

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I  
Frères Mentouri Constantine I University  
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie

كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم الميكروبيولوجي

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

N° d'ordre :  
N° de série :

Intitulé :

---

**Étude phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne  
d'une plante médicinale *Mitracarpus scaber***

---

Présenté par : ALASSAN HAMIDOU Hamza  
BEY Dounia  
SENE Ndeye Oumy

Le 21/06/2023

Jury d'évaluation :

Encadreur : BENSAID Sara Ouissem (M-C-B- Université Frères Mentouri, Constantine 1).  
Co-encadreur : ABDELAZIZ Ouidad (M-C-B- Université Frères Mentouri, Constantine 1).  
Examineur 1 : MEGHNOUS Ouissem (M-C-B- Université Frères Mentouri, Constantine 1).  
Examineur 2 : ACHOUB Hanane (M-C-B - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire  
2022 - 2023

# Remerciements

Nous remercions tout d'abord **Allah** pour nous avoir donné la santé, la volonté, la force, le courage, et la puissance pour pouvoir surmonter les moments difficiles, et atteindre nos objectifs et sans lesquels notre projet n'aurait pas pu voir la lumière du jour.

Nous remercions infiniment tous ceux qui ont contribué de près ou de loin, à la réalisation de ce projet, plus particulièrement :

Notre directrice de mémoire Mme **BENSAID Sara Ouissem** Maitre de Conférence classe B et son co-encadrante Mme **ABDLAZIZ Ouided** Maitre de Conférence classe B à l'université des Frères Mentouri Constantine 1, pour l'encadrement très précieux, la disponibilité, les conseils, la gentillesse, qu'elles trouvent ici toute notre reconnaissance et notre respect de nous avoir orienté significativement tout au long de ce travail.

Nos vifs remerciements vont au Professeur **SEGHIRI Ramdane** pour nous avoir accueilli au sein de l'Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyse Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL) de la faculté des sciences exactes, université des Frères Mentouri Constantine 1.

Nous remercions Mr **BOULAHROUF Khaled** Maitre de Conférence classe B pour nous avoir indiqué le chemin à prendre dès le début de ce projet à travers ses conseils.

Nous tenons à remercier aussi Mr **YAHAYA HAROUNA Elhabdou** depuis le Niger pour nous avoir permis d'obtenir les feuilles de *Mitracarpus scaber* en bon état sans lesquelles on ne pourrait pas faire cette étude.

Nous exprimons nos vifs remerciements à Mme **MEGHNOUS Ouissem** Maitre de Conférence classe B pour le grand honneur qu'elle nous fait, en acceptant de présider le jury et Mlle **ACHOUB Hanane** Maitre de Conférence classe B à l'Université des frères Mentouri Constantine 1, d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce mémoire.

Nos sincères remerciements à tous les membres de l'unité de recherche VARENBIOMOL particulièrement Mr **HICHAM Hazmoune** et Mme **TEBBOUB Naouel** et à l'ingénieur du laboratoire 8 du département de microbiologie Mme **SEDRATI Soumia** pour leur disponibilité, leur gentillesse et leur aide précieuse.

## Dédicace

À mon très cher père Mr LAMINE

Pour m'avoir soutenu jusqu'à ce jour, pour son amour et ses encouragements

Que Dieu te protège t'accorde santé et longue vie

À ma mère Mme MICHELINE FAYE

Elle s'est imposé de réels sacrifices pour ses enfants que ce travail puisse être le témoignage de mon amour profond à son égard.

Que Dieu te protège t'accorde santé et longue vie tu as toujours était là

À mes oncles et tantes plus particulièrement à Mr BOUCAR SENE mon deuxième papa celui sans qui je ne serais pas venu en Algérie

Soyez rassurés de ma reconnaissance sans faille pour les efforts consentis à mon égard.

À mes frères et sœurs plus précisément : NDEYE COURA SENE, AIDA SENE et NDEYE TENING SENE

Votre affection ne m'a jamais fait défaut, que le sentiment de parenté qui nous lie s'affermisse davantage

À mes neveux et nièces

Je vous souhaite bon courage.

À la mémoire de ma sœur, ma jumelle MARIETOU BARRE, que la terre te soit légère.

À mon ami, mon frère MAMA GOUMBALA et à toutes mes amies des résidences universitaires ZIANI LOUNES et AIN EL BEY 03.

Puisse le temps consolider nos liens d'amitié

À mes binômes Hamza et Dounia pour leurs patiences

À tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer.

*Oumy*

## **Dédicace**

***Après ce long parcours d'études, de travail et de persévérance, tout d'abord je remercie Dieu le tout puissant qui m'a éclairé le bon chemin et qui m'a donné le pouvoir et la patience pour compléter ce difficile parcours, et grâce à lui que je suis là.***

***Je dédie ce modeste travail à la mémoire de mon oncle maternel le grand docteur Belala Yacine que dieu lui garde dans son vaste paradis.***

***À l'homme de ma vie, mon exemple éternel, l'épaule solide, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi mon père Bey Salah aucune dédicace ne serait exprimer mes sentiments, que dieu te préserve et te procure santé et longue vie.***

***À la lumière de mes jours ma mère Belala Fatima Zohra, tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir. Tout ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je te porte, je t'aime maman, que dieu te préserve et te procure santé et longue vie.***

***À mes frères Mohamed el Amine, Nasredine et ma sœur Ahlem, avec lesquels j'ai passé toute ma vie, et auxquels je souhaite le succès dans leurs parcours.***

***Tout spécialement, je remercie mon cher ami KM, pour sa présence dans mes moments les plus difficiles, aussi pour son soutien moral et ces encouragements.***

***Et finalement à tous mes amis qui m'ont toujours donné le courage, qui ont partagé avec moi le bonheur et la misère, la joie et la tristesse.***

***À tous qui ont collaboré de près ou de loin pour que j'arrive jusqu'au là, chacun a sa part dans ce succès, je vous aime tous.***

***Enfin Un grand merci à moi d'avoir été là pour moi on a fait un long chemin plein de souffrance et des moments difficiles, tu ne m'as jamais abandonné merci, je suis Fière de moi, je m'aime.***

***Bey Dounia***

## Dédicace

*Je dédie ce travail*

*À mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,*

*À mes chères sœurs pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,*

*À mes chers frères pour leur appui et leur encouragement,*

*À mes oncles et tantes plus particulièrement à mon oncle Tidjani Boubacar mon deuxième papa celui sans qui je ne serais pas venu en Algérie.*

*Soyez rassurés de ma reconnaissance sans faille pour les efforts consentis à mon égard.*

*À toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,*

*À mes amis et mes camarades plus particulièrement Youncoussa Tiémogo et Yahaya Harouna, mes nobles amis qui ont toujours été là en tant qu'aide morale et académique.*

*À la famille Tiémogo pour tout leur soutien durant tout mon parcours académique.*

*À tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer*

*Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,*

*Merci d'être toujours là pour moi.*

**Hamza**

# Table des matières

Introduction générale .....	1
-----------------------------	---

## Partie 1 : Revue bibliographique

### Chapitre I: Rappels et aperçu sur *Mitracarpus scaber*

1. Rappels.....	3
1. 1. Phytothérapie .....	3
1.2. Plantes médicinales .....	3
1.3. Métabolites secondaires .....	3
1.3.1. Alcaloïdes .....	4
1.3.2. Composés Phénoliques .....	4
1.3.3. Terpènes .....	7
1.3.4. Stéroïdes et stérols .....	7
1.3.5. Saponines .....	7
1.4. Méthodes d'extraction .....	8
1.5. Méthode de séparation chromatographique.....	9
1.5.1. Chromatographie liquide sur colonne.....	9
1.5.2. Chromatographie planaire sur Couche Mince (CCM).....	9
1.5.3. Chromatographie planaire sur Papier (CP) .....	10
2. La famille des Rubiaceae .....	10
2.1. Généralités sur les Rubiaceae.....	11
2.2. Répartition géographique des Rubiaceae.....	11
2.3. Caractéristiques botaniques des Rubiaceae.....	11
3. Présentation de la plante étudiée : <i>Mitracarpus scaber</i> .....	11
3.1. Description botanique de l'espèce <i>Mitracarpus scaber</i> .....	11
3.2. Répartition géographique de l'espèce <i>Mitracarpus scaber</i> .....	11
3.3. Systématique de la plante .....	12
3.4. Synonymes .....	12
3.5. Noms vernaculaires .....	12
3.6. Utilisation en médecine traditionnelle .....	12
3.7. Activités biologiques reconnues et composition chimique .....	13

### Chapitre II : Aperçu sur les souches testées

1. Caractéristiques des souches fongiques testées.....	16
1.1. <i>Aspergillus niger</i> .....	16

1.2. <i>Candida albicans</i> .....	18
2. Caractéristiques des souches bactériennes testées .....	<b>19</b>
2.1. <i>Escherichia coli</i> .....	20
2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	22
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	25

