



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques

Référence / 2018

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté et soutenu par :

Boucif Hayat

Le :mardi 26 juin 2018

Evaluation de l'activité antimicrobienne des différentes extraits de *Ruta tuberculata* Forsk.

Mme. BEN ABDELLAH Fatima zohra	MAA	Université de Biskra	Président
Mme. SAIDI Asma	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme GUEROUI Mouna	MAB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire :2017 - 2018

Remerciements

Nous remercions tout d'abord le bon Dieu, le tout puissant, de nous avoir donné la force, la patience. j'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive connaissance à Mme SAIDI Asma ma directrice de mémoire à pour avoir encadré et dirigé ce Travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il m'a accordée m'ont permis de réaliser ce travail.

Je voudrais remercier également les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de par leurs propositions.

Je tiens enfin, à remercier tous mes amis et collègues, qui étaient là pour m'offrir un grand soutien moral durant la préparation de mémoire.

À tous les étudiants de master de la promotion 2018.

Enfin, je remercie toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédise ce modeste travail

Aux deux être les plus chères au monde qui ont souffert nuit et jour pour nous couvrir de leur amour :mes parents.

A mon père pour sa patience avec moi et son encouragement.

A ma source de bonheur la prunelle de mes yeux ma mère que le bon dieu vous garde en bonne santé.A tout ma famille

Et je n'oublie pas aussi mes amies Samira,fahima et warda avec qui j'ai passé mes meilleurs moments.Qui resteront un bon souvenir pour toujours.

A toutes mes collègues et amies de la promotion.

Table de matières

Sommaire

Remerciements	
Dédicace	
Table de matières.....	
Liste des tableaux	
Liste des figure.....	
Liste des abréviations	
Introduction générale	1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre1 : Activité antimicrobienne.....	
Infection microbienne et l'antibiothérapie.....	5
1. Antibiotiques ATB s et les agents antifongiques	5
1.1. Antibiotiques ATBs.....	5
1.2. Agents antifongiques.....	6
1.3. Mécanismes de résistance des microbes.....	7
Chapirte2 : Généralité sur la plante <i>Ruta tuberculata</i> Forske.....	10
Plante <i>Ruta tuberculata</i> forsk.....	10
1. Généralité sur la plante <i>Ruta tuberculata</i>	11
1.1. Classification systématique	11
2. Composition chimique du <i>R. tuberculata</i>	11
3. Usages traditionnels et vertus thérapeutiques du <i>R. tuberculata</i>	11
Chapitre3 : Métabolites secondaires.....	
1. Classes de poly phénols.....	14
1.1. Acide phénoliques	14
1.2. Flavonoïdes.....	15
1.3. Tanins.....	15

Table de matières

1.4. Huiles essentielles et composés terpéniques.....	15
2. Activité antimicrobienne des métabolites à base de plantes.....	16

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 3 : Matériel et méthode.....

1. Matériel	19
1.1. Matériel végétal.....	19
1.2. Réactifs chimiques.....	19
1.3. Souches microbiennes testées.....	19
2. Méthodes.....	20
2.1. Extraction aqueuse.....	20
2.2. Extraction hydro-alcoolique.....	20
2.3. Extraction acétonique.....	20
2.4. Extraction par l'acétate d'éthyle	20
2.5. Screening phytochimique des extraits du <i>R. tuberculata</i>	21
2.5.1. Caractérisation des polyphénols.....	21
2.5.2. Caractérisation des flavonoïdes.....	21
2.5.3. Caractérisation des tannins.....	22
2.5.4. Caractérisation des saponosides (Frothing test).....	22
2.5.5. Caractérisation des quinones libres.....	22
2.5.6. Caractérisation des anthraquinones.....	22
2.5.7. Caractérisation des sterols et polyterpènes (Lieberman- Burchard's test).....	23
2.6. Etude des activités antimicrobiennes du <i>R. tuberculata</i>	23
2.6.1. Activité antibactérienne	23

Table de matières

2.6.1.1. Repiquage et identification des souches	23
2.6.1.2. Préparation d'inoculum et l'application des disques.....	23
2.6.1.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	24
2.6.2. Activité antifongique.....	24
2.6.2.1. Préparation de suspensions des spores.....	24
2.6.2.2. Teste de l'effet antifongique.....	25
Chapitre4 :Résultats et Discussion.....	
1. Extraction.....	28
2. Screening phytochimique des extraits du <i>R. tuberculata</i>	29
3. Evaluation des effets antimicrobiens d'extraits du <i>R. tuberculata</i>	32
3.1. Identification des souches testées.....	32
3.1.1 Observation microscopique.....	32
3.1.2 Recherche de la catalase.....	32
3.1.3 Identification par le système API.....	33
3.2. Activité antibactérienne et Détermination de CMI.....	33
3.3. Activité antifongique.....	38
Conclusion	43
Bibliographie	47
Annexes	
Résumés	

Liste des tableaux

Tableau 1 :Mode d'action des antibiotiques (Perry <i>et al.</i> , 2004)	6
Tableau 2 :Mode d'action des substances antifongiques (Florence <i>et al.</i> , 2010).....	7
Tableau 3 :Screening phytochimique de différents extraits de la plante <i>R.tuberculata</i>	29
Tableau 4 :Resultats du test catalase	31
Tableau 5 :concentration minimales inhibitrices enregistrées par les différents extraits du <i>R.tuberculata</i> contre les souches testées.....	35
Tableau 6 :Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne enregistrés par les ABTs testés dans le présent antibiogramme	36

Liste de figure

Figure 1 :Photographie du <i>Ruta tuberculata</i>	10
Figure 2 : Methode de caracterisation des flavonoides de différentes extraits <i>R. tuberculata</i>	21
Figure3 . Microplaque préparée de suspension d' <i>Alternaria spp</i> 2×10^6 spores/ml en présence de différentes concentrations d'extraits de <i>R. tuberculata</i>	25
Figure 4 : Résultats du screening des composes phénoliques dans les quatres extraits du <i>R. tuberculata</i>	1
Figure5 :Tests biochimiques d'identification de la souche <i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
Figure 6 : Diamètres de zones d'inhibition de la croissance bactérienne enregistrés par les quatre extraits du <i>R. tuberculata</i> à concentration 300mg/ml.	34
Figure 7 : Zones d'inhibition induites par différents extraits du <i>R. tuberculata</i> sur certaines souches testées à concentration 300mg/ml	35
Figure 8 : Antibiogramme d'ATBs examinés sur certaines souches testées.....	37
Figure9 : Activité antifongique de différents extraits de <i>R. tuberculata</i> sur la souche <i>Alternaria sp.</i>	39
Figure10 : Activité antifongique de différents extraits de <i>R. tuberculata</i> sur la souche <i>Penicillium</i>	40
Figure11 : Activité antifongique de différents extraits de <i>R. tuberculata</i> sur la souche <i>Aspergillus</i>	40
Figure12 : Activité antifongique des quatre extraits de <i>R. tuberculata</i> sur la souche <i>Cladosporium</i>	41

Liste des abréviations

ATBs :antibiotiques

CMI :concentration minimal inhibitrice

CMF :concentration minimal fongicide

EMet :Extrait méthanolique

EAQ :Extrait aqueux

EAc :Extrait acétonique

EAcE :Extrait d'éthyle acétate

PDA :Potato Dextrose Agar

PDB: Potato Dextrose broth

AMX: Amoxicilline

SXT: Triméthoprine + Sulfamithoxazol

TCC: Ticarcilline + Acide clavulanique

C30: Chloramphénicol

CN: Gentamicine

CZ: Cefazoline

Introduction

Introduction

Avec le temps, l'expression « Microbiologie médicale » est devenue de plus en plus vague. Actuellement, elle regroupe plusieurs disciplines principalement la bactériologie, la virologie, la mycologie et la parasitologie qui sont englobées dans le même contexte car elles sont toutes à base d'agents infectieux causant des maladies infectieuses chez l'homme (Joklik *et al.*, 1980).

L'organisme humain, constamment exposé à une multitude de microbes (bactéries, virus, parasites, champignons), possède un système complexe de défense qui lui permet de rencontrer ou d'héberger ces microbes sans leur permettre d'envahir ses tissus (Hart *et al.*, 1979 ; Hille *et al.* 1964) mais, dans certaines conditions, l'infection peut entraîner une maladie infectieuse grave (Patrick *et al.*, 1988).

Par ailleurs, la maîtrise des infections bactériennes et fongiques devient complexe et difficile, du fait de l'émergence de bactéries et de champignons résistants à de nombreux antimicrobiens conventionnels. En effet, nombreuses études ont rapporté que certaines bactéries semblent être multi-résistantes (Benbachir *et al.*, 2001; Kacou *et al.*, 2001; Akoua *et al.*, 2004). Pourtant, la plus part de ces infections sont comptées parmi les maladies opportunistes, surtout chez les personnes immunodéprimées et les sujets âgés. Toutefois, la thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multi résistantes d'où l'importance d'orienter les vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (Billing et Sherman, 1998).

En effet, les principes actifs d'origine végétale utilisant en pharmacothérapie sont souvent liés aux métabolites secondaires, principalement les composés phénoliques tels les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins et les huiles essentielles ou les dérivés terpéniques, qui résultent d'un métabolisme secondaire au sein des plantes médicinales (Bourgaud *et al.*, 2001; Kar, 2007). Principalement, les polyphénols constituent le groupe de molécules le plus largement distribué dans la règne végétale, avec plus de 8000 structures phénoliques, qui représentent nombreuses propriétés thérapeutiques très intéressantes (Lugasi *et al.* , 2003). En effet, les flavonoïdes sont considérés comme un très bon agent antimicrobien grâce à leur structure caractérisée par la présence de groupe phénolique et d'autres fonctions chimiques (Harbone et William, 2000).

Parmi ces plantes, le *Ruta tuberculata*, l'une des plantes aromatiques qui s'appartient de la famille *Rutacée*. Elle est largement utilisée en médecine traditionnelle (Dupont et Guigrard, 2012), pour ses vertus médicinales où elle est employée contre la fièvre, en cas de névralgies, et des infections parasitaires intestinales (Teuscher, 2005) En effet, l'activité antimicrobienne de différents extraits de *R. tuberculata*, contre les souches testées, a été démontrée par l'étude menée par Ould el haj (2003).

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail de recherche dont le but principal est d'effectuer une analyse phytochimique ainsi que d'évaluer les activités antimicrobiennes de différents extraits de *R. tuberculata* préparés à partir de sa partie aérienne. Dans la première partie de la présente étude, nous présentons une synthèse bibliographique qui regroupe trois chapitres dont le premier est consacré à Infection microbienne et l'antibiothérapie. Le deuxième chapitre concerne la plante à étudier et dans le troisième chapitre les métabolites secondaires à base de plantes sont discutés. Cependant, la deuxième partie a y compris le matériel utilisé et les méthodes appliquées dans ce travail qui a pour objectif de :

- Préparer différents extraits de la plante *R. tuberculata*
- Cribler ou Screening phytochimique des extraits de *R. tuberculata*
- Evaluer l'activité antibactérienne de différents extraits de *R. tuberculata*
- Evaluer l'effet antifongique de différents extraits de *R. tuberculata*

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1

Activité antimicrobienne

Infection microbienne et l'antibiothérapie

Les infections microbiennes sont des inflammation et des dommages tissulaires causées par les bactéries pathogènes, les virus, les parasites ou les champignons (Page *et al.*, 1999).. Les bactéries pathogènes sont capables d'envahir l'organisme et de s'y multiplier, généralement dans un site privilégié, pour cela elles ont besoin d'armes offensives leur permettant de franchir les barrières anatomiques, le plus souvent les muqueuses, et éventuellement d'agresser l'hôte par la libération de substances nocives ou des toxines. En effet, les infections bactériennes peuvent être transmises par différentes voies qui sont, fréquemment, les voies transcutanées, digestive au cours l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminées, par voie aérienne, conjonctivale ou génitale (Nauciel et vilde, 2005).

L'élimination des microorganismes pathogènes fait appeler à des substances dites antibiotiques ATBs qui ont la capacité soit de détruire les bactéries, effet bactéricide, ou d'inhiber leur croissance, effet bactériostatique (Haddouchi *et al.*, 1999). En effet, ces substances sont entièrement ou partiellement synthétisées chimiquement ou résultent d'une voie de biosynthèse d'autres microorganisme et sont ensuite extraits (Elghozi et Duval, 1992). La lutte bactérienne se repose essentiellement sur l'utilisation alors des antibiotiques qui inhibent sélectivement, chez lesquelles, certaines voies métaboliques sans exercer habituellement un effet toxique sur les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (Bergogne-Berezin *et al.*, 1995). Toutefois, certaines bactéries pathogènes peuvent résister aux moyens de lutte, principalement à certains antibiotiques, c'est le cas de nombreux Staphylocoques d'origine animale tels *staphylococcus aureus* et *staphylococcus intermedius* (Lloyd *et al.*, 1996 ; Guérin-Faubleé et Brun, 1999 ; Werckenthin *et al.*, 2001 ; Prescott *et al.*, 2002), *Candida albicanc* (Ochiai *et al.*, 2000) et *Aspergillus fumigatus* (Mortellaro *et al.*, 1989).

