

# ÉVALUATION IN-VITRO DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTERIENNE DES EXTRAITS NATURELS D'UNE SOUS ESPECE DE *TEUCRIUM POLIUM* L. CULTIVÉE DANS LA RÉGION DE BENI SOUIK, BISKRA

ASMA FETTAH<sup>(1)</sup>, M. DJOUAMAA<sup>(1)</sup>, K. LAMARA<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Université Mohamed Khider - BISKRA, 07000 Biskra, Algérie

<sup>(2)</sup>Université Larbi Ben M'hidi, 04000 Oum El Bouaghi, Algérie

E-mail : a.fettah@univ-biskra.dz

## RESUME

Ce travail est une contribution à la valorisation des plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle. Il a pour objectifs la recherche et l'étude de nouveaux agents antibactériens issus de la plante médicinale très utilisée par la population algérienne, *Teucrium Polium* L. sous espèce thymoides de la famille Lamiaceae, cultivée dans la région Beni souik de la wilaya de Biskra.

L'extraction a été réalisée sur la partie aérienne de la plante, on utilisant des solvants de polarité croissante, ce qui nous a permis d'obtenir les flavonoïdes. L'huile essentielle a été récupérée par une hydrodistillation.

L'activité antibactérienne des extraits préparés a été évaluée in vitro en utilisant l'antibiogramme standard et la micro-dilution en milieu liquide ; vis à vis trois souches bactériennes de référence.

Les deux souches bactériennes testées *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* se sont révélées insensibles aux extraits de flavonoïdes et l'huile essentielle de *Teucrium Polium* L.. Seule la souche *Staphylococcus aureus* a montré une activité antibactérienne.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits flavonoïdes et l'huile essentielle de *Teucrium Polium* L. envers la souche bactérienne sensible varient entre 0,125 et 2 µg/ml. L'étude des concentrations minimales bactéricides (CMB) a permis de mettre en évidence l'effet bactériostatique de ces extraits, permettant de les classer comme agents antibactériens "bactéricides".

**MOTS CLES:** Activité antibactérienne, Antibiogramme, CMI et CMB, Extraits naturels, *Teucrium Polium* L.

## 1 INTRODUCTION

La recherche de nouvelles substances antibactériennes d'origine naturelle et la valorisation des plantes utilisées en médecine traditionnelle est un thème porteur depuis plusieurs années. Les laboratoires pharmaceutiques sont toujours prêts à l'élaboration de nouveaux composés actifs, à l'identification, à la caractérisation des molécules naturelles et à la mise au point des médicaments qui ont pour origine des substances naturelles et de s'inspirer de leurs structures moléculaires pour imaginer de nouveaux médicaments [1]. Ces molécules que constitue le principe actif des plantes médicinales appartiennent majoritairement aux métabolites secondaires tels que les huiles essentielles et les flavonoïdes [2].

Un grand intérêt est donné à l'investigation sur la préparation des nouvelles substances chimiques douées d'une activité antibactérienne et sur l'amélioration des indices thérapeutiques des antibiotiques déjà existants et des pharmaco-modulations adéquates [3,4].

Les antibiotiques sont des médicaments qui servent à lutter

contre les infections dues à des bactéries, malheureusement, leur efficacité est menacée car les bactéries peuvent s'adapter et résister au traitement. Les antibiotiques tuent les bactéries, ou bloquent leur prolifération. Les bactéries résistantes sont devenues insensibles à ces drogues. On parle de résistance aux antibiotiques ou aux antibactériens. La résistance croissante des bactéries pathogènes aux agents antibactériens notamment les Cocci Gram + présente un problème majeur pour les patients, l'industrie pharmaceutique et la recherche scientifique [5,6].

De nos jours plus de 4000 espèces des plantes sont utilisés en médecine traditionnelle et en médecine moderne [7]. En effet 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une molécule active d'origine végétale [8].

Ce travail est orienté vers la mise en évidence de l'activité antibactérienne des extraits naturels et bruts à partir de la plante médicinale *Teucrium Polium* L. sous espèce Thymoïdes de la famille de Lamiaceae, très utilisée en médecine traditionnelle algérienne et à la médecine moderne [9]. C'est une plante tomenteuse, blanchâtre,

vivace de 10 à 30 cm moyennement velue à odeur forte, les tiges sont nombreuses, ligneuses à la base révolutes, plus ou moins ramifiées, les feuilles sessiles, oblongues ou linéaires, à bords verte pâle en dessus, blanches en dessous. Les fleurs jaunâtres et globuleuses ou ovoïdes, calice petit (3 à 4 mm) en cloche, à dents courtes triangulaires presque égaux, très velus.

