

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET
DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE SNV



14/303

Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité / Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire / Biologie Moléculaire des
Procaryotes

**Thème : Contribution à l'étude de l'activité antioxydante et
antibactérienne de deux plantes médicinales
(*Bêta vulgaris* « var. *cicla* » et *Ruta chalepensis*)**

Présenté par : ARNAOUT OU GHARNAOUT Besma

CHIROUF Sehla

SALAH SALAH Hadjer



Devant le jury composé de :

Président : MERZOUG. A

M.A.A (Université de Guelma).

Examinatrice : BOUSSENANE. H

M.A.A (Université de Guelma).

Encadreur : HAMDIKEN. M

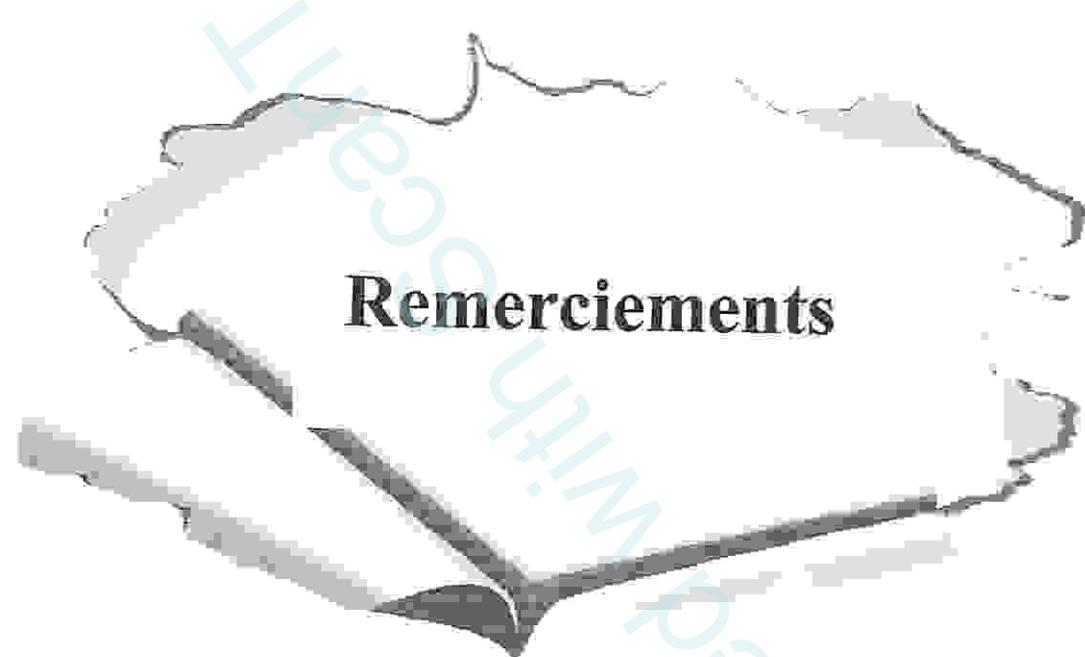
M.A.A (Université de Guelma).

Co-encadreur : BOUSSADIA.I

M.A.A (Université de Guelma).

Juin 2014

Produced with Scantopdf



Remerciements

Remerciements

Nos remerciements, d'abord à Dieu «الله» le tout puissant pour la volonté, la santé, et la patience qu'il nous a donné durant toutes ces années.

Nous tenons à exprimer notre remerciement respectueux, Et profonde reconnaissance à notre encadreur Madame HAMDIKEN Malika ; qui nous a orienté et conseillé tout au long de ce travail, Qu'elle soit vivement remerciée.

Nos remerciements les plus sincères à notre Co-encadreur, Madame BOUSAADIA Imene qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance pour nous avoir accordé sa confiance et nous avoir guidé dans notre travail.

Nous remercierons également les membres de jury Monsieur MERZOUG. A et M^{me} BOUSSENANE. H qui nous ont fait l'honneur de juger notre travail.

On tient à remercier maintenant très respectueusement M^{me} HIMER, Ratiba technicienne du laboratoire de biochimie, université de Guelma pour nous avoir soutenus durant notre période de travail au laboratoire ainsi les techniciennes des laboratoires (Ghania, Asma, Leila et Houria) qui nous ont facilité notre travail.

Nous sommes redevables à L'ensemble des enseignants qui ont contribué à notre Formation durant ces 05 dernières années.

On réserve enfin nos derniers remerciements aux gens qui nous ont aidés de près ou de loin pour réaliser ce travail précieux.

SEHLA, BESMA ET HADJER



Résumé

Produced with ScanTOPDF

Notre travail porte sur l'étude de la phytochimie et des activités antioxydante et antibactérienne de deux plantes médicinales, *Ruta chalepensis* (Fidjel) et *Bêta vulgaris var cicla* (Eselk).

Le screening phytochimique a permis de mettre en évidence la présence des Saponosides, des Tanins, des flavonoïdes, des Mucilages et des Coumarines dans les deux plantes. On a noté aussi la présence des Alcaloïdes chez *Ruta chalepensis*, tandis que l'absence de ce composé chez *Bêta vulgaris*.

L'évaluation quantitative des composés phénoliques par la méthode de Folin a montré que la quantité de polyphénols dans l'extrait méthanolique de *Ruta chalepensis* (23.33 mg EAG/g extrait) est plus importante que celle de *Bêta vulgaris* (18.66 mg EAG/g extrait). Le dosage des flavonoïdes par la méthode de trichlorure d'aluminium a révélé (6,8mg EQ/g extrait) pour *Bêta vulgaris* contre (17mg EQ/g extrait) pour *Ruta chalepensis*.

L'analyse qualitative par la chromatographie sur couche mince a révélé la présence de l'acide gallique et la quercétine dans les deux extraits.

Les deux extraits méthanoliques ont montré un pouvoir antiradicalaire piégeant le radical libre DPPH, avec IC₅₀ de 1,5mg/ml pour EMRC et 1,74mg/ml pour EMBV.

L'effet antibactérien a été déterminé par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton et la méthode de dilution sur milieu liquide a été utilisé pour la détermination de la CMI et la CMB, pour les bactéries-tests *Staphylococcus aureus* 43, *Staphylococcus aureus* 25, *Escherichia coli*, *Bacillus ceurus*, et *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats mettent en évidence que l'extrait méthanolique de *Ruta chalpensis* a manifesté une activité modérée contre *S.aureus* 25, *S.aureus* 43 et *bacillus cereus*, et une faible activité contre *Pseudomonas aeruginosa*, alors que pour *E.coli* cet extrait n'a rapporté aucun effet sur cette souche. En revanche l'extrait méthalonique de *Bêta vulgaris* n'a présenté aucune activité vis-à-vis les cinq bactéries.

Mots clés : plantes médicinales, extrait méthalonique, activité antioxydante, DPPH, activité antibactérienne.

Our work is around the study of the phytochemistry, also antioxydant activites and antibacterial of two medicinal plants, *Ruta chalepensis* (Fidjel) and *Bêta vulgaris var. ciela* (Eselk).

The phytochemical screening permitted us to bring out the presence of the Saponosides, the Tannins, the Flavonoïdes, Mucilages and the Coumarineses in the two plants. We also noted the presence of the Alcaloïdes at *Ruta chalepensis*, while the absence of this compound at *Bêta vulgaris*.

The quantitative evaluation of the phenolic compounds by the Folin method has showed that the quantity of the polyphenols in the methanolic extract of *Ruta chalepensis* (23.33 mg GAE / g extract) is more important than the one of *Bêta vulgaris* (18.66 mg GAE / g extract).

The flavonoids dosage by the aluminium trichloride's method has revealed (6.8 mg QE / g extract) for *Bêta vulgaris* against (17 mg QE / g extract) for *Ruta chalepensis*.

The qualitative analysis by the chromatography on a thin layer revealed the presence of the gallic acid and the quercetin in the two extracts.

Both the methanolic extracts has shown an antiradical power trapping the free radical DPPH, with IC₅₀ of 1,5mg / ml for the methanolic extract of *Ruta chalepensis* and 1,74mg / ml for the methanolic extract of *Bêta vulgaris*.

The antibacterial effect has been determined by the method of diffusion on gelose Mueller-Hinton and the method of dilution on a liquid environment was used for the determination of the minimum effeient concentration (CMI) and the minimal bacterial concentration (CMB), for the bacterium-tests *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus ceureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*. The results bring out that the methanolic extract of *Ruta chalpensis* has showed a moderate activity against *S.aureus* 25, *S.aureus* 43 and *Bacillus ceurus*, and a weak activity against *Pseudomona aeruginosa*, whereas for *E.coli* this extract didn't report any effect on this strain. On the other hand, the methanolic extract of *Bêta vulgaris* has presented no activity next to the five bacterias.

Key words : medicinal plants, methanolic extract, antioxydant activity, DPPH, antibacterial activity.

عملنا يركز على دراسة المادة الكيميائية النباتية المضادة للأوكسدة ومضادات البكتيريا لنوعين من النباتات الطبية: الفيجل (*Ruta chalepensis*) و السلق (*Bêta vulgaris var. cicla*)

كشفت الفحص الكيميائي النباتي وجود الصابونين، التانينات، الفلافونيدات، العفص والكومارينات في كلتا النباتين. كما لاحظنا وجود الفلويونات في *Ruta chalepensis* في حين عدم وجوده في *Bêta vulgaris*.

التقييم الكمي للمكونات القينولية بواسطة طريقة الفولين أظهر أن متعدد القينول في المستخلص الميثانولي لـ *Ruta chalepensis* (23,33 مغ مع معادل حمض الغاليك/غ مستخلص) هي أكثر من كميته في مستخلص *Bêta vulgaris* (18,66 مغ مع معادل حمض الغاليك/غ مستخلص). إن كمية الفلافونيدات بطريقة ثلاثي كلوريد الألمنيوم قد كشفت عن وجود (6,8 مغ مع معادل الكرسيتين/غ مستخلص) بالنسبة لـ *Bêta vulgaris*، ضد (17 مغ مع معادل الكرسيتين /غ مستخلص) بالنسبة لـ *Ruta chalepensis*.

أظهر التحليل الكروماتوغرافي على الطبقة الرقيقة وجود الكرسيتين و حمض الغاليك في المستخلصين. المستخلصين أظهر وجود قدرة مضادة جذرية لتثبيط الجذر الحر DPPH، مع $IC_{50} = 1,5$ مل/مغ بالنسبة لمستخلص *Bêta vulgaris* و $1,74$ مل/مغ بالنسبة لـ *Ruta chalepensis*.

إن القدرة المضادة للنشاط البكتيري قد عيّنت بطريقة الانتشار على جيلوز ميلر هانتن، و طريقة التخفيف في وسط سائل استعملت لتحديد الحد الأدنى للتركيز المثبط (CMI) و الحد الأدنى للتركيز المبيد للجراثيم (CMB) لخمس أنواع من البكتيريا: *Bacillus ceurus* ATCC 11178، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853، *Escherichia coli* ATCC 25922 و *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 و *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. أوضحت النتائج بأن المستخلص الميثانولي لـ *Ruta chalepensis* أبدى نشاط معتبر ضد كل من *S.aureus* 25، *S.aureus* 43، و نشاط ضعيف ضد *P.aeruginosa* ولم يبدي أي نشاط ضد *E. coli*. في المقابل المستخلص الميثانولي لـ *Bêta vulgaris* لم يظهر أي نتائج ضد الأنواع الخمسة من البكتيريا. **كلمات المفتاح:** النباتات الطبية، المستخلص الميثانولي، النشاط المضاد للأوكسدة، DPPH، النشاط المضاد للبكتيريا.



**Liste des
Abréviations**

% : Pourcentage.

°C : Degré Celsius.

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium.

ATB : Antibiotique.

B : *Bêta vulgaris*.

BN : Bouillon Nutritif.

CCM : Chromatographie sur Couche Mince.

cm : centimètre.

CMB : Concentration Minimal Bactéricide.

CMI : Concentration Minimal Inhibitrice.

DPTII : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

EA*G/g d'extrait* : équivalent acide gallique par gramme d'extrait.

EC₅₀ : Efficient Concentration 50%.

EMBV : Extrait Méthanolique de *Bêta vulgaris*.

EMRC : Extrait Méthanolique de *Ruta chalepensis*.

EQ*/g d'extrait* : équivalent quercétine par gramme d'extrait.

FeCl₃ : Chlorure Ferrique.

g : gramme.

GN : Gélose Nutritive.

h : heure.

H₂SO₄ : Acide Sulfurique.

HCL : Acide chlorhydrique.

Liste des abréviations

HE : Huile Essentielle.

IC₅₀ : Concentration Inhibitrice de 50 %.

m : mètre.

MH : Mueller Hinton.

ml : millilitre.

MoO₄⁻² : phosphomolybdic.

Na₂CO₃ : Carbonate de Sodium.

NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase.

NaOH : Hydroxyde de Sodium.

NH₄OH : Hydroxyde d'ammonium.

Nm : Nanomètre.

PBP : Penicillium Binding Protein.

R : *Ruta chalepensis*.

RF : Rapport Frontal.

RL : Radicaux Libres.

V : Volume.

WO₄⁻² : phosphotungstic.



**Liste des
Figures**

Figure N°	Les Titres des Figures	N° page
Figure 01	<i>Ruta chalepensis</i> .	10
Figure 02	<i>Bêta vulgaris</i> .	13
Figure 03	Carte géographique de la wilaya illustrant la région de récolte des deux plantes.	22
Figure 04	Le rot à vapeur.	26
Figure 05	Lyophilisateur.	26
Figure 06	Protocole expérimental.	27
Figure 07	Droite d'étalonnage de l'acide gallique.	23
Figure 08	Droite d'étalonnage de la quercétine.	30
Figure 09	Structure du DPPH.	31
Figure 10	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.	31
Figure 11	Application des disques d'extraits sur boîtes.	36
Figure 12	Technique de dilution en milieu liquide.	37
Figure 13	Schéma représentant la CMI et la CMB.	38
Figure 14	Test d'identification des alcaloïdes	40
Figure 15	Test d'identification des saponosides.	40
Figure 16	Test d'identification des tanins.	41
Figure 17	Test d'identification des flavonoïdes.	41
Figure 18	Test d'identification des mucilages.	42
Figure 19	Test d'identification des coumarines.	42
Figure 20	Le rendement des deux extraits.	43
Figure 21	Chromatographie sur couche mince des deux extraits méthanoliques.	44
Figure 22	Effet antiradicalaire de l'EMBV et l'EMRC sur le radical DPPH°.	47
Figure 23	Activité du méthanol sur les 4 souches de références.	48
Figure 24	Aspect macroscopique de la réponse bactérienne aux différents antibiotiques testés.	50
Figure 25	Aspect macroscopique du <i>S. aureus</i> ATCC 25923 de la réponse bactérienne aux extraits testés.	52
Figure 26	Présentation graphique de l'aromatogramme de l'espèce <i>S. aureus</i> ATCC 25923.	52
Figure 27	La série de dilution en milieu liquide de la souche <i>S. aureus</i> ATCC 25923.	53
Figure 28	Aspect macroscopique de la réponse de l'espèce <i>S. aureus</i> ATCC 43300 aux extraits testés.	54

Figure 29	Présentation graphique de l'aromatogramme de l'espèce <i>S. aureus</i> ATCC 43300.	55
Figure 30	La série de dilution en milieu liquide de la souche <i>S. aureus</i> ATCC 43300.	55
Figure 31	Aspect macroscopique de la réponse de l'espèce <i>B. cereus</i> ATCC 11178 aux extraits testés.	57
Figure 32	Présentation graphique de l'aromatogramme de l'espèce <i>B. cereus</i> ATCC 11178.	57
Figure 33	La série de dilution en milieu liquide de la souche <i>B. cereus</i> ATCC 11178.	58
Figure 34	Aspect macroscopique de la réponse d' <i>E. coli</i> ATCC 25922 aux extraits testés.	59
Figure 35	Présentation graphique de l'aromatogramme de l'espèce <i>E. coli</i> ATCC 25922.	59
Figure 36	La série de dilution en milieu liquide de la souche <i>E. coli</i> ATCC 25922.	60
Figure 37	Aspect macroscopique de la réponse du <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 aux extraits testés	61
Figure 38	Présentation graphique de l'aromatogramme de l'espèce <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.	62
Figure 39	La série de dilution en milieu liquide de la souche <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.	62
Figure 40	Photographies de la CMB.	63
Figure 41	Présentation graphique des pourcentages d'inhibition des différentes souches testées.	64



**Liste des
Tableaux**

Produced with ScanTOPDF

Liste des Tableaux

Tableaux N°	Les Titres des Tableaux	N° page
Tableau 1	Les radicaux libres.	17
Tableau 2	Les diamètres critiques des antibiotiques utilisés	35
Tableau 3	Screening phytochimique de deux plantes	40
Tableau 4	Rendement de l'extraction.	43
Tableau 5	Teneur des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans l'EMBV et l'EMRC.	46
Tableau 6	Les diamètres d'inhibition des souches testées vis-à-vis des antibiotiques.	50
Tableau 7	Les diamètres d'inhibition de la souche <i>S. aureus</i> ATCC 25923.	51
Tableau 8	Les diamètres d'inhibition de la souche <i>S. aureus</i> ATCC 43300.	54
Tableau 9	Les diamètres d'inhibition de la souche <i>B. cereus</i> ATCC 11178.	56
Tableau 10	Les diamètres d'inhibition de la souche <i>E. coli</i> ATCC 25922.	58
Tableau 11	Les diamètres d'inhibition de la souche <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.	61
Tableau 12	Pourcentages d'inhibition des souches testées.	64

Produced with ScanTopdf



**Table des
Matières**

Produced with ScanTOPDF

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1
Synthèse bibliographique	
Chapitre I : La phytothérapie	3
1. Phytothérapie.....	3
2. L'origine des plantes médicinales	4
2.1. Plantes de cueillette.....	4
2.2. Plantes de culture	4
3. Les formes de préparation en phytothérapie.....	5
3.1. Les tisanes	5
3.2. Les poudres	5
3.3. Les huiles essentielles "HE"	5
3.4. Les teintures	5
3.5. Les alcoolats.....	5
3.6. Les extraits	5
4. Les principes actifs des plantes médicinales	6
4.1. Huiles essentielles.....	6
4.2. Flavonoïdes	6
4.3. Alcaloïdes.....	6
4.4. Tanins.....	7
4.5. Saponines	7
4.6. Les coumarines.....	7
4.7. Phénols	7
4.8. Minéraux	7
4.9. Glucosides	8
4.10. Mucilages.....	8
5. Domaines d'application des plantes médicinales.....	8
5.1. En médecine.....	8
5.2. En agriculture.....	9
5.3. En alimentation	9
5.4. En cosmétique	9

Chapitre II : les plantes sélectionnées	10
1. Ruta chalepensis	10
1.1. Description de Ruta chalepensis.....	10
1.2. Systématique	10
1.3. Origine géographique.....	11
1.4. Propriété d'utilisation dans la médecine traditionnelle	11
1.5. Utilisation populaire en Algérie	11
1.6. Composition chimique	11
2. Bêta vulgaris « var. ciela».....	13
2.1. Description de Bêta vulgaris.....	13
2.2. Systématique	13
2.3. Origine géographique.....	14
2.4. Propriété d'utilisation dans la médecine traditionnelle	14
2.5. Composition chimique	14
Chapitre III : l'activité antioxydante et antibactérienne	10
1. L'activité antioxydante	15
1.1. Définition des antioxydants.....	15
1.2. Les antioxydants naturels.....	15
1.3. Les antioxydants enzymatiques.....	15
1.4. Les radicaux libres	16
1.5. Mécanismes d'action des radicaux libres.....	16
1.6. Principaux radicaux libres rencontrés en biologie	17
1.7. Stress oxydant	17
1.8. Les sources de production des radicaux libres	18
2. Les agents antimicrobiens	18
2.1. Définition	18
2.2. Mode d'action des agents antimicrobiens.....	18
2.3. Action germicide.....	19
2.4. Action germistatique (bactériostatique et fongistatique).....	19
2.5. Types d'agents antimicrobiens.....	19
2.5.1. Agents physiques.....	19
2.5.2. Agents chimiques	20
2.5.3. Agents chimio thérapeutiques.....	20
2.6. Détermination de l'activité antimicrobienne	21
2.6.1. Notion de germe test	21
2.6.2. Détermination des doses actives d'un agent antimicrobien	21
2.6.3. Méthode des porte-germes	21

2.6.4.	Détermination des doses minimales inhibitrices et bactéricides	21
Partie expérimental		
Matériel et méthodes		
1.	Récolte du matériel végétal.....	22
2.	Etude phytochimique	23
2.1.	Tests préliminaires de la composition chimique.....	23
2.1.1.	Alcaloïdes.....	23
2.1.2.	Coumarines.....	23
2.1.3.	Tanin	24
2.1.4.	Flavonoïdes.....	24
2.1.5.	Saponosides.....	25
2.1.6.	Mucilages	25
2.2.	Préparation de l'extrait méthanolique	25
2.3.	Séparation et identification par chromatographie sur couche mince (C.C.M).....	28
2.4.	Analyse des extraits méthanoliques de <i>Béta vulgaris</i> et de <i>Ruta chalepensis</i> :.....	29
2.4.1.	Dosage des polyphénols.....	29
2.4.2.	Dosage des flavonoïdes.....	30
2.4.3.	L'évaluation de l'activité anti-oxydante : Piégeage du radical libre DPPH.....	30
3.	Tests microbiologiques.....	32
3.1.	Les souches testées.....	32
3.2.	Milieux de culture utilisée.....	33
3.3.	Évaluation de l'activité antibactérienne.....	33
3.3.1.	Préparation des suspensions bactériennes.....	33
3.3.2.	Mode d'ensemencement des souches bactériennes.....	34
3.4.	Test du méthanol ou contrôle négatif.....	34
3.5.	Antibiogramme ou contrôle positif.....	34
3.6.	Méthode de diffusion en milieu gélosé ou aromatoگرامme	35
3.7.	Technique de dilution en milieu liquide.....	36
3.7.1.	Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	37
3.7.2.	Concentration minimale bactéricide (CMB).....	37
3.7.3.	Le pourcentage d'inhibition	39
3.7.4.	Analyse de la variance :	39

Résultats et discussion

1. Résultats de l'étude phytochimique.....	40
1.1. Tests préliminaires de la composition chimique.....	40
1.2. Rendement de l'extraction	43
1.3. Analyse phytochimique des extraits méthanoliques.....	44
1.3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	44
1.3.2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes	45
1.3.3. L'évaluation de l'activité antioxydante (DPPH).....	47
2. Résultats de l'activité antibactérienne	48
2.1. Test du méthanol (test négatif).....	48
2.2. Antibiogramme.....	49
2.2.1. Effet antibactérien des extraits sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	51
2.2.2. Effet antibactérien des extraits sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300.....	53
2.2.3. Effet antibactérien des extraits sur <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11178.....	56
2.2.4. Effet antibactérien des extraits sur <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	58
2.2.5. Effet antibactérien des extraits sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	60
2.3. Pourcentage d'inhibition.....	64
Conclusion.....	68

Références bibliographiques

Annexes

Produced with Scantopdf



Introduction

Des plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutique. Récemment, l'acceptation de la médecine traditionnelle comme forme alternative de santé et le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques disponibles a mené des auteurs à étudier l'activité antimicrobienne des plantes médicinales (Nostro et al, 2000) et en raison d'une conscience croissante des effets secondaires négatifs infligés par les drogues modernes, beaucoup cherchent les remèdes normaux sans effets secondaires et bien sûr coût élevé de médecine conventionnelle. (Schnaubelt, 1998)

La lutte contre le stress oxydant impliqué dans diverse pathologie (maladie neurodégénérative, le diabète, les maladies inflammatoires) constitue aussi une des plus grandes préoccupations scientifiques à travers le monde, ceci est en vue de trouver des nouvelles remèdes, bioactives ayant des effets secondaires limités ou inexistantes.

Cependant, il y a une préoccupation concernant les effets indésirables des molécules synthétiques destinées à la lutte contre le stress oxydant et les infections bactériennes. Il semble donc important de trouver une alternative à l'utilisation des antioxydants synthétiques et des antibiotiques classiques.