1. Les antibiotiques ATBs et les agents antifongiques

1.1. Antibiotiques ATBs

L'antibiotique est défini comme tout composé chimique, élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse, à coefficient chimio-thérapeutique élevé dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de

certaines processus vitaux, à l'égard des virus, des micro-organisme ou même de certain être pluricellulaire (Tableau.1).

Tableau 1 :Mode d'action des antibiotiques(Perry *et al.*,2004)

Antibiotique	Mode d'action
Pénicilline	Bloque les trans-peptidation dans la synthèse de la paroi cellulaire.
Erythromycine	Se lie aux sous unités ribosomique 50S et arrête la peptidyl-transférèse.
Chloramphénicol	Se lie aux ribosomes, bloquant la peptidyl-transférèse
Rifampicine	Bloque la transcription par l'ARN polymérase.
Tyrocidine	Ionophore altérant l'intégrité et le fonctionnement de la membrane cellulaire.
Streptomycine	Inhibe les ribosomes 30S, et bloque l'incorporation des acides aminés dans les peptides.

1.2. Agents antifongiques

Les champignons pathogènes constituent les principaux agents infectieux chez les plantes, en causant de nombreuses altérations particulièrement dans les légumes et les fruits. En effet, Il s'agit d'une grande variété de germes fongiques qui peuvent effectuer des problèmes liés à l'aspect organoleptique, durée de conservation limitée et caractéristiques (Agrios, 2004). Plus les infections fongiques systémiques ou profondes ne deviennent fréquentes en nombre mais aussi en diversité des espèces incriminées, et en gravité. Ces infections sont la cause d'une importante morbidité et conduit parfois à la mortalité (Chavante, 1997). Il s'agit d'infections invasives et sévères qui se diffusent dans le corps provoquant une atteinte grave d'un ou plusieurs organes.

Les substances antifongiques sont utilisé alors dans trois domaine en thérapeutique humaine et vétérinaire (antifongiques systémiques ou topiques), dans l'industrie alimentaire (conservateurs) et en alimentation animale, pour la prévention et le traitement des atteintes fongiques des plantes, du bois de construction ou d'autres matériaux .En effet, les antifongiques d'origine microbiologique utilisés actuellement en clinique sont essentiellement de structure polyénique, notamment l'amphotéricine B et la nystatine (Bastide *et al.*, 1986). La recherche permanente affirme qu'il ya quatre classes de molécule ciblant les voies métaboliques distinctes sur une souche fongique, qui sont les fluoropyrimidines, les

polyènes, les dérivés azolés et les échinocandines (Vandeputte, 2008).

Selon l'origine et la structure, ces antifongiques sont classifiés en des agents de synthèse chimique, principalement les azolés et les fluoropyrimidines qui sont les plus utilisés en clinique et ils se caractérisent par leur structure cycliques organiques (Vandeputte, 2008), et les antifongiques naturels tels les polyènes, les échinocandines qui peuvent jouer le rôle d'inhibiteurs de la synthèse du β -(1,3) D-glucan, un composant essentiel à la paroi cellulaire de plusieurs champignons pathogènes (Carle *et al.*, 2003 ; Rautemaa *et al.*, 2008). Le mode d'action des agents antifongiques sont envisagés sur le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 : Mode d'action des substances antifongiques (Florence *et al.*, 2010)

Agent antifongique	Mode d'action
Amphotéricine B désoxycholate (Fungizone)	Complexe avec l'ergostérol et altération de perméabilité membranaire
Amphotéricine B liposomale (Ambisome)	Formulation liposomale d'amphotéricine B
Amphotéricine B complexe lipidique (Abelcet)	Complexe phospholipidique d'amphotéricine B
5-fluorocytosine (Ancotil)	Perturbation de la synthèse d'ADN de la synthèse protéique
Itraconazole (Sporanox)	Blocage du cyt P450 et de la C14 lanostérol déméthylase inhibant alors la synthèse de l'ergostérol membranaire

1.3. Mécanismes de résistance des microbes

Un problème d'importance croissante en pratique médicale est la résistance bactérienne aux agents antimicrobiens. En effet, un espoir avait suscité l'apparition de bactéries devenues résistantes avec l'apparition des premiers antibiotiques, les sulfamides en 1935 puis la pénicilline (Lemaoui *et al.*, 2017). Cela fait appeler l'évolution d'autres antibiotiques qui sont utilisés ultérieurement tels la streptomycine, le chloramphénicol, la tétracycline et érythromycine (vaubourdolle, 2007). Cette résistance soit naturelle liée à la patrimoine génétique de bactéries elles-mêmes et présente chez tous les membres d'une même espèce ou d'un même genre bactérien (Nauciel et Vildé, 2005), soit acquise due à l'acquisition de gènes étrangers de résistance pouvant provenir de la même espèce ou d'espèces bactériennes différentes et les transmis par des éléments génétiques mobiles tels que les plasmide, les transposons, les phages et les intégrons ou à des mutations chromosomiques (García-Ruiz *et al.*, 2008 ; Kempf et Zeitouni., 2009) . Dans ce contexte, les mycoses peut être considérer

comme des maladies infectieuses très contagieuses due au développement de champignons pathogènes qui touchent différents tissus et organes chez l'homme ou chez l'animal (Guillot, 1999).

Chapitre 2

Généralité sur la plante

Ruta tuberculata Forsk

La plante *Ruta tuberculata* forsk.

1. Généralité sur la plante *Ruta tuberculata*

Ruta tuberculata Forsk. (ou *Haplophilium tuberculatum*) est un petit arbuste, de 20 à 50cm d'hauteur, largement distribué dans la région méditerranéenne, de plus généralement sur les pentes rocheuses (Miller *et al.*, 1988 ; Di Stasi *et al.*, 2002 ; Iauk *et al.*, 2004). Cette espèce, appartenant à la famille de Rutacée, se caractérise par des petites feuilles lancéolées cunéiformes très allongées et enroulées en dessous, arrondies et pennatiséquées ou pennées. Les fleurs et le feuillage aromatiques, sont le principal attrait des rues. ses fleurs, jaunes, fimbriées ou dentées, à quatre ou cinq pétales, s'épanouissent en cymes terminales (Mioulane, 2004).

La plante émet une odeur très forte plutôt désagréable et le gout de ses feuillet est très amer et acre (Durande, 1782). La face supérieure des feuilles ainsi que la tige sont couvertes de pustules sécrétant une essence extrêmement malodorante. On la trouve dans tout le bassin méditerranéen et en Asie occidentale et centrale. C'est une espèce commune dans tout le Sahara septentrional, dans les dépressions sablonneuses, jusqu'au Tademaït au sud, qui semble être absente ou très rare dans le Sahara central et méridional (Quezel, 1963 ; Ozenda, 1991 ; Chehma, 2006 ; Paquereau, 2013).



Figure 1 : Photographie du *Ruta tuberculata*

1.1. Classification systématique

Ruta tuberculata est un arbuste qui se classifié comment suivant

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta (plantes vasculaires)

Division : Magnoliophyta (plantes à fleurs)

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Rosidae

Ordre : Sapindales

Famille : Rutaceae

Genre : *Ruta*

Espèce : *Ruta tuberculata* forsk.

Nom vernaculaire: Faijel.

2. Composition chimique du *R. tuberculata*

Les espèces du genre *Ruta* occupent une intéressante place dans la phytothérapie et leurs composés présentent un large d'activités biologiques (Ulubelen *et al.*, 1986). La plante *Ruta tuberculata* contient plus de 120 composés de différentes classes de métabolites secondaires tels que les alcaloïdes de l'acridone, les coumarines, les flavonoïdes et aussi les huiles essentielles (Kuzovkina *et al.*, 2004). A ce jour, les scientifiques en ont identifié plus de 8000 constituants dans les espèces du *Ruta*, allant de molécules simples à des composés hautement complexes, qui sont regroupés en différentes classes aux noms de poly phénols tels les dérivés d'acides cinnamiques et d'acides benzoïques, de flavonoïdes, de lignines et lignanes, de triterpènes et des huiles essentielles, de coumarines et de tanins (Zellagui, 2012).

3. Usages traditionnels et vertus thérapeutiques du *R. tuberculata*

Ruta tuberculata est utilisé fréquemment dans la médecine traditionnelle dans le traitement du paludisme, la polyarthrite rhumatoïde et contre certaines maladies gynécologiques (El-Naggar *et al.*, 2014). En effet, cette espèce est utilisée pour traiter des spasmes digestifs, des algies articulaires, et des accouchements difficiles (Maiza *et al.*, 1993).

En outre, cette plante est surtout réputée en médecine traditionnelle pour ses vertus médicinales en cas de la perte d'appétit et d'hystérie, de fièvres, de névralgies, des infections parasitaires intestinales, d'hypertension artérielle et en troubles menstruelles (Teucher, 2005).

Les espèces du *Ruta* constituent une source de diverses classes de produits naturels tels que les flavonoïdes, les alcaloïdes, les huiles essentielles, coumarines, des phénols, des saponines lignanes, et triterpènes, qui présentent des activités biologiques, y compris l'activité antifongique, antibactériennes, antioxydantes, phytotoxiques, abortive, dépresseur et des activités anti-inflammatoire (Kuzovkina, 2009). En effet, les polyphénols peuvent exercer de nombreuses activités biologiques qui parmi le quelles l'activité antioxydant et fournissent ainsi aux cellules de notre organisme une protection contre les méfaits causés par le vieillissement (Hernes *et al.*, 2001).

Chapitre 3

Métabolites secondaires

Les plantes autotrophes sont capables de synthétiser, par une voie du métabolisme secondaire, des molécules organiques complexes et les accumulent en petites quantités, s'appellent les métabolites secondaires. Principalement, ils sont subdivisés en trois grandes familles, celle de polyphénols, de terpènes et d'alcaloïdes (Lutge *et al.*, 2002 ; Abderrazak et Joel, 2007).

Les composés phénoliques à base de végétaux se caractérisent par l'existence dans leur structure d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou bien engagé dans une autre fonction comme ether, ester, hétéroside...etc. (Bruneton, 1999; Lugasi *et al.*, 2003). En effet, les polyphénols constituent le groupe de molécules le plus largement distribué dans la règne végétale, avec plus de 8000 structures phénoliques (Lugasi *et al.*, 2003).

1. Classes de polyphénols

Les principales classes de composants phénoliques sont les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines, les acides phénoliques comme l'acide caféique, l'acide hydroxycinnamique et l'acide chlorogénique (King et Young, 1999 ; Tapiero *et al.*, 2002). Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C6 (non présent naturellement chez les végétaux, aux flavonoïdes en C15 et à des molécules proches sauf exception, ces substances sont présentes sous forme soluble dans la vacuole (Habauzit et Harcojada, 2008).

1.1. Acide phénoliques

Cette classe est subdivisée à son tour en deux sous-classes. D'une part, les acides hydroxy-benzoïques qui sont des dérivés de l'acide benzoïque. Ils ont une structure générale de base de type (C6-C1). En effet, ces acides se trouvent, le plus souvent, sous forme d'esters ou de glycosides (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006). D'autre part, les acides hydroxycinnamiques dérivent de l'acide cinnamique et ils ont une structure générale de base de type (C6-C3). Cependant, ils occupent sous forme combinée avec des molécules organiques les vacuoles au sein de la cellule végétale. Toutefois, les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, induisent une réactivité chimique importante au sein de ces molécules, particulièrement, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide p-coumarique et l'acide sinapique qui sont utilisés comme des antioxydants standards au cours des différents tests (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

1.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent une classe principale de polyphénols, ils sont des pigments quasiment universels des végétaux souvent responsables de la coloration des fruits, des fleurs et parfois des feuilles. Les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides dans l'état naturel (Ghestem *et al.*, 2001; Bruneton, 1999). Selon la structure, ces substances se répartissent en plusieurs sous-classes de molécules, en effet plus de 6400 structures ont été identifiées (Harborne et Williams., 2000).

Les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun une structure du diphenylpropane (C6-C3-C6), où les trois carbones servent de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B, en formant généralement un hétérocycle oxygéné C. L'existence des différentes classes structurales des flavonoïdes serait fonction des modifications de l'hétérocycle C (De Rijke *et al.*, 2006).

1.3. Tanins

Les tanins constituent un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire. Ils sont, de ce fait, des molécules fortement hydroxylées et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, en réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Comme, ils peuvent être liés à la cellulose et à de nombreux éléments minéraux (Alkurd, 2008).

1.4. Huiles essentielles et composés terpéniques

Une huile essentielle est définie comme le produit obtenu d'une plante ou certaines parties de celle-ci par hydrodistillation, distillation à la vapeur, ou d'autres méthodes avec ou sans chauffage (Rubiolo *et al.*, 2010). Ce sont des liquides huileux aromatiques, volatils, caractérisés par une forte odeur, souvent colorés, et généralement avec une densité inférieure à celle de l'eau. Ils peuvent être synthétisés par tout organe végétal (fleurs, bourgeons, graines, feuilles, brindilles, écorces, herbes, bois, fruits et racines) et stockés dans des cellules sécrétoires, des cavités, des canaux, des cellules épidermiques ou des trichomes glandulaires (Burt, 2004 ; Bakkali *et al.*, 2008).