L'évaluation de l'activité antibactérienne est effectuée sur les souches suivantes : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ; en employant la méthode d'Aromatogramme [10, 11].

## 2 MATERIEL ET METHODES

### 2.1 Récolte du matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de la partie aérienne (tiges, feuilles, fleurs) de la plante *Teucrium Polium* L. sous espèce *Thymoides*, récoltée au mois de Mai dans la région de Beni souik (coordonnées géographiques 35°5'27" N et 5°51'36" E) de la wilaya de Biskra. Les échantillons sont séchés à l'abri de la lumière et de l'humidité, à température ambiante, réduits en poudre puis stockés soigneusement dans un flacon en verre à un endroit sec en vue de leur utilisation ultérieure.

Des études réalisées à l'aide de screening phytochimique, méthodes décrites par Békro [12] et Béourou [13], ont révélé la présence de plusieurs groupes chimiques au niveau de l'espèce étudiée, dont les principaux sont les polyphénols, flavonoïdes, tannins, stérols, huiles essentielles et saponosides [14].

### 2.2 Technique d'extraction des Flavonoïdes

Pour extraire les flavonoïdes de la plante étudiée, on a macéré 200 g de poudre végétale après séchage et broyage, dans un mélange hydro-alcoolique (méthanol/eau 70/30 : V/V) trois fois sous agitation de temps en temps à la température ambiante et à l'obscurité, avec renouvellement du solvant toutes les 24 heures. Les extraits hydro-alcoolique sont réunies et évaporés sous pression réduite à une température inférieure à 50 °C jusqu'à l'obtention d'une solution visqueuse. Le résidu brut obtenu de couleur vert foncée est repris avec 150 ml d'eau distillée bouillante pendant une nuit, ensuite le mélange est filtré par une simple filtration. Après, on procède à l'affrontement par solvants organiques de polarité croissante [15]. La première est effectuée par un solvant apolaire (n-Hexane) pour éliminer les pigments et dégraisser la matière végétale [16], filtré et évaporé à sec sous pression réduite à température inférieure à 50 °C (extrait 1). La phase résiduelle est épuisée successivement par l'acétate d'éthyle puis séchée par le Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre, filtrée et évaporée à sec (extrait 2). Finalement, on suit la même procédure avec le n-butanol pour aboutir l'extrait 3 [17].

Le contrôle rapide de deux extraits 2 et 3 par la

chromatographie sur couche mince (CCM) confirme la présence des composés polaires de types flavonoïdes glycosylés détectés par l'apparition des taches visibles après révélation.

### 2.3 Extraction de l'huile essentielle

L'huile essentielle (HE) est obtenue par la méthode la plus appliquée au laboratoire de chimie organique. Par l'entraînement à la vapeur d'eau (100 g de la poudre végétale) et l'extraction liquide-liquide par un solvant organique de dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), après décantation, séchage par le sulfate de sodium Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtration et évaporation, on obtient un extrait huileux.

### 2.4 Étude de l'activité antibactérienne

La détermination de l'activité antibactérienne des produits naturels contenus dans l'huile essentielle, l'extrait d'acétate d'éthyle (extrait 2) et l'extrait butanolique (extrait 3) de la plante étudiée, a été effectuée au laboratoire de bactériologie à l'hôpital Hakim Saadane de Biskra, sur les souches bactériennes pathogènes suivantes : une de type gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et deux de type gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 2592).

#### 2.4.1 Technique de diffusion sur milieu gélosé (Antibiogramme)

La sensibilité des souches aux extraits de la plante a été réalisée par la technique, in vitro, de diffusion en milieu gélosé, ou méthode des disques [18]. Cette technique consiste à introduire le germe que l'on veut étudier à la surface du milieu gélosé (Muller Hinton), contenu dans des boîtes de pétri sur une épaisseur de 4 mm. Puis, on applique des disques imprégnés de substance chimique que l'on veut tester. On aperçoit les substances diffusées dans la gélose avec une forme circulaire. Après 18-24 heures, les disques apparaissent entourés d'une zone d'inhibition.

Dans cette étude, on a utilisé le papier Wattman N°3 coupé en disque de 6 mm. Ces derniers doivent avoir un contour régulier pour donner une zone d'inhibition facile à mesurer. Les disques, une fois préparés, sont placés dans une boîte de pétri (en verre) contenant 10 ml d'eau distillée et autoclavés pendant 20 mn à 120 °C.