Les remèdes à base de plantes constituent une alternative dans les systèmes de soins primaires et donc, une voie prometteuse pour le développement des médicaments traditionnellement améliorés. Récemment, beaucoup de chercheurs s'intéressent aux plantes médicinales pour leur richesse en antioxydants naturels à savoir les polyphénols, les flavonoïdes, les tannins, etc. (Eddouks, 2007)

De part sa situation géographique particulière, l'Algérie bénéficie d'une gamme très variée de climats favorisant le développement d'une flore riche et diversifiée. En effet, le territoire Algérien couvre d'importantes ressources végétales réparties sur les côtes, les plaines, les montagnes, la steppe, le Sahara et autour des points d'eau.

Malgré la nature hétérogène d'une biodiversité immense du continent algérien, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents thérapeutiques de ces plantes.

L'évaluation des propriétés anti-oxydantes, et antimicrobiennes demeure une tâche très intéressante et utile pour l'utilisation plus au moins fréquente dans les traditions locales

médicinales et culinaires. Ces plantes représentent une source des composés bioactifs.

Dans cette optique, ce travail s'intéresse à l'évaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de la partie aérienne de deux plantes algériennes *Ruta chalepensis* « Fidjel » et *Bêta vulgaris var. cicla* « Eselk ».

Les objectifs de la présente étude sont :

- un screening phytochimique des métabolites secondaires existant dans les deux plantes.
- La préparation des extraits méthanoliques de la partie aérienne de chaque plante.
- Evaluation de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes.
- Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de chaque plante selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH.
- Evaluation du pouvoir antimicrobien des extraits méthanoliques vis-à-vis des antibiotiques et des souches bactériennes par différentes méthodes (milieu solide, milieu liquide) et aussi estimation de certains paramètres : la concentration minimale inhibitrice (CMI), la concentration minimale bactéricide (CMB).

Synthèse bibliographique



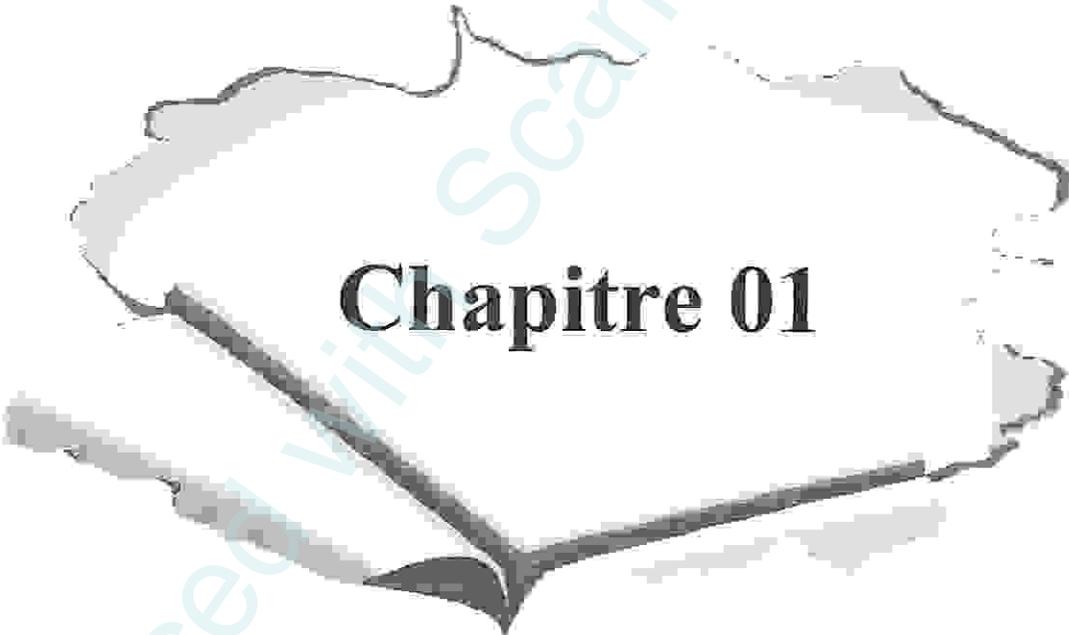
supst.

supst.
ameniti
to ~

privatne
k. 100
11 11

uhvati
njemu sve podane
the exam posla mu p
suc-cess [sək'ses] a uspeh (uspeh), to
business imati uspeha u poslu, to
postići uspeh
suc-cess-ful [sək'sɪf] a uspeo (uspio)
man uspeo čor
putovanje je bi
u narodu u

Produced by Scantopdf



Chapitre 01

La phytothérapie

1. Phytothérapie

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine. On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies. (Schauenberg et Paris, 2006)

Le mot phytothérapie provient de 2 mots grecs qui signifient essentiellement «soigner avec les plantes». La phytothérapie désigne la médecine basée sur les extraits de plantes et les principes actifs naturels. (Max wicnd, 2003) On peut la distinguer en cinq différents types :

- **Aromathérapie** : est une thérapeutique qui utilise les essences des plantes, ou huiles essentielles, substances aromatiques secrétées par de nombreuses familles de plantes, ces huiles sont des produits complexes à utiliser souvent à travers la peau.
- **Gemmothérapie** : se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les radicelles.
- **Herboristerie** : correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. L'herboristerie se sert de la plante fraîche ou séchée ; elle utilise soit la plante entière, soit une partie de celle-ci (écorce, fruits, fleurs). La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération. Ces préparations existent aussi sous forme plus moderne de gélule de poudre de plante sèche que le sujet avale.
- **Homéopathie** : a recours aux plantes d'une façon prépondérante, mais non exclusive ; les trois quarts des souches sont d'origine végétale, le reste étant d'origine animale et minérale.
- **Phytothérapie pharmaceutique** : utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présentés sous forme de sirop, de gouttes, de gélules, de lyophilisats... etc. (Strang, 2006)

2. L'origine des plantes médicinales

Les plantes médicinales sont subdivisées en deux groupes :

2.1. Plantes de cueillette

Ce sont des plantes spontanées, récoltées pour certains de leurs effets thérapeutiques reconnues par les pharmacopées traditionnelles mais celles-ci présentent un certain nombre d'inconvénients :

- Dispersion géographique.
- Irrégularité de croissance, qualité inégale et quantité insuffisante, ainsi qu'une récolte insuffisante nécessitant une main d'œuvre abondante et qualifiée. (Fournier, 1999)

2.2. Plantes de culture

Ce sont des plantes de cueillette cultivées par des techniques agricoles. Ces cultures de plantes médicinales offrent de nombreux avantages :

- Matière première abondante, homogène et de bonne qualité "possibilité d'amélioration".
Récolte aisée, souvent mécanisée.
- Frais de mains d'œuvre réduits.
- Traitement du matériel végétal au voisinage des champs de cultures évitant l'altération des principes actifs.
- Risque très faibles de substitution ou de falsification. (Callery et Emma, 1998)

Quelque soit l'origine des plantes "cueillette ou culture", il est important de faire une identification botanique des espèces de plantes choisies ainsi qu'une vérification de leurs propriétés thérapeutiques supposées, pour éviter tout effet indésirable de ces plantes. (Bahrun, 1996)

3. Les formes de préparation en phytothérapie

3.1. Les tisanes

Généralement, on utilise des plantes sèches. Les tisanes sont obtenues par macération, digestion, infusion ou décoction en utilisant de l'eau. (Sabai et Boudali, 2012)

3.2. Les poudres

Préparées par pulvérisation suivie d'un tamisage, les poudres de plantes entrent directement dans la composition des gélules mais servent aussi à la fabrication d'autres formes galéniques comme les extraits et les teintures. (Sabai et Boudali, 2012)

3.3. Les huiles essentielles "HE."

L'HE est une substance odorante, volatile de consistance huileuse que l'on retire des végétaux soit par distillation, soit par expression ou par quelques autres procédés moins souvent utilisés. La distillation est la méthode la plus courante. (Grosmond, 2001)

3.4. Les teintures

Elles sont obtenues à partir de poudres végétales sèches et leur titre alcoolique varie selon le type de drogue. Il peut être à 60° (principes actifs très solubles), de 70° à 90° (Exemple : Produits résineux et huiles volatiles). (Sabai et Boudali, 2012)

3.5. Les alcoolats

Ils sont obtenus par distillation des principes volatils de substances végétales au contact de l'alcool. Ils sont toujours incolores et inaltérables mais il faut les conserver dans des flacons bien bouchés. (Grosmond, 2001)

3.6. Les extraits

Les extraits sont obtenus en traitant la plante dans une solution vaporisable (éther, eau, alcool,...) par divers procédés d'extraction (macération, digestion, infusion) puis en évaporant ces solutions jusqu'à obtenir une consistance fluide, molle ou sèche. On les classe donc selon leurs consistances. (Grosmond, 2001)

4. Les principes actifs des plantes médicinales

La capacité d'un remède à base de plantes d'influencer les fonctions du corps humain est due à ses différents composants, des principes actifs qui se trouvent dans toutes les parties de la plante mais de manière inégale. Et tous ces derniers, d'une même plante n'ont pas les mêmes propriétés. (Bruneton, 1999)

4.1. Huiles essentielles

Les huiles essentielles végétales sont des composés volatils, oléagineux, dans la plupart des cas à la senteur aromatique, qui peuvent avoir une action très variée. Certaines possèdent ainsi des vertus anti-inflammatoires, antibactériennes, antiphagiques, antiparasitaires, antiseptiques et antivirales. (Hansw, 2007)

4.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes, présents dans la plupart des plantes, sont des pigments polyphénoliques qui contribuent, entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaune ou en blanc. Ils ont un important champ d'action et possèdent de nombreuses vertus médicinales, ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation. (Eberhard et al., 2005) Certains flavonoïdes ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antivirales, et des effets producteurs sur le foie. (Iserin, 2001)

4.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques azotés, qui doivent leur activité pharmacologique au groupe aminé qu'ils contiennent en permanence. Certains sont des médicaments connus qui ont des vertus thérapeutiques avérées. C'est le cas d'un dérivé de la pervenche de Madagascar employé pour traiter certains types de cancer. (Hansw, 2007)

D'autres alcaloïdes, comme l'atropine, présente dans la belladone, ont une action directe sur le corps : Activité sédatrice, effets sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson). (Bruneton, 1999)

4.4. Tanins

Les tanins, ou acides tanniques, sont des composés organiques complexes présents dans pratiquement toutes les plantes à des concentrations diverses. Ils sont souvent contenus dans l'écorce ou dans les feuilles, ce qui leur donne un goût piquant désagréable et les rend immangeables pour le bétail. (Hansw, 2007) Les tanins sont des composants polyphénolique, ils stoppent les hémorragies et luttent contre les infections. Il existe deux types de tanins : Les tanins hydrolysables et les tanins condensés ou pro-anthocyaniques. (Bruneton, 1999)

4.5. Saponines

Principaux constituants de nombreuses plantes médicinales, les saponines sont des glucosides contenus dans les plantes qui doivent leur nom au fait qu'elles moussent lors qu'on les mélange avec de l'eau. Il existe deux groupes différents de saponines : Les saponines triterpènes et les saponines stéroïdes. (Hansw, 2007)

4.6. Les coumarines

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

4.7. Phénols

Les phénols, caractérisés par leur structure en anneau, comprennent notamment l'acide salicylique, à partir duquel la célèbre aspirine a été développée. Les phénols étaient autrefois utilisés pour désinfecter les blessures, mais à hautes doses ils peuvent provoquer de fortes irritations cutanées. (Hansw, 2007)

4.8. Minéraux

Certaines plantes médicinales contiennent également beaucoup de minéraux, c'est-à-dire des substances inorganiques qui sont nécessaires à la construction des tissus protecteurs, à la synthèse des enzymes et au bon fonctionnement du système nerveux. (Bruneton, 1999)

4.9. Glucosides

Les glucosides sont des composés organiques. Comme ils ont souvent des actions différentes, ils sont répartis en divers sous-groupes dont le plus important est représenté par les glucosides cardiotoniques utilisés pour augmenter l'activité cardiaque lorsqu'elle est insuffisante. Ils ont en générale aussi des propriétés diurétique ce qui entraîne une diminution des liquides dans les tissus et fait ainsi baisser la pression artérielle. (Hansw, 2007)

4.10. Mucilages

Sont des produits de la polymérisation de nombreux sucres dont certains peuvent être modifiés (exemple l'acide uronique qui est un polysaccharide hétérogène). Les mucilages ont la propriété de gonfler dans l'eau. On les utilise comme : Laxatifs mécaniques à effet de lest et aussi adoucissants de la gorge. (Ledard et Guinaudeau, 1997)

5. Domaines d'application des plantes médicinales

Les substances naturelles issues de végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans : l'industrie, En alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes de nouvelles molécules actives, ou des matières premières pour la semi-synthèse. (Bahorun, 1997)

5.1. En médecine

En tant que médicament pour l'homme :

- En urologie, dermatologie, gastrites aiguës, toux, ulcères d'estomac, comme laxatifs, sommeil et désordre nerveux. (Svoboda et Hampson, 1999)
- Système cardiovasculaire, exemple : Flavoco est un médicament constitué par la flavone en combinaison avec la rutine et l'isoquercétine, il constitue un traitement efficace contre l'athérosclérose. (Narayana, 2000)
- Contre le diabète, exemple : *Allium sativum*, *Azadirachta indica*. (Dastidar, 2004)
- Les maladies de stress : Les plantes ont des activités antioxydantes, exemple : Le thé noir, le thé vert et le cacao sont riches en composés phénoliques. (Narayana, 2000)

- Activité antimicrobienne, antivirale, antiparasitaire : Depuis longtemps, les produits naturels de plantes ont joué un rôle important dans la découverte de nouveaux agents thérapeutiques exemple : La quinine obtenue à partir du quinquina "*Cinchona pubescens*" a été employée avec succès pour traiter la malaria. (Dastidar, 2004)

5.2. En agriculture

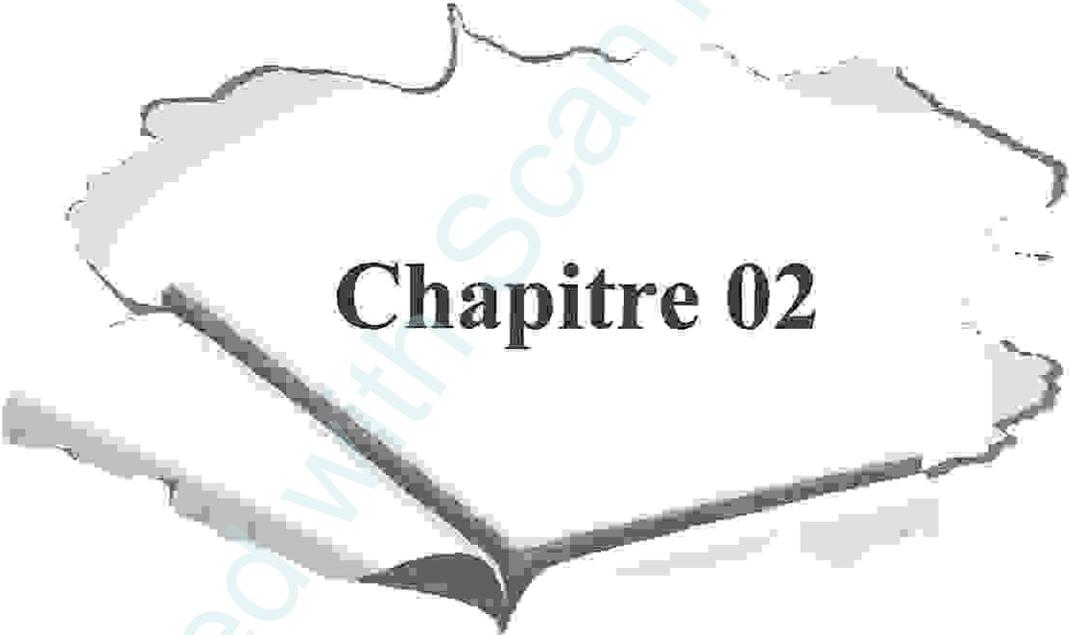
Les plantes médicinales jouent aussi un rôle très important dans l'agriculture mondiale, ainsi que l'agriculture biologique là ou en procèdent à une utilisation bio seine en utilisant ces dernières sans recourir à l'emploi de pesticides. Les huiles des plantes médicinales peuvent aussi avoir un control sur de divers insectes et nématodes (vers parasites). (Amjad Hossain, 2005)

5.3. En alimentation

Certaines plantes médicinales contiennent certaines substances végétales dans des concentrations relativement élevées et contrôlées, c'est-à-dire standardisées. Ainsi, telle ou telle plante est connue pour sa forte teneur en vitamines, en phythormone, en sel minéraux, en enzymes... Ces substances sont extraites et/ou conditionnées afin de pouvoir être utilisées par le phytothérapeute aux soins du patient. (Bahorun, 1997)

5.4. En cosmétique

A cause des dernières soupçons et ombrages qui tournent autour de la suspicion des produits chimiques et leurs dangers sur le corps humain, la tendance de l'utilisation des plantes médicinales dans les produits de beauté, parfums et articles de toilette ainsi que les produits d'hygiène s'est accélérée. N'empêche que cette tendance existe depuis longtemps, les produits cosmétiques ont utilisé les vertus associées aux plantes. Aujourd'hui, des plantes de plus en plus nombreuses entrent dans la composition de produits destinés à améliorer l'apparence physique. (Porter, 2001)



Chapitre 02

Les plantes sélectionnées

1. *Ruta chalepensis*

1.1. Description de *Ruta chalepensis*

Ruta chalepensis est une plante aromatique, appartenant à la famille des rutacées, appelée communément par la population locale « Fidjel ». (Beniston, 1984)

La rue d'Alep, plante herbacée à tige ligneuse à la base, pouvant atteindre 1 m (Baba Iassa, 1999). Les feuilles de 6 à 12 cm de long, sont aromatiques, ovales, larges, pennatiséquées, bleu-vertes, elles présentent de nombreux lobes oblongs, lancéolés ou aborales. En été, s'épanouissent des fleurs de 1 à 2 cm de diamètre, en coupe, de couleur jaune foncé, portant quatre ou cinq pétales frangés de longs poils. Elles sont réunies en cymes lâches. (Mioulane, 2004)

Appelée aussi : *Ruta angustifolia* / *Ruta graveolens* var. *angustifolia* (Duke et al., 2008).

La rue est citée sous le terme de سذاب *sadzab* par Abdalbasset et AbdeTawab, 2008, elle est aussi dite en berbère : أوورمي *ouermi*, Issel, Issin (Baba Iassa, 1999). Autres noms sont indiqués par Duke et al., 2008: *Al Shathap* الشذاب, *BouGhans*, en grec : *Pigam*, *zent*.

1.2. Systématique

Règne : *Plantae*

Sous règne : *Tracheobionta* (plantes vasculaires)

Super division : *Spermatophyta* (plantes à graine)

Division : *Magnoliophyta* (plantes à fleurs)

Sous division : *Angiospermae*

Classe : *Magnoliopsida* (dicotylédons)

Sous classe : *Rosidae*

Super ordre : *Rutanae*

Ordre : *Sapindales*

Famille : *Rutaceae*

Genre : *Ruta*

Espèce : *chalepensis*

Nom vernaculaire : فيجيل



Figure 01 ; *Ruta chalepensis* [Prise Personelle].

1.3. Origine géographique

C'est une espèce méditerranéenne, relativement commune dans toute l'Algérie septentrionale (Baba Iassa, 1999), au nord-est de l'Afrique, sud de l'Europe et le sud-ouest de l'Asie. (Mioulane, 2004)

Elle est spontanée, largement répendue en Afrique du nord, particulièrement en Algérie. On la rencontre fréquemment dans les rocailles, pelouses et coteaux secs. (Beniston, 1984) En Algérie, cette plante est aussi cultivée dans les jardins.

1.4. Propriété d'utilisation dans la médecine traditionnelle

Ruta chalepensis, est une plante médicinale encore utilisée dans la médecine traditionnelle de nombreux pays comme laxatif, anti-inflammatoire, analgésique, antispasmodique, abortif, antiépileptique, emménagogue et pour le traitement de pathologies cutanées. (Johnson, 1999)

Des investigations pharmacologiques ont montré que l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Ruta chalepensis* possède une activité anti inflammatoire et une activité antipyrétiques. (Mansour et al., 1990) Des screening phytochimiques ont mis en évidence la présence de coumarines (chalepensisin, chalpin, tutamarin...etc) et d'alcaloïdes (kokusaginine, skimmianine, arborinine, etc). (Ulubelen et al., 1986)

1.5. Utilisation populaire en Algérie

La rue est très utilisée à des fins diverses : Fébrifuge, antivenimeux local, contre les nausées et les vomissements, dans les constipations, dans le paludisme, pour soigner les anémies (Chiali, 1973), le rhumatisme, contre les douleurs gastriques, les vers intestinaux (Baba Aissa, 1999), dans les accouchements difficiles, les maux des yeux et des oreilles, dans l'asthme, les névroses. (Chiali, 1973)

1.6. Composition chimique

Les études phytochimiques de *Ruta chalepensis* indiquent la présence de divers composée :

• Huile essentielle :

Le rendement en huile essentielle et le composé majoritaire diffèrent selon le lieu de récolte mais généralement les composés les plus rencontrés sont le 2-nonanone et le 2-undecanone (Fleming et al., 2000), cétones aliphatique. (Mejri et al., 2010)

- **Coumarines**

-Hydroxy-coumarines : umbelliférone, hemiarin, gravelliféron, rutacultin.

-Furo-coumarines : bergapten, psoralen, xanthotoxin, chalepéensin, isopimpinellin, isoimperatorin, rutarin, rutaretine.

-Pyrano-coumarines : parmi eux : xanthyletine. (Milesis et al., 2001)

- **Alcaloïdes**

-Furoquinoline alcaloïdes : skimmianine, gamma-fagarine, dictamine, kokusaginine, pteleine. (Foster et Tyler, 1999)

-Acridine alkaloids : arborinine- 2-arylquinoline, rutacridone, Gravacridiol (Waterman, 1975), chalaridone. (Umbelen et Terem, 1988)

-Quinazoline alcaloïdes : comme l'arborine

-Quinoline alcaloïdes : parmi eux : graveoline, graveolineine. (Waterman, 1975)

- **Flavonoïdes :**

Le composant majoritaire est la rutine (Fleming, 2000) : tous les parties de la plante renferment un glucoside, la rutine, (Bonnier, 1999) ou rutoside qui est la vitamine P (Schauenberg et Paris, 1977) isomère de la quercitrine (Dewick, 2002), identique à un glucoside qu'on trouve dans le Cáprier. (Bonnier, 1999)

- **Lignans :** savinine, helioxanthine. (Fleming, 2000)

2. *Bêta vulgaris* « var. *cicla* »

2.1. Description de *Bêta vulgaris*

Bêta vulgaris « var. *cicla* » connue sous le nom de « bette à cardes » est une espèce du *Bêta vulgaris* de la famille des chénopodiacées tribu des *Cyclolobae* (située dans les Amaranthacées par la classification phylogénétique).

Bêta vulgaris est une herbacée bisannuelle ou plus rarement plante vivace aux tiges feuillées de plus en plus de 1-2 m de haut. Les feuilles sont en forme de cœur, 5-20 cm de long sur les plantes sauvages (souvent beaucoup plus grande chez les plantes cultivées). Les fleurs sont produites en épis denses, chaque fleur est très petite, diamètre de 3-5 mm, vert rougeâtre ou teinté, avec cinq pétales, ils sont pollinisés par le vent. Le fruit est une grappe de disques nucules. (Cachiță et al., 2004)

Nom commun : bette à cardes, blette, côte de blette, côte de bette, poirée à cardes cette plante, dicotylédone, apétale, dériverait de la betterave maritime (actuellement classée comme *Bêta vulgaris* L. subsp. *maritima* (L.) Arcang) qui est spontanée sur les rivages maritimes en Europe. C'est une plante très proche de la betterave. Ce sont en fait des formes dérivées de la même sous-espèce.

2.2. Systématique

Règne : *Plantae*.

Division : *Magnoliophyta*.

Classe : *Magnoliopsida*.

Ordre : *Caryophyllales*.

Famille : *Chenopodiaceae*.

Genre : *Bêta*.

Espèce : *vulgaris*.

Nom vernaculaire : السلق.



