



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la  
Terre et de l'Univers

Département de Biologie

**Laboratoire :**

Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique

**Mémoire**

**En vue de l'obtention du diplôme de Master**

**Option : Biochimie appliquée**

**Thème**

**Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne  
des extraits d'*Echium vulgare* de la région de Remchi (Tlemcen)**

Présenté par

M<sup>lle</sup> BABA-AHMED Samia



Devant le jury :

Présidente : M <sup>me</sup> BOUCHERIT-OTMANI Zahia	Professeur, Université Tlemcen
Examineur : M <sup>r</sup> RAHMOUN Mohammed Nadjib	Maître assistant (A), Université Tlemcen
Promoteur : M <sup>r</sup> BOUCHERIT Kebir	Professeur, Centre universitaire de Nâama

Année universitaire : 2013-2014

*« Le don d'une plante utile ne paraît plus précieux que la découverte d'une mine d'or et un monument plus durable qu'une pyramide » [Bernardin de Saint-Pierre].*

## *Dédicaces*

*A ma très chère maman qui a éclairé mon chemin et qui m'a encouragé et soutenue tout au long de mes études, tu m'as comblé avec ta tendresse et tes sacrifices.*

*A mon très cher papa, en témoignage de l'affection et le soutien que tu m'as offert depuis ma naissance.*

*Aucun mot ne saurait exprimer ma gratitude, mon amour et mon profond respect à vous deux. Puisse Dieu, tout puissant, vous prêter longue vie, santé et bonheur.*

*A mes sœurs adorées Sihem et Ibtissem pour leur humour et leur aide précieuse,  
A Nadia et son mari pour leurs encouragements et leur soutien moral...*

*A mon morceau de sucre, mon neveu adoré Amine ainsi qu'à l'adorable Meriem,  
source de joie dans notre famille.*

*A toute personne qui me connais de près ou de loin.*

## Remerciements

Au dessus de tout, je remercie Dieu le tout puissant, qui m'a donné la force, le courage et la patience pour mener à bien mon étude.

Ce travail a été effectué au Laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique » sous la direction de Monsieur **BOUCHERIT Kebir**, professeur au centre universitaire de Nâama, que je remercie d'avoir accepté de m'encadrer et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique. Il s'y est grandement impliqué par ses directives, ses suggestions et son savoir faire, mais aussi par ses encouragements dans les moments clés de son élaboration. J'espère avoir été digne de la confiance qu'il m'ait accordée et que ce travail est finalement à la hauteur de ses espérances.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à son épouse Madame **BOUCHERIT-OTMANI Zahia**, Professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen, pour son soutien constant et ses précieuses orientations. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je ne peux qu'admirer son talent. Je suis très honorée de l'avoir eu comme présidente du jury.

Je tiens à exprimer, à tous les deux, ma sincère gratitude pour leur accueil chaleureux au sein du laboratoire, leurs précieux conseils qu'ils n'ont cessé de m'apporter tout au long de ce travail, leurs qualités pédagogiques mais surtout humaines.

J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur **RAHMOUN Mouhammed Nadjib**, maître assistant de classe (A) à la faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen d'avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie de ce jury qu'il trouve ici l'expression de ma profonde sympathie.

Je tiens aussi à adresser mes sentiments de reconnaissance et de remerciements à Melle **BENTABET Nesrine**, doctorante en biochimie à l'Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen pour sa disponibilité, sa bienveillance, ses nombreuses qualités humaines et pour toute l'aide qu'elle m'a apportée au quotidien, Dieu seul pourra la récompenser.

Mes remerciements s'étendent également à mes amies et collègues, membres du laboratoire pour l'atmosphère conviviale qu'ils ont créé et spécialement à Fatima-Zahra, Djazia, Wassila, Kamila, Bouchra, Soumia, Esmâ, Imane, Houria, Rabiha, Hidayet, Khadra, Sarah, Amina, Wissame...

Un grand merci tout particulier va à ma très chère amie Benmansour Fatima-Zahra pour les sympatiques moments qu'on a passé ensemble et son soutien.

Je remercie également tous les étudiants de la promotion « Biochimie appliquée » pour leur générosité et leurs encouragements.

