflammation (œdème) de 50.67 %, plus par rapport au produit de référence (Indométacine) de 40.05%, donc nous pouvons dire qu'elle a une activité anti-inflammatoire plus que le produit de référence.

En comparant avec le travail d'**Ababsa Zine el albidine 2011**, sur l'espèce *Ammoides atlantica*, l'activité d'extrait organique de butanolique est de 65.44%, même plus que celle d'extrait aqueux de *Ammoides verticillata*. Pourtant, cet extrait donne une activité plus que celle d'extrait organique d'acétate d'éthyle (27.96%) pour l'*Ammoides atlantica*.

On peut expliquer ces résultats en prenant en considération que l'extrait aqueux contient plusieurs composés actifs qui agissent en synergie pour réduire l'œdème plus que le produit de référence qui est un seul composé actif agissant tout seul.

Ce qui nous oriente à tester l'activité antiinflammatoire des produits séparés et identifiés de cet extrait.

Conclusion

L'idée directrice de notre étude a consisté à extraire l'huile essentielle d'*Ammoidesverticilatadite* 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.

De l'analyse bibliographique, il ressort que cette plante, appartenant à la famille des Apiacées porte de nombreux synonymes végétaux.

L'hydrodistillation, méthode de choix pour l'extraction des huiles essentielles nous a permis de montrer que la plante *Nounkha* est riche en essence. Le rendement estimé est de 1.6%.

L'examen phytochimique réalisé sur la partie aérienne *Ammoidesverticillataa* a révélé la présence des composés chimiques surtout les flavonoïdes et les tannins

Les tests d'activité biologique, réalisés *in vitro*, ont permis d'évaluer la présence des zones d'inhibitions importantes indiquant que l'huile essentielle a une activité biologique sur tous les micro-organismes testés. Ces expériences révèlent une grande sensibilité des levures : *Candida albicans* ATCC 10231 et *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 vis-à-vis de l'essence par rapport aux autres germes.

En outre, les résultats de l'évaluation de l'activité anti-oxydante révèlent que l'extrait d'*Ammoidesverticilatadite* possède un pouvoir antioxydant élevé.