Particulièrement, les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unités isopréniques à 5 atomes de carbone (C₅H₈). Les polyterpènes ont alors pour formule générale (C₅H₈)_n où n peut varier de 9 à 30. Néanmoins, les terpénoïdes sont des

terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques telles le groupement alcool, aldéhyde, cétone ou acide (Bakkali *et al.*, 2008).

2. Activité antimicrobienne des métabolites à base de plantes

Les substances antifongiques et antibiotiques disponibles ne réunissent pas les critères définissant l'agent antimicrobien idéal. De ce fait, l'industrie pharmaceutique et nombreuses études microbiologiques se sont orientées vers la recherche de nouvelles molécules moins progressives pour l'organisme et plus performantes. Actuellement, nombreuses recherches ont démontré que les différents tissus des végétaux quelques soient les feuilles, les racines, les fleurs, les grains possèdent des propriétés inhibitrices contre nombreuses souches bactériennes, de champignons, et de parasites (Davicino *et al.*, 2007).

En effet, les flavonoïdes sont considérés comme un très bon agent antimicrobien grâce à leur structure caractérisée par la présence de groupe phénolique et d'autres fonctions chimiques (Harbone et William, 2000). Les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où leur reconnaissent des activités antivirales, anti-tumorales, anti inflammatoires, anti- allergiques, anti-cancéreuses, antispasmodiques, hypocholestérolémiants, diurétiques, et antibactériennes (Bruneton, 1999). Par ailleurs, les tannins favorisent la régénération des tissus en cas de blessure superficielle ou de brûlure, ils exercent un effet anti diarrhéique, antiseptique, antibactérien et antifongique (Bruneton, 1999).

Une huile essentielle contient souvent de 50 à 100 molécules différentes et peut à l'extrême en comprendre jusqu'à 300 travaillant en synergie pour donner à l'huile essentielle ses propriétés (Lahlou, 2004). Il est impossible de reproduire en laboratoire cette complexité présente à l'état naturel. C'est ce qui explique notamment la grande efficacité des huiles essentielles dans le cadre de la lutte contre les bactéries, les champignons ou les virus (Chassing; 2006). Différentes études récentes ont confirmé, *in vitro*, l'activité antimicrobienne de diverses huiles essentielles (Hili *et al.*, 1997 ; Billing et Sherman, 1998)

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 3

Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

La plante *Ruta tuberculata* a été récoltée en Décembre 2017, dans la commune de Ras EL miaad (wilaya de Biskra). L'identification de l'espèce, qui va être étudiée, a été identifiée par Dr. Salem-CourN. (Centre de recherche scientifique et technique des régions arides - Biskra). La partie aérienne de la plante (feuilles, tiges et fleurs) nettoyée avec de l'eau de robinet et séchée dans un place sec et aéré, à l'abri de la lumière du soleil et à une température ambiante durant quelque jours. Après le séchage la plante a été broyée manuellement avec un mixeur et conservée dans des sacs en papier jusqu'à son utilisation.

1.2. Réactifs chimiques

Tous les solvants et les produits chimiques utilisés dans le présent travail proviennent de la marque Sigma (allemande) et Fluka (France), Ils sont :

- Solvants d'extraction : Méthanol, Acétone, Ethyle acétate, Ether de pétrole
- Diméthylesulfoxyde (DMSO)
- Chlorure ferrique ($FeCl_3$), acide chlorhydrique (HCl)
- Magnésium, acétate de sodium
- Réactif de stiasny (10ml de formaldéhyde+5ml d'HCl concentré)
- Les milieux de culture : Mac-conkey, Muller –Hinton, Milieu Potato Dextrose Agar (PDA) et Milieu Potato dextrose broth (PDB).
- Antibiotiques : Amoxicilline (AMX) , Triméthoprime + sulfamithoxazol (SXT), Ticarcilline + acide clavulanique (TCC) , chloramphénicol (C30) , Gentamicine (CN) Cefazoline (CZ).

1.3. Souches microbiennes testées

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont les suivantes : *Staphylococcus aureus* (25923), *Escherichia coli* (25922) , *Pseudomonas aeruginosa* (27853) et *Klebsiella pneumoniae* (Souches hospitaliers pathogènes). Elles proviennent du laboratoire de bactériologie Hakim Saadan de Biskra dans des boites de pétri contenant un milieu de culture spécifique pour chacune. Cependant, les souches fongiques employées sont : *Alternaria spp*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium spp* et *Cladosporium spp* proviennent des travaux d'étude en master promotion 2017 /2018. Elles sont des souches cliniques à l'origine de nombreuses maladies infectieuses, c'est pourquoi nous avons les choisis où elles ont été conservées à 4°C jusqu'à l'utilisation

2. Méthodes

2.1. Extraction aqueuse

Après séchage dans un endroit sec et aéré et à l'abri de la lumière du soleil, la partie aérienne de la plante *R. tuberculata* broyée entièrement (200g) est mise à décoction selon la méthode décrite par Ratheesh et Helen (2007) dans d'eau distillée à ébullition avec agitation pendant 15min, puis la solution a été filtrée et séchée dans l'étuve à 40°C. Un extrait aqueux cristallin jaune obtenu (EAQ) est ensuite conservé à -4°C jusqu'à son utilisation.

2.2. Extraction hydro-alcoolique

La partie aérienne recueillie du matériel végétal a été soigneusement lavée et séché à l'ombre. Selon la méthode décrite par Bekheet *et al.* (2011), le matériel végétal en poudre trempé du *Ruta tuberculata* 10 % (w: v) a subi une macération dans du méthanol à 80% à l'ombre pendant 48h à température ambiante. Après filtration sous vide, le filtrat a subi l'évaporation (thermo spectronic, USA) puis séchés afin de récupérer un extrait brut (EMet) cristallin verdâtre. L'extrait est conservé à -4°C.

2.3. Extraction acétonique

L'extrait acétonique (EAc) de la plante *R. tuberculata* a été préparé selon la méthode de (Senthilkumar *et al.*, 2005) par macération dans du l'acétone 10% (w : v) sous agitation douce à température ambiante pendant 48h. Après filtration du mélange, l'acétone est ensuite éliminé du filtrat par évaporation (Heidolph, Hei-Vap, Allemande) à 40°C afin de récupérer un extrait brut verdâtre conservé à -4°C.

2.4. Extraction par l'acétate d'éthyle

La partie aérienne de la plante *R. tuberculata* (EAcE) a subi une extraction effectuée selon la méthode de Kacem *et al.* (2014) dans de l'acétate d'éthyle par macération de 100g de la matière végétale pendant 48h, à température ambiante et sous agitation. Le macérat est ensuite filtré sous vide et concentré sous pression (Heidolph, Hei-Vap, Allemande). Après séchage à 40°C, l'extrait obtenu a été conservé à -4°C.

2.5. Screening phytochimique des extraits du *R. tuberculata*

2.5.1. Caractérisation des polyphénols

La réaction au chlorure ferrique (FeCl_3) a permis de caractériser les polyphénols dans extrait végétal. Une goutte de solution méthanolique de FeCl_3 (2%) a été ajoutée à 2ml de chaque extrait EAQ, EMet, EAc et EAcE de la plante *R. tuberculata*. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou vert plus ou moins foncée est le signe de la présence de polyphénols (N'Geussan *et al.*, 2009)

2.5.2. Caractérisation des flavonoïdes

Selon la méthode de Ciulel (1982), la présence des flavonoïdes dans les différents extraits de *R. tuberculata* a été mise en évidence par la réaction à la cyanidine (Figure 2). En effet, les flavonoïdes sont responsables d'un dégagement d'hydrogène et de l'apparition d'une coloration allant de l'orange au rouge pourpre, en présence d'acide chlorydrique concentré et de quelques fragments du magnésium (Hadj-Salem, 2009, Aliyu *et al.*, 2011).

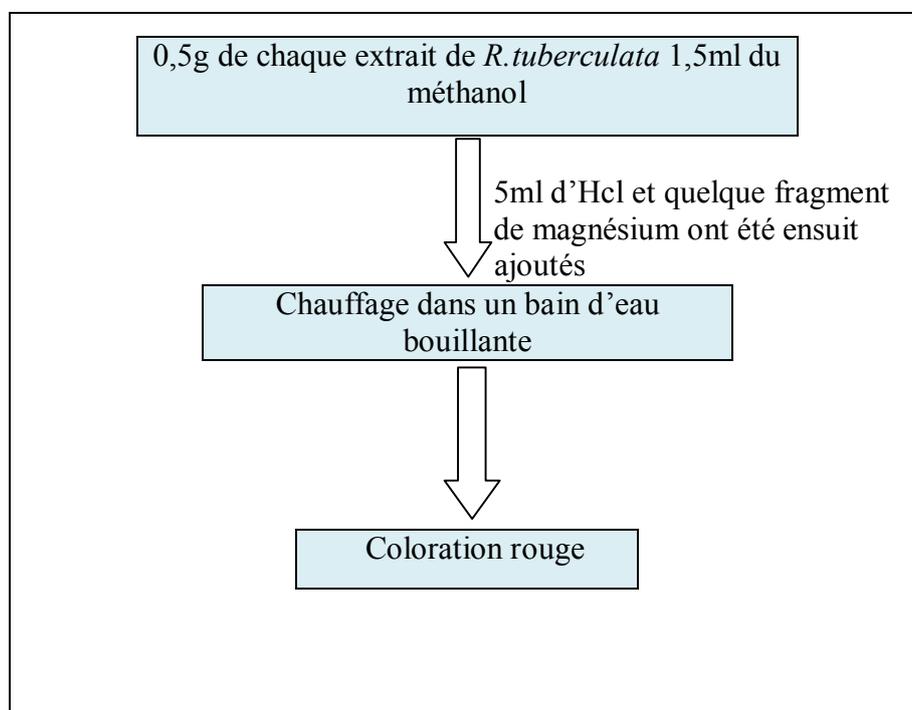


Figure 2 : Methode de caracterisation des flavonoides de differntes de differentes extraits *R.tuberculata*(Ciulel,1982)

2.5.3.Caractérisation des tannins

Une quantité de 2 à 3gouttes de FeCl_3 (1%) a été ajoutée à 1ml de chaque extrait. La couleur bleu de mélange vire vers au noir, en présence de tanins gallique, et au brun verdâtre, en

présence de tanins catéchique (Dohou *et al.*, 2003). Le réactif de stiasny a ensuite été utilisé afin de différencier convenablement entre les tanins galliques et cathéchiqes.

Pour cela, un volume de 15ml du réactif de stiasny a été ajouté à 5ml de chaque extrait. Le mélange est incubé au bain-marie à 80°C pendant 30min. L'observation d'un précipité en gros flocons reflète la présence des tanins cathéchiqes. Pour les tanins galliques, la solution précédente a été filtré, le filtrat est recueilli et saturé de sodium. L'addition de 3gouttes de FeCl₃ provoque l'apparition d'une coloration bleu-noire intense, signe de la présence de tanins gallique (N'Guessan *et al.*, 2009).

2.5.4.Caractérisation des saponosides (Frothing test)

La présence des saponosides dans les extraits aqueux et méthanolique de la partie aérienne de *R. tuberculata* a été déterminée qualitativement par l'apparition, après agitation, d'une mousse persistante pour plus de 15 à 30min. Dans ce contexte, une quantité de 1g de chaque extrait a été solubilisée dans du 10ml d'eau distillé et la solution a été agitée vigoureusement dans le sens vertical pendant 15 à 30s (Dohou *et al.*, 2003 ; Aliyu *et al.*, 2011). Après 15 min, la hauteur de la mousse a été mesurée, et lorsqu'elle plus d'un 1cm cala indique la présence de saponosides (N'Guessan *et al.*, 2009).

2.5.5.Caractérisation des quinones libres

Chaque extrait de la plante étudiée (0,05 %, w:v) a été préalablement préparé dans d'éther de pétrole. Après une agitation manuelle d'une minute et un repos de 24h, les extraits sont filtrés. La présence de quinines libres est confirmée par l'ajout de quelque gouttes de NaOH 10%, lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet (Dohou *et al.*, 2003)

2.5.6.Caractérisation des anthraquinones

Une quantité de 0,5g de chaque extrait a été préparée dans de chloroforme 10ml, Après une agitation manuelle d'une minute et un repos de 24h, les extraits sont filtrés et une petite quantité de KOH a été ensuite ajoutée à chaque préparation. Après agitation, l'identification des anthraquinones est confirmée par un virage de couleur de la phase aqueuse au rouge (Dohou *et al.*, 2003).