Enfin je remercie toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

*Samia Narimen*

## Table des matières

Première partie : Synthèse bibliographique.....	01-06
Deuxième partie : Matériel et méthodes.....	07
1. Matériel végétal.....	08
2. Méthodes.....	09
2.1. Etude phytochimique.....	09
2.1.1. Tests phytochimiques des extraits d' <i>Echium vulgare</i> .....	09
2.1.2. Dosage des polyphénols totaux.....	11
2.2. Etude de l'activité antibactérienne.....	11
2.2.1. Préparation des différents extraits des racines et de la partie aérienne d' <i>Echium vulgare</i> .....	11
2.2.2. Calculs des rendements en extraits.....	12
2.2.3. Evaluation de l'activité antibactérienne d' <i>Echium vulgare</i> .....	13
a- Technique de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode des disques).....	13
b- La méthode de la microdilution en milieu liquide (CMI).....	14
c- Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	14
Troisième partie : Résultats et discussion.....	15
1. Etude phytochimique.....	16
1.1. Tests phytochimiques.....	16
1.2. Dosage des polyphénols totaux.....	18
2. Etude de l'activité antibactérienne.....	19
2.1. Rendement des extraits.....	19
2.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits d' <i>Echium vulgare</i> .....	21

2.2.1. Technique de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode des disques).....	21
2.2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB).....	24
a- Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI).....	24
b- Concentrations Minimales Bactéricides (CMB).....	28
Quatrième partie : Conclusion et perspectives.....	32
Cinquième partie : Références bibliographiques.....	35

*Synthèse*

*Bibliographique*

Les pathologies infectieuses constituent un véritable problème de santé publique dans le monde. Elles sont dues à des virus, des bactéries ou à des eucaryotes parasites **(Gbadamassi, 2007)**.

Depuis la découverte du premier antibiotique; la pénicilline (Alexander Fleming 1928), la lutte contre les maladies infectieuses par de nouvelles molécules a connu une véritable révolution. Cependant, des microorganismes résistants sont apparus en plus de la toxicité de certains anti-infectieux constituant actuellement un réel problème d'antibiothérapie **[(Dedet, 2007) ; (Landry, 2012)]**.

En effet, l'émergence des résistances est due d'une part, au mauvais usage des antibiotiques. D'autre part, à la capacité infinie des germes à muter sous la pression des antimicrobiens, ainsi qu'à leur vitesse de réplication **(Denyer et coll., 2004)**.

Bien que les maladies bactériennes sont de mieux en mieux diagnostiquées, elles causent toujours un problème de mortalité telles que : la pneumonie, la tuberculose, la méningite, la septicémie et la typhoïde. En 2007, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a estimé plus de 3,3 millions de cas de bactériémies dans le monde, dont près de 850 000 cas en Afrique et 8 700 cas en Algérie seulement **(OMS, 2012)**.

Le recours aux ressources naturelles en général et aux plantes médicinales en particulier devient alors une des plus importantes et intéressantes pistes à explorer pour la recherche de nouveaux produits antibactériens plus efficaces **(Wright et Sutherland, 2007)**.

Depuis des milliers d'années, l'homme a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Ces plantes représentent un réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels c'est la phytothérapie **(Madi, 2010)**.

La phytothérapie est l'une des disciplines de la pharmacognosie ; terme récemment donné à la matière médicale, qui s'intéresse à la détermination de la composition chimique et les effets des principes actifs contenus dans les matières premières d'origine naturelle, le plus souvent provenant du règne végétal **[(Catier et Roux, 2007) ; (Filliat, 2012)]**.

En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), les plantes renferment une part importante de molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante et sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures. Cependant, jusqu'à une époque récente, elles ont été considérées comme des déchets du métabolisme chez les plantes. Ces molécules interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou



biochimiques ayant lieu dans l'organisme humain et procurent des propriétés curatives appréciables dont aucune chimie synthétique et combinatoire ne peut nous offrir c'est les métabolites secondaires [(Macheix *et coll.*, 2005); (Epifano *et coll.*, 2007)].

Dépassant actuellement 200000 substances identifiées, les métabolites secondaires peuvent être classés en plusieurs groupes en fonction de leurs classes chimiques et leurs origines de biosynthèse, on distingue trois principales classes : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes [(Ramawat et Merillon, 2008); (Bruneton, 2009)].