## **Partie 2 : Expérimentale**

### **Chapitre III: Matériels et méthodes**

1. Étude phytochimique de l'espèce <i>Mitracarpus scaber</i> .....	<b>27</b>
1.1 Choix du matériel végétal.....	<b>27</b>
1.2. Matériel végétal .....	<b>27</b>
1.3. Préparation des extraits végétaux de <i>Mitracarpus scaber</i> .....	28
1.4. Chromatographie plane sur Couche Mince (CCM) .....	<b>30</b>
1.5. Screening phytochimique .....	<b>31</b>
1.5.1. Alcaloïdes .....	31
1.5.2. Anthraquinones.....	31
1.5.3. Polyphénols .....	31
1.5.4. Tannins .....	31
1.5.5. Flavonoïdes .....	32
1.5.6. Saponosides.....	32
1.5.7. Stérols .....	32
1.5.8. Protéines.....	32
1.5.9. Terpènes .....	32
2. Analyse quantitative des extraits de <i>Mitracarpus scaber</i> .....	32
2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	33
2.2. Dosage des flavonoïdes totaux .....	33
3. Évaluation des propriétés antimicrobiennes des extraits de <i>Mitracarpus scaber</i> .....	34
3.1. Matériel biologique .....	<b>34</b>
3.2. Milieux de culture .....	34
3.3. Préparation de l'inoculum .....	34
3.4. Ensemencement .....	35
3.5. Préparation des différentes concentrations des extraits.....	35
3.6. Imprégnation des disques .....	35
3.7. Dépôt des disques.....	<b>35</b>

3.8. Incubation .....	36
3.9. Lecture des résultats.....	36

## **Chapitre IV : Résultats et discussions**

1. Étude phytochimique de l'espèce <i>Mitracarpus scaber</i> .....	37
1.1. Rendements des extractions .....	37
1.2. Chromatographie planaire sur Couche Mince (CCM) .....	38
1.3. Screening phytochimique .....	39
2. Analyse quantitative des extraits de <i>Mitracarpus scaber</i> .....	42
2.1. Dosage des polyphénols totaux .....	42
2.2. Dosages des flavonoïdes totaux.....	43
3. Évaluation des propriétés antimicrobiennes des extraits de <i>Mitracarpus scaber</i> .....	44



## Liste des abréviations

**µl** : Microlitre

**µm** : Micromètre

**AlCl<sub>3</sub>** : Trichlorure d'aluminium

**A. niger** : *Aspergillus niger*

**AcOEt** : Acétate d'éthyle

**ATCC** : American type culture collection

**C. albicans** : *Candida albicans*

**CC** : Chromatographie liquide sur colonne

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**CHCl<sub>3</sub>** : Chloroforme

**CP** : Chromatographie sur papier

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice

**CMB** : Concentration minimale bactéricide

**CuSO<sub>4</sub>** : Sulfate de cuivre

**DMSO** : Diméthyl-sulfoxyde

**EPEC** : *E. coli* entéropathogène

**ETEC** : *E. coli* entérotoxigène

**EIEC** : *E. coli* entéro-invasif

**EHEC** : *E. coli* entéro-hémorragique

**EAEC** : *E. coli* entéroaggrégative

**EAG** : Equivalent d'acide gallique

**E. coli** : *Escherichia coli*

**Ep** : Ether de pétrole

**EQ** : Equivalent de quercétine

**FeCl<sub>3</sub>** : Trichlorure de fer (III)

**FCR** : Folin-ciocalteu

**GVHD** : Graft versus host disease

**HCl** : Acide chlorhydrique

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Acide sulfurique

**H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : Acide phosphotungstique

**H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : Acide phosphomolibdique

**LPS** : Lipopolysaccharide

**MeOH** : Méthanol

***M. scaber*** : *Mitracarpus scaber*

**Mo<sub>8</sub>O<sub>23</sub>** : Molybdène

**Nm** : Nanomètre

**NaOH** : Hydroxyde de sodium

**pH** : Potentiel hydrogène

***P. aeruginosa*** : *Pseudomonas aeruginosa*

**R** : Rendement

**R<sub>f</sub>**: Rapport frontal

**SEPEC** : Septicémies à E. coli

**SIDA** : Syndrome d'immunodéficience acquise

***S. aureus*** : *Staphylococcus aureus*

**U/V** : Ultra-violet

**UPEC** : E. coli uropathogène

**W<sub>8</sub>O<sub>23</sub>** : Oxydes de tungstène

## Liste des figures

Figure 1 : Structures des composés phénoliques simples (A) acide benzoïque (B) acide.....	4
Figure 2 : Squelette de base des flavonoïdes .....	5
Figure 3 : Squelette de base des coumarines .....	6
Figure 4 : Squelette de base des anthraquinones.....	6
Figure 5 : Structure de stigmastérol (1) et le sitostérol (2) .....	7
Figure 6 : Schéma simplifié d'une chromatographie liquide .....	9
Figure 7 : Structures chimiques de quelques composés isolés de l'espèce <i>Mitracarpus scaber</i> .....	14
Figure 8 : Structures chimiques de quelques composés isolés de l'espèce <i>Mitracarpus scaber</i> .....	15
Figure 9 : <i>Aspergillus niger</i> .....	16
Figure 10 : <i>Candida albicans</i> .....	18
Figure 11 : <i>Escherichia coli</i> .....	20
Figure 12 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	23
Figure 13 : <i>Staphylococcus aureus</i> .....	25
Figure 14 : Images de l'espèce <i>Mitracarpus scaber</i> .....	27
Figure 15 : Extraction dans un bain à ultrasons .....	28
Figure 16 : Filtration des extraits .....	29
Figure 17 : Évaporation des extraits.....	29
Figure 18 : Organigramme de l'extraction de de <i>Mitracarpus scaber</i> .....	30
Figure 19 : Témoin positif fongique .....	35
Figure 20 : Plaques CCM des extraits sous lampe UV (254 nm) .....	38
Figure 21 : Plaques CCM des extraits révélées avec de l'anisaldéhyde .....	38
Figure 22 : Schéma indiquant les résultats des tests de screening phytochimique .....	40
Figure 23 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	42
Figure 24 : Courbe d'étalonnage de la quercétine .....	43
Figure 25 : Photographie montrant l'action des extraits de <i>M. scaber</i> sur les souches testées .....	47

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Position systématique d' <i>Aspergillus niger</i> .....	16
Tableau 2 : Position de <i>Candida albicans</i> .....	18
Tableau 3 : Position d' <i>Escherichia coli</i> .....	20
Tableau 4 : Quelques maladies cliniques causées par <i>E. coli</i> .....	22
Tableau 5 : Position de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	23
Tableau 6 : Quelques infections cliniques causées par <i>P. aeruginosa</i> .....	24
Tableau 7 : Position de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	25
Tableau 8 : Volumes des solvants utilisés.....	29
Tableau 9 : Les masses et les rendements des extraits obtenus.....	37
Tableau 10 : Profil phytochimique des différents extraits de <i>Mitracarpus scaber</i> .....	41
Tableau 11 : Teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux des extraits de <i>Mitracarpus scaber</i> .....	44
Tableau 12 : Valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition des différentes concentrations de l'extrait d'éther de pétrole vis-à-vis des cinq souches.....	45
Tableau 13 : Valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition des différentes concentrations de l'extrait chloroforme vis-à-vis des cinq souches .....	45
Tableau 14 : Valeur des diamètres moyens de la zone d'inhibition des différentes concentrations de l'extrait méthanol vis-à-vis des cinq .....	46



# **Introduction Générale**

## Introduction générale

Les plantes ont toujours été source de remède pour l'homme et l'animal et ceci depuis plusieurs milliers d'années. Et encore, une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne avec des remèdes traditionnels à base de plantes [1].

Malgré l'existence de diverses méthodes de découverte de médicaments, les plantes demeurent le principal réservoir de remèdes naturels [2]. En effet, l'industrie pharmaceutique contemporaine continue de se baser sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour identifier de nouvelles molécules aux propriétés biologiquement actives [1].

La résistance aux antimicrobiens a ravivé l'intérêt pour les plantes aux propriétés antimicrobiennes [2]. Il existe un besoin continu et urgent de découvrir de nouveaux composés antimicrobiens avec une structure chimique diversifiée et de nouveaux mécanismes d'action pour les maladies infectieuses nouvelles et réémergentes. Par conséquent, cela a conduit au criblage de plusieurs plantes médicinales pour une activité antimicrobienne potentielle [3].

La famille des *Rubiaceae* représente une famille importante de la flore tropicale tant sur le plan floristique par l'abondance et la variété de ses espèces que sur le plan économique, médical et ornemental [4].

*Mitracarpus scaber* est une *Rubiaceae* couramment utilisée dans les traitements traditionnels des maladies de la peau, notamment la dermatite infectieuse, l'eczéma, la teigne, les démangeaisons et la gale causée par des bactéries et des champignons tels que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum* et *Candida neoformans* [5,6].

Le présent travail est destiné à la valorisation des plantes utilisées en médecine traditionnelle, par la recherche de nouveaux métabolites secondaires dotés d'activités biologiques. Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'investigation phytochimique et l'évaluation de l'activité microbiologique de l'espèce *Mitracarpus scaber*. La sélection de cette plante s'est basée essentiellement sur sa grande utilisation en médecine traditionnelle.

Notre travail sera divisé en trois chapitres:

**Le premier chapitre** est consacré à des rappels bibliographiques, une étude bibliographique de la famille des *Rubiaceae* et de la plante étudiée *Mitracarpus scaber* portant sur l'aspect

## Introduction générale

botanique, l'utilisation en médecine traditionnelle, les activités biologiques et les différents métabolites antérieurement isolés.