Figure 02 : *Bêta vulgaris* [Prise Personnelle].

2.3. Origine géographique

La famille est largement distribuée dans les milieux salins tempérés et subtropicaux du monde entier, particulièrement autour de la Méditerranée, de la mer Caspienne et de la mer Rouge, dans les steppes du centre et de l'est de l'Asie et dans la pampa d'Argentine. Certaines espèces sont également devenues des plantes adventices qui poussent dans les sols alcalins autour des habitations.

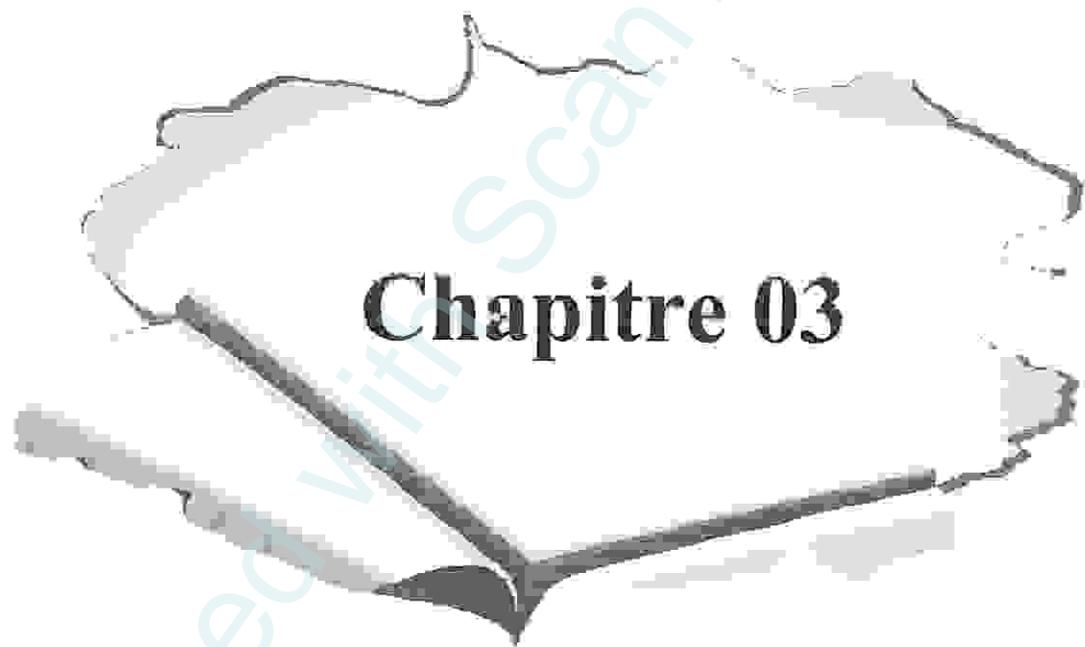
Les Chenopodiaceae sont surtout caractéristiques des terrains plus ou moins salés : ce sont des nitrophiles ou rudérales abondantes dans les décombres (*Chenopodium*) ou des halophiles formant des peuplements denses sur les côtes ou dans les steppes et les déserts salés (associations à *Atriplex*, *Salicornia*, *Spinifex*, *Salsola*, *Suaeda* des déserts d'Australie, d'Asie, des chotts sahariens ou des salitrales d'Argentine). C'est ainsi qu'elles poussent en abondance sur les rivages maritimes et les espaces laissés à sec par un retrait relativement récent des mers, comme la betterave sauvage (*Beta vulgaris*).

2.4. Propriété d'utilisation dans la médecine traditionnelle

Bette à cardé (espèce *Béta vulgaris*) est une plante herbacée bisannuelle de légumes-feuilles cultivés dans de nombreuses régions du monde pour sa disponibilité toute l'année, peu coûteux et largement utilisés dans de nombreux plats traditionnels. (Gao et al., 2009) La plante est plus robuste et plus facile à cultiver que les épinards et le céleri. Les feuilles de bette à cardé contiennent des concentrations significatives sur le plan nutritionnel de vitamines A, C et B, en calcium, en fer et en phosphore. (Pyo et al., 2004) Chard (*Béta vulgaris*L. «var. cicla» : Chenopodiaceae) a indiqué avoir des propriétés hypoglycémiques. (Bolkent et al., 2000) Ces espèces sont utilisées comme un remède folklorique populaire pour le foie et les reins, pour la stimulation des systèmes immunitaires et hématopoïétiques, et comme un régime spécial dans le traitement du cancer. (Kanner et al., 2001)

2.5. Composition chimique

L'étude phytochimique de blettes a révélé la présence de certains acides gras (acides palmitique, stéarique, oléique, linoléique et linoléique), des phospholipides, des glycolipides, des polysaccharides, l'acide ascorbique, l'acide folique, de la pectine, des saponines, des flavonoïdes, des acides phénoliques (Bolkent et al., 2000), des bêtaïnes (Kugler et al., 2004) et de l'épigénine. (Gao et al., 2009)



Chapitre 03

***L'activité antioxydante et
antibactérienne***

1. L'activité antioxydante

Les vertus des extraits méthanoliques sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises. De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche ont porté sur les activités antimicrobiennes et antioxydantes des extraits des plantes médicinales.

Quelques récentes publications ont rapporté que certains extraits des plantes sont plus efficaces que quelques antioxydants synthétiques. Les effets antioxydants d'huiles essentielles et d'extraits des plantes sont dus principalement à la présence des groupes d'hydroxyle dans leur structure chimique. (Hussain, 2010)

1.1. Définition des antioxydants

Du point de vue biologique, les antioxydants sont toutes substances qui présentes à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat (Abuja et Albertini, 2001), et dont les produits de la réaction entre l'oxydant et l'antioxydant ne doivent pas être toxiques et ne branchent pas la réaction radicalaire. (Durackova, 2008)

1.2. Les antioxydants naturels

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants in vivo ont été proposées. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, l'acide urique, les testogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E... etc. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres. (Hamidi, 2013)

1.3. Les antioxydants enzymatiques

Les enzymes antioxydants ont une signification négligeable dans l'espace extracellulaire alors qu'ils jouent un rôle très significatif dans l'espace intracellulaire. (Durackova, 2008) On note principalement : les enzymes responsables de la dismutation de l'ion superoxyde, ce sont les superoxydes dismutases, les enzymes agissant sur les peroxydes, c'est la catalase, et les glutathion peroxydases, ainsi que les enzymes intervenant dans la protection des protéines à fonction thiol, c'est la thiorédoxine. (Goudable et Favier, 1997)

1.4. Les radicaux libres

Les RL sont des espèces chimiques indépendantes (Kehrer, 1993), atome, molécules ou leurs fragments (Durackova, 2008) possédant un ou plusieurs électrons célibataires. (Kehrer., 1993 ; Delattre., 2005; Durackova.,2008)

En biologie, le terme « radical libre » est plus particulièrement utilisé dans le contexte de la communication des entreprises pharmaceutiques et cosmétiques pour désigner les dérivés réactifs de l'oxygène, ou « espèce réactive oxygénée », ou « radicaux oxygénés libres », qui agressent les constituants des cellules : on appelle cette agression le stress oxydatif ou stress oxydant.

1.5. Mécanismes d'action des radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être considérés comme des déchets du métabolisme cellulaire. Ce sont des atomes et des molécules dotés d'une forte énergie et qui avant d'être neutralisés détruisent ce qu'ils rencontrent. Ils sont produits dans toutes les cellules de l'organisme tout à fait normalement et en faible quantité dans les mitochondries. Il s'agit des ions oxygène, hydroxyde et de l'eau oxygénée qui sont libérés lors des réactions biochimiques. Avant d'être neutralisés ils provoquent des lésions sur tous les éléments qu'ils côtoient.

L'organisme sait cependant se défendre contre eux, grâce aux enzymes antioxydantes contenues dans nos cellules. Ces enzymes sont aidées dans leur action antiradicalaire par la vitamine E, C, provitamine A, le zinc et le sélénium. Si ces systèmes de défense sont débordés ou insuffisants, les radicaux libres ont tout le loisir d'être nuisibles : ils s'attaquent alors aux membranes cellulaires dont les acides gras insaturés sont dénaturés (leur structure est modifiée) ; ils agressent également les protéines. Le plus simple des capteurs des radicaux libres est l'alcool éthylique, agent de transfert d'hydrogène qui conduit à un composé biologiquement compatible, l'acétaldéhyde, bio-oxydable par la chaîne enzymatique avec production d'énergie. (Hadi, 2004)



1.6. Principaux radicaux libres rencontrés en biologie

Tableau 01 : les radicaux libres (Durackova, 2008).

Anion superoxyde	$O_2^{\circ-}$
Radical hydroxyle	$^{\circ}OH$
Oxygène singulet	1O_2
Monoxyde d'azote	NO°
Peroxyde d'hydrogène*	H_2O_2
Nitroxyde	NOO°
Peroxynitrite	$ONOO^{\circ}$
Radical peroxy	ROO°

1.7. Stress oxydant

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes de l'organisme en faveur des premiers, ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles. (Pincemail *et al.*, 1999) Le stress oxydatif est un fonctionnement de l'organisme qui est normal tant qu'il ne dépasse pas certaines limites. En effet, tous les organismes vivants qui consomment de l'oxygène produisent des radicaux libres qui sont de petites substances chimiques très oxydées par le contact avec l'oxygène, et dont nos cellules savent normalement très bien se débarrasser. Le stress oxydatif devient anormal lorsque les cellules sont soit dépassées par la quantité de radicaux libres à éliminer, soit ne disposent pas de ressources antioxydantes (vitamines, oligoéléments, enzymes) suffisantes pour les éliminer.

1.8. Les sources de production des radicaux libres

Des radicaux libres sont produits par un grand nombre de mécanismes tant endogènes qu'exogènes. Sans vouloir faire du finalisme, nous pouvons considérer que certaines de ces productions sont volontairement programmées par l'organisme à des fins de défense ou d'envoi des signaux.

- La mitochondrie est la source de production majeure d' $O_2^{\bullet-}$ dans la cellule intacte.
- L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par le complexe enzymatique NADPH oxydase des cellules phagocytaires activées.
- Une autre source importante des radicaux sont les mécanismes de cycles rédox que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones.
- Les métaux toxiques (chrome, vanadium, cuivre) mais aussi le fer libres (existant lors de surcharges générales ou localisées)
- Les rayonnements sont par différents mécanismes des sources de radicaux, qu'il s'agisse des rayons ionisants X ou gamma, ou des rayons ultraviolets. (Durackova, 2008)

2. Les agents antimicrobiens

2.1. Définition

On désigne par agent antimicrobien tout agent chimique, physique ou biologique inhibant la croissance et/ou la survie des micro-organismes. (Asada et al., 1998) Ces substances ayant une affinité pour les cellules des parasites et le pouvoir de les tuer plus fort que les dommages qu'elles causent à l'organisme ; ce qui rendra possible la destruction des parasites sans perturbation sérieuse de l'organisme. (Perry et al., 2002)

2.2. Mode d'action des agents antimicrobiens

Les agents antimicrobiens agissent par différents mécanismes et peuvent être utilisés de diverses manières, selon les objectifs recherchés et leur spécificité d'action qui peut être germicide ou germistatique.

2.3. Action germicide

Cette action caractérise les agents ayant une action létale sur les microorganismes. En fonction de la catégorie de microorganismes ciblés, les agents antimicrobiens exercent une action bactéricide (agent antibactérien), algicide (agent anti-algues), fongicide (agent antichampignons), virucide (agent anti-virus) ou antiparasitaire (agent anti-protazoaires): (Bousseboua, 2006)

2.4. Action germistatique (bactériostatique et fongistatique)

Dans ce cas, les agents inhibent la croissance du microorganisme sans le tuer (bactérie ou Champignon). (Bousseboua, 2006) Les substances bactériostatiques inhibent temporairement le développement microbien, les microorganismes recommenceront à se développer dès que la concentration de la substance aura diminué ou dès que l'application du procédé physique sera interrompue. (Guiraud, 1998)

2.5. Types d'agents antimicrobiens

Il existe trois types d'agents antimicrobiens : physiques, chimiques et chimio thérapeutiques.

2.5.1. Agents physiques

De nombreux agents physiques exercent un effet antagoniste vis-à-vis des microorganismes. La chaleur ou certains types de radiations ont une action létale qui permet leur emploi dans la stérilisation de différents milieux. D'autres agents moins agressifs, comme la dessiccation limitée sont utilisés à d'autres fins.

Les principaux agents physiques sont la chaleur (humide ou sèche), les radiations (micro-ondes, rayons ultra-violet, rayons gamma, rayons bêta, rayons alpha ; rayons X). Chaque type de radiation a une longueur d'onde spécifique qui détermine son énergie, son mécanisme d'action et son domaine d'application. (Bousseboua, 2006)

2.5.2. Agents chimiques

Ils correspondent aux substances utilisées comme désinfectants et antiseptiques. Les désinfectants sont des agents antimicrobiens utilisés sur les matériaux inertes ; leur action est létale ou inhibitrice de la croissance microbienne. Les antiseptiques ont la même nature chimique que les désinfectants mais leur toxicité plus réduite permet leur emploi sur les tissus vivants. Les désinfectants et antiseptiques les plus largement employés sont les alcools, les composés phénoliques qui agissent par dénaturation des protéines et altération des membranes cellulaires, les aldéhydes, les halogènes et les détergents. (Bousseboua, 2006)

L'aldéhyde le plus commun est le formaldéhyde, souvent commercialisé en solution à 40% (Formol). Les halogènes sont des composés dérivés du chlore, du brome et de l'iode : hypochlorites et chloramines, hypobromites, iodures, qui ont une action bactéricide par l'oxydation dénaturante des protéines et d'autres composés cellulaires. Les détergents enfin, ont la propriété de solubiliser les résidus normalement peu solubles. Seuls les détergents cationiques sont des désinfectants efficaces. (Guiraud, 1998)

2.5.3. Agents chimio thérapeutiques.

Un agent chimio thérapeutique est un composé chimique ou de synthèse qui inhibe le développement des microorganismes. Ce composé agit à faibles doses, il exerce une action très spécifique sur le fonctionnement cellulaire tout en ayant une toxicité sélective. Il inhibe le développement de sa cible ou la tue tout en étant inoffensif pour l'hôte. Dans ce groupe, on retrouve les antibiotiques, les antifongiques et les antiviraux. (Guillaume, 2000)

Il existe actuellement deux grandes catégories d'agents chimio thérapeutiques antibactériens: les sulfamides et les antibiotiques ; ils ont des modes d'action comparables et se distinguent principalement par leur origine. Les sulfamides sont des produits de synthèse alors que la majorité des antibiotiques sont d'origine naturelle (les plus anciens) d'autres de synthèse ou d'hémi synthèse. Les agents chimio thérapeutiques comprennent cinq groupes selon qu'ils affectent la synthèse de la paroi, les échanges cellulaires, la réplication et la transcription de l'ADN, la synthèse des protéines ou certaines réactions du métabolisme intermédiaire. (Prescott et al. 1995)

2.6. Détermination de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne est déterminée par plusieurs tests : le germe-test, mesure des doses actives ; porte-germes ; doses minimales inhibitrices et bactéricides (CMI et CMB).

2.6.1. Notion de germe test

On utilise des microorganismes pathogènes "modèles" comme témoins d'efficacité d'un traitement : *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium botilium*, parfois *almonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et parfois même des virus (virus de la poliomyélite) pour le traitement de l'eau, *Salmonella typhi* pour les désinfectants, *Staphylococcus aureus* pour les antiseptiques lors de la mesure du coefficient phénol, *Clostridium sporogenes* et *Bacillus stearothermophilus* pour la chaleur. (Guiraud, 1998)

2.6.2. Détermination des doses actives d'un agent antimicrobien

Il s'agit de comparer l'action d'un antiseptique avec celle du phénol en présence d'un germe test selon un protocole bien précis. Le coefficient phénol est égal au rapport entre la dilution du désinfectant et celle du phénol. (Bousseboua, 2006)

2.6.3. Méthode des porte-germes

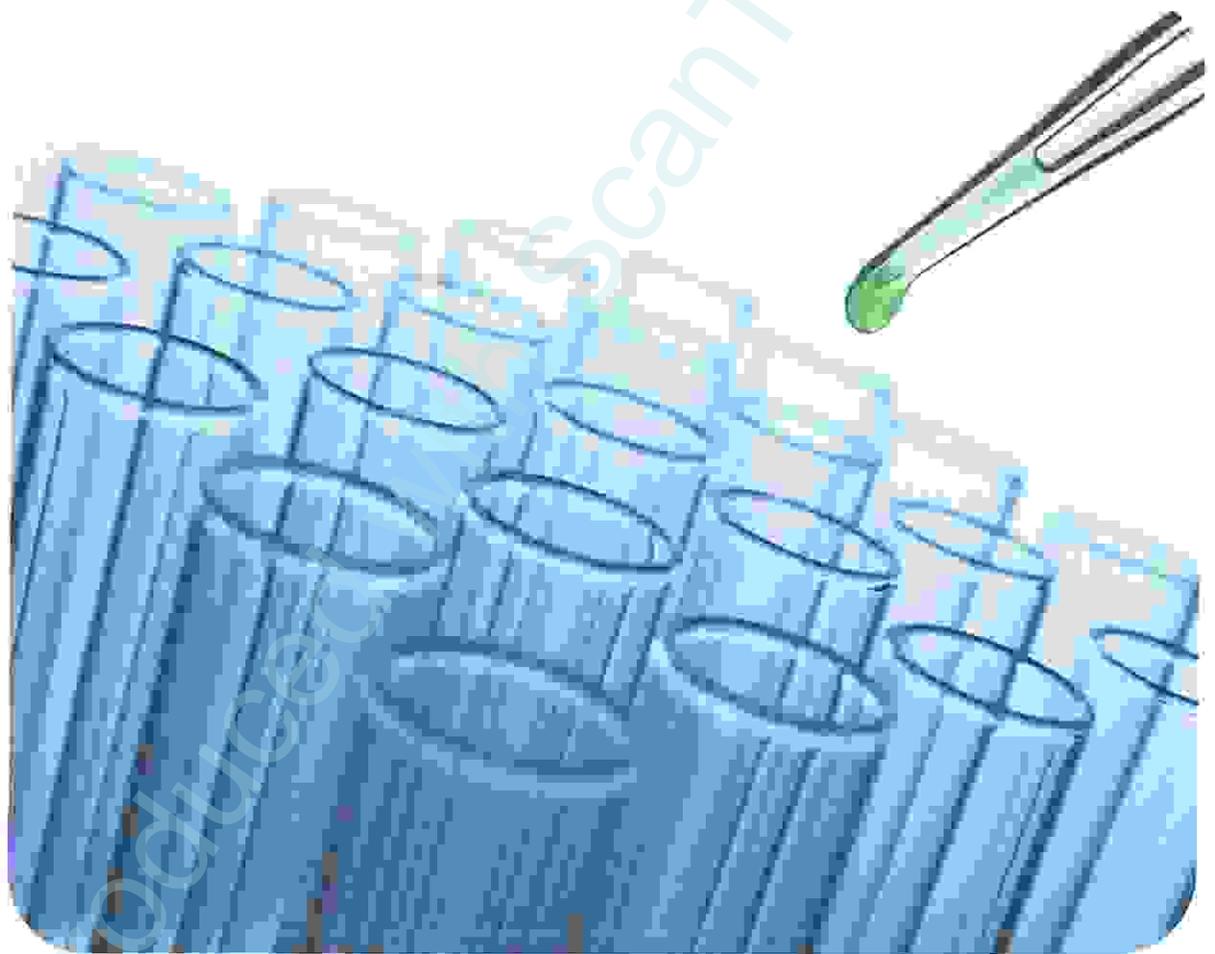
Le porte-germes est constitué d'une bandelette de papier filtre. Il est immergé dans une culture d'un germe test, séché puis mis en contact avec le désinfectant pendant des durées croissantes. La survie ou la destruction du germe est mise en évidence par immersion du préalablement séché dans un bouillon nutritif et par essai de culture. (Guiraud, 1998)

2.6.4. Détermination des doses minimales inhibitrices et bactéricides

La construction des courbes de croissance *in vitro* en présence de concentration croissante en agents antimicrobiens permet de définir des concentrations limites : c'est-à-dire la concentration pour laquelle on n'observe pas de croissance visible.

La concentration inhibitrice 50 % ou CMI correspond à une croissance égale à la moitié de la croissance du témoin et la concentration minimale bactéricide (la CMB) correspond à la concentration permettant de tuer tous les micro-organismes. Celle-ci est appréciée par étalement après culture. Ces méthodes sont adaptables aussi bien aux antibiotiques qu'à d'autres substances bactéricides. (Bousseboua, 2006)

Partie expérimentale





**Matériel et
Méthodes**

Produced with ScanTOPDF

1. Récolte du matériel végétal

La partie aérienne (les feuilles et les tiges) de *Ruta chalepensis* et de *Bêta vulgaris var. cicla* a été récoltée au mois de décembre 2013 au niveau d'une région montagneuse (la Maouna) wilaya de Guelma. (fig. 03)

Après une identification botanique par le professeur ZAAFOUR (faculté des sciences, département de biologie – Université Badji Mokhtar, Annaba). Les deux plantes, fraîchement récoltées, ont été nettoyées avec l'eau et laissées sécher à l'abri de la lumière du soleil dans un endroit sec et aéré. Le broyat va constituer la matière sèche qui va servir à la préparation de l'extrait méthanolique.

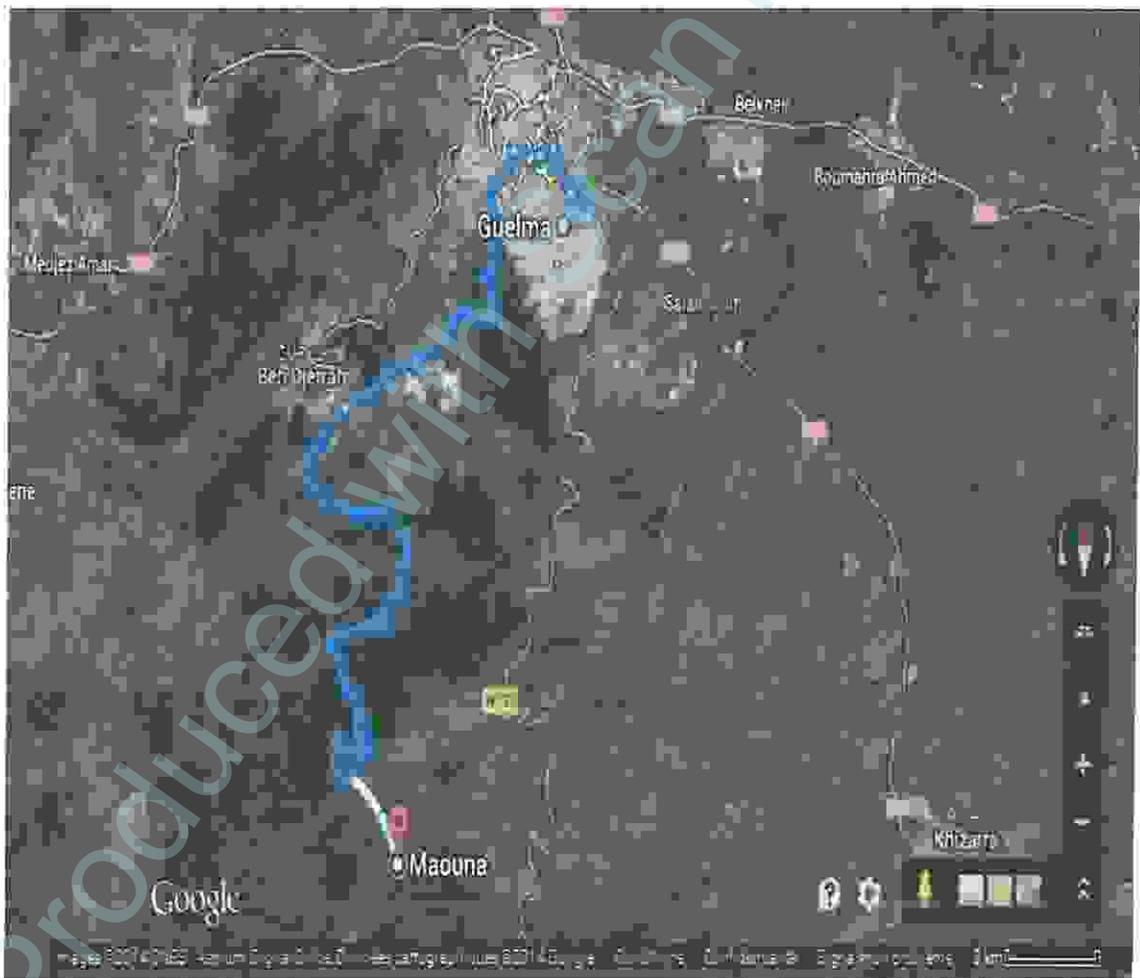


Figure 03 : Carte géographique de la wilaya illustrant la région de récolte des deux plantes.