Ces métabolites ont depuis leur découverte des actions bactéricides qui sont établies depuis des millénaires, permettant à la phytothérapie de reprendre l'avantage sur les médicaments obtenus par synthèse chimique (Sofowora, 2010).

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire une source généreuse de substances naturelles très diversifiées tels que : le Romarin (*Rosmarinus officinalis*), la Sauge (*Salvia officinalis*), le Thym (*Thymus vulgaris*), l'Ail (*Allium sativum*), l'Anis (*Pimpinella anisum*)... qui sont réputés pour leurs biens thérapeutiques, surtout pour leur effet antiseptique et antibactérien [(Zeghad, 2009); (Lucienne, 2010)].

L'étude des plantes médicinales pour leurs activités antimicrobiennes constitue une perspective intéressante pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens [(Wagner et Ulrich, 2009)].

C'est pourquoi, nous nous sommes proposé d'effectuer cette étude qui consiste à évaluer l'activité antibactérienne de la plante *Echium vulgare* qui a été utilisée traditionnellement dans le traitement de plusieurs maux (Figure N°01).



**Figure N°01 : *Echium vulgare***  
**(Frantz, 2010).**

Cette espèce appartient à la famille des Borraginacées; plantes dicotylédones, herbacées et vivaces. Selon Watson et Dallwitz, cette famille comprend 2000 espèces et 120 genres (Watson et Dallwitz, 1991).

*Echium vulgare* est une plante bisannuelle ou vivace retrouvée dans les friches et les terrains caillouteux. Cette espèce calciphile commune en Europe, en Afrique et en Asie, se plaît surtout sur les bords herbeux des champs, sur les pentes, le long des chemins et sur les murs (Boullard, 2001).

Elle pousse plusieurs tiges de 30 à 80 cm de haut, velues, marquetées de points noirs. Ses feuilles sont oblongues, étroites, rudes au toucher. Ses fleurs garnissent les tiges presque depuis le bas jusqu'en haut; elles sont formées en entonnoir, courbées et découpées par les bords, en cinq segments inégaux et sont d'une belle couleur bleue ou violet. La floraison a lieu en Mai à Août. Tous les membres de ce végétal sont densément couverts de poils raides (Bock, 2012).

Les racines de cette espèce fournissent à l'usine du textile un colorant rouge (Brock, 2013).

En botanique, la vipérine commune est classée comme suit (Dupont et Guignard, 2007) :

Règne :	Plantes
Sous règne :	Trachéophytes
Embranchement :	Spermaphytes
Sous embranchement :	Angiospermes
Division :	Magnoliophytes
Classe :	Eudicotylédones
Sous classe :	Euastéridées I
Ordre :	Lamiales
Famille :	Borraginacées
Genre espèce:	<i>Echium vulgare</i>

La vipérine commune était préconisée depuis l'antiquité comme un moyen de prévention et de remède. L'herboriste William l'a décrite comme suit : «Sa tige est entièrement tachetée comme un serpent ou une vipère et est un remède particulier contre le poison et le dard des scorpions» (Hans, 2007).

Les propriétés médicinales de la vipérine rappellent fortement celles de la Bourrache (*Borago officinalis*), riche en mucilage à fructosanes, en alcaloïdes hépatotoxiques. On utilise les sommités fleuries et les feuilles sous forme d'infusion pour bénéficier de leurs propriétés astringentes, émoullientes, expectorantes, sudorifères et on en use pour prévenir les bronchites et la grippe (Boullard, 2011).

Les racines d'*Echium vulgare* ont été utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement des fissures sur les mains, ainsi que pour la cicatrisation des plaies à l'instar de l'allantoïne (Sezik et coll., 1997). Appliqué en cataplasme ou en pansement, ce composé est un baume efficace contre les brûlures et les furoncles (Tanaka et coll., 1986).

Les alkanines et les shikonines sont des pigments rouges localisés dans la racine. Ils ont une activité anti-tumorale, ainsi qu'une activité antimicrobienne contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Sarcina lutea*. Sa racine passe également pour anti-épileptique [(Papageorgiou, 1980) ; (Petersen et Simmonds, 2003)].

Cette espèce renferme des substances toxiques pour le foie et provoquent des irritations sur la paroi de l'estomac lorsqu'elles sont ingérées ; ce sont les alcaloïdes

pyrrolizidiniques qui sont localisés dans la racine, mais à faible dose, ils exercent un effet hypotenseur et agissent comme diurétique **(Rakshain et Mats, 1973)**.