#### Préparation de l'inoculum

Pour préparer l'inoculum, on racle 4 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques à partir d'une culture de 18h sur le milieu d'isolement, puis déchargées dans de l'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne est ensuite homogénéisée à l'aide d'un vortex et sa turbidité est ajustée à 0,5 Mc Farland, soit une densité optique égale à 0,08 à 0,10 ; lue à une longueur d'onde de 625 nm correspondant à 108 UFC/ml [19].

## L'ensemencement

Cette opération doit se faire dans les 15mn qui suivent la préparation de l'inoculum. On trempe un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, puis on fait flotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées. L'opération doit se faire deux fois en tournant la boîte de pétri d'un angle de 60° à chaque fois. Après l'application immédiate des disques, les boîtes sont laissées pendant 15mn à température ambiante, puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 h. Il faut noter que chacune des boîtes de pétri contient quatre disques et à l'aide d'une micropipette, on met sur chaque disque une concentration différente. Après incubation, la présence autour des disques d'une zone d'inhibition circulaire dans laquelle il n'y a pas de croissance de micro-organismes dénote la sensibilité de ceux-ci à cet extrait. Plus la zone d'inhibition est grande, plus le germe est sensible.

### 2.4.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus faible concentration ou bien la plus petite concentration de la substance, qui peut inhiber le développement des bactéries pendant 18 à 24 h à 37 °C. On peut les déterminer, soit en milieu liquide soit en milieu solide [20, 21]. La CMI est réalisée uniquement pour les extraits les plus actifs constatés lors des tests de sensibilité [22]. Elle est déterminée par la méthode de micro-dilution en milieu gélosé. Pour cela, on réalise une série des dilutions à partir de la solution mère (Tableau 1). Cette solution a été préparée en solubilisant 20 mg de l'extrait dans le méthanol. Une même quantité de bactéries de densité 105 µg/ml répartie dans une série de tubes contenant des concentrations croissantes de la substance de volume de 2ml pour chaque tube, après 18 heures d'incubation, on observe une croissance bactérienne (se traduisant par une turbidité du milieu visible à l'œil nu) dans les tubes contenant une faible concentration de l'extrait.

Tableau 01: Les différentes dilutions de la solution mère

Concentration initiale (µg/ml)	Volume (ml)	Volume d'eau distillée (ml)	Concentration finale (µg/ml)
2000	6.4	3.6	128
1280	2	2	64
	1	3	32
	0.5	3.5	16
80	0.5	7.5	8
	2	2	4
	1	3	2
5	0.5	3.5	1
	0.5	7.5	0.5
5	2	2	0.25

	1	3	0.125
--	---	---	-------

### 2.4.3 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La concentration minimale bactéricide (CMB) est la plus faible concentration de substance qui laisse au plus 0,01% de germes survivants. C'est la plus petite concentration d'une substance qui peut tuer les bactéries après 18 h de culture à 37 °C. On peut les déterminer, soit en milieu liquide soit en milieu solide [23, 24].

Pour déterminer la CMB nous avons procédé à des sous culture à partir des tubes qui ne contiennent aucune croissance bactérienne visible. Donc c'est la concentration minimale d'une sous culture dont il n'y a pas de poussée bactérienne.

## 3 RESULTATS ET DISCUSSION

### 3.1 Caractéristiques des extraits obtenus

Les résultats de l'extraction des composés flavonoïques par macération et l'huile essentielle par hydrodistillation de la plante *Teucrium Polium L.*, sont résumés dans le tableau 2. La détermination des rendements est réalisée à partir de poids des extraits obtenus, après évaporation à sec par rapport le poids initial. Les rendements sont calculés par la moyenne des trois essais pour chaque extraction et les résultats ainsi obtenus sont illustrés sur la figure 1. Ces résultats montrent que cette plante est riche en flavonoïdes et que le bon rendement est attribué à l'extrait butanolique, qui contient les flavonoïdes glycosylés [25, 26].