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 de 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 huiles essentielles afin d'estimer à quelles conditions ou à quelle période ces huiles essentielles pourraient avoir une activité intéressante.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **AbabsaZine el abidine, 2011** Thèse magistère « Etude d'activité biologique des extrait de l' *Ammoidesatlantica* ».
- **AFNOR NF T75-006**, (Association Française et Normalisation) « Les huiles essentielles-vocabulaire-1ere liste », 1998 ; « Recueil des normes françaises « Les huiles essentielles ». Ed.
- **A.F.N.O.R.**, Tour Europe, 2 ème Ed. Paris, 1986. « Agriculture and Food Chemistiy” ,53, 1841-1856.
- **Kambouche N., El-Abed D. (2003)**: "Composition of the volatile oit from the aerial parts of *Trachyspermumammi (L.)* Sprague from Oran (Algeria)” *J. of Essentiel Oil Research*, 15:10-1 1.
- **Ashraf, M. et Orooj, A., (2006)** *Journal of AridEnvironments* , , 64, 209.
- **Ayache F., 2007.** « Les résineux dans la région de Tlemcen (Nord-Ouest algérien) : aspects écologiques « ;
- **Bakchiche B., Gherib A., Aazza S., Gago C., Miguel M. G. (2013)**: “Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Producis*” 46: 85- 96.
- **Balbaa, S.H., Hilal, S. H. etHaggag, M. Y., 1973** “*Planta Medica*”, pg 23, 312.
- **Bargava,P.P. Haskar, C.N.,** « *Perfum , Essent. Oil Rec.,* » 1959, 50,204.
- **Beldjord Amina, 2004** thèse magistère, « Evaluation de l'activité antioxydante des huiles d' *Ammoidesverticilla* dans la région de Tlemcen.
- **Berhane, T. et Berhane, A., 1981** “ *Ethiop.J. Sci.* », pg, 6, 75.
- **Bouazza M., Benabadi N. &Loise R., 2001.** « Bilan de la flore de la région de Tlemcen (Oranie-Algérie) ». *Rev. Forêt Méditerranéenne*, XXII, 2 : 130-136.
- **Bruneton J., 1999** « *Pharmacognosie – phytochimie, plantes médicinales* », 3e edition.Ed. Tec et Doc Lavoisier.
- **Chialva, F., Monguzzi, F., J., (Jan/Feb. 1993)** *Essentiel OilRes.,* , , 5, 105
- **Abdelouachic et C.Behechi 2004** Thèse magistère « pouvoir antimicrobien de l' *ammoidesverticillata* ».
- **El Ouariachi E., Tomi P., BouyanzerA ., Hammouti B., Desjobert J –M., Costa J., Paolini J. (2011)** : “Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotisverticillata* from Morocco” *.Rev, Food and Chemical Toxicology* 49 (2011) 533–536. .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Felidj M ., Bouazza M., Ferouani T.** « Note sur le cortège floristique et l'intérêt de la plante médicinale *Ammoidespussila (verticillata)* dans le Parc national des Monts de Tlemcen » (Algérie occidentale). *Rev, Geo-Eco-Trop.*, 2010, 34 : 147 – 154 .
- **Fellah M, Romdhane MA. 2006.** « Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salviaofficinalis*. Lcueillie dans deux régions différentes de la Tunisie ». *Journal de la société algérienne de chimie*, 16(2), 193-202.
- **Gharavi, N., Haggartys, El-kadi, A.O.S., 2007**“*Curr. DrugMetabol*” , 8, 1.
- **http://www.tela-botanica.org/bd_tfx_nn-4131 (Le réseau de la botanique francophone)**
- **<https://science.mnhn.fr/taxon/species/ammoides/verticillata>**
- **Ishwar, C., Nigam William, S. et Leo, L.Perf., J.** “*Essent. Oil Res.*,”1963, 25
- **Kambouche, N., 2000** « Extraction, Composition chimique de l’huile essentielle d’Ajowan (Nounkha) de la région d’Oran. Mise en évidence de son activité biologique », Mémoire de Magister, Université d'Oran Es-Sénia.
- **KhadirAbdelmounaïm, BendahouMourad, BenbelaidEFethi, BellahceneChafika, -AbdelouahidDjamel-Eddine, MuseiliAlin, Paollini Julien, DesjobertJymy, Costa Jean. 2013,** <<Evaluation of the MRSA Sensitivity to Essential Oils Obtained from four Algerian Medicinal Plants>>
- **Merad R., (1973)** « Contribution à la connaissance de la pharmacopée traditionnelle Algérienne : Les inventaires du grand Algier » Thèse d’état, Institute des sciences médicale, université d’Agier, tome11, p312.
- **Merzougui Imane et TadjiHannane, 2012**thèse magistère « Etude de l’effet antibactérien et antioxydant d’ *Ammoidesverticillata* de la région de Tlemcen »
- **Mohagheghzadeh A., Faridi P., Ghasemi Y., “Food Chemistry,” 2007,** 100, 1217.
- **Oumessaad T., et al., (2013)** “Phytochemical Screening and Antimicrobial Evaluation of the Aqueous Extracts of *Ammoidesverticillata*, an Endemic Species”.
- **Pharmacopée européenne, 2008.** 6ème édition, P2531-3302
- **Pharmacopée Européenne, 1997** 3ème Edition, Tome 1, 1997, 105..
- **Ponce AG, Fritz R, del Valle C, Roura SI. 2003.** « Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard”. *Society of foof Science and Technology*, 36(7), 679-684.
- **Quezel, P., Santa, S., (1963)** « Nouvelle flore d’Algérie ». Tome II. pg 671.