**Le second chapitre** évoque des généralités sur les souches bactériennes et antifongiques testées.

**Le troisième chapitre** apporte tous les détails expérimentaux entrepris tout au long de ce travail. Il comprend l'étude phytochimique et l'évaluation de la sensibilité de certaines souches par rapport aux différents extraits de l'espèce *Mitracarpus scaber*.

**Le quatrième chapitre** sera consacré à la discussion des résultats phytochimiques et des tests microbiologiques effectués sur les extraits obtenus.

Nous terminons notre mémoire par une conclusion générale.

**Partie 1 :**

**Revue bibliographique**

**Chapitre : I**

**Chapitre : II**



Dans le but de valoriser les plantes utilisées en médecine traditionnelle, notre travail a été réalisé sur l'espèce *Mitracarpus scaber*.

Cette partie renferme des rappels, une étude bibliographique de la famille Rubiaceae et la plante étudiée *Mitracarpus scaber* et les caractéristiques des souches bactériennes et fongiques testées.

### **1. Rappels**

#### **1. 1. Phytothérapie**

La phytothérapie correspond à l'utilisation des plantes (les feuilles, fleurs et sommités fleuries, racines ou plantes entières) dans le but de traiter ou prévenir les maladies. Des plantes spontanées ou cultivées peuvent être utilisées mais les conditions règlementaires de culture propre doivent être exigées [7].

Les modes d'utilisation des plantes sont divers selon qu'elles sont prescrites : par voie interne (absorption orale, gargarisme, bains de bouche), ou externe (cataplasme, lotion, bain, injection cavités naturelles, fumigation) [7].

#### **1.2. Plantes médicinales**

Ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles [8].

#### **1.3. Métabolites secondaires**

Les métabolites secondaires sont des composés phytochimiques biosynthétisés naturellement par les végétaux mais qui ne participent pas directement au métabolisme végétal [9]. Par opposition aux métabolites primaires qui sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés ne sont pas nécessaires à la vie de la plante, mais ils jouent un rôle dans sa relation avec son environnement, par exemple dans la résistance contre les ravageurs et les maladies, comme attractif pour les pollinisateurs ou comme composé de signalisation. Les métabolites secondaires se caractérisent par une énorme diversité chimique, chaque organisme a son propre ensemble de métabolites secondaires [10].

La classification des métabolites secondaires est basée sur : la structure chimique, la composition, leur solubilité dans divers solvants ou leur voie de synthèse.

### 1.3.1. Alcaloïdes

Les alcaloïdes forment une grande famille de molécules chimiquement hétérogènes. Leurs caractéristiques communes sont leur solubilité dans l'eau, la présence d'un moins un atome d'azote et leur forte activité biologique [11].

Le mot "alcaloïde" est pratiquement synonyme du mot "drogue". C'est un composé organique azoté plus ou moins basique. Ils sont constitués d'un hétérocycle. A forte dose, la plupart des alcaloïdes sont très toxiques ; par contre à faible dose, ils peuvent avoir une valeur thérapeutique [11].

- **Le rôle des alcaloïdes dans les plantes**

- pour constituer signaux chimique, éléments de défense et de communication.
- constituent un moyen de défense contre les infections microbiennes
- sont les premières susceptibles d'être attaquées par les herbivores [11].

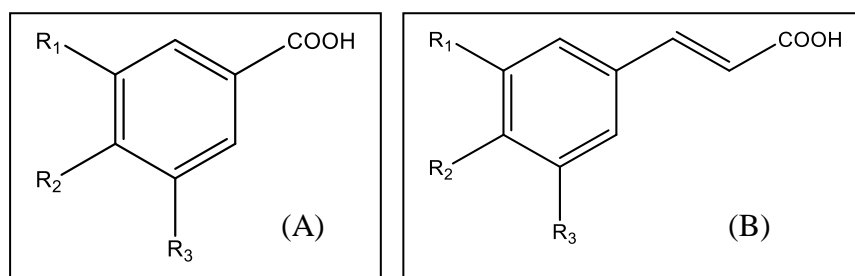
### 1.3.2. Composés Phénoliques

Le terme polyphénol a été introduit en 1980, en remplacement du terme ancien de tanin végétal et a été défini comme suit: composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton [12].

Les polyphénols naturels regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants. Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénols à des composés hautement polymérisés, de plus de 30 000 Dalton, comme les tanins [12].

➤ **Acides phénoliques**

Ils sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique, dérivés des acides benzoïques (C6-C1) ou des acides cinnamiques (C6-C3) (figure I.1). D'après Cai et *al.* (2006) [13], les acides phénoliques peuvent être subdivisés en: Acides hydroxybenzoïques et Acides hydroxycinnamiques.

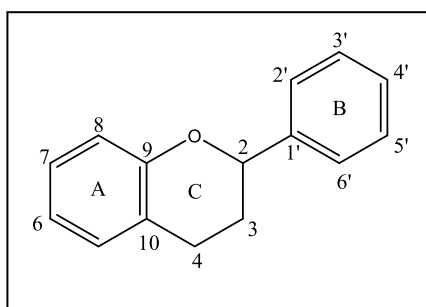


**Figure 1 :** Structures des composés phénoliques simples (A) acide benzoïque (B) acide cinnamique

### ➤ Flavonoïdes

Ce sont des composés polyphénoliques comprenant 15 atomes de carbone formant une structure C6-C3-C6, soit deux noyaux aromatiques reliés par un pont de 3 carbones. Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils ont des rôles variés dans les plantes en tant que métabolites secondaires, étant impliqués dans les processus de défense contre les UV, la pigmentation, la stimulation des nodules de fixation de l'azote et la résistance aux maladies par exemple.

La structure en C6-C3-C6 est le produit des deux voies de synthèse des composés phénoliques (Figure I.2), le noyau B et le pont carboné constituant une unité phénylpropanoïde synthétisée à partir de la phénylalanine provenant de la voie de l'acide shikimique, alors que le noyau A vient de la condensation de 3 motifs acétate via la voie de l'acide malonique. La fusion de ces deux parties implique la condensation d'un phénylpropanoïde, le 4-coumaryl, avec 3 malonyl CoA donnant chacun 2 atomes de carbone. La réaction est catalysée par la chalcone synthase, donnant ainsi le tétrahydrochalcone, qui va à son tour donner tous les flavonoïdes [12].



**Figure 2 :** Squelette de base des flavonoïdes

Il existe plusieurs groupes de flavonoïdes, dont les principaux sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines [12].

### ➤ Phénols simples

Ce sont des dérivés en C6 du noyau benzénique, rares à l'état naturel et issus de la décarboxylation de l'acide shikimique. On trouve parmi les phénols simples l'hydroquinol, le pyrocatechol et le phloroglucinol [12].

### ➤ 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 [14].

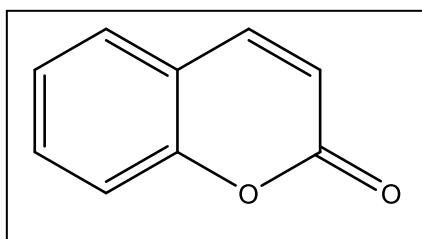
On distingue deux catégories de tanins: les tanins condensés et les tanins hydrolysables.

Les tanins condensés sont des polymères d'unités flavonoïdes reliées par de liaisons fortes carbone-carbone. Ces liaisons ne sont pas hydrolysables mais peuvent être oxydées par les acides forts libérant des anthocyanidines.

La structure des tanins hydrolysables est constitué d'un glucide, habituellement le glucose, dont un radical hydroxyle forme une liaison ester avec l'acide gallique. Les résidus de l'acide gallique se lient entre eux pour former un grand polymère réticulé [11].

### ➤ Coumarines

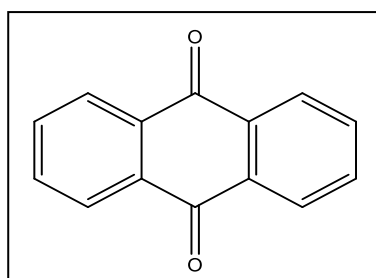
Les coumarines constituent un groupe de lactones largement répandues, issues de la formation d'un cycle fermé à partir de l'acide hydroxycinnamique. La coumarine donne au foin fraîchement coupé son odeur douceâtre caractéristique. La coumarine est également un composant de l'huile de bergamote, qui est utilisé pour parfumer le tabac de pipe, le thé et d'autres produits. Alors que la coumarine n'est pas toxique en soi, elle peut être convertie par les champignons, en une toxine le dicoumarol qui est typiquement présent dans le foin moisi [11].



**Figure 3 :** Squelette de base des coumarines

### ➤ Anthraquinones

Les anthraquinones sont des composés de la famille des quinones, ils sont constitués de deux cycles aromatiques reliés par deux groupes carbonyle pour former une structure aromatique plane. Ces métabolites existent sous forme glycosides et d'aglycones, ils sont présents dans les parties aériennes et les racines des plantes. Des études ont clairement montré que les anthraquinones possèdent une activité antidiabétique [15].



**Figure 4 :** Squelette de base des anthraquinones

### 1.3.3. Terpènes

Les composés terpénoïdes constituent un groupe de molécules très différentes tant d'un point de vue structurel que fonctionnel. Avec près de 15000 molécules connues, ils constituent probablement la classe la plus vaste et la plus diversifiée de composés végétaux.