Tableau 02: Caractéristiques des extraits obtenus

Extraits	Extrait (1)	Extrait (2)	Extrait (3)	Huile essentielle
Aspect	Visqueux	Visqueux	Visqueux	liquide visqueux
Couleur	Vert	Vert-jaune	Marron foncé	Jaune
Odeur	Agréable	Faible	Forte	Agréable
Poids (g)	0.44	7.48	9.5	1.37

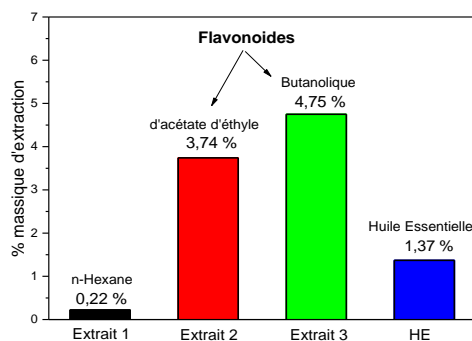


Figure 01: Rendements moyens des extraits de *Teucrium Polium*

L. exprimés en % massique

Tableau 03: Les zones d'inhibition sur les souches étudiées

SOUCHES BACTERIENNES	Zones d'inhibition des souches bactériennes (mm) dans les dilutions							
	Extrait butanolique				Extrait d'acétate d'éthyle			
	EXT	EXT/2	EXT4	EXT/8	EXT	EXT/2	EXT/4	EXT/8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	D 22 S ++	21 ++	16 +	15 +	16 +	00 -	00 -	00 -
<i>E-coli</i> ATCC 25922	D 00 S -	00 -	00 -	00 -	00 -	00 -	00 -	00 -
<i>Pseudo-Aeruginosa</i> ATCC 27853	D 00 S -	00 -	00 -	00 -	00 -	00 -	00 -	00 -

### 3.3 Résultats de la CMI et CMB des flavonoïdes

Les résultats de CMI (concentration minimale inhibitrice) et CMB (concentration minimale bactéricide) de l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait butanolique sont portés sur le tableau 4.

Tableau 04: CMI et CMB en ( $\mu\text{g/ml}$ ) de l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait butanolique sur la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Extrait	Butanolique	d'acétate d'éthyle
<b>CMI</b>	0.125 $\mu\text{g/ml}$	0.125 $\mu\text{g/ml}$
<b>CMB</b>	0.25 $\mu\text{g/ml}$	0.25 $\mu\text{g/ml}$

Les résultats portés sur (les tableaux 3 et 4) montrent que les réponses sont très variables en fonction de la souche testée, du type d'extrait et de la concentration utilisée. Ils permettent de mentionner que :

### 3.2 Résultats de l'antibiogramme des flavonoïdes

La détermination de la zone d'inhibition permet une estimation du caractère de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne vis-à-vis des extraits testés. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés par une règle, après 18 h d'incubation (tableau 3).

L'extrait est considéré comme bactéricide si aucune colonie n'est observée dans la zone d'inhibition. Par contre, il est dit bactériostatique quand quelques colonies sont présentes même en densité faible.

- Aucun des extraits étudiés n'est actif sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.

Vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* :

- L'extrait butanolique présente le meilleur résultat sur un diamètre élevé de la zone d'inhibition (22 mm) avec une CMI de 0,125  $\mu\text{g/ml}$  et CMB de 0,25  $\mu\text{g/ml}$ . son effet inhibiteur couvre aussi bien les bactéries Gram positif que celles Gram négatif.

- L'extrait d'acétate d'éthyle doué une activité intéressante sur *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de la zone d'inhibition (16 mm), une CMI de 0,125  $\mu\text{g/ml}$ , et CMB de 0,25  $\mu\text{g/ml}$ .

- Vis-à-vis les bacilles Gram - *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, l'absence d'une zone d'inhibition pour les extraits testées par la méthode des disques et liée à plusieurs facteurs : la charge de disque lors de l'imprégnation, l'aptitude d'extrait a diffusé correctement, la polarité et la solubilité des produits testés.

- Vis-à-vis les Cocci Gram + *Staphylococcus aureus*, La présence d'une zone d'inhibition bien appréciable autour des extraits testés permettant de constater une activité relativement importante.

- Cette espèce est significativement sensible aux deux

extraits avec des CMI extrêmement faibles montrant un effet bactériostatique.

- Les CMB obtenus pour les deux extraits étudiés sont plus proches de CMI, ce qui explique que les deux extraits testés ont un pouvoir bactéricide [27, 28].

### 3.4 Résultats de l'antibiogramme de l'huile essentielle

Les résultats obtenus après 24 h d'incubation à l'étuve à 37°C, sont rassemblés dans le tableau 5.