- **Sijelmassi A., (1991)** : « Les plantes médicinales du Maroc ». 2eme Ed. Le Fennec
- **www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2633941**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Ammoides+verticillata
- Chialva, F., Monguzzi, F., J. 1993 « *Essent. Oil Res* », pg 5,105.
- **Oumessaad T., et al., (2013)** “Phytochemical Screening and Antimicrobial Evaluation of the Aqueous Extracts of *Ammoidesverticillata*, an Endemic Species”
- **Merad R., (1973)** Contribution à la connaissance de la pharmacopée traditionnelle Algérienne : Les inventaires du grand Alger Thèse d'état, Institute des sciences médicale, université d'Agier, tome11, p312.
- www.tela-botanica.org. **Benoit Bock et al., du janvier 2016** « Référentiel des tracéophytes de France métropolitaine ».
- **El Ouariachi E., Tomi P., Bouyanzer A., Hammouti B., Desjobert J –M., Costa J., Paolini J. (2011)** : “Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotisverticillata* from Morocco”. *Rev, Food and Chemical Toxicology* 49 (2011) 533–536.
- **Belouad A. 2001.** Plantes Médicinales d'Algérie, Office des Publications Universitaires Algiers, 206-207.
- **Abdelouachic et C.Behechi 2004** Thèse magistère « pouvoir antimicrobien de l'ammoidesverticillata ».
- **Ayache F., 2007.** »Les résineux dans la région de Tlemcen (Nord-Ouest algérien) : aspects écologiques et cartographie » . Mémoire de magistère. Univ. Tlemcen. Fac Sciences. Départ. Biologie.Lab.Gest. Ecosystèmes. 223 p.
- **Bouazza M., Benabadhi N. &Loise R., 2001.** Bilan de la flore de la région de Tlemcen (Oranie-Algérie). *Rev. Forêt Méditerranéenne*, XXII, 2 : 130-136.
- **J.B. Harborne, 1973.** 3Methods of plant analysis”, in: “Phytochemical Methods” Chapman and Hall, London, 1973, p. 132.
- **KhadirAbdelmounaïm, BendahouMourad, BenbelaidEFethi, BellahceneChafika, AbdelouahidDjamel-Eddine, MuseiliAlin, Paollini Julien, DesjobertJymy, Costa Jean. 2013,** <<Evaluation of the MRSA Sensitivity to Essential Oils Obtained from four Algerian Medicinal Plants>>
- **Sanchez Moreno C. et Larrani J.A., 1998.** « main methods used in lipids oxydation determination” *Food science and technology international* ,4 ; 391-399.
- **Ultee A., Bennik M.H.J., etMoezelaar R., 2002;** “the phenolic hydroxyl groupe of cavarcol is essential for action against the food bornepathon*Bacillus cereus*”. *Applied environmental Microbiology*; 68 (4) 1561-1568.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Denissew, S. A., J., 1993.** “*Essent. OilRes*”, Sept/Oct., 5, 466. KalpanaPlatel, M.Sc. et K. Srinivasan, Ph.D., *Nutrition Research*, 2001, 21, 1309 et références citées.
- Dashti-Rahmatabadi, M. H., Hejazian S. H., Morshedi A., Rafati A., *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, 109, 226.
- Boskabady, H., Jandaghi, P., Kiani, S., Hasanzadeh, L., *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 97, 79.
- Gilani, A.H., Jabeen, Q., Ghayur, M.N., Janbaz, K.H., Akhtar, M.S., *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 98, 127.
- Rasooli, I., Fakoor, M. H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A., BagherRezaei, M., *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 122, 135.
- **Getahum, A.**, « *Some common medicinal and poison plants used in Ethiopian folk medicine* », Addis Ababa University, 1976.
- **Jansen, P.C.M.**, « *Spices condiments and medicinal plants in Ethiopia, their taxonomy and agricultural significance* », Centre for Agri. Publ. and documentation, Wageningen, 1981.
- **Watson, I., Dallwitz, M. J.**, « *Les feuilles de usines florissantes* », 1992.
- **Mahmoudi, Y.**, « *Les plantes médicinales dans le jardin prophétique* », Palais du livre, Algérie, 1990.
- **Avesina, A.**, “*Law in medicine. A Sharafkandi, translator, vol. 2, second ed.* Soroush Press, Teheran, 1985, 187.
- **Valnet, J.**, « *Aromathérapie : traitement des maladies par les essences des plantes* », Ed. Maloine. S.A, n°10, 1984.
- **Seddik, M., Dib, S., Fortas, Z. et El Abed, D.**, « *Etude du pouvoir antimicrobien de l’huile essentielle d’*Ammoides verticillata* de la région d’Adrar* », Congrès International sur la Santé et l’Agro-alimentaire (CISA), 02-03 Décembre, 2010, Sidi Fredj-Alger.
- **AFNOR NF T75-006**, « *Les huiles essentielles-vocabulaire-1ere liste* », 1998
- A.F.N.O.R. (Association Française de normalisation). « *Recueil des normes françaises «Les huiles essentielles* ». Ed. A.F.N.O.R., Tour Europe, 2ème Ed. Paris, 1986.
- **Pharmacopée Européenne**, 3ième Edition, Tome 1, 1997, 105.
- **Wehmer C., (1931):** Die Planzestoffe ;Zweiter Band.
- **S. Aazza, B. Lyoussi and M. G. Miguel (2011).** Antioxidant activity of some Moroccan hydrosols, *J. Med. Plants Res.* 5, 6688-6696