Les terpènes sont des substances généralement lipophiles qui dérivent d'une entité simple à cinq atomes de carbone. Leur grande diversité trouve son origine dans le nombre d'unités de base qui composent la chaîne ainsi que dans les divers modes d'assemblages. La formation des structures cycliques, l'addition des fonctions comprenant de l'oxygène et la conjugaison avec des sucres ou d'autres molécules peuvent rendre leurs structures complexes.

Les terpènes sont les principaux constituants des inclusions huileuses rencontrées dans les tissus sécréteurs des plantes. Souvent volatiles, ils se vaporisent donnant les essences auxquelles beaucoup de plantes doivent leur parfum. On leur donne souvent le nom d'huiles essentielles [16].

### 1.3.4. Stéroïdes et stérols

Les stéroïdes sont des triterpènes tétracycliques. Ils sont synthétisés à partir d'un triterpène acyclique, la squalène. Bien qu'ils soient généralement modifiés et qu'ils possèdent moins de 30 atomes de carbone. Les stéroïdes qui possèdent un groupement alcool, ce qui est le cas chez pratiquement toutes plantes, sont appelés stérols. Les stérols les plus abondants chez les plantes sont le stigmastérol et le sitostérol (figure 5) [11].

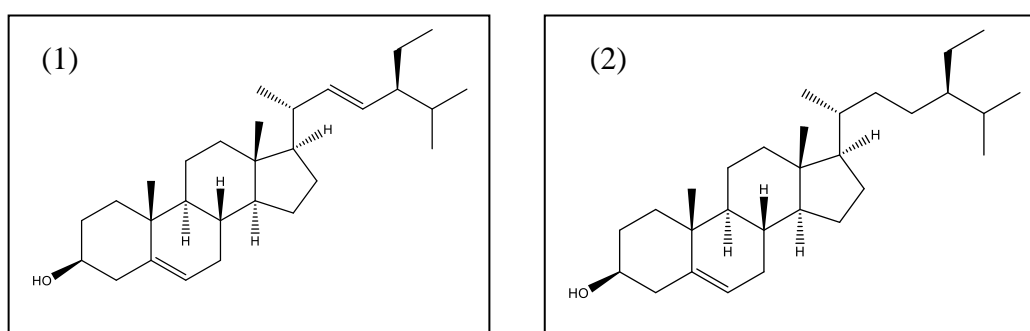


Figure 5 : Structure de stigmastérol (1) et le sitostérol (2)

### 1.3.5. Saponines

Les saponosides (parfois encore appelés saponines) sont des terpènes glycosylés. Ils peuvent être des stéroïdes glycosylés, des stéroïdes alcaloïdes glycosylés ou des hétérosides triterpéniques. Ils peuvent aussi se trouver sous forme d'aglycone (génines) appelés sapogénines. La combinaison d'un triterpène hydrophobe et d'un glucide hydrophile confère aux saponosides des propriétés tensioactives ou détergentes qui, lorsqu'ils sont agités avec de

l'eau, produisent une mousse savonneuse. Le terme de saponoside est dérivé de la saponaire qui était jadis utilisée comme substitut du savon [11].

### 1.4. Méthodes d'extraction

L'extraction des composés bioactifs peut être décrite comme étant un phénomène de transfert de masse où les solides solubles, contenus dans les structures végétales, migrent dans le solvant jusqu'à l'équilibre. Il existe plusieurs méthodes d'extraction:

➤ **Méthode d'extraction par décoction:** la décoction est une méthode d'extraction des composés solubles par introduction du matériel végétal dans l'eau en ébullition constante à 100 °C.

➤ **Méthode d'extraction par infusion:** l'infusion est la mise en suspension du matériel végétal séché dans de l'eau chaude (proche de l'ébullition) afin d'extraire les constituants utiles, suivi d'un refroidissement

➤ **Méthode d'extraction par macération:** la macération est la mise en contact prolongée à froid du matériel végétal séché dans l'eau à la température ambiante du laboratoire ( $25 \pm 4$  °C) pour une durée de 48 h, en vue d'extraire les composés solubles [17].

La méthode d'extraction par décoction ou par infusion peut causer la dégradation des composés à cause des températures élevées et de la durée d'extraction.

De nouvelles techniques combinant l'extraction conventionnelle avec d'autres facteurs accélérant l'extraction (extraction par microondes, extraction par ultrasons, extraction sous haute pression hydrostatique, extraction par fluide supercritique ou par eau sous critique) sont utilisées pour pallier cette dégradation [18,19].

#### ➤ **Extraction assistée par ultrasons (EAU)**

L'extraction assistée par ultrasons est une technologie émergente utilisée pour l'extraction des composés naturels. Ces composés sont souvent extraits par la méthode conventionnelle qui dure de nombreuses heures. L'utilisation des ultrasons permet d'effectuer des extractions en quelques minutes avec une reproductibilité élevée, ce qui simplifie l'opération et donne une plus grande pureté au produit final. Les ultrasons interagissent avec le matériel végétal et modifient ses propriétés physiques et chimiques. Un effet de cavitation est créé, ce qui facilite la libération des composés extractibles et améliore le transfert de matière en perturbant les parois cellulaires des plantes [20].

Le choix approprié du solvant et de la température permet une meilleure extractibilité. De plus, l'optimisation des paramètres d'extraction assistée par ultrasons tels que la fréquence, puissance des ultrasons, le temps d'extraction ainsi que la distribution d'ondes ultrasonores permet aussi d'augmenter le rendement d'extraction [21].

### 1.5. Méthode de séparation chromatographique

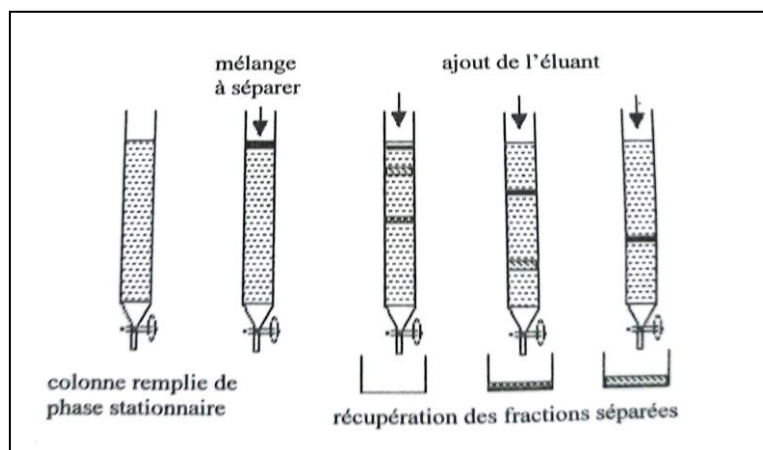
La séparation des composés naturels est fondée essentiellement sur les différentes techniques chromatographiques telles que : la chromatographie liquide sur colonne (CC), la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie sur papier (CP), etc...

#### 1.5.1. Chromatographie liquide sur colonne

Les méthodes chromatographiques sont habituellement employées pour l'analyse et la séparation de très faibles quantités de produits, alors que la chromatographie liquide sur colonne (CC) peut être une méthode préparatoire ; elle permet en effet la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre plusieurs grammes.

Elle présente cependant plusieurs inconvénients:

- De grandes quantités de solvant sont nécessaires à l'élution
- La durée de l'élution est généralement très grande
- La détection des composés exige une attention constante.



**Figure 6** : Schéma simplifié d'une chromatographie liquide [22]

#### 1.5.2. Chromatographie planaire sur Couche Mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est apparue vers 1938, c'est une chromatographie de partage, elle est indiquée pour la micro-analyse d'extraits de faibles volumes. Un faible volume d'extrait est déposé sur une plaque chromatographique dont la

partie inférieure est immergée dans un solvant. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Le choix des couches fixes dépend des composés à séparer. Ainsi les couches peuvent correspondre à la Silice, la Cellulose, l'Alumine, le Polyamide etc... Les plaques sont généralement vendues avec leurs couches spécifiées. [22].

### ➤ Principe

Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Lorsque les conditions opératoires sont connues, elle permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique. Si l'analyse, réalisée avec divers solvants et différents adsorbants, révèle la présence d'une seule substance, on peut alors considérer que cet échantillon est probablement pur. On peut aussi l'employer pour suivre la progression d'une réaction. La chromatographie sur couche mince est également la technique habituellement employée pour rechercher le meilleur solvant, avant d'entamer une séparation sur colonne classique [22].

### 1.5.3. Chromatographie planaire sur Papier (CP)

La CP est une chromatographie de partage qui permet de séparer et d'identifier les espèces chimiques d'un mélange. Elle est basée sur leur différence d'affinité pour deux phases : la phase stationnaire, ou phase fixe, et la phase mobile appelée éluant et constituée d'un mélange de solvants [22].

La technique ressemble à celle de la CCM mais le principe repose sur des phénomènes de partage. Ses plus grands inconvénients par rapport à la CCM sont:

- Une durée de développement beaucoup plus longue.
- Une séparation généralement moins bonne [22].

## 2. La famille des *Rubiaceae*

### 2.1. Généralités sur les *Rubiaceae*

La famille des *Rubiaceae* a été décrite pour la première fois en 1789 par le botaniste français Antoine-Laurent de Jussieu. Son nom vient de *Rubia* qui veut dire « rouge » en latin et fait référence aux propriétés tinctoriales des garances dont la racine est riche en matières colorantes [23].



Les *Rubiaceae* constituent l'une des plus vastes familles d'Angiospermes [24] avec environ 611 genres et 13143 espèces réparties dans le monde entier [25].