(Google Map-Guelma, 2014)

2. Etude phytochimique

2.1. Tests préliminaires de la composition chimique

2.1.1. Alcaloïdes

❖ Macération

Dans un Erlenmeyer de 250ml, 10g de la poudre végétale sont mélangés avec 50ml de H_2SO_4 dilué au 1/10. Après agitation, puis macération pendant 24 heures à la température du laboratoire. Le mélange est filtré sur un papier filtre avec lavage à l'eau distillée de manière à obtenir environ 50ml de filtrat. (Dohou *et al.*, 2003).

❖ Réactions de caractérisation

Dans un tube à essai, on introduit 1ml de filtrat, puis on ajoute 5 gouttes de réactif de Mayer. La présence d'alcaloïdes est indiquée par la formation d'un précipité blanc jaunâtre.

❖ Test de confirmation

Nous procédons à une extraction de la poudre végétale en milieu acide. Dans un ballon de 500ml contenant 5g de poudre végétale, on verse 25 ml d'acide chlorhydrique 0,05N. Le mélange est laissé en macération sous agitation magnétique à la température du laboratoire (environ 25° C) pendant 24 heures, puis on filtre et on lave à l'eau distillée. La solution obtenue est ensuite ajustée à 20ml avec de l'eau distillée, et après on réalise le test de caractérisation précédent avec la solution obtenue. (Dohou *et al.*, 2003)

2.1.2. Coumarines

1g d'échantillon de la poudre végétale est placé dans un tube à essai en présence de quelques gouttes d'eau distillée. Le tube est recouvert avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et porté dans un bain marie pendant quelques minutes. Puis on ajoute 0,5ml de NH_4OH dilué (10%) on met deux taches sur un papier filtre et on examine sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines. (Rizk, 1982)

2.1.3. Tanin

❖ Extraction

Dans un Erlenmeyer, on disperse 5g de poudre dans 100ml d'eau bouillante. Après infusion pendant 15 mn, on filtre et on complète le filtrat à 100 ml avec de l'eau distillée.

❖ Mise en évidence des tanins

• Caractérisation par le chlorure ferrique

A 5ml de filtrat, on ajoute quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique (FeCl_3) à 2%, puis on agite le mélange. Le test positif est révélé par l'apparition d'une couleur brun-vert. (Karumi et al., 2004)

❖ Différenciation des tanins

• Tanins catéchiques

A 5 ml de solution, on ajoute 5 ml d'HCl concentré. L'ensemble est porté à ébullition pendant 15 mn puis on filtre sur papier filtre. En présence de tanins catéchiques, il se forme un précipité rouge.

• Tanins Galliques (Réaction de Stiasny)

A 30 ml de solution, on ajoute 15 ml de réactif de Stiasny (10 ml de formol à 40 % et 5 ml d' HCl concentré), puis on chauffe le mélange au bain-marie à 90°C pendant 15 mn environ. Après filtration, le filtrat a été saturé par 5g d'acétate de sodium. On ajoute 1 ml goutte à goutte d'une solution de FeCl_3 à 1 %. L'obtention d'une teinte bleue noire montre la présence de tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny.

2.1.4. Flavonoïdes

❖ Extraction

On met 3g de la poudre végétale séchée avec 75ml d'eau distillée dans une fiole. Le mélange est porté à ébullition pendant 15 minutes puis on filtre sur papier filtre et on laisse refroidir. (Edeoga1 et al., 2005)

❖ Réaction générale de caractérisation des flavonoïdes

• Coloration en milieu alcalin

En milieu alcalin, les flavonoïdes se dissolvent facilement en donnant des colorations allant du jaune au brun.

A 2ml d'extrait, on ajoute quelque millilitres de soude au 1/10^e dans un tube à essai. (Okmu, 2005) Le test positif est révélé par l'apparition d'une couleur jaune orangé.

• Coloration par perchlorure de fer (FeCl₃)

Les flavonoïdes, du fait de la présence de fonction phénolique dans leur génines, donnent des colorations variées avec des solutions diluées de FeCl₃.

A 2ml de la solution extractive on ajoute 2 à 3 gouttes d'une solution diluée de FeCl₃ à 2%. Le test positif est révélé par l'apparition d'une couleur verdâtre. (Okmu, 2005)

2.1.5. Saponosides

On porte à ébullition 100ml d'eau distillée dans un Erlenmeyer de 250ml puis on ajoute 1g de la poudre ensuite on maintient le mélange à ébullition pendant 15 mn. Après filtration, on ajuste le filtrat à 100 ml.

On remplit 1ml du décocté à 1% préparé dans un tube à essai et on ajuste le volume à 10 ml avec de l'eau distillée. Ensuite, on agite les tubes à essai verticalement, on laisse reposer pendant 15 minutes. L'apparition d'une mousse qui dure quelque instant indique la présence des saponosides. (Karuni et al., 2004)

2.1.6. Mucilages

On introduit 1ml du décocté à 10% dans un tube à essai et on ajoute 5 ml d'éthanol absolu. Après une dizaine de minutes, l'obtention d'un précipité floconneux indique la présence de mucilages. (Karuni et al., 2004)

2.2. Préparation de l'extrait méthanolique

Cette opération consiste à épuiser le matériel végétal par plusieurs solvants organiques. Cette dernière comprend les étapes suivantes :

a) Délipidation

250 g de chaque plantes (*Bêta vulgaris* et *Ruta chalepensis*) sont macérés séparément dans l'éther de pétrole. Cette macération est répétée 3 fois pendant 24 heures avec filtration et renouvellement du solvant à chaque fois.

b) Dépigmentation

Le résidu obtenu après la délipidation est macéré trois fois avec le chloroforme pendant 24 heures en filtrant à chaque fois.

c) Extraction des polyphénols

L'extraction s'effectue par macération dans le méthanol pendant 24h suivie d'une filtration. Cette opération est répétée trois fois.

Les trois filtrats sont récupérés et évaporés à basse température (40°C) dans un rot à vapeur (R-215) (fig. 04), le résidu est récupéré dans des flacons hermétiquement fermés, puis lyophilisé (fig. 05). Le lyophilisat est pesé pour calculer le rendement de l'extraction.



Figure 04 : le rot à vapeur.



Figure 05 : lyophilisateur.

➤ Calcul du rendement

Le rendement de l'extraction est le rapport entre le poids de l'extrait obtenu et le poids initial de la plante utilisée. Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$R = 100 \frac{m}{m_0}$$

Tel que

R : le rendement en %.

m : la masse de l'extrait.

m₀ : la masse initiale de la plante.

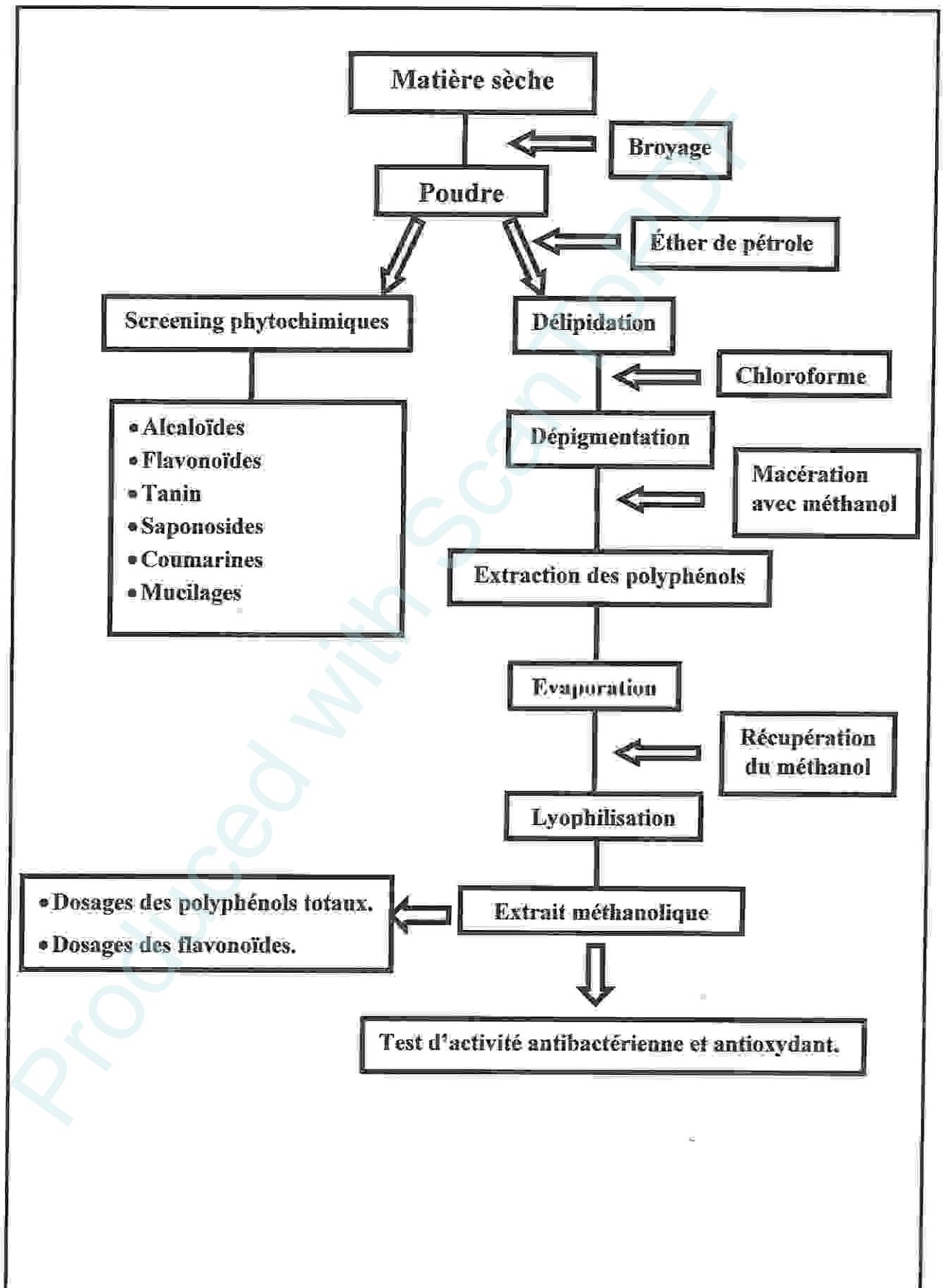


Figure 06 : Protocol expérimental.

2.3. Séparation et identification par chromatographie sur couche mince (C.C.M)

La chromatographie sur couche mince est une méthode rapide de contrôle dont la phase stationnaire est constituée d'une couche mince et uniforme, de 0,25 mm d'épaisseur, de silice séchée, finement pulvérisée et appliquée sur un support approprié (feuille d'aluminium ou de verre).

La phase mobile ou éluant se propage à la surface de la plaque par capillarité.

❖ Préparation du solvant de migration

Le solvant de migration est préparé selon les proportions suivantes : Acétate d'éthyle - méthanol - eau distillée (100V : 135V : 10V).

❖ Dépôt des échantillons

A 2cm du bord de la plaque. (25DC-Alufolien 20x20cm, Kieselgel 60 F254) :

- Déposer 8µl de chaque extrait sur la plaque à l'aide d'un capillaire.
- Déposer 8 µl de la quercétine, acide gallique et alanine (les standards).

Les points sont disposés sur une ligne horizontale, et sont séchés immédiatement sous courant d'air chaud.

❖ Migration

La plaque ainsi préparée est introduite dans la cuve à chromatographie au fond de laquelle se trouve l'éluant approprié. (Antonot et Marchal, 1998) La phase mobile parcourt alors la phase stationnaire provoquant ainsi une succession de partage des constituants entre les deux phases, ce qui permet une séparation des constituants entre les deux phases. (Marouf, 2002)

La migration est arrêtée lorsque le front du solvant a parcouru 10 à 15cm. La plaque est ensuite séchée.

❖ Révélation

Pour révéler les taches sur la plaque, on pulvérise la plaque avec une solution de Ninhydrine, d'une manière homogène. (Marouf, 2002)

Après révélation, on obtient des taches colorées (spots), correspondant aux plusieurs groupes chimiques caractérisés par leurs rapport frontaux (RF).

Le RF est donné par la formule suivante :

$$Rf = \frac{\text{distance parcourue par l'échantillon}}{\text{distance parcourue par le solvant}}$$

2.4. Analyse des extraits méthanoliques de *Bêta vulgaris* et de *Ruta chalepensis* :

2.4.1. Dosage des polyphénols

La teneur en composés phénoliques des deux extraits de *Bêta vulgaris* et *Ruta chalepensis* (EMBV et EMRC) a été effectuée par la méthode de Folin-ciocalteu selon. (Li et al., 2007) Ce dosage est basé sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstic (WO_4^{2-}) phosphomolybdic (MoO_4^{2-}) du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés polyphénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. (Georgé et al., 2005)

Brièvement 200 μ l de chaque extrait (dissous dans le méthanol) ont été ajoutés à 1ml de réactif de Folin (dilué 10 fois) avec des dilutions convenables. Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 4 minutes.

Après l'incubation 800 μ l d'une solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (0,75%) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 heures d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-200 μ g/ml) et exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait. (fig 07)

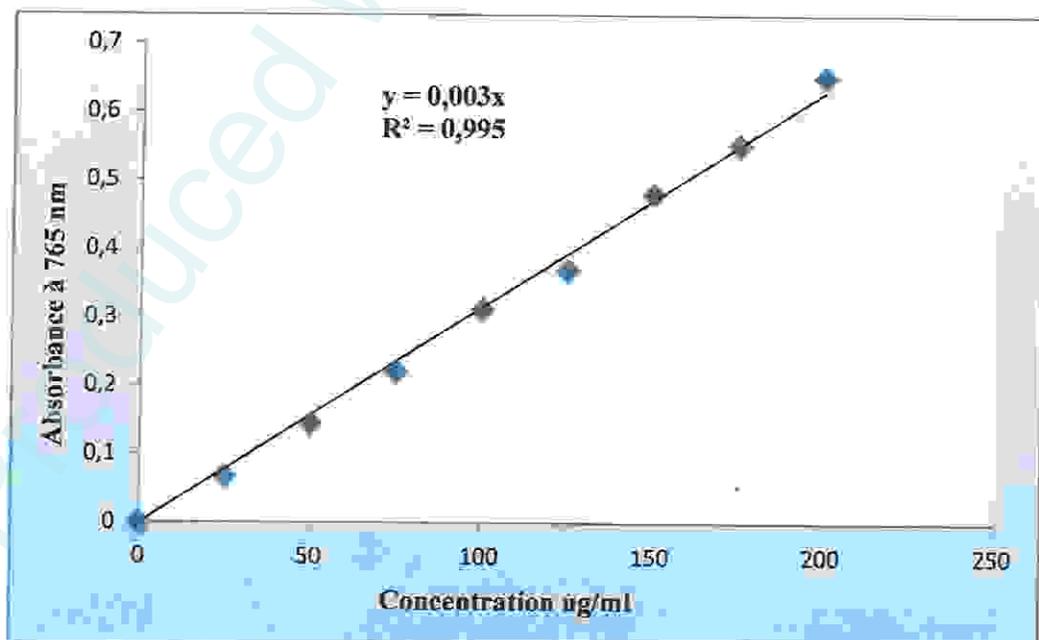


Figure 07 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

2.4.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium est employée pour déterminer la teneur en flavonoïdes totaux dans nos extraits. (Yi et al., 2007)

Brièvement, les échantillons sont préparés par la dissolution de 1mg (extrait)/ml (méthanol). 1 ml de chaque échantillon est ajouté à 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2%, dans le méthanol). (Zhishen et al., 1999) Après dix minutes d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm. Une gamme étalon est établie séparément avec la quercétine (0-40 µg/ml) pour calculer la concentration des flavonoïdes dans chaque extrait. Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait. (fig 08)

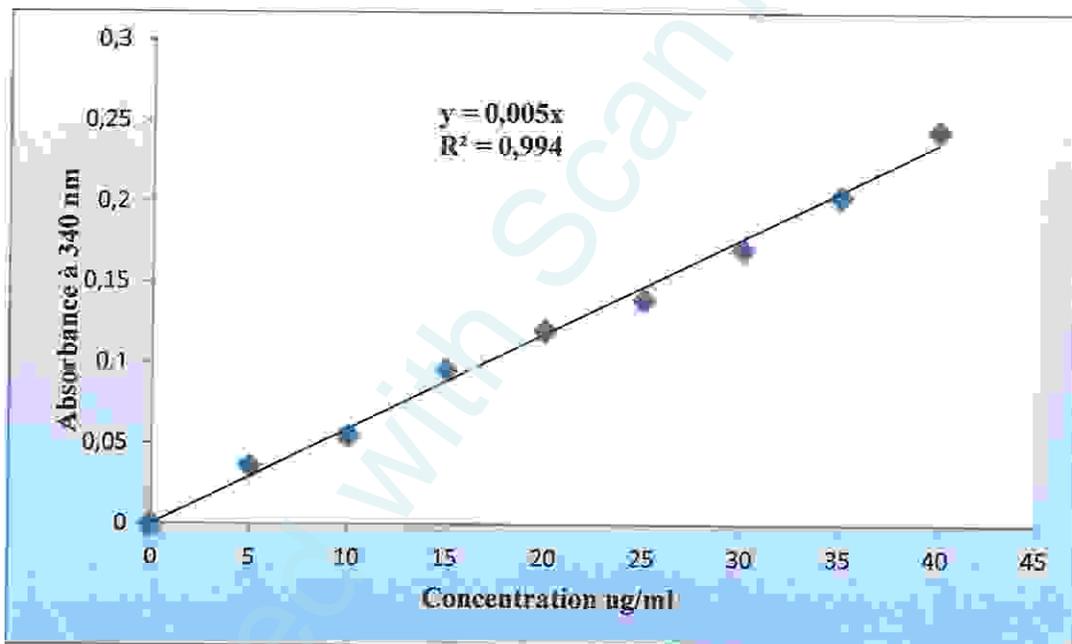


Figure 08 : Droite d'étalonnage de la quercétine.

2.4.3. L'évaluation de l'activité anti-oxydante : Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)

Pour étudier l'activité antiradicalaire des deux extraits, nous avons opté le DPPH comme un radical libre qui est le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité anti-oxydante en raison de sa stabilité en forme radical libre et la simplicité de l'analyse. (Bozin et al., 2008) Il absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm. Le test consiste à mettre le radical DPPH (fig. 09) (de couleur violette), en présence des molécules dites anti-oxydantes afin de mesurer leur capacité à le réduire. (fig. 10) La forme

réduite (diphénylpicryl-hydrazine : de couleur jaune) n'absorbe plus à 515 nm, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance. (Sanchez-moreno, 2002)

Selon le protocole décrit par Mansouri et al., 2005. La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4mg de DPPH dans 100ml de méthanol (6×10^{-5} M). 25µl des solutions d'extraits ou standard (acide ascorbique) sont ajoutés à 975µl DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant la solution de DPPH et du méthanol est mesurée à 517 nm. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = \frac{(\text{Abs contrôle}) - (\text{Abs échantillon})}{(\text{Abs contrôle})} \times 100$$

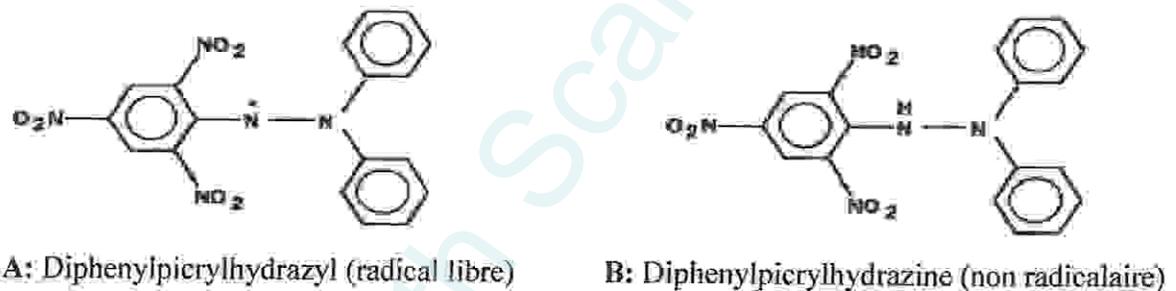


Figure 09 : Structure du DPPH.

L'activité anti-oxydante de l'EMBV et l'EMRC vis-à-vis le radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm.

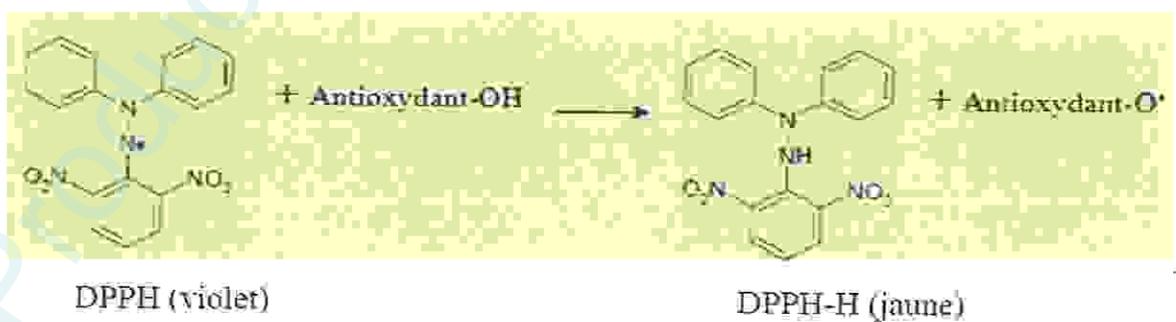


Figure 10 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

Pour l'évaluation de cette activité, on a préparé une gamme de dilutions allant de 0 à 2 mg/ml pour l'acide ascorbique et des deux extraits méthanoliques.

Les différentes densités optiques ont permis de tracer pour chaque extrait, une courbe d'allure exponentielle, ce qui signifie l'existence d'une relation proportionnelle entre le pourcentage de réduction du radical libre et la concentration de l'extrait dans le milieu réactionnel.

➤ Calcul des IC₅₀

IC₅₀ (concentration inhibitrice de 50 %), aussi appelée EC₅₀ (Efficient concentration 50%), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH.

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

N.B : L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

3. Tests microbiologiques

3.1. Les souches testées

Les souches utilisées dans les tests d'activité antibactérienne des extraits des plantes cibles font parties de la flore pathogène qui menace la santé humaine.

Les micro-organismes testés proviennent du laboratoire de Microbiologie de l'hôpital IBN ZOHR, Guelma et du laboratoire de recherche de microbiologie de l'université Mentouri, Constantine. Ils correspondent aux espèces suivantes :

- *Staphylococcus aureus*

Les Staphylocoques sont des cocci à Gram positif qui tendent à se grouper en amas.

L'espèce *Staphylococcus aureus* (staphylocoque doré), tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales. (Chambers, 1997)

- *Escherichia coli*

Bacille à Gram négatif, commensal du tube digestif, c'est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires. Elle peut aussi provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers, ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales. (Nataro et Kaper, 1998)

- *Pseudomonas aeruginosa*

Bacilles à Gram négatif, c'est une bactérie de l'environnement opportuniste souvent à l'origine des infections nosocomiales. Il s'agit aussi de bactéries résistantes à de nombreux antibiotiques. (Philippon, 1995)

- *Bacillus cereus*

L'espèce *Bacillus cereus* représentée sous forme de bacilles de grande taille ($>1.0 \mu\text{m}$) à Gram positif, sont généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche, et très répandus dans la nature et sont souvent isolées du sol, de la poussière ou de la surface de végétaux, ce qui favorise leur propagation dans les aliments. Certaines espèces sont aussi capables d'infecter des mammifères et/ou des insectes. (Kotiranta et al., 2000)

Ces souches sont maintenues en vie par des repiquages continus, sur gélose nutritive en boîtes et dans des tubes de gélose inclinée. Après ensemencement, incubation puis conservation au réfrigérateur à 4°C.