2.5.7.Caractérisation des sterols et polyterpènes (Lieberman- Burchard's test)

Les stérols et les poly-terpènes ont été recherchés par la réaction de Lieberman- Burchard's. Dans laquelle, les deux extraits de la plantes *R. tuberculata* (0.5g) sont additionnés chacun de 1ml d'anhydride acétique puis de 0.5ml de chloroforme, après dissolution, les solutions sont

transférées dans des tubes à essai auxquels sont ajoutés 0.5ml d'acide sulfurique concentré. L'apparition, à l'interphase, d'un anneau pourpre ou violet qui indique la présence des stéroïdes cette couleur vire au bleu puis au vert indiquant la présence des terpènes (N'Guessan *et al.*, 2009)

2.6. Etude des activités antimicrobiennes du *R. tuberculata*

2.6.1. Activité antibactérienne

Le principe d'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits consiste à réaliser une culture microbienne sur milieu solide, en présence de disques imprégnés de différents extraits à concentrations différentes. Si les extraits ont une activité antibactérienne, on observera une zone d'inhibition autour du disque. Le diamètre de cette zone d'inhibition est proportionnel à l'efficacité de l'activité antimicrobienne de l'extrait testé (Fattouch *et al.*, 2007)

2.6.1.1. Repiquage et identification des souches

Les différentes souches microbiennes, utilisées dans l'évaluation de l'effet antibactérien possible de différents extraits du *R. tuberculata*, ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24h. Ensuite, à l'aide d'une série de tests biochimiques ayant servi à l'identification des souches a été appliqué au laboratoire de Bactériologie Hakim saadan a y compris la coloration de Gram (Denis *et al.*, 2004), la production de catalase (Dellaras, 2007) et la galerie biochimique API20^E (Leyral *et al.*, 1998).

2.6.1.2. Préparation d'inoculum et l'application des disques

L'activité antibactérienne de différents extraits du *R. tuberculata* a été évaluée par la méthode de diffusion, en milieu gélosé, décrite par Bauer *et al.* (1966) et reprise par Barry *et al.* (1985). A partir de colonies jeunes de 18 à 24 h, une suspension bactérienne est réalisée dans l'eau distillée stérile pour chaque souche. La turbidité de cette suspension est ajustée à 0,5 Mc Farland puis diluée au 1/100. On obtient alors un inoculum estimé à 10⁶ unités Farland colonie par millilitre (Ufc/ml).

L'inoculum est ensuiteensemencé par inondation sur des boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller-Hinton (SFM, 2008). Les disques imprégnés de différents extraits à différentes doses (100,200,300mg/ml) sont ensuite délicatement déposés à la surface de la gélose. L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque (Doughari *et al.*, 2007 ; Attou, 2010). Des témoins

négatifs (disques imprégnés d'une solution DMSO ou d'eau distillée) ont été testés. Tous les essais ont été répétés trois fois.

Après diffusion, les boîtes sont incubées pendant 18 à 24h à 37 °C. L'effet engendré par les différents extraits examinés se traduit par l'apparition autour de disque d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible (Choi *et al.*, 2006; Doughari *et al.*, 2007; Attou, 2010). Plus le diamètre de cette zone d'inhibition de croissance est grand plus la souche est sensible, plus l'activité antibactérienne de l'extrait est importante (Choi *et al.*, 2006).

2.6.1.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Une gamme de cinq concentrations décroissantes de chaque extrait de *R. tuberculata* a été effectuée par dilutions successives de raison 1/2 à partir d'une solution mère de 450 ou 500mg/ml, ça dépend de la concentration mère de chacun d'extrait. Dans des tubes à hémolyse, l'ensemble d'inoculum bactériens, correspondent à des suspensions bactériennes de 10⁸ à 10⁶ bactéries/ml, ont été préparées à partir d'une culture jeune de 24h dans un bouillon nutritif Mueller-Hinton. Chaque inoculum a subi une dilution en milieu liquide, en présence de l'extrait qui dissout dans de DMSO, et la croissance bactérienne se visualise par un trouble ou un culot bactérien. Après 24h d'incubation à 37°C, la CMI est estimée comme la faible concentration, parmi les cinq concentrations examinées de chaque extrait, correspond à celle en premier tube ne présentant ni un trouble ni un culot bactérien .

2.6.2. Activité antifongique

2.6.2.1. Préparation de suspensions des spores

Les champignons *Alternaria spp*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium spp* et *Cladosporium spp* ont été cultivés pendant 7jours à 27°C sur un milieu de la gélose à la pomme de terre et au dextrose PDA (OXOID, Hampshire, Angleterre). À partir de cette culture, les spores de champignons testés ont été ensuite recueillies dans le bouillon potato dextrose broth (PDB) sur des plaques d'agar comme décrit par Broekaert *et al.* (1990). La concentration des suspensions en spores a été déterminée, en utilisant une cellule malassez, et ajustée à 2 × 10⁶ spores. ml⁻¹ (Abril *et al.*, 2008).

2.6.2.2. Teste de l'effet antifongique

À partir d'une concentration initiale de l'ordre de 500mg/ml de chaque extrait EAQ, E Met, EAc de *R. tuberculata*, une série de différentes concentrations externes a été réalisée (31,25/62,5/125/250 mg/ml). Dans chaque puits d'une microplaque de 96puits, 100µl de la suspension de spores (2×10^6 spores/ml dans du PDB) sont additionnés à 100µl de différentes concentrations d'extraits. L'évaluation de l'effet inhibiteur exercé par l'extrait sur les spores est comparé aux puits contrôle négatif contenant 100µl suspension de spores et le même volume de DMSO, correspondant à la croissance maximale (Figure 4).

Après l'agitation, les plaques ont été incubées pendant les premiers 30min à 27°C. L'absorbance a été mesurée ensuite à 630nm dans un lecteur de plaque ELISA (BIOTEK) . Après 48h d'incubation à 27°C, la croissance a été enregistrée par la mesure de l'absorbance de chaque puits à 630 nm. Chaque concentration de chaque extrait est examinée dans de 3 puits (n=3).

Les pourcentages d'inhibition de la croissance ont été calculés selon la formule suivante :

$$I \% : \Delta C - \Delta T / \Delta C \times 100$$

ΔC : variation correcte dans l'absorbance de microculture des puits control négatif à 630nm.

ΔT : variation correcte dans l'absorbance de microculture des puits test à 630nm

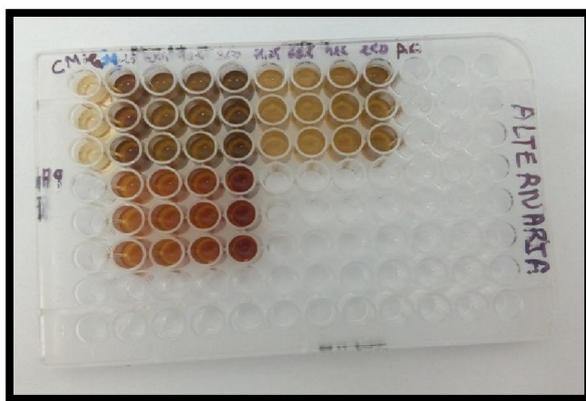


Figure3. Microplaque préparée de suspension d'*Alternaria spp* 2×10^6 spores/ml en présence de différentes concentrations d'extraits de *R. tuberculata*.

Etude statistique

L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide d'un logiciel de Excel stat 2007 .

Chapitre 4

Résultats et discussion

1. Extraction

L'étape d'extraction permet à nous d'attirer différentes espèces chimiques de plantes, selon le système solvant utilisé, et de calculer le rendement massique de cette plante en ces composés. Dans la présente étude, différents extraits ont été préparés à partir de la partie aérienne de *R. tuberculata*, en utilisant des solvants à polarité décroissante, il s'agit de l'eau distillée, le méthanol 80%, l'éthyle acétate et l'acétone, ce qui nous permet d'obtenir quatre extraits différents qui sont l'extrait aqueux EAQ en poudre (Thenmozhi, 2011), l'extrait méthanolique cristallin E Met (Bekheet *et al.*, 2001), l'extrait d'acétate d'éthyle EAcE et un autre acétonique EAc, qui se caractérisent par un aspect pâteux (Kacem *et al.*, 2014).

L'extrait brut E Met que nous avons l'obtenu se caractérisé par un aspect cristallin de couleur verdâtre et un rendement égal à 19.74% qui a constitué le rendement le plus élevé, suivi par celui de l'EAQ de l'ordre de 14.5%. Cependant, les rendements d'extraits E AcE et E Ac semblent être les plus faible avec des proportions égales à 1,62 et 1,32%, respectivement. En plus de la méthode d'extraction appliquée, le système solvant utilisé est l'un des facteurs essentiels qui influencent le rendement d'extraction et la qualité de l'extrait, autrement dit la pureté des principes actifs extraits (Tabart *et al.*, 2007).

De point de vue comparatif, le rendement d'EMet obtenu dans le présent travail s'avère plus important et plus élevé trois fois que celui reporté (3,75%) par El-said *et al.* (1990) qui ont étudié le même extrait de la partie aérienne de l'espèce *R. tuberculata*. La différence peut se résider dans les méthodes d'extraction appliquée où ils ont effectué l'extraction par soxlet, à température très élevée à long duré, ce qui peut provoquer la dégradation plus au moins importante de métabolites sensibles tels les composés phénolique (Andersen Et Markham, 2006) ce qui n'est pas le cas dans notre étude où l'extraction a été faite à froid par simple macération.

En effet, plusieurs facteurs peuvent influencer le contenu de la plante en molécules bioactives notamment ses propriétés génétiques et le degré de maturité de plante, le moment de la récolte (Ozguven et Tanis, 1998 ; Bruneton, 1999 ; Chahboun *et al.*, 2015). De plus, Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée, à chaud ou à froid, affectent tous le contenu en phénols et en flavonoïdes, et par conséquent, affecte le rendement et les activités biologiques de la plante qui s'attribuent à son contenu en ces métabolites (Lee *et al.*, 200)

En outre, l'utilisation des solvants à polarités différentes permet de séparer les composés phénoliques selon leur degré de solubilité dans chaque solvant (Koffi *et al.*, 2010 ; Mahmoudi *et al.*, 2013). Leur solubilité dépend également de leur nature chimique et leur degré de polymérisation. Cette diversité structurale est responsable de la grande variabilité des propriétés biologiques des polyphénols (Garcia-Salas *et al.*, 2010). En effet, les solvants organiques comme l'acétate d'éthyle et l'acétone permettent d'extraire aussi bien les flavonoïdes aglycones comme le flavonol (Yakubu, 2015) et les composés apolaires comme les saponine, les tannins, les terpenoïdes, les alcaloïdes et les stéroïdes (Hassan *et al.*, 2007 ; Shinkafi, 2013). Par contre, l'eau et les systèmes hydro-alcooliques permettent d'entraîner les métabolites polaires et à polarité moyenne.

2. Screening phytochimique des extraits du *R. tuberculata*

Dans le but de caractériser le contenu chimique de la plante *R. tuberculata* en métabolites secondaire, les extraits obtenus ont soumis à une série de criblage phytochimique qualitative dont les résultats sont présentés dans le tableau 3. La réaction au chlorure ferrique ($FeCl_3$) a permis de caractériser les polyphénols dans l'extrait végétal (N'Geussan *et al.*, 2009), nous avons noté, par ce test, l'apparition d'une coloration verte plus ou moins foncée, qui se varie d'un extrait à un autre, constitue alors le signe de la présence de polyphénols (Figure 5.A). Par ailleurs le dosage des flavonoïdes a été mis en évidence par la réaction à la cyanidine (Ciulel, 1982). L'obtention d'une couleur allant au rouge a indiqué la présence des flavonoïdes dans les différents extraits de la plante (Figure 5.B). De plus, un autre test nous permet de confirmer la présence des tannins (Figure 5.C) soit galliques ou catéchiques (Dohou *et al.*, 2003).

	Saponosides	Quinones libres	Anthraquinones	Stérols et polyterpènes	Polyphénols	Flavonoïdes	Tanins galliques	Tanins condensés
EAQ	+	-	-	+++	++	++	+	++
EMet	+++	-	+	++	+	+++	+	++
EAcE	n	n	n	n	+	+	+	+
EAc	n	n	n	n	+	+	+	+

Tableau 3 :Screening phytochimique de différents extraits de la plante *R.tuberculata*.n:test non effectué;(+++):Fortement present;(++):Moyennement present;(+) :Faiblement present

Les résultats obtenus ont montré que la plante *R .tuberculata*, à des différents extraits, semble être riche en métabolites secondaires notamment en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins, à la fois, galliques et catéchiques. En outre, les extraits bruts EAQ et EMet de cette plante représentent tous les une richesse en saponosides et en stérols et poly-terpènes. Cependant, ils ont révélé une carence de quinones libres et anthraquinones.

En effet, les composés phénoliques sont des métabolites secondaires polaires et de polarité moyenne, ce qui explique la richesse de l'extrait EAQ en ces substances que l'EAc apolaire. Néanmoins, les flavonoïdes constituent une famille d'un large spectre des molécules polaire, à polarité moyenne et à faible polarité. Cela se lie alors à la nature chimique et la solubilité de ces espèces extraites avec les deux systèmes d'extraction appliqués sur la plante.