**Tableau 05: Zone d'inhibitions en mm de l'huile essentielle du *Teucrium Polium* L. sur les souches bactériennes testés.**

Souches bactériennes	Diamètre en (mm)			
	HE	HE/2	HE/4	HE/8
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	D 00 S -	00 -	00 -	00 -
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	D 00 S -	00 -	00 -	00 -
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	D 16 S +	14 +	13 +	12 +

D : diamètre de la zone d'inhibition ; S : Sensibilité ;

- : Résistante ; + : Sensible.

### 3.5 Résultats de la CMI et CMB de l'huile essentielle

Les valeurs obtenus des CMI et CMB de l'huile essentielle de la plante étudiée, sur la souche *S. aureus* portés sur le tableau 6.

**Tableau 06: Résultats CMI et CMB de l'huile essentielle du *Teucrium polium* L.**

	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<b>CMI</b>	1 µg/ml
<b>CMB</b>	2 µg/ml

Les tests que nous avons effectuée montrent que l'huile essentielle de cette plante a un effet négatif sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* où le diamètre d'inhibition est équivalent au diamètre de disque.

En effet une activité, remarquable vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, dont le diamètre de la zone d'inhibition (16 mm) avec une CMI "effet bactériostatique" de 1 µg/ml et CMB "effet bactéricide" de 2 µg/ml (Tableau 6).

L'huile essentielle obtenue est active sur les Cocci Gram positif et inactive sur les bacilles Gram négatif.

La CMI est proche de CMB ce qui montre le pouvoir bactéricide de l'huile essentielle de cette espèce de *Teucrium Polium*.

## 4 CONCLUSION

Ce travail fait partie des travaux de recherches sur les extraits de la plante médicinale *Teucrium Polium* L. sous espèce *Thymoïdes*, de la famille *Lamiaceae* cultivée dans la région Beni souik de la wilaya de Biskra, il porte essentiellement sur l'étude de l'activité antibactérienne, in vitro, des extraits butanolique, d'acétate d'éthyle et l'huile essentielle, issus de la partie aérienne de la plante.

Cette étude a montré que ces extraits naturels ont une bonne activité antibactérienne particulièrement encourageante sur les Cocci Gram + (notamment la souche de choix *Staphylococcus aureus* ATCC 25923). Malheureusement aucune activité n'a été envisagée sur les Bacilles Gram - (particulièrement les souches : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichiacoli* ATCC 25922).

L'étude de l'activité antibactérienne a été effectuée selon la méthode de diffusion en milieu gélosé en déterminant la sensibilité des bactéries vis -à- vis des agents antibactériens et la méthode des micro-dilutions en milieu liquide en confirmant leur capacité d'inhiber la croissance bactérienne (effet bactériostatique) ou leur capacité de tuer les bactéries (effet bactéricide). La bonne activité intrinsèque des deux extraits et l'huile essentielle testés ont été objectivés par un pouvoir bactéricide, bactériostatique respectivement de 0,125 µg/ml et 0,25 µg /ml pour les deux extraits et 1µg /ml, 2µg /ml pour l'huile essentielle.

En effet, cette étude a pu montrer que les flavonoïdes et l'huile essentielle de la plante *Teucrium Polium* L. répandent au souci constant de l'industrie pharmaceutique de résoudre les problèmes thérapeutiques posés par les bactéries résistantes, notamment les Cocci Gram +. Les produits naturels testés augmentent les possibilités thérapeutiques de la plante *Teucrium polium* L. par une activité considérable notamment vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. Cette activité a été objectivée par des CMI et CMB extrêmement faible. Ces produits sont considérés comme des agents antibactériens de classe bactéricide en tant qu'il y a peu d'écart entre la CMI et la CMB.