3.2. Milieux de culture utilisée

- **Gélose nutritive (GN)** : un milieu d'isolement non sélectif utilisé dans le but de contrôler la pureté de la souche bactérienne, et le repiquage de cette dernière.
- **La gélose de Mueller Hinton (MH)** : est reconnu par tous les experts comme étant le milieu de référence pour l'étude de la sensibilité des germes aux antibiotiques et toutes autres substances qui possèdent une activité antibactérienne.
- **Le bouillon nutritif** : constitue un milieu d'utilisation générale pour un grand nombre de micro-organismes ne présentant pas d'exigences particulières.

3.3. Evaluation de l'activité antibactérienne

3.3.1. Préparation des suspensions bactériennes

Les bactéries à tester sont ensemencées par stries sur des boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive (GN) puis incubées pendant 24 heures, afin d'obtenir une culture jeune et des colonies bien isolées.

A partir de ces boîtes, et à l'aide d'une anse de platine quelques colonies isolées et identiques sont prélevées et mises dans 5ml d'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne est

bien homogénéisée puis la densité optique lue à 625 nm est justifiée de 0,08 à 0,10 afin d'obtenir une charge bactérienne de l'ordre de 0,5 Mc Farland, donc l'inoculum est ajusté soit en ajoutant de la culture s'il est trop faible ou de l'eau physiologique stérile s'il est trop concentré. (Mohammedi, 2006)

3.3.2. Mode d'ensemencement des souches bactériennes

L'ensemencement doit se faire au moins 15 min après la préparation de l'inoculum sur milieu gélosé Muller- Hinton stérile, fondu et versé aseptiquement dans les boîtes de Pétri avec une épaisseur de 4mm. Laisser solidifier puis à l'aide d'un écouvillon stérile chargé de la suspension bactérienne, on étale la surface entière de la gélose à deux reprises, faisant un frottement de haut en bas, en stries serrées, et en tournant la boîte à environ 60° après chaque application dont le but d'avoir une distribution homogène de l'inoculum.

Dans le cas d'ensemencement de plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois. (Mohammedi, 2006)

3.4. Test du méthanol ou contrôle négatif

Après ensemencement du MH par les suspensions bactériennes (0,5 Mc Farland), des disques stériles de papier whatman N°1 de 6 mm de diamètre sont déposés en surface à raison de 4 disques par boîte, par la suite un volume de 10 µl de méthanol sont déposés sur deux disques, les deux autres disques qui restent sont imbibés directement dans le méthanol. Les boîtes ainsi sont stockées dans un réfrigérateur à 4°C pendant 2 heures, en suite elles sont incubées 24 heures à 37°C. Après incubation, les diamètres d'inhibitions formés sont mesurés. (Lesueur et al., 2007)

3.5. Antibiogramme ou contrôle positif

A l'aide d'une pince stérile, des disques d'antibiotique (Chloramphénicol 30µg, Erythromycine 15µg, Rifampicine 5µg, et la Pénicilline 10µg) sont déposés à la surface de la gélose MH ensemencée par les différentes souches sélectionnées, puis les boîtes sont stockées pendant 2 h au réfrigérateur, après elles sont incubées 24 heures à 37°C. De même après incubation, les diamètres d'inhibitions formés sont mesurés. (Hussain et al., 2010). Et comparés aux diamètres critiques. (tab. 02)

Tableau 02 : Les diamètres critiques des antibiotiques utilisés. (SFM, 2013)

Antibiotiques	Charge des disques	Diamètre critiques	
		Sensibles	Résistantes
Pénicilline (P)	10 µg	≥29	<18
Rifampicine (RIF)	5 µg	≥19	<14
Erythromycine (E)	15 µg	≥22	<17
Chloramphénicol (C)	30 µg	≥23	<19

3.6. Méthode de diffusion en milieu gélosé ou aromatoگرامme

L'aromatoگرامme est la technique choisie pour déterminer l'activité antibactérienne de l'extrait à tester.

Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des extrait sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri, elle nous permet de mettre en évidence l'effet antibactérien de l'extrait sur les inocula, ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces bactéries vis-à-vis de cet extrait. (Gachkaret *al.*, 2006)

La technique consiste à :

- déposer à l'aide d'une pince stérile des disques imbibés de 10µl de la gamme de concentration d'extrait (10mg, 50mg, 100mg, 150mg, 200mg, 250mg)/ml du méthanol à la surface de la géloseensemencée par les souches sur boîte de Pétri (fig. 11). Par la suite les mettre au réfrigérateur durant 2h, puis incuber 18 à 24h à 37°C. Durant cette période, les substances diffusent dans la gélose à partir des disques selon un gradient de concentration jusqu'à une limite où sa concentration est la plus faible, déterminant ainsi des zones d'inhibition. (Hamidi, 2013)

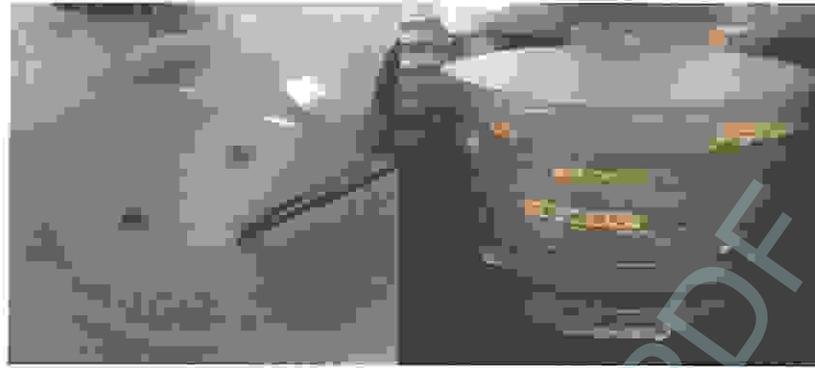


Figure 11 : Application des disques d'extraits sur boîtes.

L'effet du produit antibactérien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition et en fonction de ce diamètre la souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante : (Hamidi, 2013)

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre $< 8\text{mm}$.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre $\geq 20\text{mm}$.

NB : cette technique est réalisée en triplicata.

3.7. Technique de dilution en milieu liquide

A partir de la poudre stérile des extraits végétaux, on a préparé une gamme de concentration allant de 10 mg/ml à 250 mg/ml. Ensuite 50 μL de chaque concentration est introduit dans un duplicata de tube à essai stérile contenant 4ml de bouillon nutritif et 20 μL de suspension bactérienne, le témoin comprend la même composition, hormis l'extrait et à sa place on a additionné 50 μL du méthanol dilué. (fig. 12)

Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24h.

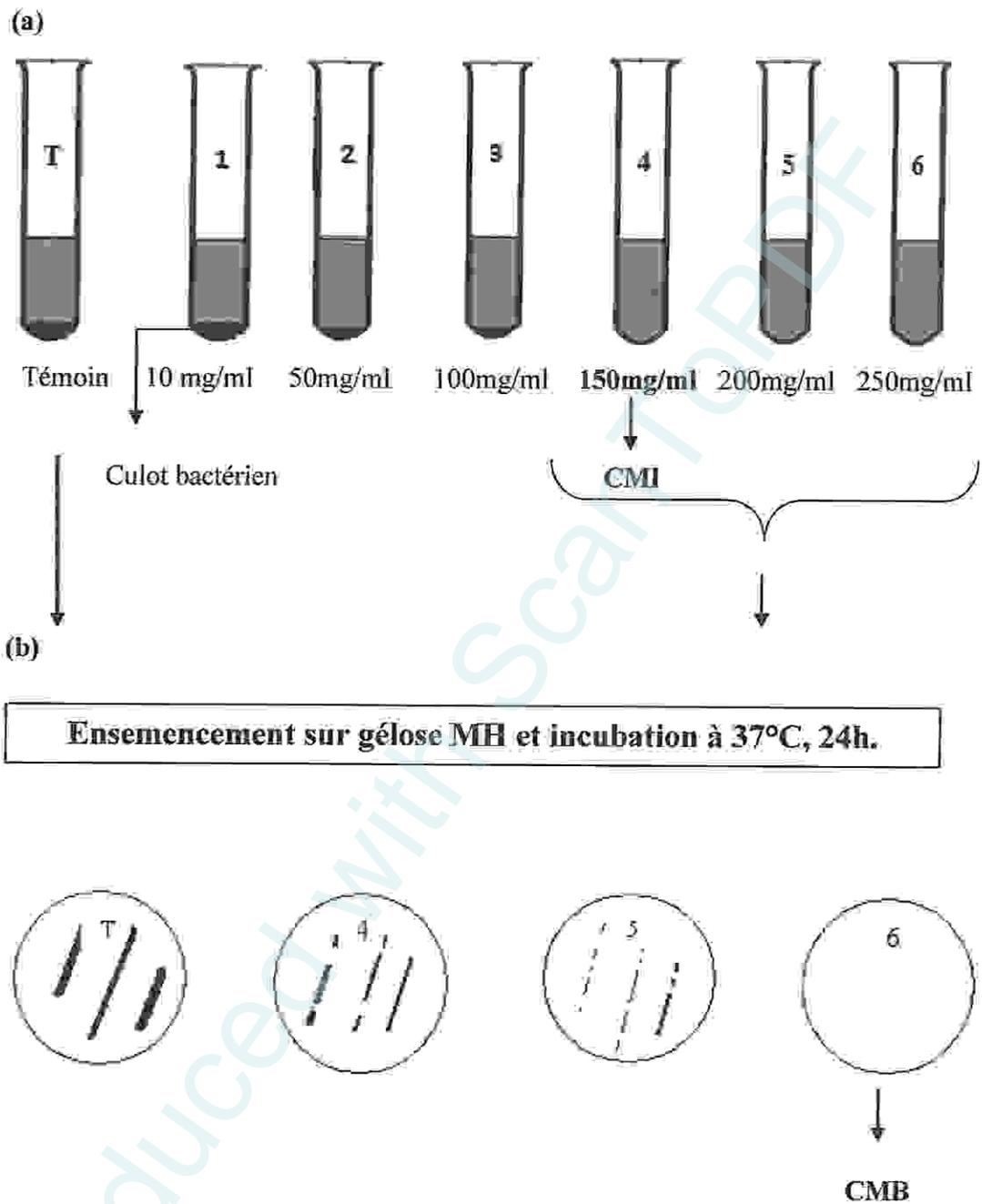


Figure 13 : Schéma représentant la CMI et la CMB.

3.7.3. Le pourcentage d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition réalisée par la mesure du diamètre d'inhibition est issu de la réponse bactérienne par rapport au diamètre de la boîte est présenté dans le **Tableau 12**.

Ce dernier est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = (D_{\text{test}} / D_{\text{control}}) \times 100$$

Tel que :

D_{test} : diamètre de la zone d'inhibition.

D_{control} : diamètre de la boîte de Pétri.

3.7.4. Analyse de la variance :

L'analyse de la variance à un seul facteur a été réalisée par le logiciel statistique (origine version 6), avec un seuil de 5%.



**Résultats
et Discussion**

Produced with ScanTOPDF

1. Résultats de l'étude phytochimique

1.1. Tests préliminaires de la composition chimique

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur le matériel végétal broyé de *Ruta chalepensis* et de *Bêta vulgaris*, en utilisant des réactifs spécifiques de révélation.

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de notre plante. La détection de ces composés chimiques est basée sur des réactions de précipitation, apparition de la mousse, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette, les résultats sont exprimés dans le tableau suivant :

Tableau 03 : Screening phytochimique de deux plantes.

Plante	Test					
	Alcaloïdes	Saponosides	Tanins	Flavonoïdes	Mucilages	Coumarines
<i>Ruta chalepensis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Bêta vulgaris</i>	-	+	+	+	+	+

(+) présence, (-) absence



Figure 14 : Test d'identification des alcaloïdes.



Figure 15 : Test d'identification des saponosides.

(R : *Ruta chalepensis*, B : *Bêta vulgaris*)

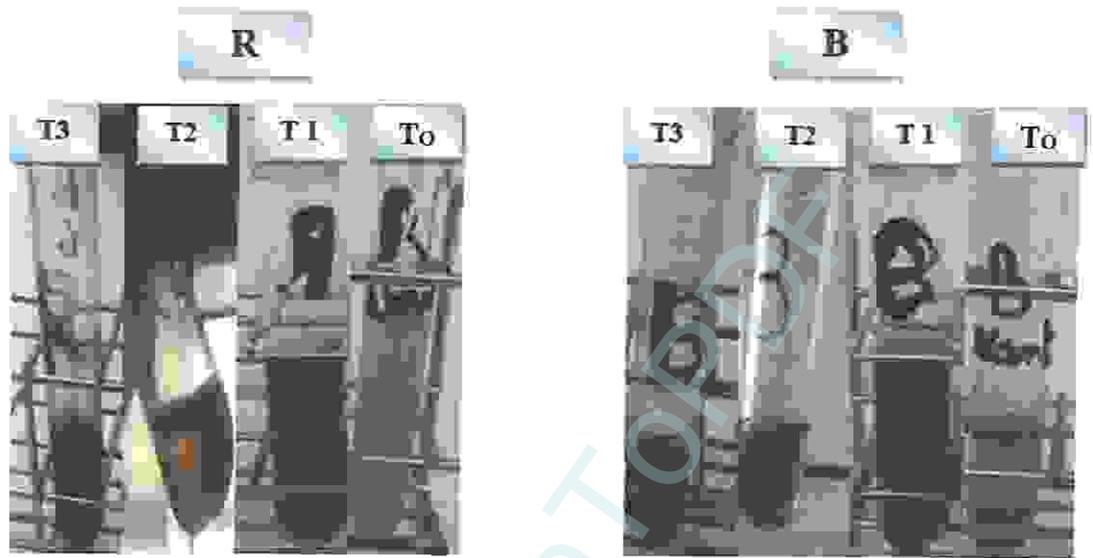


Figure 16 : Test d'identification des tanins.

(T₀ : Tube initial, T₁ : Caractérisation par le chlorure ferrique, T₂ : Tanins Catéchiques, T₃ : Tanins Galliques).

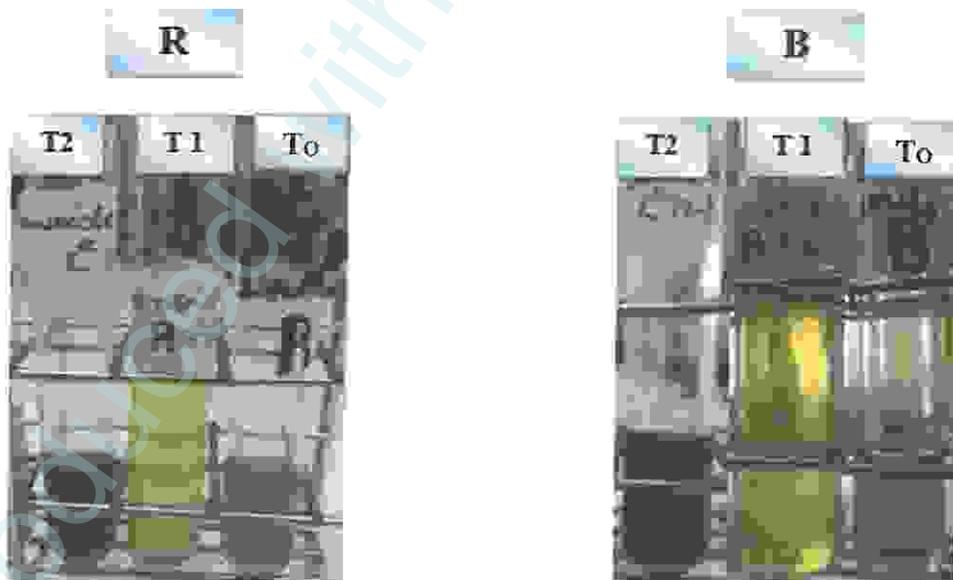


Figure 17 : Test d'identification des flavonoïdes.

(T₀ : Tube initial, T₁ : Coloration en milieu alcalin, T₂ : Coloration par perchlorure de fer (FeCl₃)).

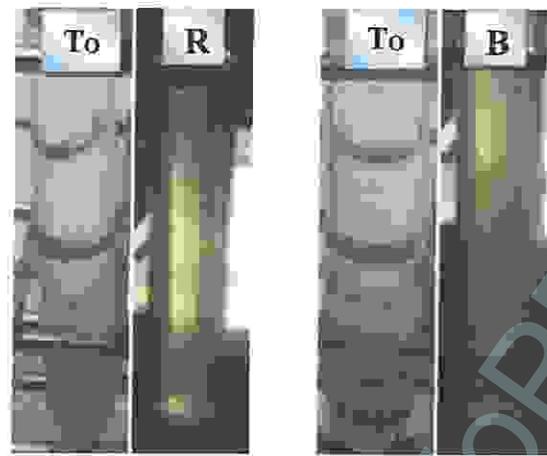


Figure 18 : Test d'identification des mucilages.
(**To** : Tube initial, **R** : *Ruta chalepensis*, **B** : *Bêta vulgaris*)

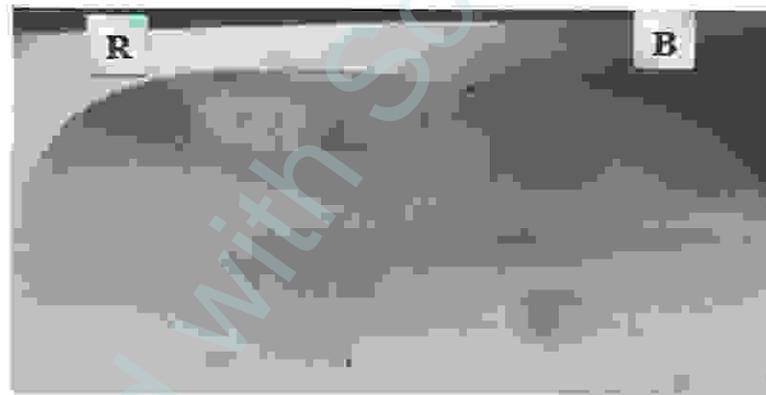


Figure 19 : Test d'identification des coumarines.
(**R** : *Ruta chalepensis*, **B** : *Bêta vulgaris*).

Notre étude nous a permis en premier lieu d'identifier les principaux groupes chimiques présents dans *Bêta vulgaris* et *Ruta chalepensis*.

Le screening phytochimique montre la présence des groupes chimiques suivants : les Saponosides, les Tanins, les flavonoïdes, les Mucilages et les Coumarines dans les deux plantes. On note aussi la présence des Alcaloïdes chez *Ruta chalepensis*, tandis que l'absence de ce composé chez *Bêta vulgaris*.

De façon général, les familles chimiques détectées dans notre étude viennent confirmer les travaux de Hnatyszyn *et al.*, (1974) ; Mohr *et al.*, (1982) Ulubelen et Teremen (1988) et aussi Mansour *et al.*, (1990) sur *Ruta chalepensis* et de Bolkent *et al.*, (2000); Kugler *et al.*, (2004) ; Gao *et al.*, 2009) sur *Bêta vulgâris*.

D'après ces résultats, on déduit que les deux plantes *Bêta vulgaris* et *Ruta chalepensis* sont riches en divers métabolites secondaires ce qui explique l'intérêt et l'attention particulière portée par les chercheurs à travers les études scientifiques sur ces deux plantes. (Naghbi *et al.*, 2005)

1.2. Rendement de l'extraction

L'opération de l'extraction à partir de 250g du matériel végétal à l'aide du méthanol et après lyophilisation a permis d'obtenir un résidu sec d'extrait méthanolique que y est mentionnée dans le tableau suivant :

Tableau 04 : Rendement de l'extraction.

	<i>Bêta vulgaris</i>	<i>Ruta chalepensis</i>
Rendement (g)	5,55	21,41
Rendement %	2,22	8,65

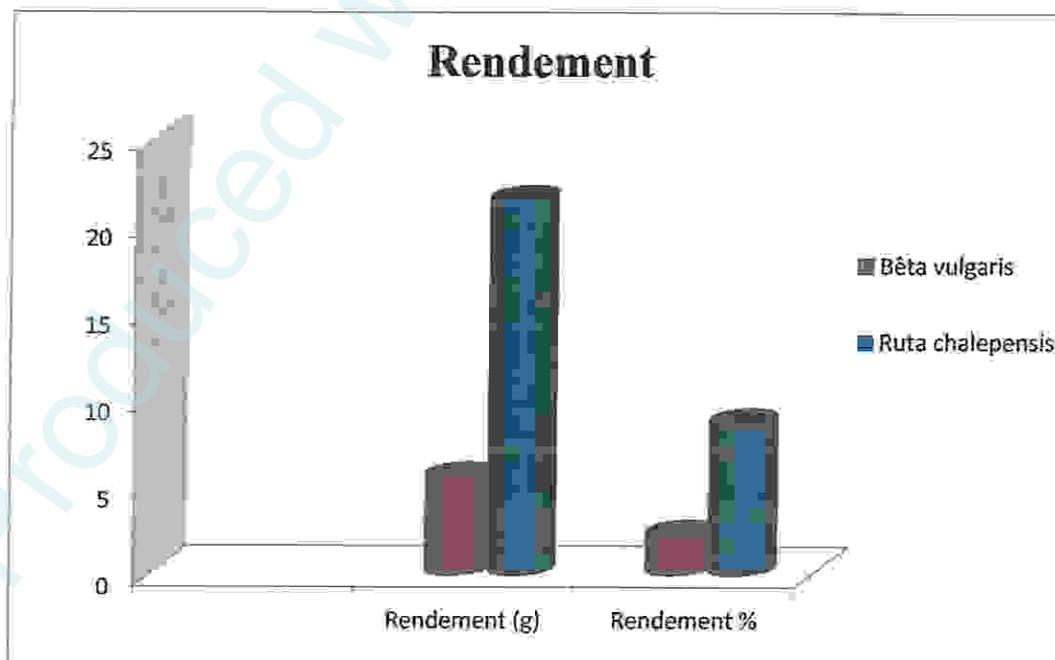


Figure 20 : Le rendement des deux extraits.

Les résultats obtenus montrent que le rendement en extrait méthanolique est variable selon les espèces des deux plantes. Cependant, le rendement le plus important est enregistré dans *Ruta chalepensis* (8,65 %) contre (2,22 %) de *Bêta vulgaris*.

selon une étude mener par Mansouret *al.*,(1990) sur la même espèce *Ruta chalepensis*, le rendement en extrait méthanolique de la partie aérienne entière est de 3.75%. Rendement nettement inférieure à celui obtenu dans notre étude. Cela est peut être dû à l'utilisation de soxhlet où la température élevée pendant plusieurs heures qui peut dégrader certains constituants sensibles (tels les polyphénols...) (Andersen et Markham, 2006), ce qui n'est pas le cas dans notre étude où l'extraction est réalisée à froid par simple macération.

1.3. Analyse phytochimique des extraits méthanoliques

1.3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

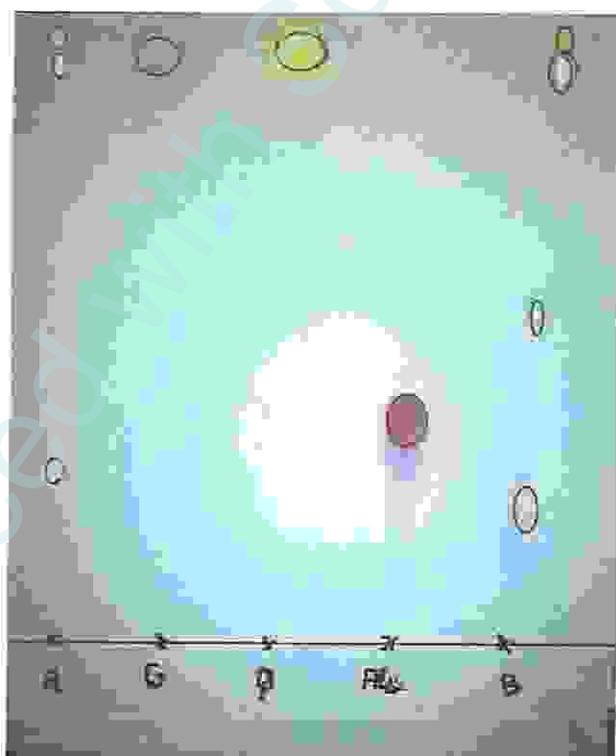


Figure 21 : Chromatographie sur couche mince des deux extraits méthanoliques

[Prise personnelle].