Nos résultats s'accordent avec ceux-ci trouvé au cours des travaux réalisés par l'équipe de chaibeddra et ses collaborateurs (2016), sur la même espèce, qui ont démontré la richesse de son extrait méthanolique en flavonoïde, ainsi que la présence des saponines et des tanins dans l'extrait aqueux a été également prouvé. En comparaison aux résultats obtenus dans notre étude, Daoudi *et al.* (2015) ont effectuée d'autre étude, qui dans laquelle, ils ont travaillé sur deux espèces du genre *Ruta*, le *R. chalpensis* et le *R. montana*. Ils ont comparé entre les deux espèces et trouvé que l'espèce *Ruta montana* est pourvue des tanins galliques et aussi bien des tanins catéchiques alors que l'espèce *Ruta chalepensis* ne présente que ce dernier groupe. Les travaux de cette équipe a révélé aussi que les tests de caractérisation des

saponines et des anthraquinones ont donné des résultats négatifs avec les deux espèces, au contraire, nos résultats semblent être positifs vis-à-vis les saponines et en accord avec eux concernant les anthraquinones. Cette différence remarquée entre les différentes espèces du *Ruta* peut s'expliquer par les caractères génotypiques caractérisant chaque espèce, l'origine géographique et les conditions climatiques dans lesquelles les trois plantes ont poussé, la saison de la récolte, les conditions et la durée de stockage et la méthode d'extraction appliquée (Raffo et al., 2002).

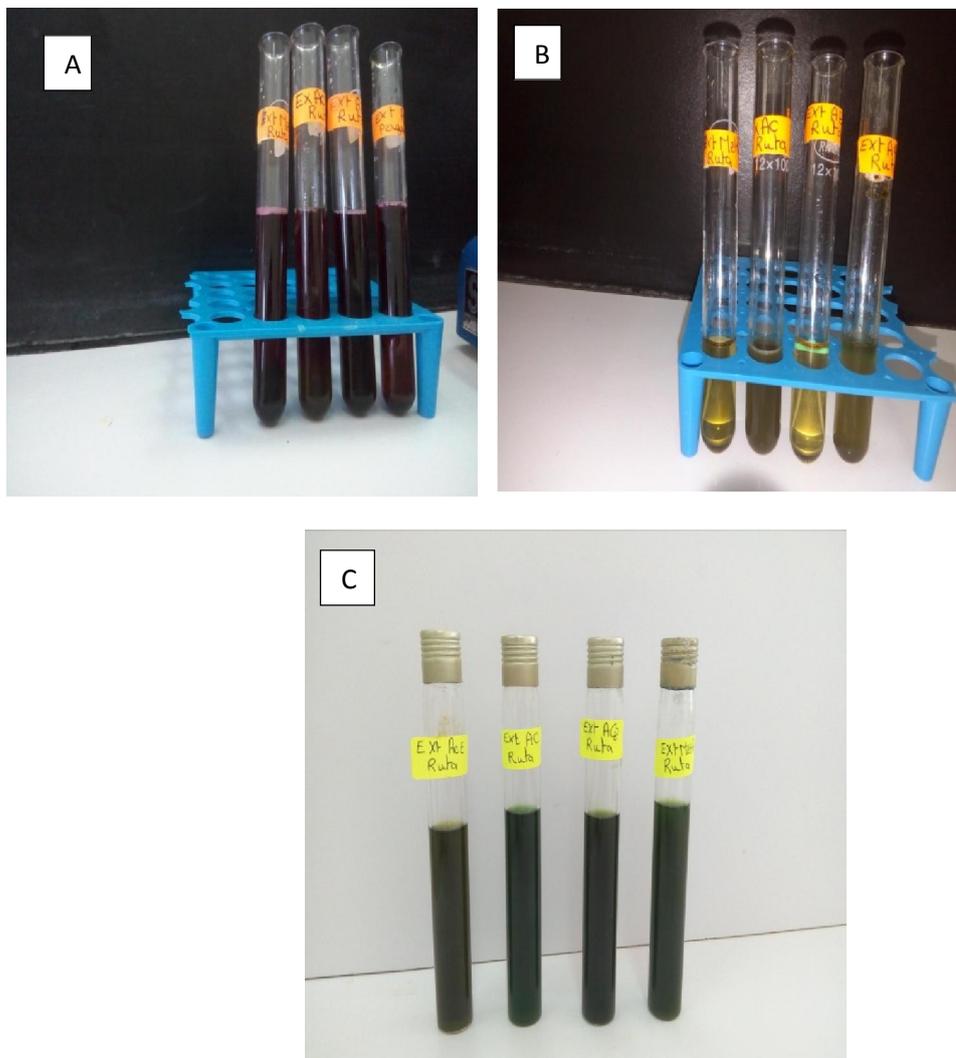


Figure 4: Résultats du screening des composés phénoliques dans les quatre extraits du *R. tuberculata*. (A) présence des polyphénols (B) présence des flavonoïdes (C) présence des tanins.

3. Evaluation des effets antimicrobiens d'extraits du *R. tuberculata*

3.1. Identification des souches testées

Afin de mettre en évidence l'activité antibactérienne des extraits de la plante *R.tuberculata* des microorganismes causant pour la plupart des infections urinaires et des maladies nosocomiales ont été testés. Après incubation de colonies isolées sur milieu spécifique pour chaque souche, Mac-conkey pour *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* et Chapman pour *S. aureus*, la pureté a été immédiatement vérifiée par l'examen à l'état frais puis la coloration de Gram, et le test de la catalase.

3.1.1 Observation microscopique

Nous avons révélé qu'il y a trois souches se sont présentées sous une forme de bacille colorées en rose (bacille à Gram négatif) et une souche qui est apparue sous forme de cocci colorées en violet (cocci à Gram positif).

3.1.2 Recherche de la catalase

La recherche de l'enzyme catalase a été réalisée par la dissociation d'une colonie isolée dans des gouttes de l'eau oxygénée. La présence d'une catalase se traduit par la formation de bulles d'oxygène (Freney *et al.*, 2007).

Les résultats du test sur la catalase effectués sur les souches sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4 : Résultats du test catalase

Nous avons révélé que les quatre souches testées sont de catalase positive.

3.1.3 Identification par le système API

La détermination des caractères biochimiques est indispensable pour l'identification précise des genres et des espèces bactériennes. Dans notre travail nous avons utilisé une galerie API 20E pour la souche de *K. pneumoniae*.



Test	ONP	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
<i>Klebsiella</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Figure 5 : Tests biochimiques d'identification de la souche *Klebsiella pneumoniae*

3.2. Activité antibactérienne et Détermination de CMI

Le pouvoir antibactérien de différents extraits préparés de la partie aérienne de la plante *R. tuberculata* a été évalué *in vitro* par une simple méthode de diffusion sur milieu gélosé solide du Muller-Hinton (Rahal, 2005), en utilisant des disques ou chargés d'antibiotiques vis-à-vis de quatre germes pathogènes qui sont *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *K. pneumoniae* ou imbibés de différentes doses d'extraits allant à 300 mg/ml pour les extraits EAcE, EAc, 450 mg/ml pour l'extraits AQ et 500mg/ml pour l'extraits EMet. L'activité antibactérienne des extraits et des ATB s a été exprimée en termes de diamètre (en mm) alors que ce test a été répété trois fois (n=3).

Le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique de substance dissous et toutefois l'attention devrait également être prêtée aux interactions possibles entre lui et les substances à étudier et entre lui et les germes testés (Yrjoen, 2004). De ce fait, l'effet de DMSO, utilisé comme un témoin négatif, a été également examiné dans notre travail.

Les résultats montrent que le DMSO ne présent aucun effet antibactérien sur la croissance normale des souches bactériennes testés. Par contre, les souches testées ont montré des différentes sensibilités aux antibiotiques standards utilisés Amoxicilline, Chloramphenicol, Ticarcilline, Gentamicine co-trimoxazole et cefazoline. Néanmoins, on a noté que l'extrait exerce une action bactériostatique si on observe une zone d'inhibition autour le disque chargé de lui et si le diamètre de cette zone d'inhibition est supérieur à 12mm (Sagdac, 2003).

Dans la présente étude, les quatre extraits EAQ, EMet, EAcE et EAc de *R. tuberculata* s'avèrent des agents antibactériens excellents envers l'ensemble de flore bactérienne testée, avec différentes degrés d'efficacité (Figure 6). Particulièrement, la souche *S. aureus* à montré une grande sensibilité vis à vis les extraits EMet, EAQ, EAcE et EAc à la dose de 300mg/ml. Cependant, la souche *P. aeruginosa* semble être résistante envers les quatre extraits organiques nommés précédemment. Cette efficacité que montre les extraits sur les souches testées (Figure 6), peut s'expliquer par le contenu de cette plante en composant antibactériens actifs.

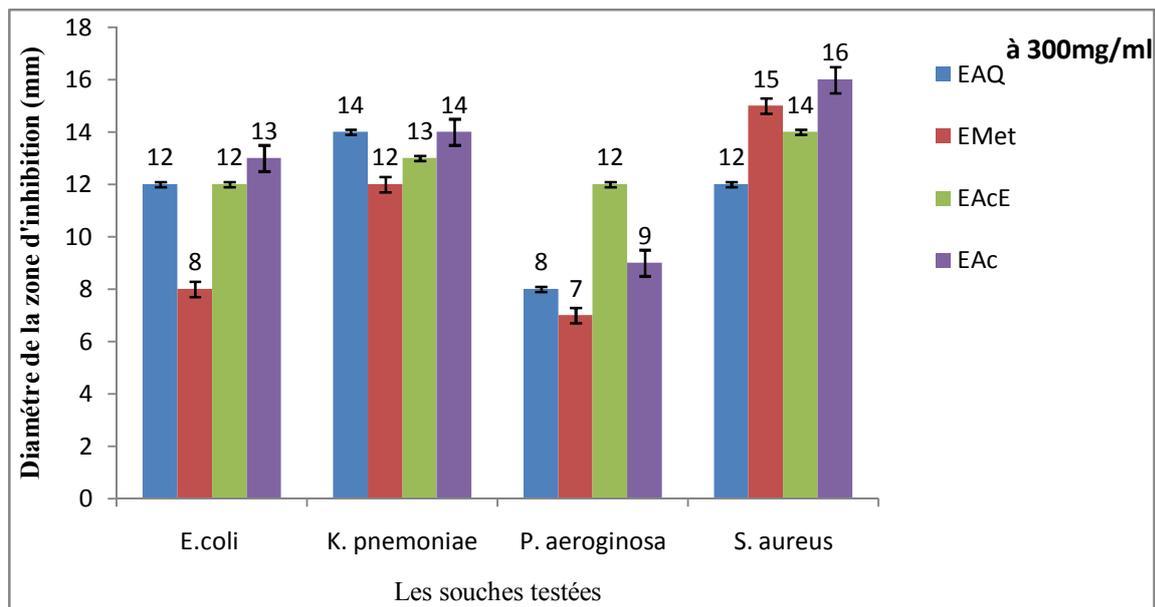


Figure 6: Diamètres de zones d'inhibition de la croissance bactérienne enregistrés par les quatre extraits du *R. tuberculata* à concentration 300mg/ml. Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions \pm SD.



(D) Effet antibactérien de l'EAcE contre les souches *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*

Figure 7: Zones d'inhibition induites par différents extraits du *R. tuberculata* sur certaines souches testées. (A) antibiogramme d'EAQ (B) antibiogramme d'EMet (C) antibiogramme d'EAc, (D) antibiogramme d'EAcE , à concentration 300mg/ml .

Afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice, qui par laquelle chacun d'extraits de *R.tuberculata* a inhibé la croissance bactérienne d'une souche donnée, l'activité antibactérienne de toute une gamme de concentrations décroissantes (31.25, 62.5, 125, 250mg/ml) de ceux-ci a été évaluée selon la méthode standardisée par (Djenane *et al* , 2012). la CMI est alors exprimée comme la faible concentration, parmi les cinq concentrations examinées de chaque extrait, correspond au premier tube dans la série qui ne présente ni trouble ni culot bactérien. De ce fait, les résultats obtenus lors de la détermination de CMI des différents extraits de *R.tuberculata* sont envisagés dans le tableau 5.

Tableau 5 :consentration minimales inhibitrices enregistrées par les différents extraits du *R.tuberculata* contre les souches testées

CMI (mg/ml) Souches	EAQ	EMet	EAc	EAcE
<i>K. pneumoniae</i>	125mg /ml	250mg/ml	62,5mg/ml	31.25mg/ml
<i>E. coli</i>	62.5mg/ml	Culot	31.25mg /ml	250mg/ml
<i>P. aeruginosa</i>	Culot	Culot	Culot	125mg/ml
<i>S. aureus</i>	250mg/ml	62.5mg/ml	31.25mg/ml	31.25mg/ml

En outre, les souches testées ont montré différentes sensibilités aux antibiotiques standards (tab6), utilisés comme des témoins positifs T⁽⁺⁾, tels l'amoxicilline (AMX), Ticarcilline (TCC), choramphenicol (C30), cefazoline (CZ), Gentamecine (CN), co-trimoxazol (SXT).