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Rolland Y. (2004)**: Antioxydants naturels végétaux. *OCL. 11(6): P 419-424.*
- **Carson C.F., Mee B.J., Riley T.V. (2002)**: Mechanism of action of *Melaleuca alicornifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kili, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents Chemotherapy. 46: 1914-1920.*
- **Carré P. (1953)** : précis de technologie et de chimie industrielle. Tome 3., Ed. Ballière J.B. et fils. France. Paris. **In : Bekhchi C. (2002)**: analyse d'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* (nunkha) de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien. Thèse de magister, Université de Tlemcen.
- **Brian Williams et M.L. (1995)**: The isolation of aromatic materials from plant products, R.J. Reynolds Tobacco Company, Winston- Salem (USA), p.57-148
- **Daine E-A., Mostefai N. (1998)** : Contribution à l'étude du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle d'*Ammoides 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 de Tlemcen.
- **Clevenger J.F., (1928)**. Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Pharm. Assoc., 17,*
336-341.
- **Dorman, H.J.; Deans, S.G., J. Appl. Microbiol, 2000, 88(2), 308-316.**

Annexe1-Fiche technique pour les réactifs préparés et utilisés

✓ Chlorure de Fer anhydrique à 5% :

FeCl₃.....10g

L'eau distillée200ml

✓ Réactif de Stiansy :

2 volumes de formol50ml

1 volume de Chlorure acide. In25ml

✓ L'ammoniac 0.5

Ammoniac30ml

L'eau distillée.....60ml

✓ Acétate de Sodium :

Poudre d'acétate de Sodium9.5g

Eau désoxydée (bouillir puis refroidir).....10ml

Met dans une fiole et agiter avec agitateur magnétique

Annexe 2- Composants des milieux de culture utilisés

✓ Milieu de Mueller Hinton :

Infusion du viande2g

Hydrolysate de caséine.....17.5g

Amidon de maïs.....1.5g

L'eau distillée.....1000ml

Ajuster le pH à.....7.4

✓ Gélose Sabouraud :

Peptone de viande..... 50g

Pepton de caséine.....5g

D glucose.....40g

Agar agar.....15g

L'eau distillée.....1000ml

ajuster le pH à.....506

LISTE DES ANNEXES

✓ Gélose Nutritive :

Extrait du viande.....1g
 Extrait de la levure.....2g
 Chlorure de Sodium.....5g
 Agar-agar.....10g
 L'eau distillé.....11ml pour 28g de mélange
 Ajuster le pH à.....7.4

N. B : Tous les milieux sont stérilisés par Autoclavage à 120°C pendant 30 minutes.

Annexe 3-

- Préparation de solutions utilisées dans l'étude antioxydant par la méthode de DPPH :
 - ✓ Solution de DPPH (control) ; La poudre de DPPH (4mg) + l'eau distillée (100ml) et mettre à l'ombre pendant 30minutes.
 - ✓ Solution de la Vitamine C (Solution de référence) :La poudre de Vit C (3mg) + Solution de méthanol (100ml).
 - ✓ Solution d'extrait d'*Ammoidesverticillata* ; La poudre (10g) + 100ml d'eau distillée.
 - ✓ Solution de méthanol (Blanc) ; 0.075ml d'eau distillée + 2.925ml de méthanol. Mettre à l'ombre pendant 30minutes.
- DO (Absorbance du contrôle (Méthanol + DPPH) =1.263
 - $I\% = (\text{Absorbance}_{\text{contrôle}} - \text{Absorbance}_{\text{echantillon}}) \times 100$