(R : *Ruta chalepensis*, G : acide gallique, Q : Quercétine, A : alanine, B : *Bêta vulgaris*)

Après révélation de la plaque CCM par le biais d'une solution Ninhydrinique, le chromatogramme est représenté dans la figure précédente

La plaque obtenue présente une bonne migration par conséquent une bonne séparation qui permet l'analyse qualitative des composés flavonoïques. Alors les rapports frontaux sont calculés selon l'équation suivante :

Le front de solvant = 10cm

Distance parcourue par la quercétine = 9.3cm

$$Rf_Q = 0.93$$

Distance parcourue par l'acide gallique = 9.1 cm

$$Rf_G = 0.91$$

Distance parcourue par l'acide aminé alanine = 3.8 cm

$$Rf_{Ala} = 0.38$$

- *Ruta chalepensis*

Distance parcourue par la 1^{ère} tache = 2.8 cm

$$Rf_{1\text{ère tache}} = 0.28$$

Distance parcourue par la 2^{ème} tache = 9.1 cm

$$Rf_{2\text{ème tache}} = 0.91$$

Distance parcourue par la 3^{ème} tache = 9.3cm

$$Rf_{3\text{ème tache}} = 0.93$$

- *Bêta vulgaris*

Distance parcourue par la 1^{ère} tache = 2.3 cm

$$Rf_{1\text{ère tache}} = 0.23$$

Distance parcourue par la 2^{ème} tache = 5.6 cm

$$Rf_{2\text{ème tache}} = 0.56$$

Distance parcourue par la 3^{ème} tache = 9.1 cm

$$Rf_{3\text{ème tache}} = 0.91$$

Distance parcourue par la 4^{ème} tache = 9.3cm

$$Rf_{4\text{ème tache}} = 0.93$$

La chromatographie sur couche mince que nous avons effectué sur les deux extraits, nous a permis de confirmer la présence de l'acide gallique et la quercétine dans les deux extraits méthanoliques R et B.

1.3.2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

Le résultat de dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes sont exprimés dans le **Tableau 05**.

Tableau 05 : Teneur des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans l'EMBV et l'EMRC.

	Teneur en polyphénols (mg EAG /g extrait)	Teneur en flavonoïdes (mg EQ/g extrait)
<i>Bêta vulgaris «var. cicla»</i>	18.66	6.8
<i>Ruta chalepensis</i>	23.33	17

La méthode modifiée de Folin-ciocalteu s'est avérée efficace pour le dosage des polyphénols totaux dans les deux extraits méthanoliques. Cette méthode a été choisie car elle satisfait aux critères de reproductibilité et de faisabilité. L'évaluation quantitative de ces composés phénoliques montre que la quantité de polyphénols dans l'extrait méthanolique de *Ruta chalepensis* (23.33 mg EAG/g extrait) est plus importante que celle de *Bêta vulgaris* (18.66 mg EAG/g extrait). Il a été rapporté que la quantité de composés phénoliques totaux dans la variété *rutacea* est plus élevée que dans d'autres familles. En effet, les quantités de composés phénoliques totaux dans les extraits de plantes que nous avons testé ont été élevées par rapport à ce qui a été rapporté dans d'autres plantes. (Kaur et Kapoor, 2002) Ces différences peuvent être dues à la variabilité du métabolisme phénolique dans différentes plantes mais aussi à la différence dans les conditions climatiques (température, l'exposition solaire, la sécheresse et la saison de croissance).

En conclusion, tous ces résultats ont montré la richesse de ces plantes en composés phénolique permettant d'étudier leurs activités biologiques potentielles.

Il est intéressant de déterminer la quantité de flavonoïdes dans les extraits méthanoliques afin de mieux les caractériser. Le dosage des flavonoïdes par la méthode de trichlorure d'aluminium révèle (6.8mg EQ/g extrait) pour *Bêta vulgaris* contre (17mg EQ/g extrait) pour *Ruta chalepensis*, la quantité des flavonoïdes de *Ruta Chalepensis* est supérieur à celle retrouvé dans les travaux de Dayemetal.,(2013) qui était de (12,78 ± 0,08), et cela du probablement à l'utilisation d'une extraction au soxhlet pendant 48h à 65°C qui peut détruire les flavonoïdes.

Selon Djeridane et al., (2006), les flavonoïdes représentent un groupe important de composés phénoliques chez le genre *Ruta*.

1.3.3. L'évaluation de l'activité antioxydante (DPPH)

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de deux plantes *Ruta chalepensis* et *Bêta vulgaris* a été fait en comparaison avec l'antioxydant : l'acide ascorbique.

L'activité antiradicalaire *in vitro* des flavonoïdes est évaluée par la diminution du taux de DPPH° dosé après l'addition des flavonoïdes à différentes concentrations.

Le pouvoir antiradicalaire le plus élevé (65,811%) est observé pour *Ruta chalepensis* contre (58,68%) pour *Bêta vulgaris*, pouvoir inférieur à celui qu'exerce l'acide ascorbique (95,72%).

Ce test nous a permis de déterminer la concentration inhibitrice piégeant 50% du radical DPPH° (IC₅₀) qui était de (1,5 mg/ml) pour l'EMRC et (1,74 mg/ml) pour l'EMBV contre (0,12 mg/ml) pour l'acide ascorbique (fig. 22)

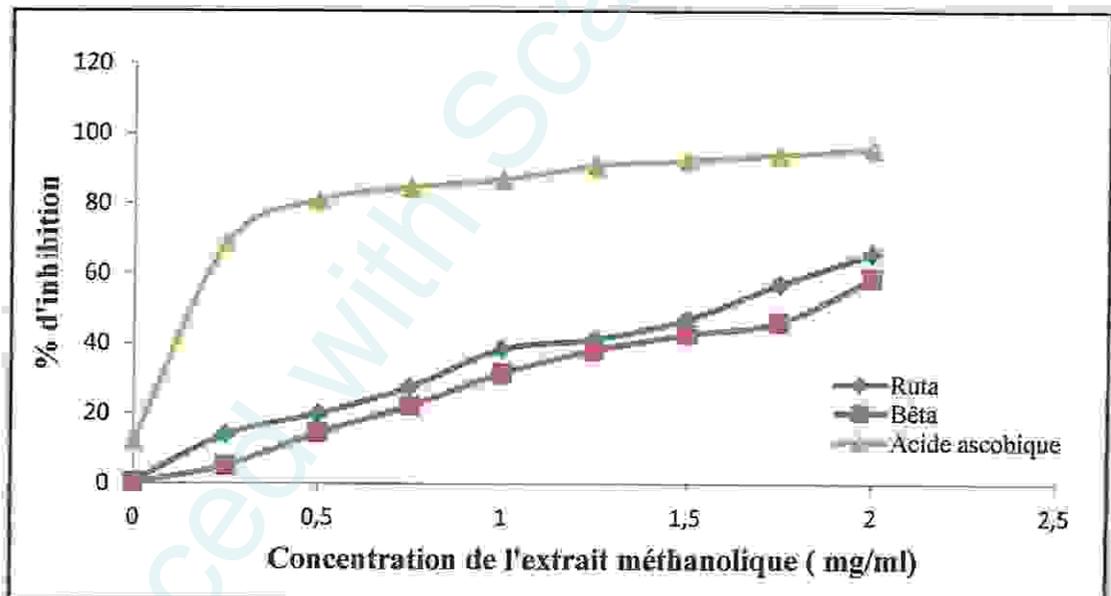


Figure 22 : Effet antiradicalaire de l'EMBV et l'EMRC sur le radical DPPH°.

Le modèle de balayage le radical DPPH instable est une méthode largement utilisée pour évaluer les activités antioxydantes dans relativement peu de temps par rapport à d'autres méthodes. DPPH est un radical libre instable et accepte un électron ou un radical hydrogène pour devenir une diamagnétique stable molécule.

L'évaluation de l'effet de deux plantes contre le stress oxydant est un objectif principal dans notre étude, raison pour laquelle il était indispensable de l'étudier *in vitro* avant de passer à

l'étude in vivo. Pour cela on a réalisé le test de DPPH qui montre une concentration inhibitrice (IC_{50}) de 1,74mg/ml pour le *Bêta vulgaris*. Cette valeur est inférieure à l'étude de Pyo et al., (2004) et de 1,5mg/ml pour le *Ruta chalepensis*, cette valeur est inférieure à l'étude menée par Daycem et al., (2013) sur l'activité anti radicalaire DPPH de la même espèce.

2. Résultats de l'activité antibactérienne

2.1. Test du méthanol (test négatif)

Le test méthanol à différentes concentrations, réalisé sur les souches de référence *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* montre que ce solvant n'a aucun pouvoir antibactérien sur ces micro-organismes. (fig. 23)

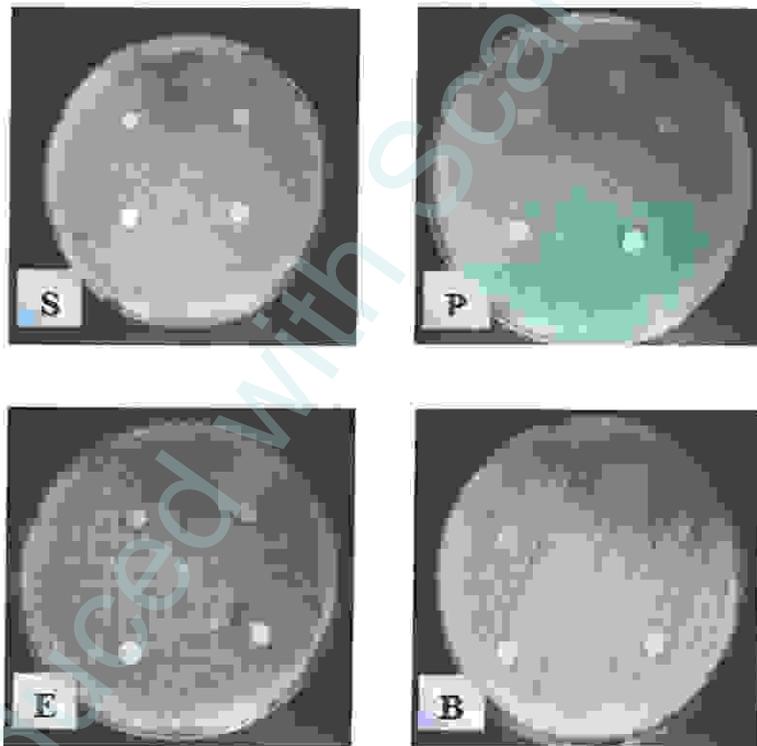


Figure 23 : Activité du méthanol sur les 4 souches de références

(S : *S. aureus* ATCC 43300, B : *B. cereus* ATCC 11178, P : *P. aeruginosa* ATCC 27853, E : *E. coli* ATCC 25922).

2.2. Antibiogramme

La mise en contact des différentes souches avec les antibiotiques a permis de réaliser un antibiogramme afin de déterminer le diamètre d'inhibition et par conséquent voire la sensibilité ou la résistance bactérienne vis-à-vis de ces derniers. Les résultats de l'antibiogramme sont présentés dans la **Figure 24** et le **Tableau 06**, on remarque que la série d'ATB testés a un effet variable sur les souches cibles, ils ont un effet inhibiteur sur certaines et sont soumis à une résistance avec d'autres.

Pour le Chloramphénicol, toutes les souches se sont manifestées sensibles dont le diamètre est > 23 à l'exception la souche *P. aeruginosa*.

En ce qui concerne la pénicilline et l'érythromycine, toutes les souches testées sont révélées résistantes vis-à-vis ces deux antibiotiques, à l'exception de l'espèce *B. cereus* qui se montre sensible à l'égard de l'érythromycine. Pour la rifampicine seule l'espèce *B. cereus* se montre sensible.

La résistance de la souche vis-à-vis les Béta lactamines ne peut être expliquée que par une diminution de l'affinité de la liaison d'ATB (PBP : Penicillium Binding Proteins) suite à une mutation de celles-ci ou à une diminution du nombre de PBP, la réduction d'affinité est documentée chez les G^- , les deux mécanismes sont rencontrés chez les G^+ .

Pour l'érythromycine, c'est un bactériostatique des coques et bacilles G^+ , coques G^- mais inactif sur les Entérobactéries et *P. aeruginosa*.

Pour les phénicolés c'est un inhibiteur à large spectre, la résistance du genre *P. aeruginosa* est liée probablement aux pompes membranaires, responsable de la résistance croisée. (Ban Bamkeke et al., 2008)

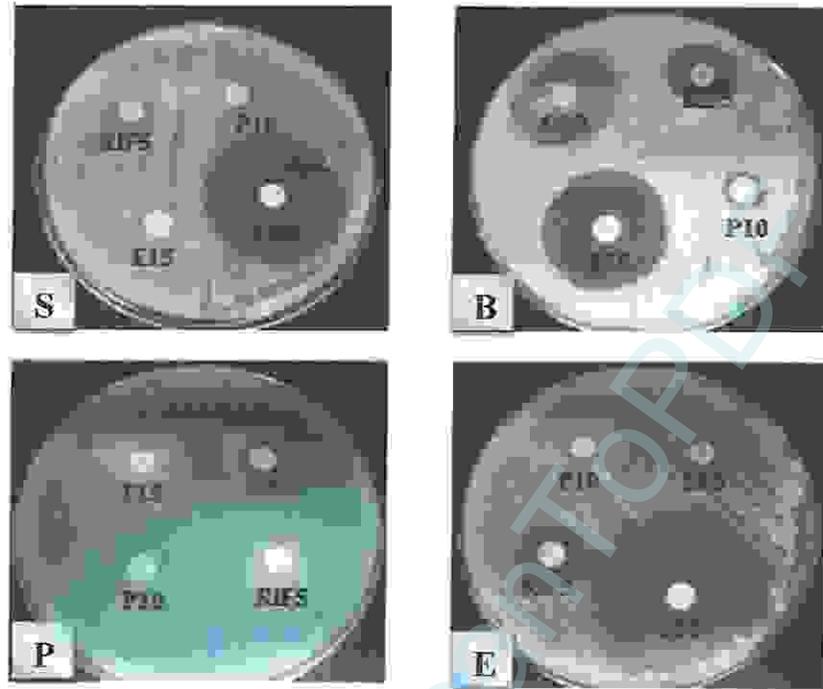


Figure 24 : Aspect macroscopique de la réponse bactérienne aux différents antibiotiques testés

(S : *S. aureus* ATCC 43300, B : *B. cereus* ATCC 11178, P : *P. aeruginosa* ATCC 27853, E : *E. coli* ATCC 25922, RIF 30 : Rifampicine 5 μ g, C 30 : Chloramphénicol 30 μ g, P 10 : Pénicilline 10 μ g, E 15 : Erythromycine 15 μ g).

Tableau 06 : Les diamètres d'inhibition des souches testées vis-à-vis des antibiotiques.

ATB Souche	Les diamètres d'inhibition (mm)			
	Chloramphénicol 30 μ g	Erythromycine 15 μ g	Rifampicine 5 μ g	Pénicilline 10 μ g
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	35	0	13	0
<i>B. cereus</i> ATCC 11178	30	30	20	10
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	12	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	40	0	15	0

Test de l'activité antibactérienne des extraits de *Ruta chalepensis* et *Bêta vulgaris* sur les souches testées

2.2.1. Effet antibactérien des extraits sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

❖ Méthode de dilution en milieu solide (aromatogramme)

La méthode des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien des extraits méthanoliques vis-à-vis des souches testées. Les zones d'inhibition sont indiquées dans le Tableau 07.

Tableau 07 : Les diamètres d'inhibition de la souche *S. aureus* ATCC 25923.

	Les diamètres d'inhibition (mm)					
	10mg/ml	50mg/ml	100mg/ml	150mg/ml	200mg/ml	250mg/ml
Extrait R	0	9,33	13,66	13	14	12,33
Extrait B	0	0	0	0	0	0

D'après les résultats qu'on a obtenu, il n'y a eu aucun effet de l'extrait *Bêta vulgaris* sur la souche, ceci reflète sa résistance vis-à-vis de l'extrait. Tandis que, l'extrait *Ruta chalepensis* présente des diamètres d'inhibition qui varient entre 9.33 et 14mm relatifs aux concentrations 50, 100, 150 et 200mg/ml, ce qui nous permet de dire que la souche est sensible. En revanche la concentration 10mg/ml du méthanol ne montre aucun effet. (fig. 25 et 26)

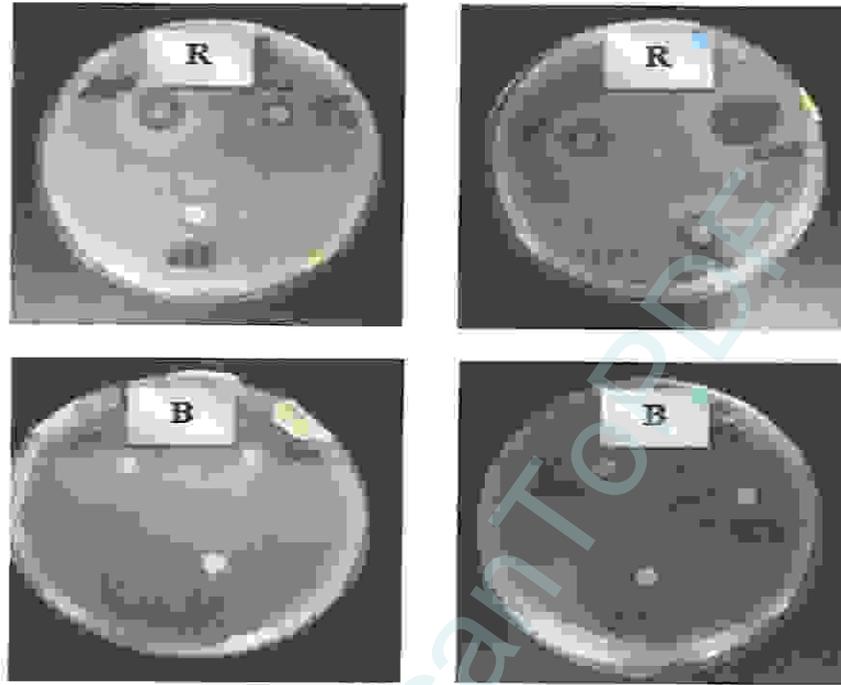


Figure 25 : Aspect macroscopique de la réponse de l'espèce *S. aureus* ATCC 25923 aux extraits testés
(R : *Ruta chalepensis*, B : *Bêta vulgaris*).

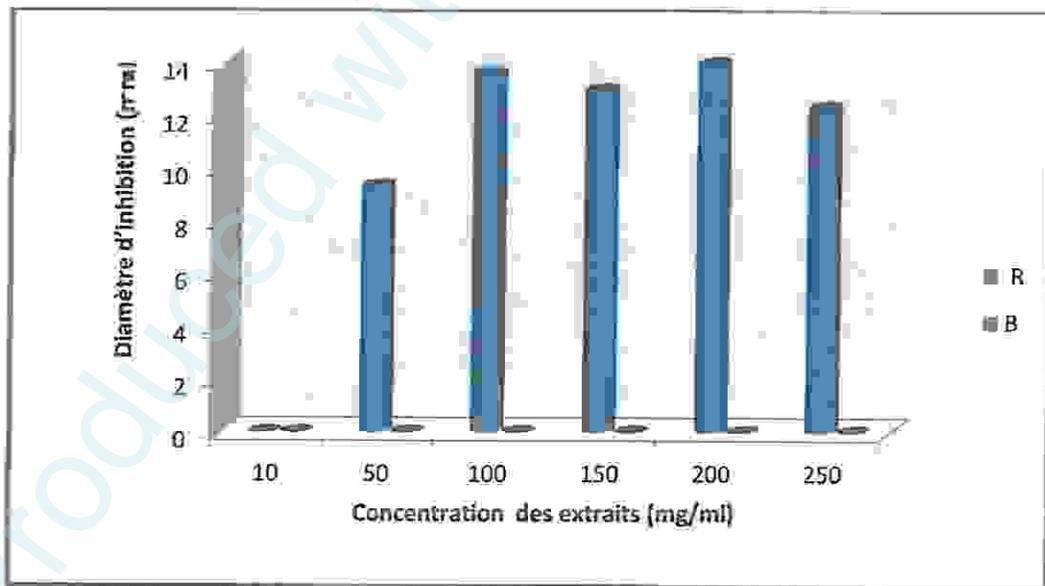


Figure 26 : Présentation graphique de l'aromatogramme de l'espèce *S. aureus* ATCC 25923
(R : *Ruta chalepensis*, B : *Bêta vulgaris*).

❖ Méthode de dilution en milieu liquide

A la suite de cette épreuve de dilution en milieu liquide, on a pu déterminer que la concentration minimale inhibitrice (CMI) de nos extraits est équivalente à 100mg/ml pour l'extrait R et indéterminé pour l'extrait B. (fig. 27)



Figure 27 : La série de dilution en milieu liquide de la souche *S. aureus* ATCC 25923 (R : *Ruta chalepensis*, B : *Bêta vulgaris*).

2.2.2. Effet antibactérien des extraits sur *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

❖ Méthode de dilution en milieu solide (aromatogramme)

Les résultats de l'aromatogramme (fig. 28) montrent l'effet négatif de la plante *Bêta vulgaris* par rapport à l'extrait de la plante *Ruta chalepensis*, ce dernier à différentes concentrations choisies inhibe la croissance de la souche même à de faibles concentrations (Fig. 29), notons toutefois, un effet plus important (diamètre > 20mm) avec la concentration 150mg/ml. (tab. 08)

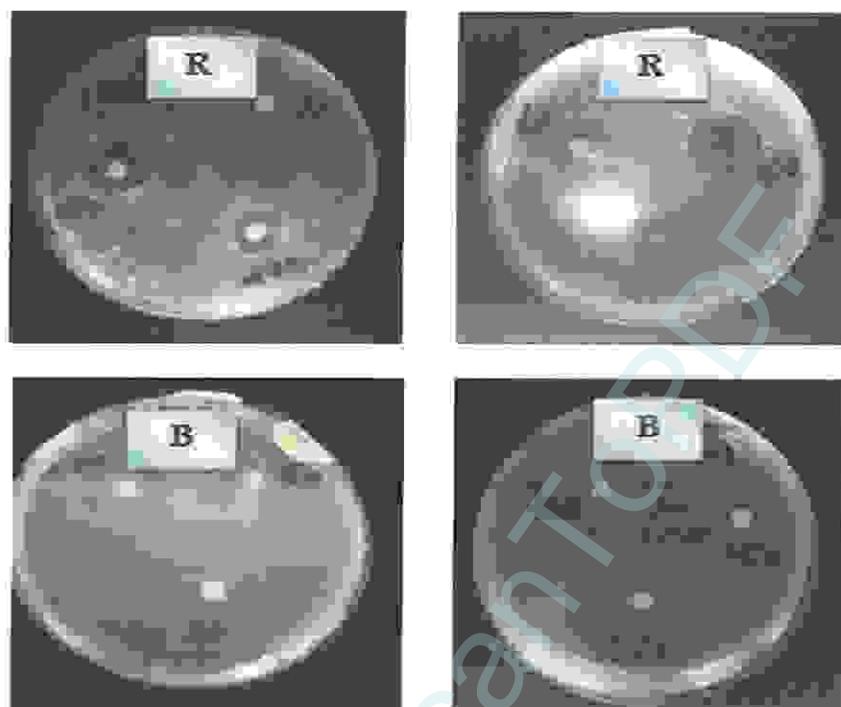


Figure 28 : Aspect macroscopique de la réponse de l'espèce *S. aureus* ATCC 43300 aux extraits testés

(R : *Ruta chalepensis*, B : *Bêta vulgaris*).

Tableau 08 : Les diamètres d'inhibition de la souche *S. aureus* ATCC 43300.