Les *Rubiaceae* ont une importance économique énorme, surtout en ce qui concerne le café. Ce sont des plantes facilement reconnaissables en raison de leurs feuilles opposées simples et entières, leurs stipules interpétiolaires et leur corolle tubulaire. Les fleurs sont bisexuées et produisent un fruit qui peut être une baie ou une capsule [23].

### **2.2. Répartition géographique des *Rubiaceae***

Les *Rubiaceae* ont une distribution cosmopolite mais la diversité des espèces et la biomasse sont nettement concentrées dans les régions tropicales et les zones subtropicales et en particulier dans les forêts humides [26].

La famille est moins présente mais assez répandue dans les régions tempérées. On la trouve également dans les régions Subpolaires de l'Arctique et l'Antarctique, mais absente dans les stations typiquement aquatiques et les stations de haute montagne. Dans les régions tropicales, les *Rubiaceae* sont sensibles aux perturbateurs et sont rarement retrouvées dans les forêts secondaires [26].

### **2.3. Caractéristiques botaniques des *Rubiaceae***

Les *Rubiaceae* sont des plantes herbacées, arbustes, arbres ou lianes, dont les feuilles sont opposées-décussées, simples, stipulées avec des stipules parfois aussi développées que les feuilles pouvant former des pseudo verticilles. L'inflorescence est variée : cymes, racèmes, panicules et plus rarement des fleurs solitaires [27-29].

## **3. Présentation de la plante étudiée : *Mitracarpus scaber***

### **3.1. Description botanique de l'espèce *Mitracarpus scaber***

Cette plante est une herbe annuelle de 10 à 50 cm de hauteur. Les tiges sont ramifiées, évasées, rondes et pubérulentes. Cependant les feuilles sont lancéolées, elles mesurent 3 à 6 cm de long sur 1 cm de large. Elles sont subacutes, glabres dessous et scabres ou lisses dessus. Les fleurs sont blanches, situées à l'aisselle des feuilles et entourées de stipules [30].

### **3.2. Répartition géographique de l'espèce *Mitracarpus scaber***

C'est une espèce courante dans les cultures, sur les terrains vagues, le long des routes et pistes de l'Afrique intertropicale [31].

### 3.3. Systématique de la plante [32]

**Règne:** Végétal

**Sous règne:** Eucaryote

**Embranchement:** Spermaphytes

**Sous embranchement:** Angiospermes

**Classe:** Dicotylédones

**Sous-classe:** Gamopétales

**Série:** Epigynes

**Sous-série:** Isostémones

**Ordre:** Rubiales

**Famille:** *Rubiaceae*

**Genre:** *Mitracarpus*

**Espèce:** *scaber*

### 3.4. Synonymes [33,34]

Ces différents synonymes sont:

*Mitracarpus scaber* (Zuccar)

*Mitracarpus villosus* (Sw) DC

*Mitracarpus hirtus* (L.) DC

*Mitracarpus verticillatus* (Schmach and Tonn)

*Staurospermum verticillatum* (Schum-Thonn)

*Mitracarpus senegalensis* DC

*Spermacoce hirta* L.

*Spermacoce villosa* Swartz.

### 3.5. Noms vernaculaires [31,35]

Anglais: Button grass

Bambara: Kuguruba

Wolof : Ndotukan, ndatukan, gurguli

Sérère: Kotumbefono, nokoto, kumtura, tubadin turo, ndatukana

Peuhl: Gududel

### 3.6. Utilisation en médecine traditionnelle

*Mitracarpus scaber* est traditionnellement utilisée en Afrique tropicale à diverses fins. Au Sénégal, cette plante est employée dans le traitement des maux de gorge et de la lèpre, alors qu'au Nigeria, le jus de la plante broyée est appliqué par voie topique pour le traitement des maladies de la peau ou appliqué sur des pansements pour les plaies et les ulcères, une décoction aqueuse se prend également pour le traitement de la diarrhée [6, 36].

Elle est largement utilisée dans le traitement de la dermatite infectieuse, l'eczéma, la teigne, les démangeaisons et la gale causée par des bactéries et des champignons tels que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Candida neoformans* [6].

L'extrait des feuilles de *M. scaber* (Zucc). a été utilisé pour traiter l'hépatite, la jaunisse, l'inflammation, les infections bactériennes et fongiques, les maux de dents, les maux de tête, la dyspepsie, l'aménorrhée, les maladies vénériennes, les maladies du foie, les maladies respiratoires, aménorrhée, infections cutanées et comme antidote aux poisons. Les jeunes feuilles sont pressées et appliquées sur la partie affectée du corps 3 fois par jour [37].

### 3.7. Activités biologiques reconnues et composition chimique

L'investigation biologique de la plante *Mitracarpus scaber* a montré que les extraits de cette espèce possèdent une activité antimicrobienne, antioxydante, antidiarrhéique et antidiabétique [37].

La technique du criblage phytochimique a permis de caractériser des flavonoïdes, des anthocyanes, des coumarines, des stérols, des triterpènes et des tanins catéchiques et galliques [38,39].

Harounoside est une diglycoside de l'hydroquinone de la pentalogine qui a été isolé, élucidé et nommé par Harouna et *al.*, en 1994. Aucune activité n'a été testé pour cette molécule [40].

Azaanthraquinone est un alcaloïde isolé à partir des parties aériennes de *Mitracarpus scaber* possède une activité antimicrobienne sur les germes liés au SIDA [41].

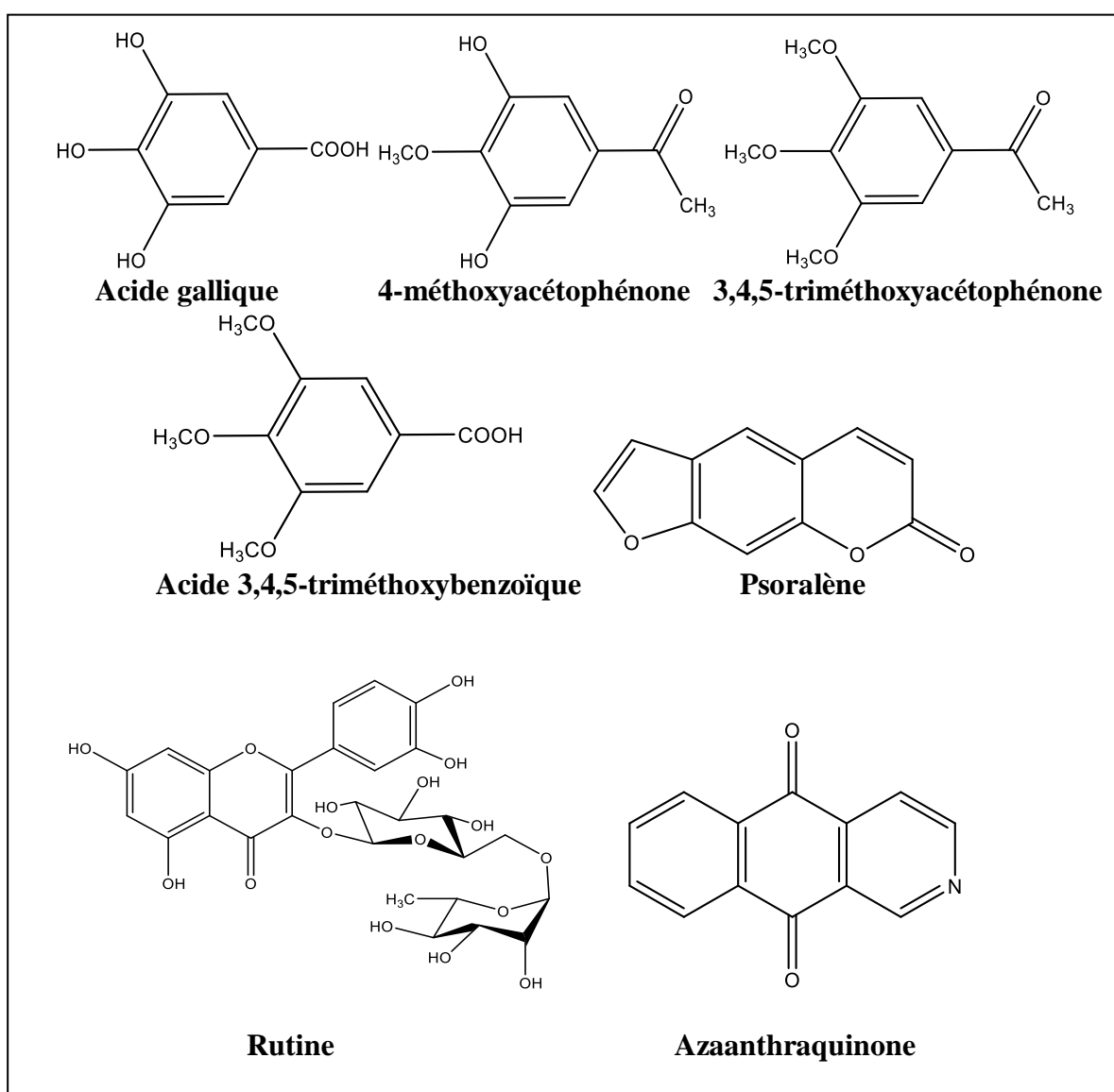
La composition de l'huile essentielle des parties aériennes de cette plante a été étudiée par chromatographie en phase gazeuse et la chromatographie en phase gazeuse combinée à la spectrométrie de la masse. Les résultats ont révélé la présence de 26 composés dont 11 acides gras comme constituants majeurs [42].