Tableau XI : Valeurs des Absorbance (Densité Optique) de substances testées

Concentration/ Dilution	0.1	0.01	0.001	0.0001	0.00001
DO	0.081	0.722	0.979	1.066	1.084
I% (extrait)	93.58	42.83	22.48	15.59	14.17
DO	0.066	0.268	0.483	1.073	1.189
I% (vitamine C)	94.77	78.78	61.75	15.043	5.850

Annexe 4-La solution préparée dans activité anti-inflammatoire :

➤ Préparation de l'infusé :

Ajouter 100ml d'eau bouillante à 20g de poudre de la tige feuillée. Laisser infuser pendant 15minutes et filtrer. (Bardeau, 2009). Le filtrat est ajusté à 100ml avec d'eau distillée

LISTE DES ANNEXES

- Préparation de l'eau physiologique :

Volume à préparer un litre.

Solubiliser 9 g de NaCl dans un litre d'eau distillée

- Préparation de la solution de carragénine :

Nous avons la carragénine 1%, c'est-à-dire que :

1g de carragénine — 100ml d'eau distillée

X ————— 50ml d'eau distillée

Donc :

$$X = 50 \times 1 / 100 = 0.5g$$

Pour la préparation : on met 25ml d'eau distillée dans un petit bécher, on lui ajoute progressivement de la carragénine (0.5g), puis on ajuste le volume à 50ml avec de l'eau distillée.

- Préparation de la solution du produit de référence (Indométacine 200mg) :

Pour la préparation de cette solution, on utilise Indométacine comprimé 200mg : La dose active : 1200mg/60kg (**Vidal, 2008**)

Le poids moyen des souris est de 21,5g, et chacune d'elles reçoit 0.5ml de médicament

1200mg —————> 60000 g

X —————> 21,5g

$X = 21,5 \times 1200 / 60000 = 0.43mg/Souris \rightarrow X =$ dose du médicament à administrer pour chaque souris.

0.43mg —————> 0.5ml

1cp=200mg —————> X

$$X = 200 \times 0.5 / 0.43 = 232ml$$

Donc : dissoudre 1cp (200mg) dans 100ml d'eau distillée puis ajuster le volume à 232ml.

Annexe 5: Matériel animal (souris) utilisé pour l'évaluation de l'activité antiinflammatoire



Photo 8 : Souris utilisés pour l'évaluation de l'activité antiinflammatoire.



Photo 9: Sonde gavage de suspensionstestées



Photo 10: Injection de la solution decarragénine sous l'aponévrose plantaire (intra-plantaire) de la patte arrière gauche d'une souris



Photo 11 : Les pattes gauches des souris de lot témoin négative (l'eau physiologique), d'essai d'extrait d'*Ammoidesverticillata* et d'essai témoin positive (d'indométacine) respectivement.

Annexe 6 : Résultats de l'activité antiinflammatoire de 3 produits testés.

Tableau XII : Résultats du lot témoin négative/ contrôle (eau physiologique)

Numéro de souris	Poids patte gauche (g)	Poids patte droite (g)	Poids de l'œdème (g)
01	0.1950	0.1220	0.0502
02	0.1720	0.1340	0.0229
03	0.1900	0.1210	-0.0037
04	0.1640	0.1110	0.0163
05	0.1570	0.1250	0.0419
06	0.1520	0.1140	0.0056
Moyenne	0.1710	0.1210	0.0222

$$\% \text{ de l'œdème témoin / d'essai du contrôle} = \frac{0.1710 - 0.1210}{0.1210} \times 100 = 40.322\%$$

$$\% \text{ de la réduction de l'œdème d'essai du contrôle} = \frac{40.322 - 40.322}{40.322} \times 100 = 0.00\%$$

Tableau XIII : Résultats du témoin positive/ d'essai de référence (Indométacine)

Numéro de la souris	Poids patte gauche (g)	Poids patte droite (g)	Poids de l'œdème (g)
01	0.1748	0.1495	0.0253
02	0.1703	0.1494	0.0209
03	0.1703	0.1420	0.0283
04	0.1939	0.1594	0.0345
05	0.1618	0.1440	0.0178
06	0.1998	0.1487	0.0511
Moyenne	0.1784	0.1488	0.0381