	Les diamètres d'inhibition (mm)					
	10mg/ml	50mg/ml	100mg/ml	150mg/ml	200mg/ml	250mg/ml
Extrait R	10,66	14,66	15,33	20,66	13,33	17
Extrait B	0	0	0	0	0	0

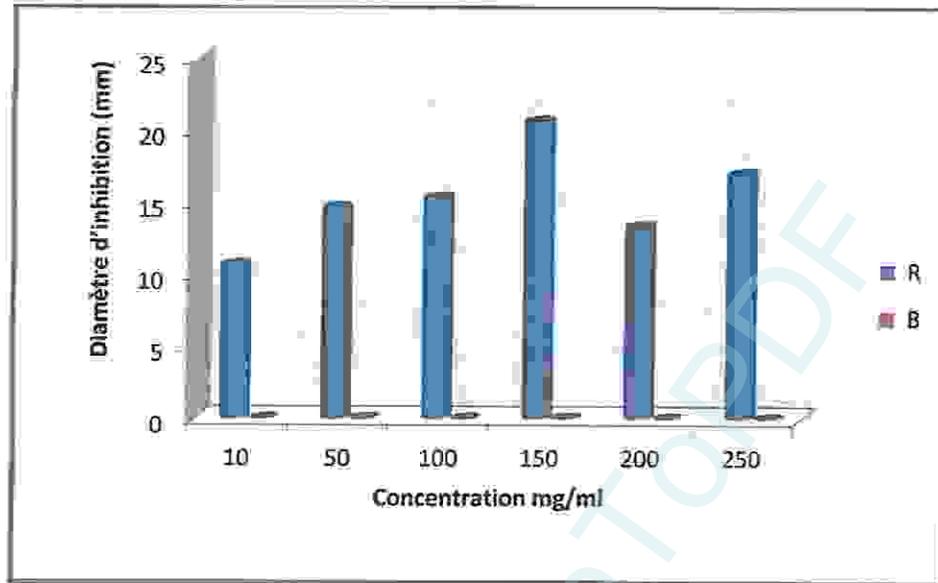


Figure 29 : Présentation graphique de l'aromatogramme de l'espèce *S. aureus* ATCC 43300

(R : *Ruta chalepensis*, B : *Bêta vulgaris*).

❖ Méthode de dilution en milieu liquide

Les résultats démontrent que la concentration minimale inhibitrice (CMI) de nos extraits est de 10mg/ml concernant l'extrait *Ruta chalepensis* et encore indéterminée pour l'extrait *Bêta vulgaris*.

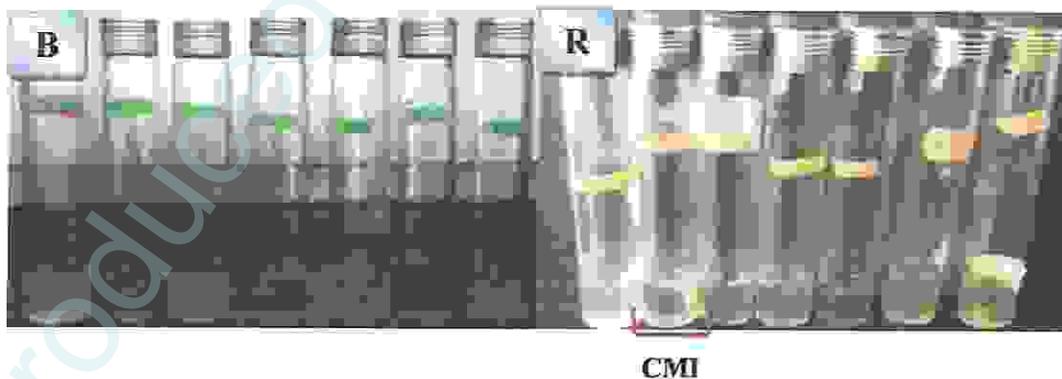


Figure 30 : La série de dilution en milieu liquide de la souche *S. aureus* ATCC 43300 (R : *Ruta chalepensis*, B : *Bêta vulgaris*).

2.2.3. Effet antibactérien des extraits sur *Bacillus cereus* ATCC 11178

❖ Méthodes de dilution en milieu solide (aromatogramme)

Les résultats obtenus montrent que la gamme de concentration de l'extrait *Ruta chalepensis* à une action positive sur la souche *B. cereus* à l'exception de la concentration 10mg/ml qui donne un diamètre de 7mm < 8mm (tab. 9), considérant ainsi la bactérie non sensible.

De manière générale, les concentrations variant de 50 à 250mg/ml donne le même effet permettent de classer la bactérie dans la catégorie sensible.

Concernant l'extrait de la plante *Bêta vulgaris*, on n'observe aucun effet sur la souche cible. (fig. 31 et 32)

Tableau 9 : Les diamètres d'inhibition de la souche *B. cereus* ATCC 11178.

	Les diamètres d'inhibition (mm)					
	10mg/ml	50mg/ml	100mg/ml	150mg/ml	200mg/ml	250mg/ml
Extrait R	7	10,66	12	13,33	14,66	13,66
Extrait B	0	0	0	0	0	0

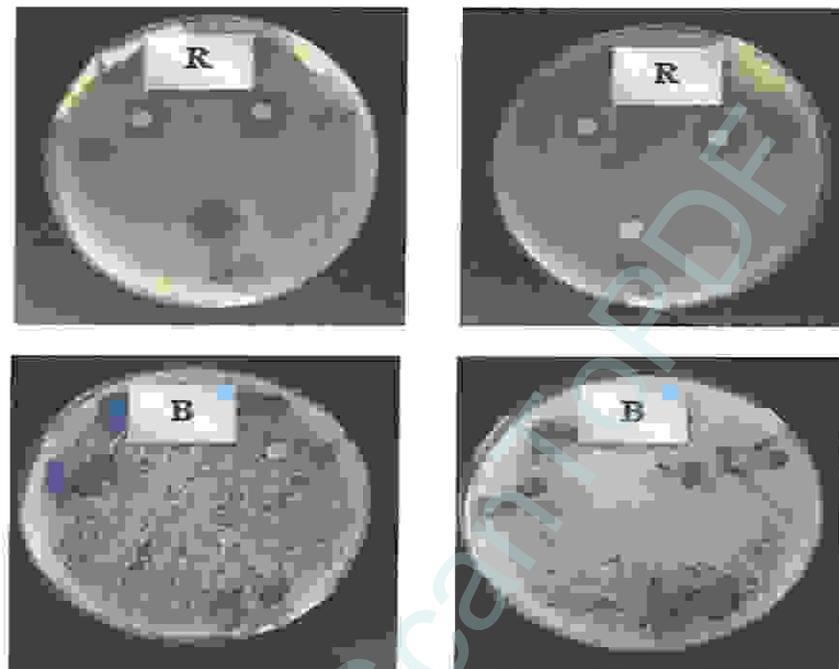


Figure 31 : Aspect macroscopique de la réponse de l'espèce *B. cereus* ATCC 11178 aux extraits testés (R : *Ruta chalepensis*, B : *Bêta vulgaris*).

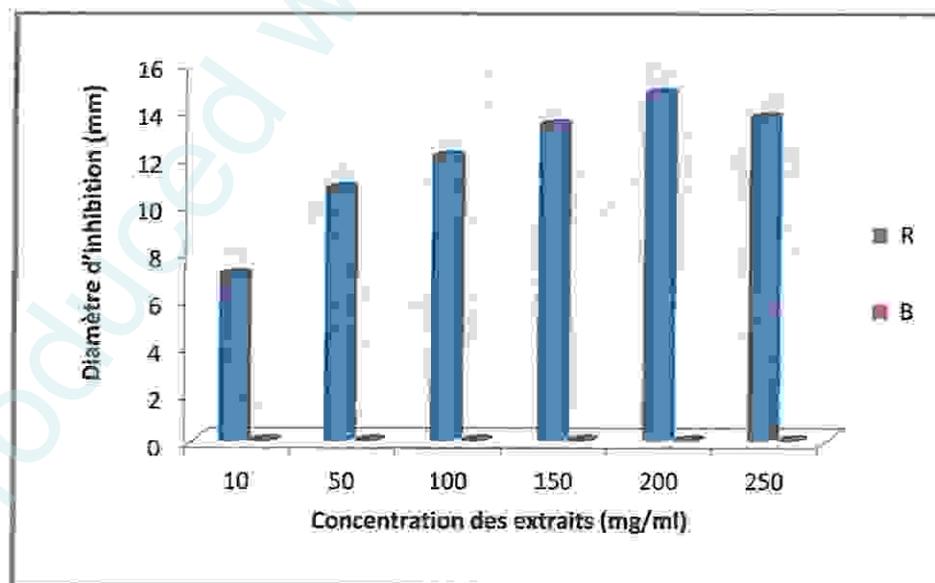


Figure 32 : Présentation graphique de l'aromatogramme de l'espèce *B. cereus* ATCC 11178 (R : *Ruta chalepensis*, B : *Bêta vulgaris*).

❖ Méthode de dilution en milieu liquide

A partir de la série de dilution en milieu liquide contenant la gamme de concentration allant de 10 à 250mg/ml de l'extrait *Ruta chalepensis*, la concentration 50mg/ml a permis l'obtention d'un tube claire traduisant ainsi l'inhibition de la croissance bactérienne.

La série de dilution de l'extrait *Bêta vulgaris* montre en revanche la résistance de la bactérie. (fig. 33)



Figure 33 : La série de dilution en milieu liquide de la souche *B. cereus* ATCC 11178 (R : *Ruta chalepensis*, B : *Bêta vulgaris*).

2.2.4. Effet antibactérien des extraits sur *Escherichia coli* ATCC 25922.

❖ Méthode des disques (aromatogramme)

Les résultats relatifs à l'aromatogramme de la souche *E. coli* montrent l'absence des zones d'inhibition de la bactérie en réponse à la gamme de concentration des extraits des plantes testés. (tab. 10) et (fig. 34 et 35)

La résistance de cette souche peut être attribuée à plusieurs mécanismes plasmidiques ou chromosomiques tels que : les modifications enzymatiques de la cible, diminution d'affinité, des mutations ou même dans notre cas les concentrations sont faibles pour exercer un pouvoir positif sur la souche.

Tableau 10 : Les diamètres d'inhibition de la souche *E. coli* ATCC 25922.

	Les diamètres d'inhibition (mm)					
	10mg/ml	50mg/ml	100mg/ml	150mg/ml	200mg/ml	250mg/ml
Extrait R	0	0	0	0	0	0
Extrait B	0	0	0	0	0	0

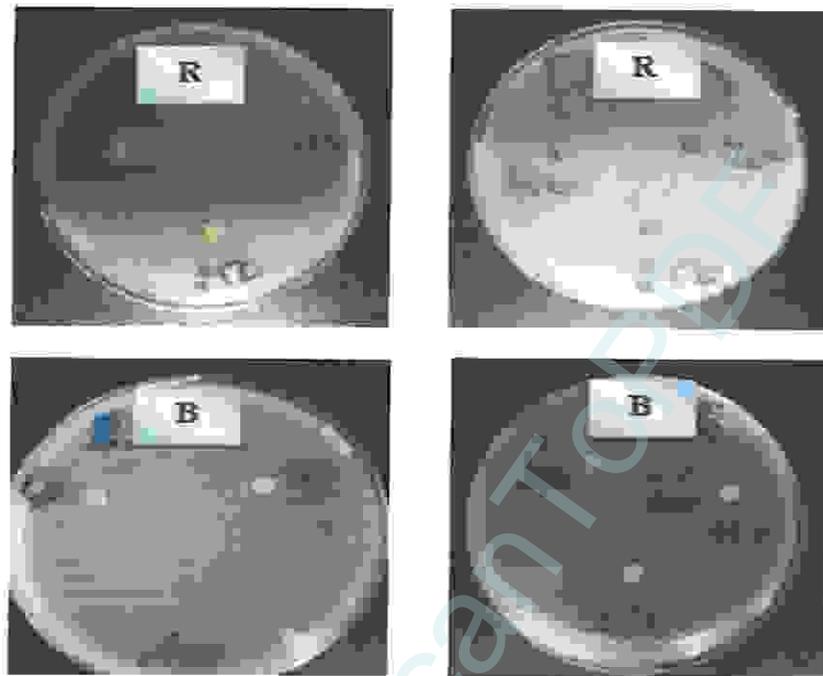


Figure 34 : Aspect macroscopique de la réponse d'*E.coli* ATCC 25922 aux extraits testés

(R : *Ruta chalepensis*, B : *Bêta vulgaris*).

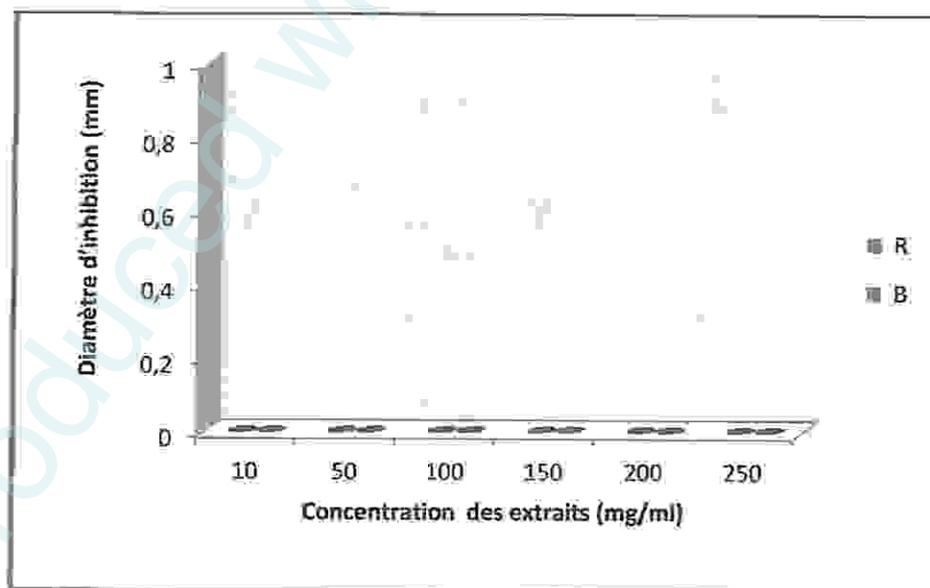


Figure 35 : Présentation graphique de l'aromatogramme de l'espèce *E. coli* ATCC 25922

(R : *Ruta chalepensis*, B : *Bêta vulgaris*).

❖ Méthode de dilution en milieu liquide

D'après la série de dilution effectuée aucun tube clair n'a pu être observé (fig. 36), donc la CMI recherchée n'a pu être déterminée pour les 2 extraits.

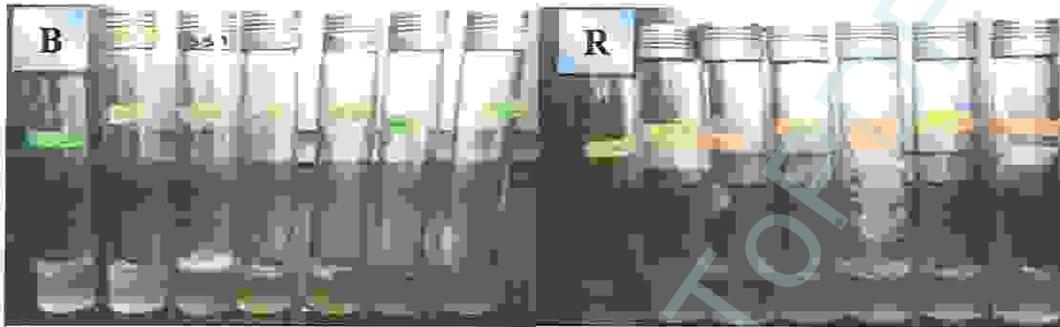


Figure 36 : La série de dilution en milieu liquide de la souche *E. coli* ATCC 25922 (R : *Ruta chalepensis*, B : *Bêta vulgaris*).

2.2.5. Effet antibactérien des extraits sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

❖ Méthode des disques (aromatogramme)

Les tests des différentes concentrations de l'extrait *Ruta chalepensis* sur la souche *P. aeruginosa* montre un effet positif sur cette dernière avec les concentrations allant de 100 à 250mg/ml de méthanol (fig. 37), où la bactérie s'est manifesté sensiblement (diamètre compris entre 8 et 14mm) (tab. 11). Par ailleurs les concentrations 10 et 50mg n'ont donné aucun effet.

En ce qui concerne l'extrait méthanolique de la plante *Bêta vulgaris*, on note une résistance de la souche vis-à-vis des différentes concentrations. (fig. 38)

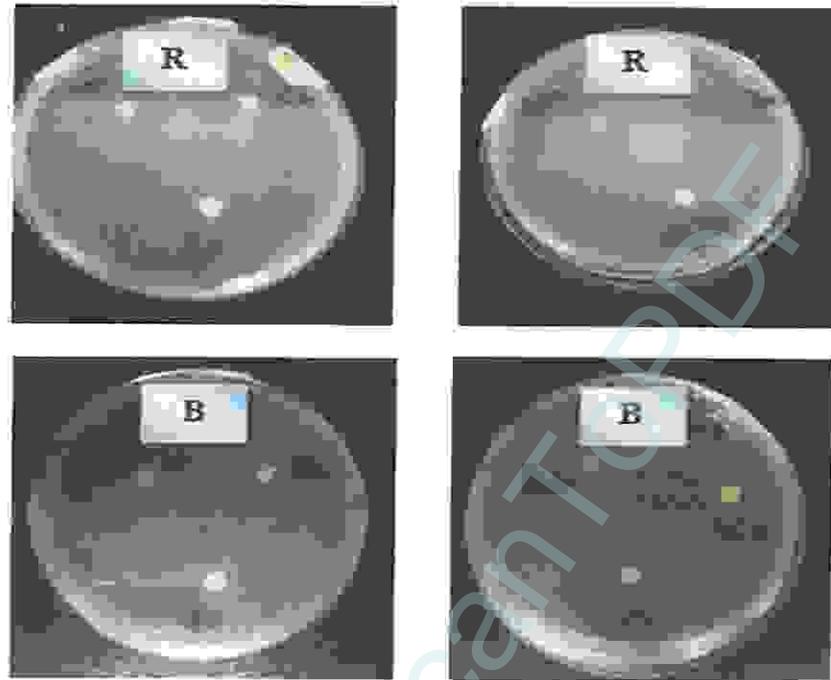


Figure 37 : Aspect macroscopique de la réponse du *P. aeruginosa* ATCC 27853 aux extraits testés

(R : *Ruta chalepensis*, B : *Béla vulgaris*).

Tableau 11 : Les diamètres d'inhibition de la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853.

	Diamètre d'inhibition (mm)					
	10mg/ml	50mg/ml	100mg/ml	150mg/ml	200mg/ml	250mg/ml
Extrait R	0	0	9,66	9,33	10,66	9
Extrait B	0	0	0	0	0	0

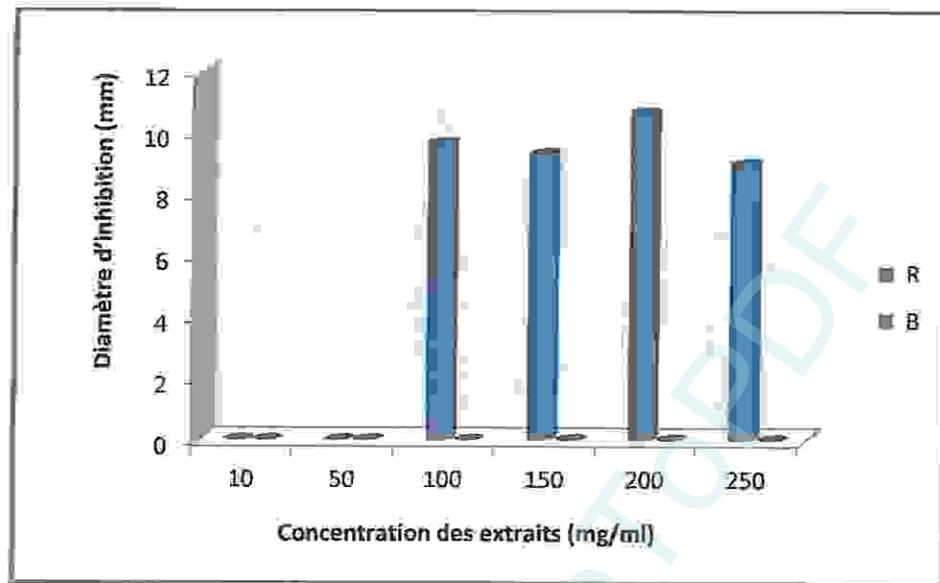


Figure 38 : Présentation graphique de l'aromatogramme de l'espèce *P. aeruginosa* ATCC 27853

(R : *Ruta chalepensis*, B : *Bêta vulgaris*).

❖ Méthode de dilution en milieu liquide

Pour l'extrait *Ruta chalepensis* la concentration minimale inhibitrice (CMI) a pu être déterminée à partir de la concentration 100mg/ml.

En revanche, dans la série de dilution composée de l'extrait *Bêta vulgaris*, aucun tube clair n'est observé traduisant ainsi la résistance de la souche vis-à-vis de cette extrait. (fig. 39)



Figure 39 : La série de dilution en milieu liquide de la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853

(R : *Ruta chalepensis*, B : *Bêta vulgaris*).

❖ Concentration minimale bactéricide (CMB)

A partir de la série des dilutions précédente, où on a pu déterminer une CMI, des boîtes de GN ont été ensemencées puis incubées afin de déterminer la CMB toujours pour l'extrait de *Ruta chalepensis*, les résultats relatifs ne montrent aucune inhibition de la croissance bactérienne des souches cible, ceci confirme que les concentrations testées pour l'extrait de *Ruta chalepensis* ont un effet bactériostatique et non pas bactéricide. (fig. 40)

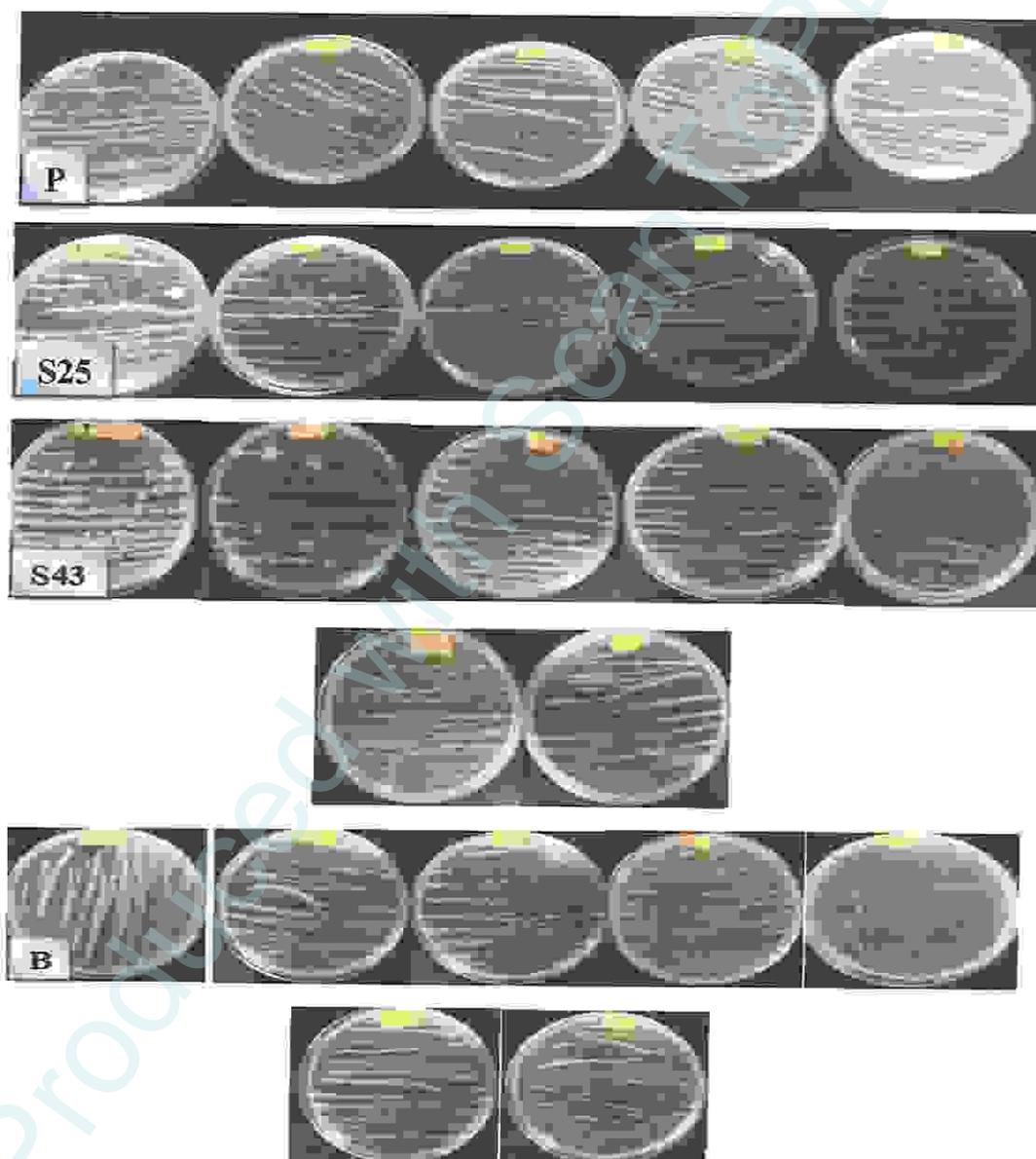


Figure 40 : Photographies de la CMB

(P : *P. aeruginosa* ATCC 27853, S25 : *S. aureus* ATCC 25923, S43 : *S. aureus* ATCC 43300, B : *B. cereus* ATCC 11178).