D'autres études ont permis d'isoler à partir de l'extrait méthanolique de *Mitracarpus scaber* 7 substances polyphénoliques : acide gallique, acide 3,4,5-triméthoxybenzoïque, 3,4,5-triméthoxyacétophénone, 4-méthoxyacétophénone, kampférol-3-O-rutinoside, rutine et le

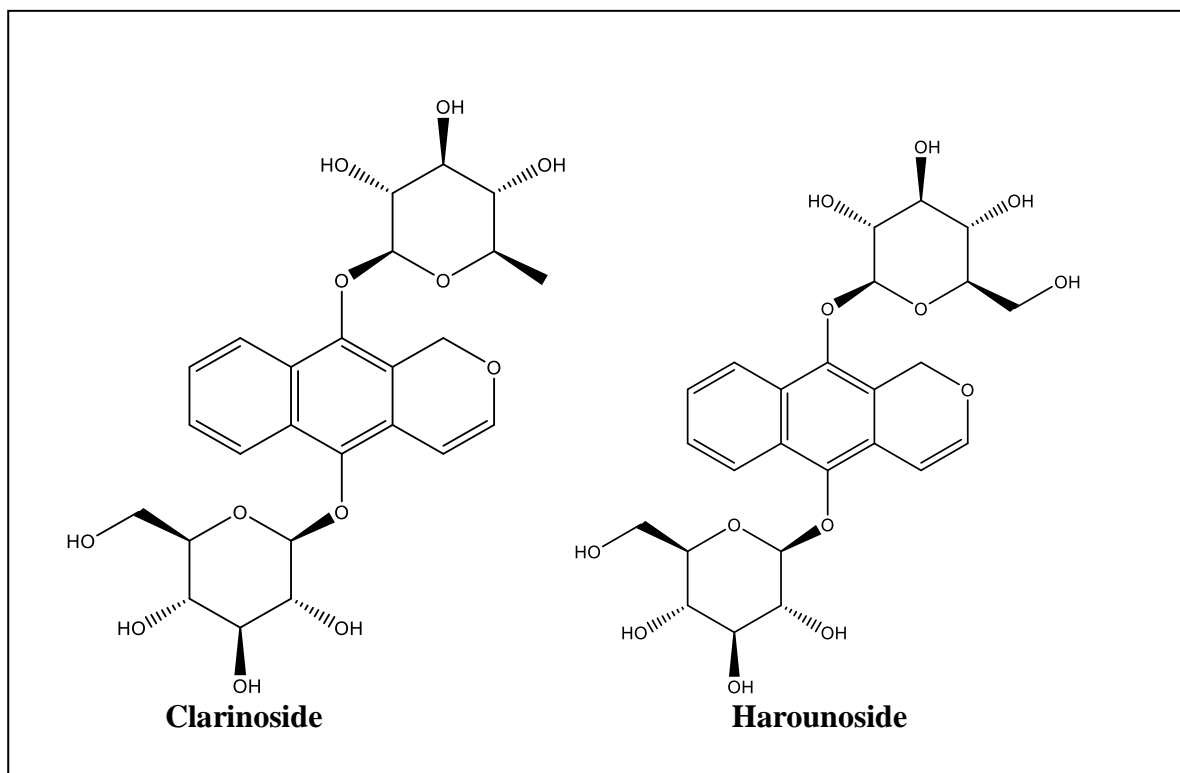
psoralène. Les deux premiers composés inhibent la croissance de *Staphylococcus aureus* tandis que les deux suivants inhibent la croissance de *Candida albicans* et les trois derniers ont montré un faible effet antibactérien et antimycosique [43].

Une étude approfondie de la composition chimique de la plante *Mitracarpus scaber* a permis d'identifier la clarinoside ; un nouveau dérivé de la pentalogine contenant un fragment quinovose rare avec le composé connu harounoside. Ces deux composés ont été testés pour leur activité anti-inflammatoire et le composé clarinoside a montré un résultat positif [44].

Les figures I.7 et I.8 illustrent les structures chimiques de quelques composés isolés à partir de *Mitracarpus scaber*.



**Figure 7** : Structures chimiques de quelques composés isolés de l'espèce *Mitracarpus scaber*



**Figure 8 :** Structures chimiques de quelques composés isolés de l'espèce *Mitracarpus scaber*

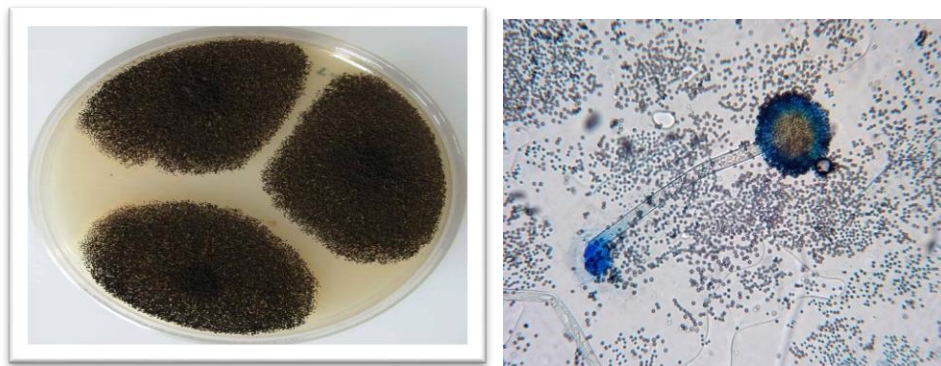
### 1. Caractéristiques de souches fongiques testées

Les champignons, également appelés mycètes ou *fungi*, sont des organismes eucaryotes qui n'ont pas de structure tissulaire et dont la masse cytoplasmique est enfermée dans une paroi rigide qui forme le thalle ou le mycélium. Le thalle se présente généralement sous forme de filaments ramifiés, appelés hyphes, qui forment un système tubulaire. Dans certains cas, le thalle peut être simplifié en une structure unicellulaire sphérique ou subsphérique sans formation de mycélium, appelée champignons levuriformes ou levures. Les champignons préfèrent généralement les environnements humides et aérobies, avec une température optimale de croissance entre 20 et 28°C [45].

Les souches fongiques qui feront l'objet de cette partie sont : *Aspergillus niger* et *Candida albicans*.

#### 1.1. *Aspergillus niger*

*Aspergillus niger* est un champignon ascomycète filamenteux qui est omniprésent dans l'environnement et a été impliqué dans des infections opportunistes de l'homme [46]. C'est une espèce commune dans le genre *Aspergillus*, elle peut apparaître sur les fruits et légumes sous forme d'une moisissure de couleur noire (figure 9, tableau .1).



**Figure 9 : *Aspergillus niger* [47,48]**

La position systématique d'*Aspergillus niger* est résumée comme suivant [49,50]:

**Tableau 1 : Position systématique d'*Aspergillus niger***

<b>Règne</b>	<i>Fungi</i>
<b>Embranchement</b>	<i>Amastigomycota</i>
<b>Sous- embranchement</b>	<i>Deutromycotina</i>
<b>Classe</b>	<i>Deutéromycètes</i>
<b>Ordre</b>	<i>Moniliales</i>
<b>Famille</b>	<i>Moniliaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Aspergillus</i>

## Chapitre II. Aperçu sur les souches testées

Espèce	<i>Aspergillus niger</i>
--------	--------------------------

Les *Aspergillus* sont caractérisés par la présence de conidiophores dressés, terminés par une vésicule supportant, soit une seule rangée de phialides (structure unisériée), soit une rangée de phialides et une rangée de cellules sous-jacentes appelées Métules (structure bisériée). L'ensemble stipe et vésicule constitue le conidiophore et l'ensemble vésicule, phialides et conidies forme la tête aspergillaire [51,52]. Les phialides produisent des spores ou conidies qui caractérisent le mode de reproduction asexuée du champignon. Ces phialospores sont regroupées en panache, dont la couleur et la forme varient en fonction de l'espèce [51].

Comparé à d'autres champignons filamenteux, il ne se pose pas de problème particulier d'allergie ou de mycopathologie. Quelques cas médicaux, par exemple des infections pulmonaires, ont été signalés, mais toujours chez des patients gravement immunodéprimés. Dans les régions tropicales, des infections de l'oreille (otomycose) surviennent en raison de l'invasion par *A. niger* du conduit auditif externe, mais cela peut être causé par des dommages mécaniques de la barrière cutanée [53].

La culture et l'histopathologie des échantillons de tissus sont généralement nécessaires pour confirmer le diagnostic; l'histopathologie peut différencier l'infection invasive de la colonisation. Les échantillons sont généralement prélevés dans les poumons par bronchoscopie ou biopsie à l'aiguille percutanée et dans les sinus par rhinoscopie antérieure [54].

La recherche d'Ag tels que le galactomannane peut être spécifique mais, dans le sérum, elle est souvent trop peu sensible pour identifier la plupart des cas dès les premiers stades [54].

Les infections invasives nécessitent généralement un traitement rapide et efficace par le voriconazole ou l'isavuconazole, qui sont aussi efficaces que le voriconazole et ont moins d'effets indésirables. L'amphotéricine B (en particulier la formulation lipidique) est tout aussi efficace mais plus toxique. Dans certains cas, l'itraconazole ou le posaconazole par voie orale (mais pas le fluconazole) peuvent être efficaces. La caspofungine ou d'autres échinocandines peuvent être utilisées comme traitement d'appoint. L'association du voriconazole et des échinocandines peut être efficace chez certains patients [54].