Des travaux antérieurs ont montré que les fleurs de la vipérine commune sont une très bonne source de nectar et de pollen. Elles sont fréquemment visitées par les bourdons et les abeilles **[(Leiss et Klinkhamer, 2005) ; (Chwil et coll., 2011)]**.

Le parfum floral unique d'*Echium vulgare* joue un rôle majeur dans l'attraction de l'abeille *Hoplitis adunca* qui est capable de discriminer cette espèce des autres Borraginacées par émission de signaux chimiques **[(Burgera et coll., 2010) ; (Filella, 2011)]**.

Une étude histologique a démontré que les cellules épidermiques des feuilles et des tiges de la vipérine sont plus longues chez les plantes qui poussent dans l'ombre; ce qui explique l'adaptation de cette espèce aux différentes conditions écologiques **(Papp, 2011)**.

Un criblage biologique de divers extraits de plantes médicinales a révélé qu'*Echium vulgare* possède une activité anti-tumorale **(Karakas et Yildirim, 2012)**.

Face aux problèmes de la résistance bactérienne aux antibiotiques synthétiques, aux risques de toxicité par les additifs alimentaires et par certains produits pharmaceutiques, la nécessité de remplacer les produits chimiques par des produits naturels nous a conduit à réaliser une étude phytochimique et à évaluer l'activité antibactérienne des extraits d'*Echium vulgare* de la région de Remchi.

*Matériel*

*Et*

*Méthodes*

Ce travail a été effectué au laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen.

### 1. Matériel végétal

Notre étude a porté sur la plante *Echium vulgare* récoltée durant le mois de Mars 2013 dans la région de Remchi qui se situe à 21 km au nord-ouest de la ville de Tlemcen.

La partie aérienne (**Figure N°02**) et la partie racine (**Figure N°03**) de notre plante ont été séchées à l'ombre et à l'abri de l'humidité dans une étuve à 25°C pendant une semaine.

Une fois séchées, ces dernières ont été broyées puis soumises à l'extraction.

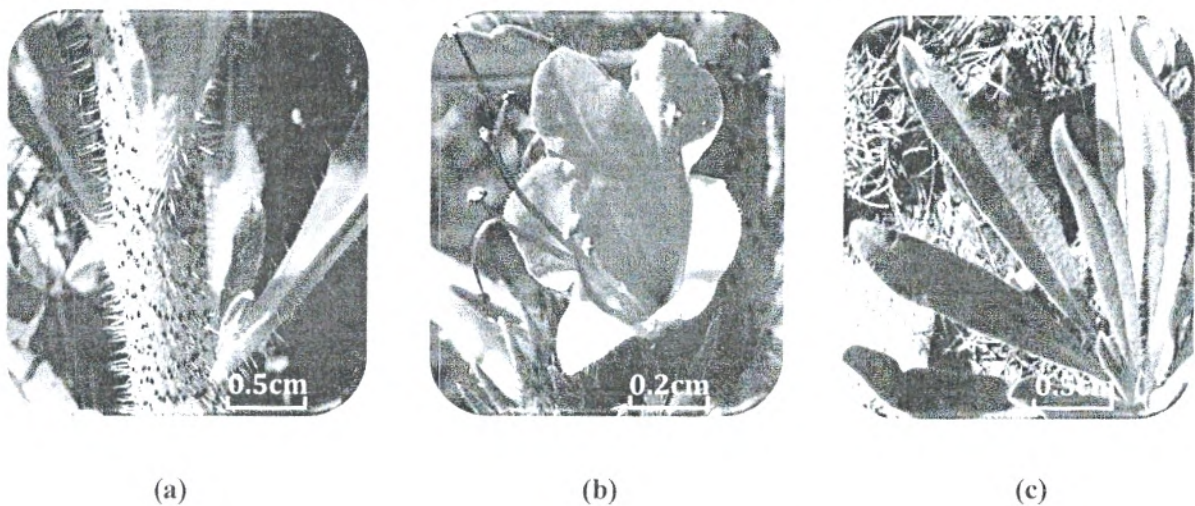


Figure N°02. *Echium vulgare* : partie aérienne

Tige (a); fleur (b) et feuilles (c)

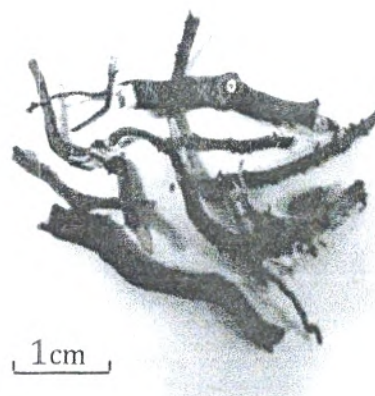


Figure N°03. *Echium vulgare* : partie racine.