% de l'œdème d'essai de référence = $\frac{0.1784 - 0.1488}{0.1488} \times 100 = 19.89\%$

0.1488

% de la réduction l'œdème d'essai de référence = $\frac{40.322 - 19.89}{40.322} \times 100 = 50.672\%$

40.322

Tableau XIV : Résultats de l'essai (extrait aqueux d'*Ammoidesverticillata*)

Numéro de la souris	Poids patte gauche (g)	Poids patte droite (g)	Poids de l'œdème (g)
01	0.1492	0.1213	0.0279
02	0.1394	0.1303	0.0031
03	0.1690	0.1501	0.0189
04	0.1756	0.1334	0.0422
05	0.1628	0.1264	0.0364
06	0.1721	0.1184	0.0537
Moyenne	0.1613	0.1299	0.0303

%de l'œdème d'essais d'extrait = $\frac{0.1613 - 0.1299}{0.1299} \times 100 = 24.17\%$

0.1299

% de la réduction de l'œdème d'essai d'extrait = $\frac{40.322 - 24.17}{40.322} \times 100 = 40.057\%$

40.322

TableauXV : Les % de l'œdème et % de leur réduction de l'essai d'extrait de l'*Ammoidesverticillata*, d'Indométacine et d'eau physiologique :

Substance testé	% de l'œdème	% de la réduction de l'œdème
L'eau physiologique (témoin négative / essais du contrôle)	40.322	0.000
Extrait d'A.v (Substance étudiée)	19.89	50.672
Indométacine (témoin positive / essai du référence)	24.17	40.057

Annexe7:Tableau XVI : Généralité sur les souches testées

Souches de référence lévuriens

Candida albicans ATTC 10231

Saccharomyce cerevisiae ATTC 9763

Soches bactérienne d'origine clinique

Microorganisme	Caractères généraux	Origine du prélèvement	Maladie/service	Antibiogramme (Résistance)
<i>Klebsiellapneumoniae</i>	-Enterobacteriaceae. -Gram négative -Bacille, immobile, capsulée et non sporulée. -Aero-anaérobie -Catalase positive -Oxydase négative	Urines	Intervention chirurgicalené come du colon (Diabétologie)	Cip, Tic, Sxt, GM, AMC.

LISTE DES ANNEXES

<i>Escherichia coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Enterobacteriaceae -Gram négative -Colibacille -Immobile -Fermentation du glucose. -Production d'indol à partir du tryptophane -Oxydase négative 	Hémoculture	Médecine Interne	NSE, AMC, FOS, CS, Net.
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	<ul style="list-style-type: none"> -Gram positive Staphylococcaceae -Coque en amas Immobile -Asporulé -Absence de capsule -Oxydase positive -Lactose négative 	Pur (mal parfaitement plantaire)	Diabète	FOX, Rif, OX, E, K.
<i>Pseudomonas auriginosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> Pseudomonadaceae -Gram négative -Forme bacille -Aérobie stricte -Mobile/Immobile -Asporulée -Absence de capsule -Oxydase positive -Lactose négative 	Crachat (DDB)	Service de pneumo	Tic, TB, CAZ, AN,Cip.
<i>Bacille spp</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Gram positive -Bacillaceae -Ovale centrale -Sporulée -Mobile -Aérobie stricte -Oxydase négative -Catalase positive 	Yaourt pérenne	Industrie agroalimentaire	AM, AMC.