### ➤ Traitement de l'aspergillose

- Voriconazole

## Chapitre II. Aperçu sur les souches testées

- Isavuconazole
- Amphotéricine B (y compris les formulations lipidiques)
- Échinocandines comme thérapie de sauvetage
- Une prophylaxie au posaconazole ou à l'itraconazole peut être envisagée chez les patients à haut risque (maladie aiguë du greffon contre l'hôte (GVHD) ou neutropénie due à une leucémie myéloïde).
- Parfois, intervention chirurgicale en cas d'aspergillome [54].

### 1.2. *Candida albicans*

*Candida albicans* est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie qui est trouvée dans le corps humain, y compris la bouche, le tube digestif et la région génitale [55]. Il est généralement inoffensif et fait partie de la communauté microbienne naturelle. Cependant, dans certaines circonstances, telles qu'un système immunitaire affaibli ou une perturbation de l'équilibre normal des micro-organismes (figure 10, tableau 2), *Candida albicans* peut proliférer et provoquer des infections, appelées candidoses.



**Figure 10 :** *Candida albicans* [56,57]

La position systématique de *Candida albicans* est résumée comme suivant [58]:

**Tableau 2 :** Position de *Candida albicans*

<b>Règne</b>	<i>Fungi</i>
<b>Embranchement</b>	<i>Deutéromycotina</i>
<b>Classe</b>	<i>Blastomycètes</i>
<b>Ordre</b>	<i>Cryptococcales</i>
<b>Famille</b>	<i>Cryptococcaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Candida</i>
<b>Espèce</b>	<i>Candida albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> ...



## Chapitre II. Aperçu sur les souches testées

*Candida albicans* : est une levure non pigmentée, non encapsulée, à bourgeonnement multiple et formant un pseudo-mycélium et du mycélium vrai. C'est un saprophyte endogène de la lumière intestinale humaine et des cavités génitales par contiguïté (chez la femme). Cette levure diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes [55], se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastospore) [59], formant ainsi des colonies blanches crémeuses.

Les levures du genre *Candida* sont parmi les agents pathogènes les plus courants. Elles sont responsables de diverses affections qui peuvent toucher la peau, les ongles, les cavités naturelles et différents organes en se propageant dans le sang [45]. Au cours des dix dernières années, il y a eu une augmentation significative de la recherche sur l'utilisation de produits naturels pour lutter contre les espèces de *Candida*, comme indiqué dans la littérature scientifique [60].

La symptomatologie est généralement utilisée pour diagnostiquer la plupart des infections à *Candida*. Cependant, pour confirmer le diagnostic, les médecins doivent examiner un échantillon prélevé afin d'identifier les champignons à l'aide d'un microscope. Des échantillons de sang ou d'autres tissus infectés peuvent être envoyés au laboratoire pour une mise en culture et une identification des champignons [61].

Pour une détection rapide et précise de *Candida* dans le sang, les médecins peuvent utiliser une analyse sanguine appelée T2Candida® Panel. D'autres tests peuvent également être réalisés pour détecter le matériel génétique des micro-organismes, tels que la PCR (amplification en chaîne par la polymérase). La technique de PCR permet de produire de multiples copies d'un gène provenant d'un micro-organisme, facilitant ainsi son identification [61].

Si la candidose est limitée à la peau, à la bouche ou au vagin, elle peut être traitée par des antifongiques appliqués directement sur la zone touchée (comme le clotrimazole et la nystatine). Le médecin peut aussi prescrire un antifongique, le fluconazole par voie orale [61].

### 2. Caractéristiques des souches bactériennes testées

Les bactéries sont des organismes généralement simples dans leur structure. Elles sont unicellulaires avec une taille de l'ordre du micron (1 – 10 µm). Leur cellule est procaryote caractérisée par l'absence d'une membrane nucléaire autour du matériel génétique (absence de vrai noyau) et est également dépourvu de tout organe cellulaire. Selon la composition de la paroi cellulaire, les bactéries sont classées en deux groupes : les bactéries Gram positif qui se caractérisent par la présence d'une large couche de peptidoglycane et les bactéries Gram négatif dont la paroi contient une fine couche de peptidoglycane au-dessus duquel se trouve une

## Chapitre II. Aperçu sur les souches testées

membrane externe. Cependant il existe d'autres bactéries dépourvues de paroi qui vivent sous forme de parasite obligatoire au sein d'une cellule hôte (les *Mycoplasma*). La forme de la cellule bactérienne peut être bacille, Cocci, ou spirales adaptant parfois des arrangements spéciaux). Elles peuvent aussi être classés selon leur exigence en oxygène (qui les subdivise en aérobie et anaérobie), selon la source d'énergie (phototrophe ou hétérotrophe), etc. Les bactéries sont omniprésentes dans tout notre environnement, elles sont présentes dans le sol, l'eau, l'air et sont les principaux colonisateurs de notre peau, notre bouche et de nos intestins. Certaines d'entre elles ont la capacité de supportés des conditions extrêmes de température, de pH ou de salinité. En dépit du fait que certaines bactéries provoquent des maladies, majeur d'entre elles sont bénéfique pour le bon fonctionnement de l'organisme humain et pour l'environnement [62,63].

Les souches bactériennes qui feront l'objet de cette partie sont : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

### 2.1. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* est une entérobactérie Gram négative, mobile, membre dominante de la flore intestinale normale de l'homme et des animaux à sang chaud. Cette dernière synthétise dans le côlon des vitamines K et B qui aide à protéger le tractus gastro-intestinal contre la colonisation des germes pathogènes. Cependant bien que la majorité des souches d'*E. coli* sont non pathogène, certaines sérotype sont capable de provoquer des maladies chez l'homme tel que la diarrhée, les infections urinaires etc... [64].



**Figure 11 : *Escherichia coli* [64, 65]**

La position systématique d'*Escherichia coli* est résumée comme suivant [64]:

**Tableau 3 : Position d'*Escherichia coli***

<b>Règne</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Embranchement</b>	<i>Proteobacteria</i>
<b>Classe</b>	<i>Gamma proteobacteria</i>
<b>Ordre</b>	<i>Enterobacterales</i>

## Chapitre II. Aperçu sur les souches testées

<b>Famille</b>	<i>Enterobacteriaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Escherichia</i>
<b>Espèce</b>	<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )

*E. coli* est l'hôte normal du microbiote intestinal de l'homme et de certains animaux. C'est un coliforme dont la présence dans l'eau et les aliments indique une contamination d'origine fécale [64].

*Escherichia coli* est une bactérie en forme bacille, Gram négatif, immobile ou mobile avec une ciliature péritriche, disposé en monobacille ou en diplobacille et non sporulé. Elle est mésophile avec une température optimale de croissance de 37°C et anaérobie facultatif capable de métabolisme respiratoire et fermentaire. Sur milieu gélose nutritif elle présente des colonies blanches opaque, lisse avec une forme circulaire de taille 1 – 3mm [66].

*Escherichia coli* est une bactérie catalase positive, oxydase négative, uréase négative, indole positive, H<sub>2</sub>S positif et peut fermenter le lactose et le mannitol [67].

La structure antigénique d'*E. coli* est basé sur les antigènes O, K, H dont O représente les antigènes somatique, K les antigènes capsulaires, et H les antigènes flagellaires. Des numéros spécifiques sont attribués aux antigènes afin de définir un sérotype précis (exemple : sérotype *E. coli* O18 : K1 : H7 principalement responsable de la méningite chez les nouveau-nés [64].

Lorsque les conditions de croissance deviennent favorables, certaines souches d'*E. coli* sont capables de provoquer des infections intestinales ou extra-intestinales en fonction du nombre de gène de virulence qu'elles possèdent [64].

**Tableau 4 :** Quelques maladies cliniques causées par *E. coli* [64,68]

## Chapitre II. Aperçu sur les souches testées

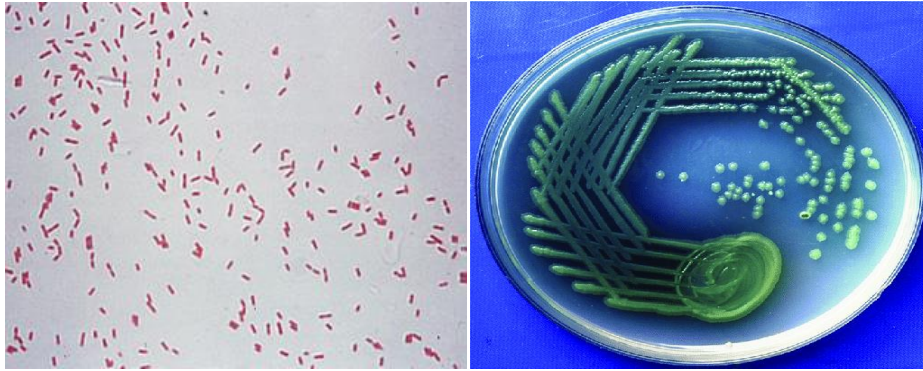
Maladies cliniques	Caractérisation clinique de la maladie
<b>Infection intestinale</b>	Les gastro-entérites causées par <i>E. coli</i> se manifestent généralement par des diarrhées banales ou parfois sanglantes. Les <i>E. coli</i> impliqués dans les gastro-entérites sont classifiés en cinq pathovars : <i>E. coli</i> entéropathogène (EPEC), <i>E. coli</i> entérotoxigène (ETEC), <i>E. coli</i> entéro-invasif (EIEC), <i>E. coli</i> entéro-hémorragique (EHEC) et <i>E. coli</i> entéroaggrégative (EAEC)
<b>Infection urinaire</b>	Environ 70-80% des cas d'infection urinaire sont due à <i>E. coli</i> uropathogène (UPEC). La virulence d'UPEC est due aux fimbriae qu'elle produit qui lui permette de se fixer et de coloniser le tractus urogénital. Si cette dernière n'est pas bien traitée, les souches flagellées d'UPEC peuvent atteindre les reins à travers l'uretère et provoqué une infection rénale aigue (pyélonéphrite)
<b>Septicémie</b>	Les septicémies à <i>E. coli</i> sont dues au pathovar SEPEC qui est responsable d'environ 15% des septicémies nosocomiales. Parfois la septicémie peut survenir de la dissémination de l'infection rénale (pyélonéphrite aigue) vers la circulation sanguine