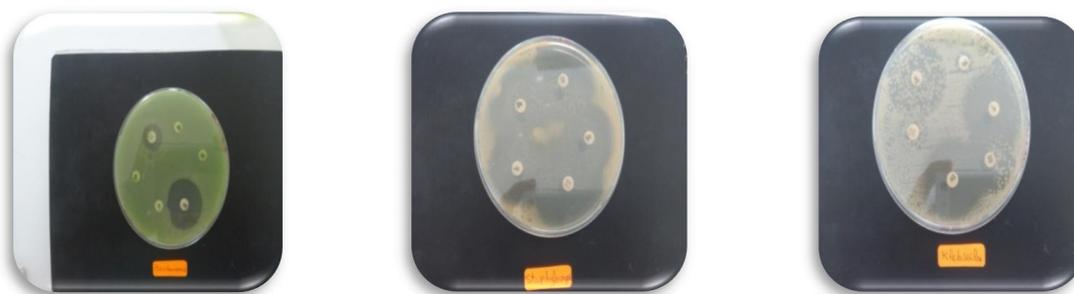


Figure 8: Antibiogramme d'ATB s examinés sur certaines souches testées.

Tableau 6 : Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne enregistrés par les ABTs testés dans le présent antibiogramme .Les valeurs représentent la moyenne de trois répétition±SD.

ATBs Souches	AML	SXT	TCC	C	CZ	CN
<i>K. pneumoniae</i>	10±0.01	25±0.12	14±0.00	25±0.00	20±0.00	25±0.15
<i>E.coli</i>	7±0.58	25±0.00	6±0.15	14±0.57	15±0.00	18±1.73
<i>P. aeruginosa</i>	6±0.00	6±0.12	12±0.00	6±1.15	6±0.15	25±0.58
<i>S.aureus</i>	6±1.15	24±0.57	14±0.15	25±0.54	20±0.00	25±0.57

Les résultats obtenus dans le présente étude, ont montré que les extraits E AcE, E Ac, E AQ exercent un effet bactériostatique plus important contre *K. pneumonie* avec une valeur de CMI égale à (31.25, 62.5, 125mg/ml) respectivement. Ces extrait ont révélé aussi actif sur les souches bactériennes *E.coli* et *S.aureus* avec de CMI pour l' E AcE (250 , 31.25mg/ml) respectivement et de CMI (31.25 , 31.25mg/ml) pour l'E Ac respectivement et de CMI égale à (62.5 , 250mg/ml) pour l'E AQ respectivement .Ce qui approuve les travaux de Daoudi *et al*(2015) le résultat le plus remarquable chez vous est la sensibilité de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis de l'extrait obtenu par décoction de la partie aérienne, le diamètre d'inhibition étant égal à (27,33± 1,15 mm) pour *R .chalepensis*. Bayoud *et al.*, (2007) ont montré, que l'extrait éthanolique et les alcaloïdes totaux des parties aériennes de *Ruta graveolens* et *Datura stramonium* ont une bonne activité antimicrobienne contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Escherichia coli*.

D'après les résultats obtenu (figure 8), *P.aeruginosa* est sensible à la Ticarcilline +Ac. clavulanique, Gentamicine avec des diamètres d'inhibition de 12, 25 mm respectivement. Alors qu'elle résistante à l'Amoxicillin, chloramphénicol, céfazoline.

En outre, la souche *staphylococcus aureus* semble sensible à co-trimoxazole Ticarcilline+acide clavulanique, chloramphénicol, Céfazoline, Gentamicine. avec des diamètres de zones d'inhibition de l'ordre 24,14,25,20,25mm respectivement et encore cette souche est résistante à l'Amoxicilline. Pour la souche *K. pneumoniae*, sa sensible enregistrée est aussi bien différentielle contre co-trimoxazol, Ticarcilline, Chloramphénicol, Gentamicine, céfazoline avec des diamètres de zone d'inhibition égale à 25, 14, 25, 25, 20. et 27mm, sauf *P. aeruginosa* est résistante de tout antibiotiques nommé précédemment que Gentamicine, Ticarcilline.

Par comparaison avec les ATBs, les diamètres des zones d'inhibitions créés par les extraits l'EAQ, EAc sur la souche *K. pneumoniae* révèle statistiquement une similitude, avec une valeur de CMI de l'ordre 125mg/ml, à celui engendré par antibiotique co-trimoxazol. Ce qui indique la similarité dans leur effet antibactérien.

Encore que l'effet de l'extrait EAc est similaire à ce exercé chloramphénicol. Concernant la souche *P. aeruginosa* les diamètres d'extraits est presque inférieur à celle de ATB s.

L'activité antibactérienne de différents extraits de notre plante *Ruta tuberculata* a été démontrée également effectués par les travaux Ivanova et al (2005) sur l'espèce *R. graveolens* ont un effet inhibiteur vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Naili et al (2010), ont étudié l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles d'*A. campestris* de la même classe de *R. tuberculata*, Ils ont utilisé plusieurs souches dont *Staphylococcus aureus*, *Escherich coli* *Pseudomonas aeruginosa*, les résultats obtenus dans cette étude ont montré que cet extrait possède un effet inhibiteur sur toutes les bactéries étudiées.

3.3. Activité antifongique

L'évaluation de l'activité antifongique chez les extraits EAQ, EMet, EAc, et EAcE de la plante *R. tuberculata* à différentes concentrations a été effectuée sur quatre souches fongiques pathogènes selon la méthode décrite par (Broekaert et al., 1990). Dans le présent travail, l'effet antifongique a été estimé par le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique.

Nous avons considéré qu'un extrait possède un effet fongistatique (CMI) ou fongicide (CMF) si le pourcentage d'inhibition, qu'il exerce, est supérieur à 90 % et 98 % respectivement.

Jusqu'à dose 250mg/ml, aucun effet fongistatique d'extraits EMet et EAc n'a été remarqué sur la croissance de *Alternaria sp* (figure9) qui est inhibée par l'extraits EAc (93%) et EAQ (75%) à concentration CMI de 250mg/ml et de 62,5mg/ml respectivement. ce qui montre que l'EAc révèle un effet inhibiteur significativement supérieur à celui engendré par l'EAQ.

Par contre, ce dernier, l'EAQ, a exercé un effet fongicide sur la souche *Penicillium* avec un (figure 10) pourcentage d'inhibition atteint la valeur de 98% à concentration CMF de 250mg/ml. Contre la même souche, l'effet inhibiteur enregistré par l'EAc semble être moins important avec un pourcentage d'inhibition est égale à 65% à CMI égale à 31,25mg/ml que celui de l'EAQ qui engendre une activité fongicide intéressante de 98% à CMI 250mg/ml, en l'absence de toute activité inhibitrice d'EMet sur cette souche.

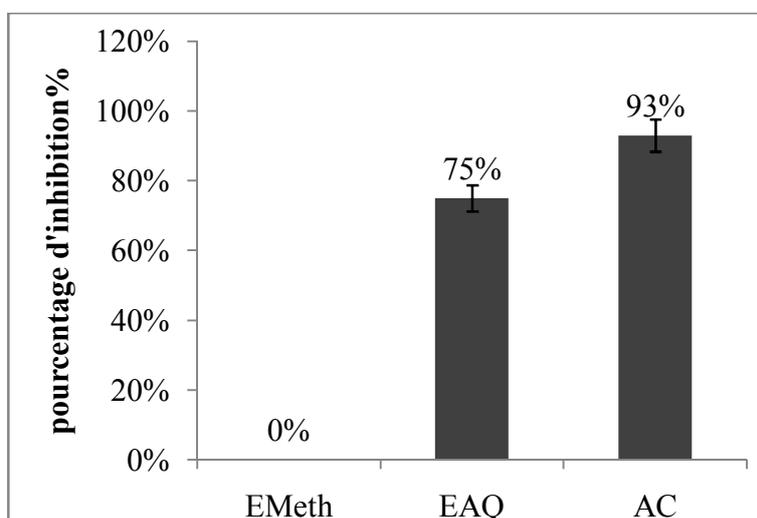


Figure9 : Activité antifongique de différents extraits de *R. tuberculata* sur la souche *Alternaria sp*. Les valeurs représentent ($m \pm SD$) et le test a été fait en trois répétitions. Ns

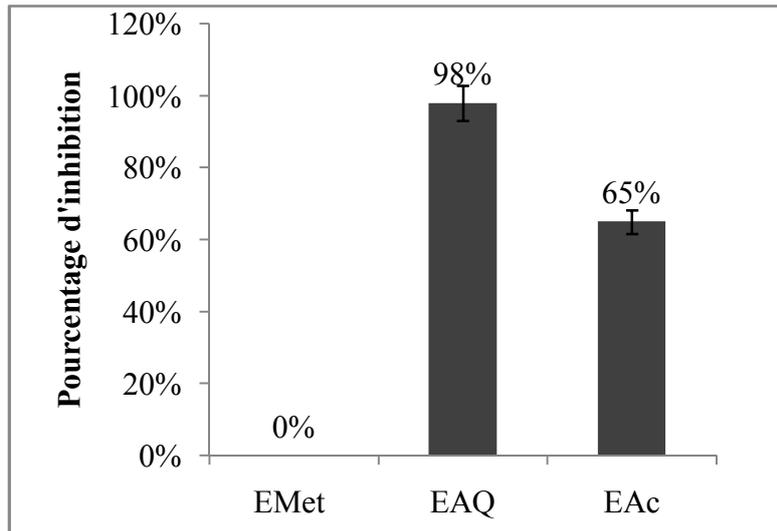


Figure10 : Activité antifongique de différents extraits de *R. tuberculata* sur la souche *Penicillium*. Les valeurs représentent ($m \pm SD$) et le test a été fait en trois répétitions.

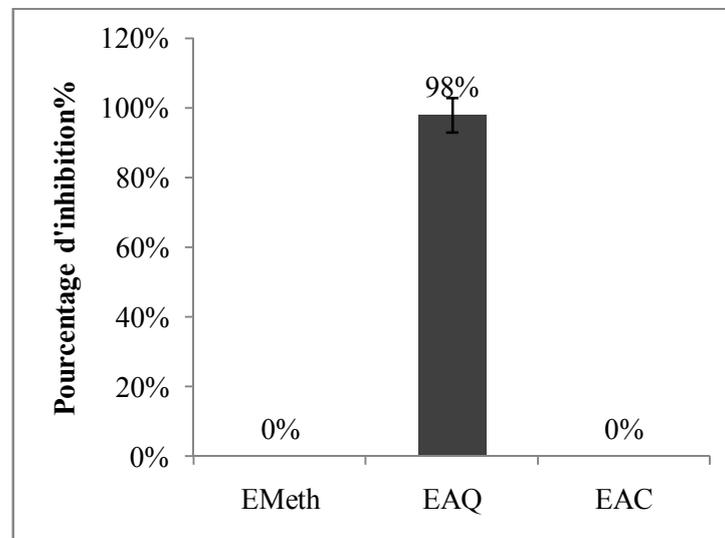


Figure11: Activité antifongique de différents extraits de *R. tuberculata* sur la souche *Aspergillus*. Les valeurs représentent ($m \pm SD$) et le test a été fait en trois répétitions.

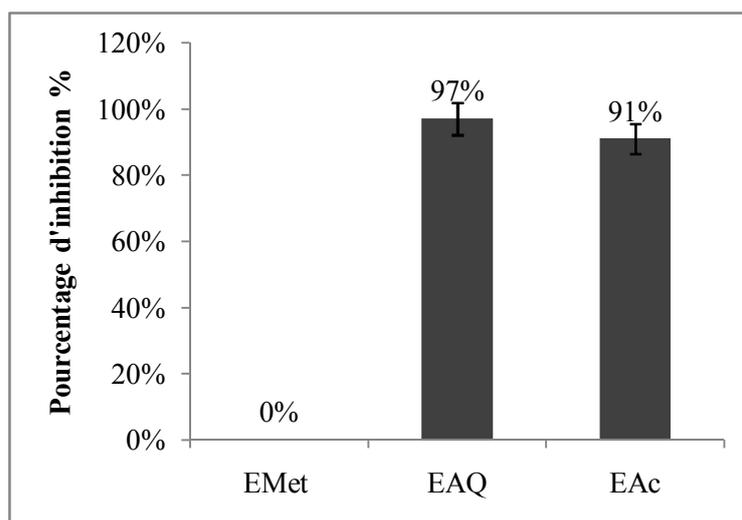


Figure12: Activité antifongique des quatre extraits de *R.tuberculata* sur la souche *Cladosporium*. Les valeurs représentent ($m \pm SD$) et le test a été fait en trois répétitions.

Une inhibition fongicide importante est enregistrée par l'EAQ sur la croissance des souches *Aspergillus* et *Cladosporium* avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 98% et de 97% correspond à la CMF de 250 et 125mg /ml respectivement (Figure 11et 12). Bien que l'EAc ne présente aucun effet inhibiteur vers l'*Aspergillus* par contre ce extrait a exercée une inhibition(91%). sur *Cladosporium* de CMI égale à 125mg/ml. Toutefois, l'EMet de *R. tuberculata* n'a donné aucun effet inhibiteur contre les deux souches précédemment discutées qui semblent très résistantes envers cet extrait (Figure 11et 12).

De point de vue comparatif, le Galangine est un flavonol, qui se trouve généralement dans des échantillons de *Propolis*, il a montré une activité inhibitrice contre *A. tamarii*, *A. flavus*, *C. sphaerospermum*, *P. digitatum* et *P. italicum* (Afolayan et Meyer, 1997). Deux autres flavones isolés de la plante *Artemisia giraldi*, qui partage la même classe de *R. tuberculata*, ont exhibé un activité antifongique intéressante contre *A. flavus* (Zheng et al., 1996). Ce qui peut confirmer nos résultats qui ont indiqué que l'EAQ et les extraits organiques, préparés de la plante *R. Tuberculata* dans la présente étude, possèdent un effet fongistaique et parfois fongicide très important sur les champignons testés ultérieurement, à l'exception de l'EMet qui ne présente aucun effet contre ces souches.