LISTE DES ANNEXES

<i>Streptococcus fecaux</i>	-Gram positive -Asporulée -Cocci libres, en paire ou en en chaînette -Facultatif -Aéro-anaérobie -Oxydase négative -Catalase négative	Pur d'un pied diabétique	Diabétologie (Diabète)	Ext, VA, K, E, Pt.
<i>Escherichia coli</i> (BLSE)		Urine de la sonde	Pneumo (homme)	FOX, AM, CRO, CZ, AN, GN.
<i>Candida albicans</i>	-Saccharomycetaceae -Levure unicellulaire ou filamenteuse -Souvent pathogène	Souche ATTC		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-Levure de forme ovoïde -Elaboration des produits alimentaires ex : pain			

Tableau XVII: L'antibiogramme des souches bactérienne clinique testées :(Registre du laboratoire d'hôpital de Fabor –Blida, 2016)

Souche bactérienne	Antibiogramme (rouge- résistante, noir- sensible)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cip, Tic, Sxt, GM, AMC, AM.
<i>Escherichia coli</i>	AM, AMC, Tic, CZ, Fox, OFX, GM, GN, AN, Cip, Sxt, CRO, Net.
<i>Escherichia coli</i> (BLSE)	AMC, Tic, GM, Cip, FOX, AM, CRO, CZ, AN, GN.
<i>Staphylococcus aureus</i>	FOX, OX, E, K, P, CM, Sxt, FA.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tic, Pip, GN, NA, CAZ, AN, Cip, CFS, TCC
<i>Streptococcus fecaux</i>	Ext, VA, E, Pt, S, K, GM, CM.
<i>Bacillus</i> spp (souche non clinique)	AM, Mer, Tob, AMC, Net, OX, MA,

2- Préparation de l'inoculum

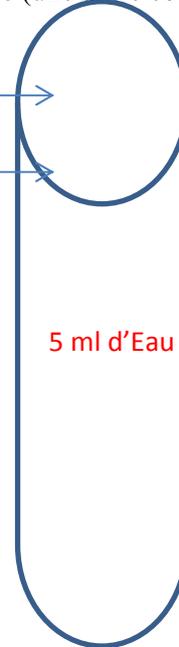


Isolement

Prélèvement d'une souche pure (une seule colonie)



Souche pure sur GN



5 ml d'Eau physiologique

Suspension d'opacité **0,5** sur l'échelle de Mac Farland

3- Ensemencement de la galerie API 20 E

Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles.



Pour certains caractères :

1.



Remplir de suspension le tube et la cupule
CIT, VP, GEL

2.



Remplir le tube de suspension et recouvrir d'huile de paraffine
ADH, LDC, ODC, H₂S, UREE

4- Lecture de la galerie API 20 E

- Les 10 premiers tests



Tests négatifs



Tests positifs

- Les 10 derniers tests



Tests négatifs



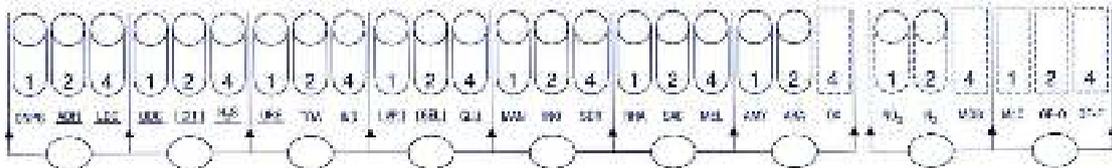
Tests positifs

5- Identification de la souche

Résultats de la galerie



api 20 E



Résultats reportés sur la fiche d'identification

Code n°: 5 215 773 (55)	Ident.
--------------------------------	--------

Se référer au catalogue pour identifier la souche à l'aide du code

Annexe 9: (BLSE) :bêtalactamases à spectre élargi

Définition

Les bêtalactamases à spectre élargi (BLSE) sont une grande famille très hétérogène d'enzymes bactériennes découverte dans les années 80 en France, puis en Allemagne.