## REFERENCES

- [1] Blumenhal, M.; Busse, N.; Goldberger, A., The complete commission E. monographs therapeutic guide to herbal medicine. Boston MA Integrative Medicines Communications 1998, 80-81.
- [2] Macheix, J.-J.; Fleuriot, A.; Jay-Allemand, C., Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques : 2005.
- [3] Gurib-Fakim, A., Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular aspects of Medicine 2006,27 (1), 1-93.
- [4] Benchelah, A.-C.; Bouziane, H.; Maka, M., Fleurs du Sahara, arbres et arbustes, voyage au coeur de leurs usages avec les Touaregs du Tassili. Phytothérapie 2004,2 (6), 191-197.
- [5] Redo, M.; Rios, J.; Villar, A., A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978–1988. Phytotherapy Research 1989,3 (4), 117-125.
- [6] Samdumu, F. B. Characterization of antimicrobial compounds from *Combretum paniculatum*, a plant with proven anti-HIV replication activity. University of Pretoria, 2007.
- [7] Yano, Y.; Satomi, M.; Oikawa, H., Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. International journal of food microbiology 2006,111 (1), 6-11.
- [8] Ashnagar, A.; Gharibnaseri, N.; Foroozanfar, S., Isolation and identification of the major chemical components found in the upper parts of *Teucrium polium* plants grown in Khuzestan province of Iran. Chinese Journal of Chemistry 2007,25 (8), 1171-1173.
- [9] Judd WS, Campbell C Botanique systématique une perspective physiologique. Ed. De Boeck Supérieur, Université s. a., Paris 2002, pp. 84-87.
- [10] Panovska, T.; Kulevanova, S.; Gjorgoski, I.; Bogdanova, M.; Petrushevska, G., Hepatoprotective effect of the ethyl acetate extract of *Teucrium polium* L. against carbontetrachloride-induced hepatic injury in rats. Acta pharmaceutica 2007,57 (2), 241-248.
- [11] Cavallo, J.; Chardon, H.; Chidiac, C.; Choutet, P.; Courvalin, P.; Dabernat, H.; Drugeon, H.; Dubreuil, L.; Goldstein, F.; Jarlier, V., Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie. Communiqué : 2006.
- [12] Békro YA, Békro JAM, Boua BB, TRA BFH, Ehilé EE. Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae). Rev Sci Nat. 2007;4:217-225.
- [13] Béourou S, Tuo K, Ouattara K, Touré AO, Meité S, Ako AAB, et al. Phytochemical screening of some medicinal plants used to treat malaria in Côte d'Ivoire (West Africa). Intern J of Chem and Pharm Sc ; 2014 2:919-925.
- [14] Parsaee, H., Shafiee-Nick, R. Anti-Spasmic and anti-Nociceptive effects of *Teucrium polium* aqueous extract. Iran Biomed J 2006 10(3): 145-9.
- [15] Torck, M.; Pinkas, M., Les flavonoïdes du genre *Vicia*. Biochemical systematics and ecology 1992,20 (5), 453-457.
- [16] Stocker, P.; Yousfi, M.; Djerridane, O.; Perrier, J.; Amziani, R.; El Boustani, S.; Moulin, A., Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. Biochimie 2004,86 (12), 919-925.
- [17] Djeridane, A.; Yousfi, M.; Nadjemi, B.; Vidal, N.; Lesgards, J.; Stocker, P., Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. European Food Research and Technology 2007,224 (6), 801-809.
- [18] Guérin-Faublée, V.; Carret, G., L'antibiogramme: principes, méthodologie, intérêt et limites. Journées nationales GTV-INRA 1999, 5-12.
- [19] Gachkar, L.; Yadegari, D.; Rezaei, M. B.; Taghizadeh, M.; Astaneh, S. A.; Rasooli, I., Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chemistry 2007,102 (3), 898-904.
- [20] Jorgensen, J.; Tumidge, J.; Washington, J., A (1999): Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C 1999, 1526-1543.
- [21] Orfila, J., Rickettsiales. LE MINOR, L., VERON, M. Bactériologie médicale. 2ème édition. Paris : Flammarion Médecine-Sciences 1989, 1069-1071.
- [22] Skandamis, P. N.; Nychas, G. J., Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. Journal of Applied Microbiology 2001,91 (6), 1011-1022.
- [23] Soussy, C., Antibiotiques, généralités. Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C. Précis de bactériologie clinique. Eska, Paris 2000.
- [24] Weber, M., Les pièges de l'antibiogramme. Revue Française des Laboratoires 2003, (352), 21-26.
- [25] Naghibi, F.; Mosaddegh, M.; Mohammadi Motamed, M.; Ghorbani, A., Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 2010, 63-79.
- [26] Havsteen, B. H., The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & therapeutics 2002,96 (2), 67-202.
- [27] Moussaid M, Elamrani AA, Berhal C, et al Comparative evaluation of phytochemical and antimicrobial activity between two plants from the Lamiaceae family: *Marrubium vulgare* (L.) and *Origanum majorana* (L.). (2012) Int J Nat Prod Res 1(1): 11-13
- [28] Ibewuiké, J.; Ogungbamila, F.; Ogundaini, A.; Okeke, I.; Bohlin, L., Anti-inflammatory and antibacterial activities of C-methyl flavonoids from *Pilistigmationnigii*. Society of Chemical Industry. John Wiley and Sons, Ltd 1997,61 (2), 186-190.