Le mécanisme d'action des extraits organiques de cette plante contre les souches fongiques pathogènes testées peut être due à leur contenu en composés phénoliques principalement en flavonoïdes, en tannins et en saponine, en poly-terpènes, en alcaloïdes et en stéroïdes qui semblent avoir une capacité de lyser la paroi cellulaire fongique, par la formation des pores dans la cellule et la fuite des constituants cytoplasmiques, ou par

l'induction d'une rupture dans la chaîne de transport d'électrons (Shelton, 1991 ; Dominguez et Martin, 1998).

Conclusion

Conclusion

La phytothérapie, proposant des remèdes naturels, est bien acceptée par l'organisme. De nos jours, elle connaît un renouveau exceptionnel en occident du fait des effets secondaires induits par les médicaments inquiétant les utilisateurs qui font alors appel à une médecine plus douce. La découverte de ressources naturelles du règne végétal reste capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques comme la plante que nous avons l'étudiée, le *R. tuberculata*, une espèce très connue pour ses vertus thérapeutiques variées.

Le présent travail s'est porté sur *R. tuberculata*, Il a permis de mettre en évidence, à travers une analyse phytochimique, la richesse de la partie aérienne de cette plante en métabolites secondaire notamment en polyphénols, en saponosides et en polyterpènes.

La détermination du rendement en extraits bruts a montré que les rendements d'extractions se varient considérablement en fonction du solvant utilisé au cours l'extraction, la solubilité des composés extraits et de leur nature chimique. Les résultats obtenus ont montré que les meilleurs rendements sont ceux enregistré par l'extrait méthanolique de 19,74% suivi par l'extrait aqueux de 14,5%, tandis que les plus faible, sont ceux notés chez les extraits d'acétate d'éthyle (1,62%) et acétonique (1.32%), respectivement.

Qualitativement, le contenu de différents extraits de cette plante en métabolites secondaires semble avoir une diversité en polyphénols, en flavonoïdes, en tanins gallique et catéchiques, en saponosides, en poly-terpènes, en absence d'antraquinones et de quinones libres. Toutefois, les extraits EAQ et EMet, s'avèrent les plus riches en composés phénoliques.

La présente étude du pouvoir antimicrobien des extraits phénoliques de la plante *R. tuberculata* vis-à-vis des souches microbiennes testées (Bactéries, Champignons) a révélé, d'une part, que les extraits peuvent inhiber modérément la croissance de l'ensemble des bactéries testées en comparaison des ATBs examinés, à l'exception de la souches *Pseudomonas aeruginosa* qui semble être multi-résistante envers les quatre extraits et tous les ATBs testés comme contrôle positif. D'autre part, l'activité antifongique de ces extraits se traduit en pourcentage important d'inhibition de la croissance des spores testées à l'exception de l'extrait EMet qui n'exerce aucune inhibition sur tous les champignons testés.

A la lumière de nos résultats, on peut conclure que la plante *Ruta tuberculata* est riche en molécules bioactives qui expriment le pouvoir d'inhiber la croissance de micro-organismes pathogènes. Ces molécules sont considérées comme des agents antimicrobiens naturels pouvant être employées dans la lutte microbienne ce qui explique l'importance de l'incorporation de cette plante en médecine traditionnelle. Elle pourrait donc constituer une alternative moins coûteuse et disponible dans notre pays pour le traitement de certaines maladies liées aux infections bactériennes et fongiques.

Cependant, l'ensemble de nos résultats obtenu *in vitro* n'est pas impérativement adéquate pour donner tout donné précisément mais ces résultats ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances d'origine naturelle bioactives dans les différents extraits de la plante *R. tuberculata*, il serait également intéressant d'effectuer des études plus approfondis tels que :

- d'évaluer d'activités antimicrobiennes de différents extraits vis-à-vis d'autres microbes

- de déterminer la concentration minimale bactéricide (CMB) et fongicide (CMF) de différents extraits de cette plante.

- D'appliquer des analyses phytochimiques de caractérisation, et d'identification de leur contenu en métabolites secondaires aux activités biologiques.

Références bibliographiques

Abderrazak M. et Joël R. (2007). La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. 177p.

Abril, M., K.J. Curry, B.J. Smith, and D.E. Wedge. 2008. Improved microassays used to test natural product based and conventional fungicides on plant pathogenic fungi. *Plant Disease* 92:106-112.

Adesokan A. A., Akanji M.A., and Yakubu M.T, (2007), Antibacterial potentials of aqueous extract of *Enantia chlorantha* stem bark, *African Journal of Biotechnology*, 6 (22), p. 2502 - 2505.

Afolayam A.J et Meyer J. J. 1997. the antimicrobial activity of 3,5,7 trihydroxy flavane isolated from the shoot of *Helichrysum aureonitens*. *Journal Ethnopharmacol.* 57 : 177-181.

Agrios, G.N. 2004. Losses caused by plant diseases. p. 29-45. *Plant Pathology*. Elsevier, Oxford, UK.

Akoua Koffi C., Guessenn N., Gbonon V., Faye-Kette A. Y. H., Dosso M. (2004) Methicillin resistant of *staphylococcus aureus* in Abidjan. A new hospital problem. *Medicines et maladies infectieuses*; 34 (3) pp. 132-136.

Aliyu, A. B., Musa, A. M., Abdullahi, M. S., Ibrahim, H., et Oyewale, A. O., Phytochemical screening and antibacterial activities of *Vernonia ambigua*, *Vernonia blumeoides* and *Vernonia ocephala* (Asteraceae), *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, 68(2011) 67-73.

Alkurd A., Hamed T. R., Al-Sayyed H., 2008. Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan. *Jordan. J. Agric. Sci.* 4: 265 - 274.

AL-Naggar E.B., EL darier S., EL mekanen A., svadejlnka E., Zimilieka M. 2014. Chemical Composition of Essential Oil of *Haplophyllum tuberculatum* (Rutaceae) Grow Wild in Different Habitats of Egypt.

Attou A., 2011. Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent. Mémoire de magister en biologie, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, 93 p.

ATTOU A., 2010- contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchen. Mémoire de magister en biologique : 67.

Bakkali F., Averbek S., Averbek D., Idaomar M., 2008. Biological effects of essential oils. *Rev: Food. Chem. Toxicol.* 46: 446–475.

Barry A.L. and Thonsberry C., (1985), Susceptibility test, diffusion test procedure, American Journal of Clinical Pathology, 19, p. 492 - 500.

Bastide A., M. de Méo, M. Andriantsoa, M. Laget & G. Duménil, (1986). Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyénique *mircen J. 2* : 453-466.

Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherriz T.C., and Truck M. (1966), Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method, American Journal of Clinical Pathology, 45, p. 493 - 496.

Bekheet S.H.M., Abdel-Motaal F.F., Mahalel U.A. 2011. Antifungal effects of *Ficus sycomorus* and *pergularia tomentosa* aqueous extracts On some organs in *Bufo regularis* treated with *Aspergillus niger*. *Tissue and Cell* 43 :398-404.

Benbachir M., Benredjeb S., Boye C. S., Dosso M., Belabbes H., Kamoun A., Kane O., Elmdaghri N. (2001) Two-year surveillance of antibiotic resistance in *streptococcus pneumonia* in four African cities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 45 (2) pp. 627-629.

Bergogne-Berezin E., Dellamonica P. (1995) *Antibiothérapie en pratique clinique*. Ed Masson, Paris, 486p.

Billing, J., sherman, P.W. Antimicrobial Function of spices : Why Some Like it Hot. *Quarterly Review of Biology*, 1998, Vol. 73, n1, pp. 3-49 biologique : 67.

Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., et Gontier E.; 2001; Production of plant secondary metabolites: a historical perspective; *Plant Science* 161, p: 839-851.

Broekaret W.F., Terras F.R.G., Cammue B.P.A., Venderleyden J. 1990. On automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiology letters*. 69 :55-60.

Bruneton J. (1999) Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3ème Ed Tec&Doc. Paris.

Burt S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential application in Foods.

Carle S. (2003). Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. Pharmactuel. 36 (1), 25-41.

Chahboun N., Esmail A., Abed H., Barrahi M., Amiyare R., Berrabeh M., Oudda H., Ouhssine M. 2015. Evaluation of the bactériostatic activity of the essential oil of *Lavandula officinalis* towards of the original strains resistant to antibiotic clinic. J. Mater. Environ. Sci. 6(4) : 1186-1191.

ChavanetP.(1997)AmphotéricineB désoxycholate(Fungizone) : Vieux médicament,nouvelles version.Rev Med Interne ;18pp. 153-165.

Chehma A., 2006-Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. Laboratoire de protection des écosystèmes en zone arides et semi arides, Université Kasdi Merbah, Ouargla, 140 p.

Choi Y.M., Noh D.O., Cho S.Y., Suh H.J., Kim K.M., and Kim J.M. (2006). Antioxidant

Ciule I, Methodologie for Analysis of Vegetable Drug, Romania, 1983, 1-26.

Davicino, R., M.A. Mattar, Y.A. Casali, S. Graciela, E. Margarita, and B. Micalizzi. 2007. Antifungal activity of plant extracts used in folk medicine in Argentina. Revista Peruana de Biología 14:247-251.

De Rijke E., Out P., Niessen WMA., Ariese F., Gooijer C., Brinkman UAT., 2006.

Dellaras C. 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et Documentation. 1^{er} édition, Lavoisier Paris, 476 p.

Di Stasi, L. C., Oliveira, G. P., Carvalhaes, M. A., Queiroz, M., Jr., Tien, O. S., Kakinami,S. H., & Reis, M. S. (2002). Medicinal plants popularly used in Brazilian tropical atlantic forest. *Fitoterapia*, 73(1), 69–91.

Doughari J.H., Pukuma M.S., and De N. (2007), Antibacterial effects of *Balanites aegyptiaca* L. Drel. and *Moringa oleifera* Lam. on *Salmonella typhi*, *African Journal of biotechnology*, 6 (19), p. 2212 - 2215.

Douhou N. et al; 2003 ; Screening Phytochimique d'une Endémique Ibéro-Marocain : *Thymelaea lythroides*; *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* 142; p: 61 -78.

Dupont F., Guigrard J. L., 2012- *Botanique (les familles des plantes)*. 15ème édition

Edited by: Appleton-Centry-Crofts. 1980. New.York.

Elghozi J.L., Duval D.(1992). *Pharmacologie* 2^{ème} Ed :Médecine Flammarion.Paris.289p.

Elsevier Masson . Paris: 154, 203, 188, 189, 192, 204, 214.

Fattouch S., Caboni P., Coreneov, Tuberness C., Angioni A., Dessi S., Marzouki N., Cabras P., 2007. Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia Oblonga miller*) pulp and peel phenolic extracts, *j. Agric. Food Chem.*, 55: 963-969.

Florence R.G., Sylviane Ch., Claude G.2010. Les antifongiques pour le traitement des mycoses systémiques et cutanées profondes. *Service de Parasitologie-Mycologie*. 16(4). 313-315.

Freney J., Renaud F., Leclercq R et Riegel P., 2007. *Précis de bactériologie clinique*.

Garcia-Ruiz A., Bartolomé B., Martinez-Rodriguez A.J., Pueyo E., Martin-Alvarez P.J., and Moreno-Arribas M.V. (2008). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine *Food Control*. 19: 835–841.

Guerin-Faublée V., Brun Y. La résistance aux antibiotiques chez les staphylocoques d'origine animale. *Rev. Méd. Vét.*, 1999, 150, 299-312.

Guillot J. (1999) Diagnostic biologique des mycoses animales. *Revue française des laboratoires*; 310 : 57-64.

Haddouchi F., Lazouni H., Ahammer KA., Carson CF., Riley TV., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86:985-990.

Hart P.E ; Russel E.Jr & Remington J.S.- The compromised host and infection II, Deep fungal infection J. Infect.Dis., **1969**, 120 : 169-176.

Hassan S. W., Umar R. A., Ladan M. J., Nyemike P., Wasagu R. S. U., Lawal M., Ebbo A. A. 2007. Nutritive value. Phytochemical and antifungal properties of *P. tomentosa* L. (Asclepiadaceae). International Journal of Pharmacology. 3 (4) : 334-340.

Hernes Pj., Benner R., Cowie G L., Goni M A., Bergamaschi B A., And Hedges Ji, (2001). Tannin Diagnosis In Mangrove Leaves From A Tropical Estuary: A Novel Molecular Approach. Geochimicaetcosmochimicaacta. 65: 3109-3122.

Hill R.B.Jr, Rowlands D.J Jr & Rifkind D.- Infectious pulmonary disease in patient receiving immunosuppressive therapy for organ transplantation. N. Engl. J. Med. **1964**, 271 : 1021-1028.