## 2. Méthodes

### 2.1. Etude phytochimique:

#### 2.1.1. Tests phytochimiques des extraits d'*Echium vulgare*

##### a- Alcaloïdes

Nous avons procédé à une macération de 24 heures de 10g de poudre d'*Echium vulgare* avec 50 mL d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) à 10 %. Après filtration, nous avons complété le filtrat à 50 mL avec de l'eau distillée.

Ensuite, dans deux tubes à essai nous avons introduit 1 mL de filtrat et ajouté 5 gouttes de réactif de Mayer dans le premier tube et 5 gouttes de réactif de Wagner dans le second. L'apparition d'un précipité indique la présence d'alcaloïdes (**Mojab et coll., 2003**).

##### b- Polyphénols

Pour la mise en évidence des tanins, des flavonoïdes et des anthocyanes, nous avons préparé un infusé à 5% pendant 15 minutes.

##### ❖ Tanins

Dans un tube à essai, nous avons introduit 5 mL d'infusé à 5 % et ajouté 1 mL d'une solution aqueuse de trichlorure ferrique ( $FeCl_3$ ) à 1 %. En présence des tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.

##### ➔ Tanins catéchiques

A 5 mL d'infusé à 5%, nous avons ajouté 5 ml d'acide chlorhydrique concentré. L'ensemble est porté à ébullition pendant 15 min puis filtré sur papier filtre. En présence des tanins catéchiques, il se forme un précipité rouge soluble dans l'alcool isoamylique.

##### ➔ Tanins galliques : réaction de Stiasny

A 30 mL d'infusé à 5 %, nous avons ajouté 15 mL de réactif de Stiasny (10 mL de formol à 40 % et 5 mL d'acide chlorhydrique concentré), puis nous avons chauffé au bain-marie à 90 °C pendant 15 min environ. Après filtration, nous avons ajouté goutte à goutte une solution de trichlorure ferrique ( $FeCl_3$ ) à 1 % (**Karumi et coll., 2004**).

##### ❖ Anthocyane

A l'infusé à 5 %, nous avons ajouté 5 mL d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) à 10 % puis de l'hydroxyde d'ammonium ( $NH_4OH$ ) à 25%. Si la coloration s'accroît par acidification, puis vire au bleu-violacée en milieu basique, cela permet de conclure la présence d'anthocyanes (**Bruneton, 1999**).

➔ **Flavonoïdes**

5 mL d'infusé à 5% sont ajoutés à 2 mL d'acide chlorhydrique concentré (HCl) et 0,2g de copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose orangée, rose violacée ou rouge indique la présence d'un flavonoïde.

➔ **Leucoanthocyanes**

Nous avons effectué la réaction à la cyanidine sans ajouter les copeaux de magnésium et chauffé au bain-marie pendant 15 min. En présence des leucoanthocyanes, il se développe une coloration rouge cerise ou violacée. Les catéchols donnent une teinte brun-rouge (Malec et Pamelio, 2003).

**c- Dérivés anthracéniques**

❖ **Anthraquinones libres**

A 1 g de poudre d'*Echium vulgare*, nous avons ajouté 10 mL de chloroforme et chauffé pendant 3 min au bain-marie. Nous avons ensuite filtré à chaud et complété à 10 mL. A 1 mL de l'extrait chloroformique obtenu, nous avons ajouté 1 mL d'oxyde d'ammoniaque (NH<sub>4</sub>OH) dilué à 10%. La coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres (Oloyede, 2005).