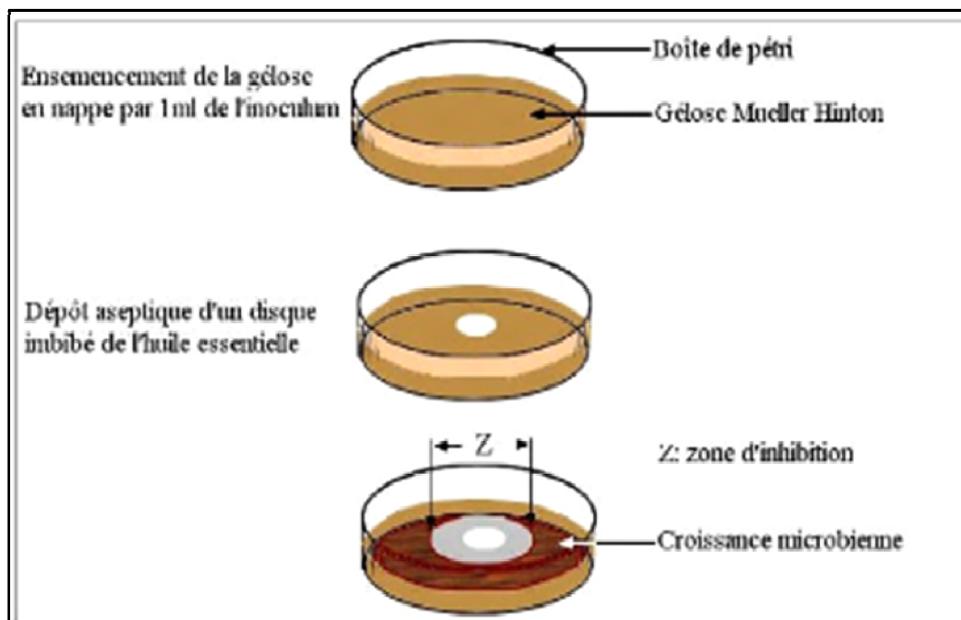
Elles sont induites soit par des plasmides (fréquents), soit par la mutation du génome naturel chez *Klebsiellaspp*, codant pour une bêtalactamase SHV. Les deux mécanismes confèrent aux bactéries touchées la capacité d'hydrolyser une grande variété de pénicillines et de céphalosporines.

La majorité des BLSE sont le résultat de mutations génétiques de bêtalactamases naturelles, en particulier de TEM-1, TEM-2 et SHV-1. Elles sont très actives contre les pénicillines et moyennement actives contre les céphalosporines de première génération. Les mutations génétiques à l'origine des BLSE élargissent le spectre de ces enzymes et touchent également les céphalosporines de troisième génération (ceftazidime et céfotaxime) et les monobactames (aztréonam).

Les bactéries produisant une BLSE n'hydrolysent pas les céphamycines (céfoxitine) ni les carbapénèmes (imipénem) et elles sont inhibées par l'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam, les inhibiteurs classiques de bêtalactamases. La présence de BLSE est fréquemment associée à la résistance aux fluoroquinolones.

Paterson DL, Bonomo RA.,(2006)“Extended-spectrum beta-lactamases : A clinical update. Clin Microbiol R”.

Annexe 10:Figure6: Lecture de la diamètre de la zone d'inhibition d'HE sur l'inoculum.



Annexe 11: Tableau XIX : Matériels non biologique

Verreries et petite matériels	Equipement et appareille
<ul style="list-style-type: none"> - Boite de Pétri - Bécher gradué - Eprouvettes graduées - Entonnoirs - Erlenmeyers - Papier filtre (Papier wattman) - Fiоле conique stérile - Pipettes gradués - Spatules métallique - Bec bunsen - Discs bactérienne - Gant - Papier aluminium - Pissette - Pince - Ance de platine - Tubes à essais - Ballons à col rodé 	<ul style="list-style-type: none"> - Balance analytique ; Balance pour les animaux - Plaque chauffante - Etuve et Auto-clave - Incubateur - Agitateur magnétique - Centrifugeuse - Reflux - Haute - Pied à coulisse manuel - Broyeur à hélices - Bain marie - Réfrigérateur - Spectrophotomètre - Réfrigérant à reflux -

Annexe 12 : Réactifs en solution :

- Eau distillée
- Méthanol
- Iode
- Ethanol absolue
- Acide sulfurique concentré à 90%
- Alcool ethylique
- Alcoolique de KOH à 10%
- HCl à 37%
- Hydroxyle d'ammoniaque concentré à 30%
- Solution de FeCl₃ à 1%
- Alcool isoamylique
- Chloroforme

Introduction Générale :

Chapitre I :
Synthèse bibliographique.

A :

Généralité sur l'*Ammoidesverticillata*

Chapitre II :
Etude expérimentale.

A :

Matériel et Méthode.

B :
Résultats et Discussion.

Conclusion générale et Perspective :

Références bibliographique :

Liste des Annexes :