2.3. Pourcentage d'inhibition

Après le calcul des pourcentages d'inhibition, les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 12 : Pourcentages d'inhibition des souches testées.

	Concentration mg/ml méthanol						P
	10	50	100	150	200	250	
	Pourcentages d'inhibition (%)						
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0	10,97	16,07	15,29	16,47	14,50	0,0000
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	12,54	17,24	18,03	24,30	15,68	20	0,0000
<i>B. cereus</i> ATCC 11178	8,23	12,54	14,11	15,68	17,24	16,07	0,0000
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0	0	0	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	11,36	10,97	12,54	10,58	0,0000
P	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-

P : probabilité à un seuil de 5%

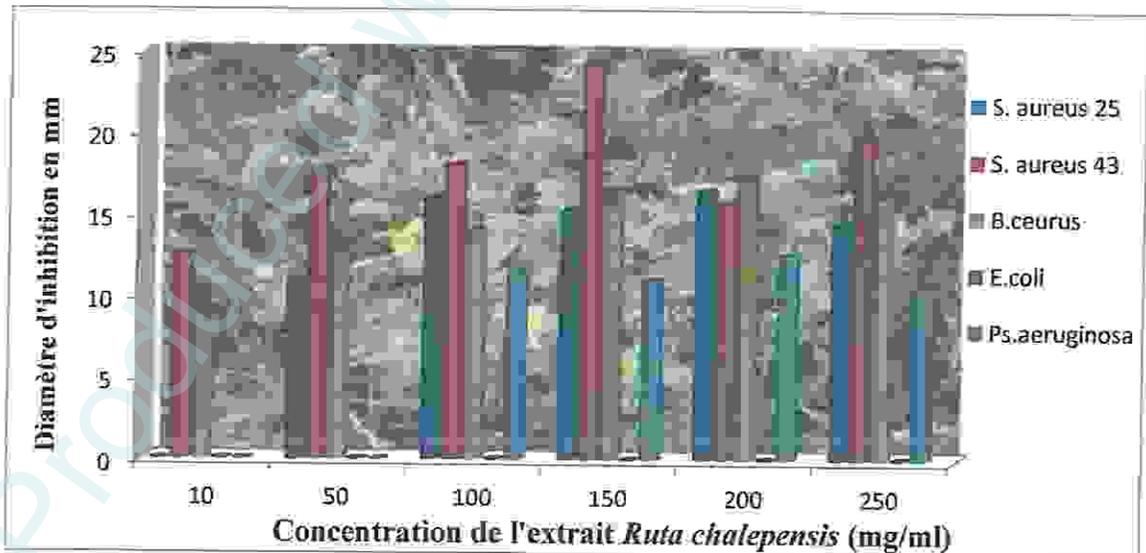


Figure 41 : Présentation graphique des pourcentages d'inhibition des différentes souches testées.

(*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *B. cereus* ATCC 11178).

Le calcul des pourcentages d'inhibition de la gamme de concentration choisie pour l'extrait de *Ruta chalepensis* présenté dans le **Tableau 12** et la **Figure 41** nous montre que sur l'ensemble des souches testées les espèces *B. cereus* ATCC 11178 et *S. aureus* ATCC 43300 se révèlent plus sensibles. Par ailleurs, la souche *E. coli* ATCC 25922 apparaît résistante vis-à-vis des différentes concentrations.

P. aeruginosa ATCC 27853, elle se montre résistante uniquement avec les faibles concentrations (10 et 50mg/ml), les zones d'inhibition calculées permettent de classer la souche dans la catégorie sensible.

Pour la souche *S. aureus* ATCC 25923, elle se montre plus résistante par rapport à la souche *S. aureus* ATCC 43300 avec la concentration 10mg/ml et sensible vis-à-vis du reste.

Donc on peut dire que l'activité des majorités des souches se change selon les concentrations.

D'après les zones d'inhibition, générées par l'extrait méthanolique de *Ruta chalepensis* les bactéries les plus sensibles sont : *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 25923 et *B. cereus* ATCC 11178, tandis que la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853 elle montre des sensibilités à des concentrations plus élevées. Concernant l'espèce *E. coli* ATCC 25922 les extraits sont inactifs à son égard.

A partir des résultats de l'antibiogramme tirés, on peut dire que l'extrait R révèle plus puissant que les molécules de synthèse testés (antibiotiques) sur la majorité des souches.

Selon la littérature, les bactéries à Gram positif sont plus sensibles, par rapport aux bactéries à Gram négatif. Cela peut être expliqué par la présence de la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif, qui est capable de diminuer la perméabilité des composés hydrophobes.

Nos résultats sont confirmés par le travail de Attou, (2011), qui montre que la plante *Ruta chalepensis* exerce une bonne activité antimicrobienne vis-à-vis du *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. cereus* ATCC 11178, *E. coli* ATCC 25922, où ils ont remarqué une grande variation entre les huiles essentielles de cette plante par rapport aux différentes stations de cueillette.

Plusieurs études ont montré également l'efficacité des extraits méthanoliques de *Ruta* sur d'autres souches microbiennes tels : l'activité antifongique (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Microsporium canis*, *Paecilomyces lilacinus*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*) d'extrait méthanolique de *Ruta* démontrée par les travaux de Lauk et al., 2000. D'autres travaux effectués sur l'activité antimicrobienne d'extraits et même d'huile essentielles des espèces proches (*Ruta montana* et *Ruta graveolens*) renforcent plus nos résultats (Ivanova et al., 2005 ; Emea, 1999).

Malgré que nous n'ayons pas trouvé dans la littérature des études sur l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Ruta*, le profil des composés qu'il contient selon des travaux variés, confirme l'activité qu'il peut l'exercer.

L'analyse des données expérimentales montre qu'il y a une diminution du nombre de colonies pour la majorité des souches testées.

Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes ainsi que les effets antioxydants et l'effet antibactérien des extraits méthanoliques de la partie aérienne de *Ruta chalepensis* (Fidjel) et de *Bêta-vulgaris* « var *cicla* » (Eselk) ont été évalués dans le présent travail.

Les résultats montrent que les deux extraits méthanoliques sont riches en composés polyphénoliques avec la prédominance de ces derniers dans l'extrait méthanolique de *Ruta chalepensis*.

Par ailleurs, les deux extraits possèdent une activité antioxydante importante *in vitro*. Ils montrent une inhibition très importante vis-à-vis du radical DPPH.

En outre, seul l'extrait méthanolique de *Ruta chalepensis* a montré une activité antibactérienne relativement importante vis-à-vis *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus*, faible vis-à-vis *P. aeruginosa* tandis que l'extrait méthanolique de *Bêta vulgaris* « var. *cicla* » ne possède aucun effet antibactérien vis-à-vis des souches testées.

Ruta chalepensis et *Bêta vulgaris* sont des sources prometteuses d'agents antioxydants mais *Ruta chalepensis* est de fort agents antibactériens ce qui est expliqué par la nature des composés présents dans cette plante par contre l'effet antibactérien de *Bêta vulgaris* reste non confirmé. Pour cela d'autres études concernant l'identification des molécules bioactives, la confirmation de la capacité antioxydante de la Rue et de Blettes par des tests *in vivo* ainsi que l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits et des huiles essentielles de ces deux plantes vis à vis d'autres souches bactériennes sont nécessaires.

- **Bolkent S., Yanardag R., Tabakoglu-og uz A., Ozsoy-sacan O. (2000).** Effects of Chard (*Beta vulgaris L var. cicla*) extract on pancreatic B cells in streptozotocin diabetic Rats: a morphological and biochemical study. *J. Ethnopharmacol.* 73. P: 251-259.
- **Bonnier G. (1999).** La Grande Flore en Couleur. Ed: BELIN. Tome 3.P: 205 - 206.
- **Bouamama H, Noël T, Villard J, Benharref A, Jana M. (2006).** Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus L.* species. *J. Ethnopharmacol.* P: 104-107.
- **Bousseboua H. (2001, 2006).** Eléments de microbiologie générale. 32, P : 160-167.
- **Bozin.B, N., Mimica - Dukic, L, Samojlik, A., Goranand R. (2008).** Içic, Phenolics as antioxydants in garlic (*Allium sativumL., Alliaceae*), Food Chemistry, 111: P. 925-929.
- **Bruneton Jean. (1999).** Pharmacognosie: phytochimie et plantes médicinales. 3ème édition (TEC & DOC). P: 1085.
- **Cachiță, C.D., Deliu, C., Rakosy, T.L., Ardelean, A. (2004).** Tratat de biotehnologii vegetal a. Dacia Publ., Cluj-Napoca.
- **Callery., Emma. (1998).** Le grand Livre des herbes « le guide pratique de la culture, du séchage et des vertus de plus de 50 herbes ».
- **Chambers H. F. (1997).** Methicillin resistance in staphylococci : molecular and biochemical basis and clinical implications, *Clin. Microbiol. Rev.* 10. P: 781.
- **Clermont-Beaugiraud S. (1968).** Chromatographie sur couche mince des oses et oligosaccharides. *Chemistry and Materials Science.* Vol 16, N1 4, P : 92-101.
- **Dastidar S.G. (2004).** Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23.P: 99-102.
- **Delattre J. (2005).** Radicaux libres et stress oxydant ed : TECDOC. Londres-paris – newYork. P : 620.
- **Dewick P.M. (2002).** Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. Ed 2: JOHN WILEY & SONS. P: 291- 398.
- **Dohou N., Yamni., Tahrouch S. (2003).** Screening phytochimique d'une endémique ibéro-Marocaine, Thymelaea lyhroides. *Bull Soc Pharm. Bordeaux.* 142, P : 61-78.
- **Duke A.J., Duke P.A.K., Duceilie J.L. (2008).** DUKE'S HANDBOOK of Medicinal Plants of the Bible. Ed: CRC PRESS. P: 394 – 397.

- Durackova Z., Djrolo F., Houngbe H., Avode G., Attoulou V., Addra B., Kodjoh N., Avimadj M. (2008). Oxidants, Antioxydants and Oxidative stress. Mitochondrial medicine Gvozdzakova A (ed). P : 19-43.
- Eberhard T, Robert A, Annelise L, (2005). Plantes aromatiques, épice aromates, condiments et huiles essentielles. Tec et Doc. Lavoisier. Paris France.
- Eddouks M., Ouahidi M.L., Farid O., Moufid A., Khalidi A., Lemhadri A. (2007). L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. Phytothérapie 5, P : 194–203.
- Edeogal H.O., Okwu D. E., Mbaebie B.O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* Vol. 4 (7). P: 685-68.
- EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products). (1999). Committee for Veterinary Medicinal Products : *Ruta graveolens*; EMEA 98 (542), P: 4.
- Fleming T. (2000). PDR for Herbal Medicines. Ed: MEDICAL ECONOMICS COMPANY. P: 618-619.
- Foster S., Tyler V.E. (1999). A Sensible Guide to the Use of Herbs and Related Remedies. Ed 4: Tyler's honest herbal, HAWORTH HERBAL PRESS. P: 325-326.
- Fournier P. (1999). Plantes médicinales et vénéneuses de France.
- Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. and Rasooli I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.*, 102.P : 898.
- Gao, Z.J., Han, X.H., Xiao, X.G. (2009). Purification and characterization of polyphenoloxidase from red Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cicla*) leaves. *Food Chem.* 117. P: 342–348.
- Georgé S., Brat P., Alter P Etamiot J.M. (2005). Rapid determination of polyphénols and Vitamine C in plant-derived products. *J. Agr. Food Chem.* 53, P: 1370-1373.
- Goudable J.I., Favier A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Métabol.* Vol 11, P : 15.
- Grosmond G. (2001). La phytothérapie. Elevage et agriculture biologique. Bulletin des GTV et HS.P:143-145.

- **Guiraud J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod. P : 71-75.
- **Hamidi, Abdelrazag.** Etude phytochimique et activité biologique de la plante *Limoniastrum guyonianum* [en ligne]. Thèse de magister. Ouargla : université Kasdi Merbah, 2013,P : 86. disponible sur http://bu.univ-ouargla.dz/HAMIDI_ABDELRAZAG.pdf?idthese=3070 (consulté le 04/04/2014).
- **Hansw Kothe. (septembre 2007).** 1000 plantes aromatique et médicinales .Toulouse: Edition Terres. P: 10 -13.
- **Hussain A.I., Anwar F., Chatha S.A.S., Jabbar A., Mahboob S. and Nigam P.S. (2010).** *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology* 41. P: 1070-1078.
- **Iserin, P., (2001).** Larousse Encyclopédie des plantes médicinales, Ed. Larousse, p:10-17 & p:132.
- **Ivanova A. et al. (2005)**Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ruta graveolens*; *Fitoterapia* 76; Ed: ELSEVIER, P: 344.
- **Kanner J., Harels ET Granit R. (2001).**Betalains: a new class of dietary cationizedantioxidants. *J. Agric. Food. Chem.* 49. P: 5178 5185.
- **Karumi Y., Onyeyili P.A., Ogughuaja V O. (2004)** Identification of active principles of *M. balsamina* (balsam Apple) leaf extract. *J Med Sci*; 4(3). P:179-182.
- **Kelver J.P. (1993).** Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Critical review in toxicology, 23 (1). P:21.
- **Kotiranta A, Lounatmaa K & Haapasalo M. (2000).**Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection* 2. P : 189.
- **Kugler F., Stintzing F.C., Carle R. (2004).** Identification of betalains from petioles of differently colored Swiss chard (*Beta vulgaris* L. ssp. *ciela* [L]. Alef. Cv. Brightlights) by high-performance liquid chromatography-electrospray ionizationmass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 52. P: 2975–2981.
- **Ledard F., Guinaudeau H. (1997).** Encyclopédie des plantes et leurs propriétés- Algo Vision.
- **Lesueur D., Serra D.de Rocca, Bighelli A., Hoi T.M., Ban N.K., Thai T.H., Casanova J. (2007).** Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Michelia faveolata* Meryll ex Dandy from Vietnam Flavour and Fragrance Journal, 22, P: 317-321.

- **Li h.b., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F et Jiang Y. (2007).** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Foodchem.* 102. P: 771-776.
- **Madhavi d.L. et al; 1996;** Food antioxidants; Ed: CRC PRESS, P: 361- 460.
- **Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E et Kefalas P. (2005).** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*); *Food Chemistry* 89. P: 411-420.
- **Marouf A. (2002).** Analyse instrumentale à l'usage des biologistes 2^{ème} édition Dar el Gharb. Oran. P: 17-20.
- **Max Wichd., Bbert. (2003).** Plantes thérapeutiques : Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
- **Mejri J., Abderrabba M., Mejri M. (2010).** Chemical composition of the essential oil of *Ruta chalepensis L.* Influence of drying, hydrodistillation duration and plant parts. *Industrial Crops and Products* 32, Ed: ELSEVIER. P: 671- 673.
- **Merad Chiali R. (1973).** Contribution à la Connaissance de la Pharmacopée Traditionnelle Algérienne. Thèse de Doctorat d'état en Pharmacie; Institut Des Sciences Médicales. P : 101- 370.
- **Milesi S., Massot B., Gontier E., Bourgaud F. et Guckert A. (2001).** *Ruta graveolens L.*, a promising species for the production of furanocoumarins. *Plant Science* 161. P: 189- 199.
- **Mioulane P. (2004).** Encyclopédie Universelle des 15000 plantes et fleurs de jardins ; Larousse ; Ed : PROTEA. P : 7-50.
- **Mohammedi Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse magistère, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, P: 155.
- **Narayana K.R. (2000).** Bioflavonoids Classification, Pharmacological, Biochemical Effects and therapeutic Potential. *Indian Journal of pharmacology* P: 33:2-13.
- **Nataro J. P., Kaper J. B. (1998).** Diarrheogenic *E. coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11. P : 142.
- **Nostro A., Gennano M. p., D'Angelo V., Marino A. et Cannatelli M.a. (2000)** Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lettres en microbiologie appliquée.* 30 (5), P; 379.

- **NT. beniston. (1984).** «Fleurs d'Algérie, Entreprise nationale du livre, N° d'édition 1822/84, Alger 120.
- **Okmu D.E. (2005).** Phytochemicals, vitamins and mineral contents of two Nigerian medicinal plants. *Int J Mol Adv Sci*; 1 (14). P: 375-381.
- **Perry J., Staley J., Lory S et al. (2002).** Microbiologie. Cours et question de révision. Dunod. P : 159.
- **Philippon A. (1995).** Quelques bacilles à Gram négatif aérobies stricts non fermentaires et sensibilité aux antibiotiques. *Lett. Infectiol.* 10. P : 619.
- **Pincemail J, Meurisse M, Limet R et Defraigne J O. (1999).** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*, 4 (5)
- **Porter N. (2001).** Essential oils and their production. *Grup & food Rasearh.* P: 39.
- **Prescott., Harley & Klein. (1995).** Microbiologie.Bruxelles. DeBoeck Université.
- **Pyo, Y., Lee, T., Logendra, L., Rosen, R.T. (2004).** Antioxidant activity and phenolicCompounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*) extracts. *Food Chem.* 85. P: 19-26.
- **Rizk, A.M. (1982).** Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterrapia*, 52 (2).P: 35-42
- **S. mansour, M.A. tariq, M.A. yahya, S. rafatullah, O.T. giunawi and A.M. Ageel, J. (1990).** *Ethnopharmacol*, 28.P: 305-312.
- **Sabai M., Boudali M., (2012).** La phytothérapie entre confiance et méfiance, mémoire professionnel infirmier de la santé publique, institut de formation paramédical CHETTIA, 07-10, P: 15.
- **Sanchez-Moreno C. (2002).** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems.*International Journal of Food Science and Technology*.8. P: 121-137.
- **Schauenberg p., Paris F. (1977).** Guide des plantes médicinales. Ed3 : DELECHAUX & NIESTLE. P : 106-119.
- **Schnaubelt K. (1998).** *Advanced Aromatherapy.* Vermont:Healing Arts Press.
- **SFM. (2013).** Comité de l'antibiogramme de société française de microbiologie. *Recommandation.* P : 60.

- **Strang C. (2006).** Larousse medical. Ed Larousse.
- **Svoboda K.P., Hampson J.B. (1999).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic Plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other pharmacological activities Plant Biology Department, SAC Auchincruive, AyrScotland, UK, KA65HW.
- **T. Johnson. (1999).** "Ethnobotany desk reference". CRC Press Boca Raton London, New York, Washington, D.C., USA 730.
- **Thagara J. H. S., ADJEI O., ALLEN B. W., PORTAELS F. et al. (2000).** *In vitro* activity of ciprofloxacin, Sparfloxacin, Ofloxacin, Amikacin and Rifampicin against Ghanaian isolates of *Mycobacterium ulcerans* ; J. Antimicrob. Agents Chemother, **45** (2), 2000, P : 231-233.
- **Torres R. (2006).** Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudates of *Haplopappusmultifolius*; *Phytochemistry* 67. Ed: ELSEVIER. P: 984-987.
- **Ulubelen A., Terem B. (1988).** Alkaloids and Coumarins from roots of *Ruta chalepensis*. Pargamon Journals, Photochemistry 27 (2), P: 650-651.
- **Vun Bambecke F., Tulken P. (2008).** Pharmacologie et pharmacotérapie anti-infectieuse, Syllabus national belge de pharmacologie, P: 212.
- **Wagner H. (1993).** Pharmazeutische Biologie. Drogen und ihre Inhaltsstoffe, Gustav Fisher Verlag. Stuttgart-New-York, P : 522.
- **Waterman P. G. (1975).** Alkaloids of the *Rutaceae*: their distribution and Systematic Significance, Biochemical Systematic and Ecology 3. Ed: PERGAMON PRESS. P: 149-180.
- **Yi z-b., Yu y., Liang Y-Z., Zeng B. (2007).** In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of Pericarpium Citri Reticulatae of new Citrus cultivar and its main flavonoids, LWT-Food of Science and Technology. 4. P: 1000-1016.
- **Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999).** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, 64 (4). P: 555-559.

Produced with ScanTopDF



Annexes

Annexe 1

1. Matériel et Produits utilisés

1.1. Les produits Chimiques et les réactifs :

- H_2SO_4 , $FeCl_3$, HCl , NH_4OH , Réactif de Fehling, Ethanol.
- Réactif de Folin, Carbonate de sodium, acide gallique, $AlCl_3$, Quercétine, acide ascorbique,
- Acétate d'éthyle, eau distillée, ninhydrine. Méthanol, L'eau physiologique, $BaCl_2$.
- Gélose Nutritive, Gélose Mueller Hinton, Bouillon Nutritif

1.2. Les équipements :

- le rot à vapeur R-215 (Büchi).
- Lyophilisateur.
- Spectrophotomètre (JENWAY 6305).
- Cuve de chromatographie.
- Balance (BB310) et (Sartorius).
- Balance de précision (Explorer[®] Pro).
- Verrerie.
- Eppendorf.
- Tubes capillaires.
- Vortex (snijders 34524).
- Autoclave.
- Four Pasteur.
- Etuve.
- Réfrigérateur.

Annexe 2

2. Solutions préparées

- **Préparation de la solution 0.5 MacFarland**

Cette solution représente le mélange d'une solution de BaCl_2 à 1% et de l'acide sulfurique à 1%.

- **Solution de BaCl_2 à 1%**

1g de $\text{BaCl}_2 \longrightarrow$ 100ml d'eau distillée

- **Solution d' H_2SO_4 à 1%**

Prélever 1ml d'acide sulfurique et compléter le volume jusqu'au 100ml par l'eau distillée.

Prélever 0,5ml de la solution de BaCl_2 et le déposer dans une fiole ou une éprouvette. Compléter le volume jusqu' à 100 ml avec la solution de l'acide sulfurique.

Mesurer l'absorbance de mélange, elle doit être comprise entre 0,08 à 0,1 lue (longueur d'onde 625nm).

Conserver cette solution dans un flacon ombré à température ordinaire.

- **L'eau physiologique**

-l'eau physiologique est une solution à 9%.

9g de NaCl pour 1litre de l'eau distillée.

Après préparation stériliser cette solution et la conserver à 4°C jusqu'à leur utilisation

3. Préparation des milieux de cultures

- **Gélose Nutritive**

Dissoudre 39g dans un litre d'eau distillée, autoclaver 15 minutes à 121°C. Ensuite conserver dans un endroit frais en absence d'humidité.

- **Gélose de Muller Hinton**

Gélose Muller Hinton (38 g) plus 1L d'eau distillée. Porté à ébullition avec agitations jusqu'à la dissolution complète de la poudre. La solution a ensuite été stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 30 min.

- **Bouillon Nutritif**

Mettre 20g du milieu nutritif déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée. Agiter lentement jusqu'à dissolution complète. Répartir en tube ou en flacons, stériliser à l'autoclave.

Conserver au réfrigérateur pour un usage ultérieur.

Produced with ScanTOPDF