**d- Stérols et triterpènes**

1 g de poudre d'*Echium vulgare* est ajouté à 20 mL d'éther et laissés macérer pendant 24 heures. Après évaporation à sec de 10 mL de l'extrait, nous avons dissous le résidu dans 1 mL d'anhydride acétique et 1 mL de chloroforme. Ensuite nous avons ajouté 1 mL d'acide sulfurique concentré. La formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet dans la zone de contact des deux liquides indique la présence des stérols et triterpènes [(Edeoga et coll., 2005) ; (Bruneton, 1999)].

**e- Saponosides**

Nous avons préparé un décocté à 1% pendant 15 minutes. Ensuite, dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, nous avons reparti successivement 1,2,...10 mL de la solution décoctée. Le volume final est ajusté à 10 mL avec de l'eau distillée. Chaque tube est agité dans le sens de la longueur pendant 15 secondes. Après avoir laissé au repos pendant 15 minutes, nous avons mesuré la hauteur de la mousse dans chaque tube.

Le tube dans lequel la hauteur de la mousse dépasse 1 cm indique la présence des saponosides qui est calculée par la formule suivante (Dohou et coll., 2003):

$$I = \text{Hauteur de mousse (en cm) dans } X^{\text{ème}} \text{ tube} * 5/0,0X.$$



#### **f- Composés réducteurs**

A 5 mL de la solution décoctée à 10 %, nous avons ajouté 1 mL de réactif de Fehling (0,5 mL de réactif A et 0,5 mL de réactif B, mélange extemporané). Un test est jugé positif s'il y a apparition d'un précipité rouge brique après chauffage (**Trease et Evans, 1987**).

#### **g- Coumarines**

1g de la poudre végétale est placé dans un tube en présence de quelques gouttes d'eau distillée. Les tubes sont recouverts avec le papier imbibé de NaOH dilué et sont portés à ébullition. Toute fluorescence jaune témoigne de la présence des coumarines après examen sous ultra-violet (**Bruneton, 1999**).

#### **2.1.2. Dosage des polyphénols totaux:**

L'extrait eau/méthanol (macération 48 heures et évaporation à sec) est solubilisé dans le méthanol à une concentration de 1 g/L pour le dosage des polyphénols totaux. Le taux des polyphénols totaux des extraits de la plante étudiée est déterminé par spectrophotométrie en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. La coloration produite dont l'absorption maximum est comprise entre 700 et 760 nm est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits végétaux. Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par **Vermerius et Nicholson (2006)**. 0.1 mL de l'échantillon est mélangé avec 2 mL d'une solution de carbonate de sodium à 2%. Après agitation et incubation de 5 minutes, 100 µL du réactif de Folin-Ciocalteu à 1N sont additionnés. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la lecture des D.O (densités optiques) est faite à 700 nm contre un blanc. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions expérimentales en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à des concentrations finales allant de 0,1 à 1 mg/mL.

### **2.2. Etude de l'activité antibactérienne:**

#### **2.2.1. Préparation des différents extraits d'*Echium vulgare***

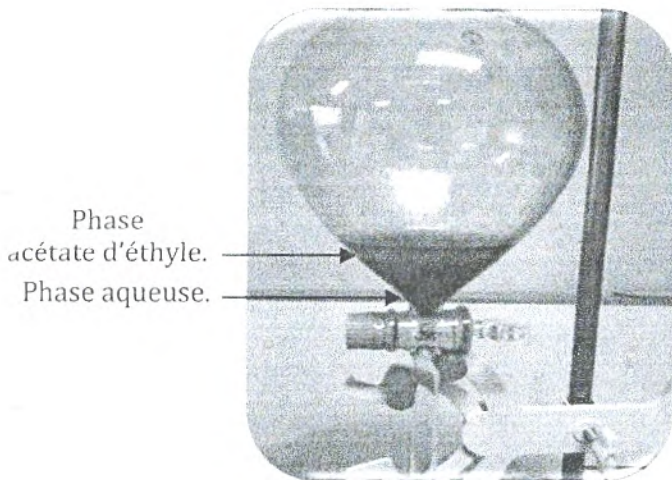
##### **a- Préparation de l'extrait brut aqueux**

Nous avons utilisé la technique d'extraction sous reflux continue. 10g de poudre des deux parties d'*Echium vulgare* sont mises en contact avec 100mL d'eau distillée. L'opération est répétée trois (03) fois en renouvelant le solvant toutes les 30 minutes. Les trois (03) fractions sont réunies puis filtrées et évaporées à sec.