Iauk, L., Mangano, K., Rapisarda, A., Ragusa, S., Maiolino, L., Musumeci, R., Costanzo, R., Serra, A., & Speciale, A. (2004). Protection against murine endotoxemia by treatment with *Ruta chalepensis* L., a plant with anti-inflammatory properties. Journal of Ethnopharmacology, 90, 267–272.

in the prevention, of the human pathologies? *Biomed.pharmacother.* **56**: 200-207.(cited in

Ivanova A. et al; 2005; Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ruta graveolens*; Fitoterapia 76; Ed: ELSEVIER; p: 344-347

Joklik W.K., Willett H.P & Asmos D.B.- Zinser microbiology(17th edition).

Kacem M, Kacem I, Simon G, Ben Mansour A, Chaabouni S, Elfeki A, Bouaziz M, food Bioscience, 2015, 1, 12, 73-83.

Kar A.; 2007; Pharmacognosy and Pharmabiotechnologie; Ed 2: New Age International Publishers; p: 1-30.

Kempf S. Zeitouni. (2009). Coût biologique de la résistance aux antibiotiques: analyse et conséquences Pathologie Biologie : *article in press.*

Kettani A., Belkhadir Z.H., Mosadik A., Faroudy M., Abadou A., Lazreg C. et Sbihi A. (2006) traitement antifongique des candidoses systémiques en réanimation. *Journal de Mycologie Médicale* ; 16 pp. 16-25

King A., and Young G. (1999). characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Jof the American dietetic association*.99:213-218. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008.

Koffi E., Sea T., Dodehe Y., Soro S. 2010. Effect of solvent type on extraction of polyphénols from twenty three Ivorian plant. *Journal of Animal & plant Sciences*. 5(3) : 550-558.

Kuzovkina, I., Al'terman, I., Schneider, B. (2004) La méthode de l'accumulation et les structures de l'acridone révisé de glucosides dans l'alcaloïde de racines transformées conseils de *Ruta graveolens*, *Phytochimie* 65(8), 1095-100.

Lemaoui C.E.,Layaida.H.,Badi.A.,Foudi.N.2017.Stratégie actuelle de lutte contre la résistance aux antibiotiques.Département de Pharmacie.Faculté de médecine.Universit Farhat Abbas Setif.19 :13p.

Leyral G., Joffin J. N., Figarella J. 1998. Microbiologie technique : 2 documentation technique. 2^{ème} édition, Bordeaux, CRDP d'aquitaine, 304 p.

Llyod D.H., Lamport A.I., Feeny C. Sensitivity to antibiotics amongst cutaneous and mucosal isolates of canine pathogenic staphylococci in the UK, 1980-96. *Vet. Dermatol.*, 1996, 7, 171-175.

Lugasi A., Hovari J., SagiK., and Biro L. (2003). The role of antioxidant. phytonutrients in the prevention of diseases. *J.Acta.biologica. szegediensis*. 47 (1-4):119-125. (Cited in Mohammedi Z, 2005) Lutge U., Kluge M., Bauer.

Lutge U., Kluge M., Bauer G. (2002). Botanique 3ème Ed : Technique et documentation. Lavoisier .Paris. 211p.

Mahmoudi S., Khali M., Mahmoudi N. 2013. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de fleur d'artichant (*Cynara Scolymus*). *Revue Nature et Technologie. B-Sciences Agronomiques & Biologiques*. 9 : 35-40

Maiza K., Brac DE LA Periere R.A., Hammiche V., 1993. Pharmacopée traditionnelle saharienne : Sahara septentrional. Actes du 2^e Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11^e Conférence internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg, 169-171.

Miller L., Ricklefs R., 2005. Ecologie de boeck et larcier. Bruxelles, paris, 807p.

Mioulane P. ; 2004 ; Encyclopédie Universelle des 15000 plantes et fleurs de jardins ; Larousse ; Ed : PROTEA ; p : 7-50.

Mortellaro C.M., FrancaP. Della, Caretta G. *Aspergillus fumigatus*, a causative agent of infection of the frontal sinuses and nasal chambers of the dog. *Mycoses*, 1989, 32, 327-335.

N'guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G. N., Traoré, D., Aké-Assi, L., Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire), *Sciences & Nature*, 6(2009) 1-15.

Nauciel .C .,et Vildé J.L.(2005).Bactériologie médicale,2^{ème} Ed.Masson.Paris.pp :24-40.

Ochiai K., Valentine A., Altschul M. Intestinal candidiasis in a dog. *Vet. Rec.*, 2000, 146, oils. *Rev. Food. Chem.Toxicol.* 46: 446–475.

Ould EL hadj M. D., Hadj-Mahammed M., Zabierou H., 2003- Place des plantes spontanées dans la maladie traditionnel de la région de Ouargla Sahara Septentrional Est. *Courrier du savoir*, N° 03 : 47-51.

Ozenda P., 1991-Flore et végétation du Sahara. 3^{ème} édition, augmentée. Edition: CNRS, Paris. 662p.

Page C.,Curtis M.,Walker M.,Sutter M.,Hoffman B.1999.Pharmacologie intégrée.1 édition,De Boeck université,paris,p.419.

Paquereau J., 2013. Au jardin des plantes de la bible. IDF, Paris, 408 p.

Perry J.J.,Staley J.T.,Lory S.2004.Microbiologie.1^{er} édition,Dunod,paris,856p.

Prescott J.F., Brad Hanna W.J., Reid-Smith R., Drost K. Antimicrobial drug use and resistance in dogs. *Can. Vet. J.*, 2002, 43, 107-116.

Quezel P., Santa S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris, 1170 p.

Rahal K. 2005. Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS, 4^{ème} édition, ministère de la santé, de la population et de la réforme hospitalière.

Ratheesh, M and Helen, A. (2006). Anti-inflammatory activity of *Ruta graveolens* Linn on carrageenan induced paw oedema in wistar male rats, *Afr. J. Biotechnol.* **6**, 1209–1211.

Rautemaa R., Richardson M., Michael A., faller P., Perheentupa J., saxen H. (2008). Activity of Amphotericin B, Anidulafungine, Caspofungin, Micafungin, Posaconazole and Voriconazole against *Candida albicans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* **62** :182-185.

Rubiolo P., Sgorbini B., Liberto E., Cordero C., Bicchi ., 2010. C. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. *Flavour Fragr. J.* **25**, 282-290.

Sarni-Manchado P., Cheynier V., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Lavoisier.

SFM (2008), Société Française de Microbiologie, Recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, Janvier 2008, 49p.

Shinkafi S. A. 2013. Antidermatophytic activity- phytochemical screening and chromatographic studies of *Pergularia tomentosa* L. and *Mitracarpus scaber* zucc (Leaves) used in the treatment of dermatophytoses. *International Research Journal of Microbiology (IRJM).* **4** (1) : 29-37.

Tabert J., Kevers C., SLIPEL A., Pincemail and J., Defraigne J.O. et Dommes J (2007). Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from currant leaves and buds and of stability during storage. *Food Chemistry* **105** :1268-1275.

Tapiero H., Tew K.D., Nguyen B.G., and Mathé G. (2002). Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies? *Biomed. pharmacother.* **56**: 200-207. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).

Thenmzohi C.D. et ty of Premalakshmi V. 2011. preliminary phytochemical screening and antibacterial activity of *Pergularia daemia* forsk. International Journal of pharma and Bio sciences 2(1):975-6299.

Ulubelen, B., E., Terem, Tuzlaci, K., Cheng, F., Kong, Y.C. (1986). Al-kaloids et coumarines de *Ruta chalepensis* A, *Phytochimie* 25, 2692-26930.

Vandeputte. V .(2008). Mécanismes moléculaire de la résistanc aux antifongiques chez *candida glabrata*. Thèse de Doctorat. Université d'Angers, (France).pp 168.

Vaubourdolle, M. Infectiologie. 3^{ème} édition. Paris : Wolters Kluwer, 2007.

Werckenthin C., Cardoso M., Martel J.L., Schwarz S. Antimicrobial resistance in *Staphylococci* from animals, with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus* and canine *Staphylococcus intermedius*. *Vet. Res.*, 2001, 32, 341-362.

Yakubu R., Jibril F. M., Lukman A., Sheikh F. 2015. Trends for antioxidant power of phytochemicals from *P. tomentosa* L. (Asclepiadaceae) whole plant. *Sch. Acad. J. Pharm (SAJP)*. 4 (2) : 74-80.

Yrjoen T. 2004. Extraction and planar Chromatogrphic separation Techniques in the Analysis of Natural products, Faculty of pharmacy, these de doctora, University of Helsink, 76 p.

Zellagui A., Belkassam A., Belaidi A., N Gherraf, *Advances In Environmental Biology*, 2012, 6, 10, 2684-2688.

Annexe

1.Composition des milieux de culture

Gélose nutritive :

- Extrait de viande 0.1g
- Extrait de levure 02 g
- Peptone05g
- Chlorrure de sodium 05g
- Agar 15g
- Ph=7.5

Muller Hinton :

- Infusion de viande de bœuf 300em
- Peptone de caséine 17.5g
- Amidon ce mais 1.5g
- Agar 17g
- Ph=7.4

PDA (potato dextrose agar)

- Pomme de terre 200g/l
- Sacchorose 10g/l
- Agar 15g/l

Matériels utilisés :



Lecture Elisa

Résumés

يركز عملنا على دراسة البحث عن عوامل جديدة مضادة للميكروبات مستخلص الميثانول الطبيعي ، مائي ، خلاص إيثيل ، الأستون من الجزء الهوائي للنباتة. هو نبات عطري ، ينتمي إلى عائلة سذابية التي يطلق عليها عادة السكان المحليين الفيجل عفوية منتشرة في شمال أفريقيا ، لا سيما في الجزائر. هو نبات طبي عطري لا يزال يستخدم في الطب التقليدي في العديد من البلدان كمسهل ، مضاد للالتهابات ، مسكن ، مضاد للتشنج ، ولعلاج الأمراض الجلدية. فالفحص الكيميائي النباتي كشف عن وجود البوليفينول ، الفلافونويد ، التانينات ، السابونوزيدات ، التربين ، والكوبونون الحر والأنثراكوينون. هذه الثروة أكدت من خلال اختبارات نوعية لمستخلصات خلاص إيثيل ، الأستون ، مائي ، مستخلص الميثانول. ظهر نتائج تقييم النشاط المضاد للبكتيريا من خلال طريقة نشر في وسط مولر-هينتون أن المستخلصات النباتية الأربعة التي تم دراستها كلها نشطة على السلالات البكتيرية المدروسة بدرجات متفاوتة التي تمت دراستها باستثناء المكورات العنقودية. في الواقع ، لدى المستخلص مائي تثبيط الفطريات أكثر من ذلك الذي تم الحصول عليه للمستخلصات الأخرى ذات النسب المئوية المتفاوتة للتثبيط.

الكلمات المفتاحية : نشاط مضادات الميكروبات ، الفيجل ، الاحماض الفينولية.

Résumé

Notre travail porte sur l'étude de la recherche de nouveaux agents antimicrobiens naturels, extrait méthanolique, aqueux, éthyle acétat, acétonique de la partie aérienne de la plante *Ruta tuberculata* est une plante aromatique, appartenant à la famille des rutacées, appelée communément par la population locale « Fidjel ». Elle est spontanée, largement répandue en Afrique du nord, particulièrement en Algérie. La rue est une plante aromatique médicinale encore utilisée dans la médecine traditionnelle de nombreux pays comme laxatif, anti-inflammatoire, analgésique, antispasmodique, et pour le traitement de pathologies cutanées. Le screening phytochimique a mis en évidence la présence de polyphénols, flavonoïdes, tanin, saponosides, terpènes et de quinon libre et anthra-quinon cette richesse est confirmé par des tests qualitaives pour les extraits EMeth, EAQ, EAc, EAce. Les résultats d'évaluation de l'activité antibactérien par la méthode de diffusion sur milieu gélose Mueller-Hinton mettent en évidence que les quatre extraits de plantes étudiées sont tous révéles actifs sur les souches bactériennes étudiées à l'exception de *pseudomonas aeruginosa*. En effet, l'EAQ présente une inhibition fongicide important plus que celle obtenus pour les autres extraits avec des pourcentages d'inhibition inégal.

Les mots clés : L'activité antimicrobienne , *Ruta tuberculata* , les acides phénoliques

Abstract

Our work focuses on the study of the research of new natural antimicrobial agents, methanolic extract, aqueous, ethyl acetate, acetonetic of the aerial part of the plant *Ruta tuberculata* is an aromatic plant, belonging to the family of rutaceae, commonly called by the local population "Fidjel". It is spontaneous, widespread in North Africa, particularly in Algeria. The street is an aromatic medicinal plant still used in traditional medicine in many countries as laxative, anti-inflammatory, analgesic, antispasmodic, and for the treatment of cutaneous pathologies Phytochemical screening has revealed the presence of polyphenols, flavonoids, tannins, saponosides, terpènes and free quinone and anthraquinone this wealth is confirmed by qualitative tests for extracts E Meth, E AQ, E Ac, E Ace. The résultat of évaluation of the antibacterial activity by the Mueller-Hinton agar diffusion method show that the four plant extracts studied are all active on the bactériale strains studied with the exception of *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: antimicrobial activity, *Ruta tuberculata*, phenolic acids