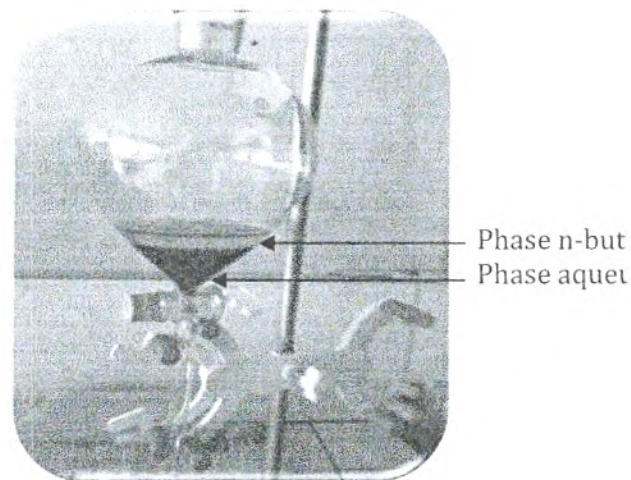
**b- Préparation de l'extrait eau /méthanol et des deux fractions des flavonoïdes**

Pour la préparation de l'extrait eau/méthanol, nous avons utilisé le protocole d'Upson et ses collaborateurs (2000). 5g de poudre végétale sont laissés macérer pendant 48h dans 50mL de méthanol à 70% en renouvelant le solvant toutes les 24 heures. Après filtration, le filtrat est évaporé sous vide à sec en utilisant un rotavapeur.

Les résidus secs obtenus de l'extrait méthanolique à 70% sont repris avec de l'eau distillée. La phase aqueuse est filtrée et extraite dans un premier temps deux fois par l'acétate d'éthyle (v/v) dans une ampoule à décanter. La phase acétate d'éthyle est évaporée à sec (extrait acétate d'éthyle) (Figure N°04). La phase aqueuse issue de l'extraction avec l'acétate d'éthyle quant à elle est traitée deux fois avec le n-butanol et nous récupérons ainsi la phase n-butanol qui est évaporée a sec (extrait n-butanol) (Figure N°05) (Harborne, 1998).



**Figure N°04 : Extraction liquide/liquide phase acétate d'éthyle.**



**Figure N°05 : Extraction liquide/liquide phase n-butanol.**

**2.2.2. Calculs des rendements en extraits:**

Le rendement en extrait brut est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait brut sec et la masse du matériel végétal broyé à traiter.

$$R = (M1/M2) * 100$$

R : rendement en extrait brut sec exprimé en %.

M1 : masse en grammes de l'extrait brut sec.

M2 : masse en grammes du matériel végétal broyé.

### **2.2.3. Evaluation de l'activité antibactérienne d'*Echium vulgare* :**

L'activité antibactérienne des différents extraits d'*Echium vulgare* a été évaluée par deux méthodes de référence:

- La technique de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode des disques);

-La méthode de microdilution en milieu liquide pour déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et les Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) par la technique de Charbet.

Il faut noter que le DMSO à la concentration finale utilisée, n'exerce aucune activité vis-à-vis des souches testées.

#### **a- Technique de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode des disques)**

Pour la préparation de l'inoculum, chaque culture bactérienne est ensemencée en stries sur une gélose nutritive pour obtenir des colonies bien isolées. Après une incubation à 37°C pendant 24 heures, quelques colonies sont transférées à l'aide d'une anse de platine dans un tube à essai contenant de l'eau physiologique. Les densités optiques sont ajustées à l'aide d'un spectrophotomètre «SPECORD 200 plus» à une longueur d'onde de 625 nm. La densité optique doit être comprise entre 0,08 et 0,1 l'équivalent de  $10^8$  UFC/mL (CLSI, 2006).

L'inoculum ainsi préparé est dilué au  $1/100^{\text{ème}}$  dans l'eau physiologique. La densité optique finale obtenue de l'inoculum doit être équivalente à  $10^6$  UFC/mL. Les boîtes de Pétri contenant le milieu Muller Hinton gélosé sont ensemencées par écouvillonnage. Des disques de 6 mm de diamètre sont préparés en extemporané à partir de papier filtre stérile, puis imprégnés avec les extraits à tester (20µL pour chaque disque).

Les disques sont placés aseptiquement sur la gélose inoculée préalablement. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures. L'activité antibactérienne est déterminée par mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des disques. L'activité antibactérienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et est exprimé en millimètre (EUCAST, 2003).

**b- La méthode de la microdilution en milieu liquide (CMI)**

Le bouillon Muller Hinton (MHB) supplémenté en cations est largement utilisé comme milieu standard pour la microdilution en plaque. Il permet une meilleure croissance de la plupart des bactéries pathogènes non exigeantes, en plus de son faible effet antagoniste vis-à-vis des antibiotiques (EUCAST, 2003). La microplaque à 96 puits permet de déterminer la CMI des différents extraits végétaux. Dans les puits des colonnes 1 à 12, nous avons introduit à l'aide d'une micropipette 100µL de bouillon Muller Hinton (MHB). Ensuite, 100µL de l'extrait végétal est ajouté dans le 2ème puits (qui servira de témoin négatif) et 100µL dans le 3ème puits. A partir de ce dernier, nous avons procédé à des dilutions de 100µL de puits à puits à l'aide d'une micropipette. Le facteur de ½ est pris en considération dans le calcul des concentrations des produits à tester. Chaque puits contient 100µL de bouillon et le produit testé en dilution. Ensuite, nous avons additionné 100µL de l'inoculum ( $10^6$ UFC/mL) dans les 96 puits sauf ceux de la colonne 2 (témoin négatif). Le puits 1 sert de témoin positif (100µL du bouillon et 100µL de l'inoculum). La microplaque est couverte et incubée à 37°C de 18 à 20 heures. La lecture se fait à l'œil nu sachant que la CMI est la plus faible concentration de la substance testée à laquelle aucun trouble visuel n'est observé. Nous avons utilisé comme antibiotique de référence la gentamycine à une concentration de la solution mère de 5,12 mg/mL.

**c- Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)**

La CMB est définie comme étant la plus faible concentration de l'antibiotique qui détruit 99,9% de la concentration cellulaire finale. Après la détermination de la CMI, les deux puits contenant les concentrations en substance antibiotique strictement supérieures à la CMI ont servi pour la détermination de la CMB. Pour ce faire, un échantillon de 20µL de chaque puits (ne présentant pas de croissance) sont transférés dans des boîtes de Pétri contenant du Muller Hinton Agar (MHA).

Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte correspondant à la CMB compte un nombre de colonies inférieur à 3 (EUCAST, 2003).

*Résultats*

*Et*

*Discussion*

## 1. Etude phytochimique:

### 1.1. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différents composés existant dans les deux parties étudiées de la plante par des réactions qualitatives. Ces dernières sont basées sur des phénomènes de précipitations ou de colorations par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques mentionnés dans le **Tableau N°01** indiquent une forte présence dans les deux parties d'*Echium vulgare* : des flavonoïdes, des tanins catéchiques, des composés réducteurs, des alcaloïdes et des coumarines. La recherche des stérols et des triterpènes s'est montrée moyennement positive dans les deux parties de la plante. Ces résultats confirment ceux obtenus par **Gheffour en 2012**. Les tanins galliques, les leucoanthocyanes et les anthraquinones libres quant à eux sont absents.

Les résultats des tests phytochimiques effectués sur la plante *Echium pycnanthum* par **Chaouche en 2010**, montrent une forte présence des tanins, flavonoïdes, et saponosides dans les feuilles et les racines, ainsi qu'une absence totale des anthraquinones et des anthocyanes, ce qui est compatible avec nos résultats à l'exception des saponosides qui sont absents dans les racines d'*Echium vulgare*.

Tableau N° 01: Résultats des tests phytochimiques.

Métabolites secondaires		Feuilles + Tiges+ Fleurs	Racines
Alcaloïdes		+	+++
Tanins	Tanins catéchiques	+++	+++
	Tanins galliques	-	-
Flavonoïdes		+++	+++
Anthocyanes		-	+
Leucoanthocyanes		-	-
Anthraquinones libres		-	-
Saponosides		+	-
Composés réducteurs		+++	+++
Coumarines		+++	++
Stérols et triterpènes		++	++

Réaction fortement positive: +++

Réaction moyennement positive: ++

Réaction faiblement positive: +

Réaction négative: -