Pour les infections extra-intestinales, le diagnostic consiste à isoler et identifier la bactérie au site d'infection. Le diagnostic des infections des voies urinaires se fait en déterminant la concentration de bactéries dans l'urine. En d'infection, le nombre de bactéries atteint généralement des valeurs élevées ( $>10^5$ /ml). Certains marqueurs génétiques sont maintenant utilisés pour aider à identifier *E. coli* dans les infections entériques [68, 69].

Une antibiothérapie assistée par des tests de sensibilités est généralement prescrite dans les infections à *E. coli*. En cas de diarrhées aiguës, le traitement curatif est basé sur la réhydratation [68, 69].

### 2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* est une bactérie de forme bâtonnet, ubiquiste fréquemment rencontré dans les environnements humides (eau, sol). C'est agent pathogène opportuniste responsables de nombreux infections nosocomiales chez les personnes immunodéprimées [70].



**Figure 12 :** *Pseudomonas aeruginosa* [71, 72]

La position systématique de *Pseudomonas aeruginosa* est résumée comme suivant [73]:

**Tableau 5 :** Position de *Pseudomonas aeruginosa*

<b>Règne</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Embranchement</b>	<i>Proteobacteria</i>
<b>Classe</b>	<i>Gammaproteobacteria</i>
<b>Ordre</b>	<i>Pseudomonadales</i>
<b>Famille</b>	<u><i>Pseudomonadaceae</i></u>
<b>Genre</b>	<i>Pseudomonas</i>
<b>Espèce</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

*P. aeruginosa* est une bactérie saprophyte qui habite les milieux humide (eau, sol, plante etc.). Elle est aussi présente en commensale dans le tube digestif de l'homme et de certains animaux où elle peut exercer un pouvoir pathogènes chez les organismes déficients. Elle figure également parmi les souches fréquemment isolée dans les milieux hospitaliers [73].

Les *P. aeruginosa* sont des bactéries de forme bacille, Gram négatif de 2 – 4 µm de long arrangées de manière isolé ou en diplobacille. Elles sont monotriche et ne forme pas de spore. Certaines souches de *P. aeruginosa* isolé chez les malade atteint par la mucoviscidose sont capable de produire une couche mucoïdale visqueuse. Leurs cultures se fait en aérobie à une température comprise entre 20 – 42°C et à pH situé entre 6,5 à 8. Sur gélose nutritif les colonies apparaissent d'un éclat métallique avec une odeur florale de seringa et élaborent deux types de pigments : pyocyanine (caractéristique de l'espèce de fluorescence bleu-vert) et la pyoverdine (de fluorescence jaune-verdâtre) [68-70].

*P. aeruginosa* ont un métabolisme respiratoire oxydative en aérobie. Elles ne sont pas capables d'effectuer la fermentation en anaérobie mais peuvent utiliser le nitrate comme accepteur final d'électron. Elles sont oxydase positive (qui les distingue des entérobactéries), catalase positive, nitrate et nitrite réductase positifs [69].

## Chapitre II. Aperçu sur les souches testées

*P. aeruginosa* produit plusieurs types de facteurs de virulence impliquée dans son pouvoir pathogène. Ceux-ci impliquent : les lipopolysaccharide (LPS), les pili, flagelle (interviennent dans à l'attachement aux cellules hôte), des enzymes extracellulaires (tel que les protéases, les elastases et les phospholipases), exotoxine A (chez les eucaryotes, elle inhibe la synthèse protéique), Exoenzyme S, Exoenzyme T, Exoenzyme U et Exoenzyme Y [69, 74].

*P. aeruginosa* est responsable d'une variété d'infection clinique tel la pneumonie, les bactériémies, les infections urinaires, etc.

**Tableau 6 :** Quelques infections cliniques causées par *P. aeruginosa* [74]

<b>Infections cliniques</b>	<b>Caractérisation clinique de l'infection</b>
<b>Pneumonie</b>	Les pneumonies à <i>P. aeruginosa</i> est très fréquente chez les malades atteint de mucoviscidose, neutropénie et les patients immuno-défaillant. L'infection des poumons survient généralement par la colonisation des voies respiratoire ou aussi parfois via la circulation sanguine. La pneumonie à <i>P. aeruginosa</i> se manifeste par la fièvre, des difficultés à respirer, la toux, des douleurs à la poitrine etc.
<b>Infection urinaire</b>	Environ 10% des infections urinaires nosocomiale sont dû à <i>P. aeruginosa</i> . L'infection peut survenir lors d'une intervention médicale sur le système urinaire ou après un cathétérisme. Lors d'un cathétérisme les dommages causés aux muqueuses sont les voies par lesquels le germe atteint et colonise les voies urinaires
<b>Bactériémie</b>	La bactériémie à <i>P. aeruginosa</i> est généralement issue des infections des voies urinaires, des voies respiratoires ou de la peau (à travers les plaies). Il se produit fréquemment chez les personnes atteintes de brûlures intenses, de neutropénie et de diabète.

Le diagnostic de *P. aeruginosa* est principalement basé sur l'isolement de la souche suivi de l'identification des caractéristiques spécifiques de l'espèce telles que la production du pigment pyocyanine, la réaction de l'oxydase (*P. aeruginosa* est oxydase positive) et la possibilité de croître à 42°C [69].

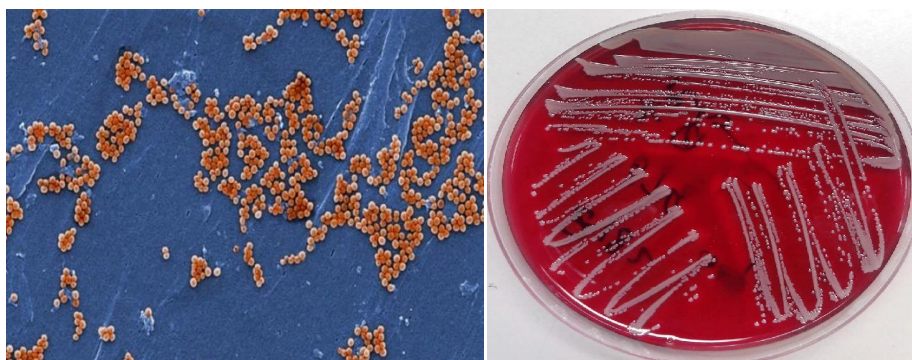
En raison de la résistance fréquente de *P. aeruginosa* à divers antibiotiques, des tests de sensibilité aux antimicrobiens sont recommandé avant chaque traitement sous antibiotique. Les antibiotiques couramment utilisés contre les infections à *P. aeruginosa* sont les aminosides (la gentamicine, la tobramycine, amikacine), Les bêta-lactamines (la pipéracilline-tazobactam, la ceftazidime, la céfépime etc.), les fluoroquinolones (ciprofloxacine, lévofloxacine) etc. Dans

## Chapitre II. Aperçu sur les souches testées

un cas sévère de l'infection, une association aminoside et bêta-lactamines est préconisée [68,69].

### 2.3. *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* sont des bactéries ubiquistes, de forme Cocci à Gram positif adaptant un arrangent en grappe de raisin. Son nom dérive de cet aspect (grappe de raisin) vue sous microscope, du latin *staphyle* (grappe de raisin) et *kokkos* (baie). Et *aureus* fait référence à la couleur dorée de la colonie. Ce sont des agents pathogènes opportunistes qui cause divers état infection chez l'homme [75].



**Figure 13 :** *Staphylococcus aureus* [76, 77]

La position systématique de *Staphylococcus aureus* est résumée comme suivant [73]:

**Tableau 7 :** Position de *Staphylococcus aureus*

<b>Règne</b>	<i>Bacteria ou Eubacteria.</i>
<b>Embranchement</b>	<i>Firmicutes.</i>
<b>Classe</b>	<i>Bacilli.</i>
<b>Ordre</b>	<i>Bacillales.</i>
<b>Famille</b>	<i>Staphylococcaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Staphylococcus.</i>
<b>Espèce</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>

Les *S. aureus* sont des bactéries qui vivent en commensale chez l'homme et les animaux (sur la peau et sur les muqueuses). Ce sont aussi des bactéries saprophytes qui peuvent vivre dans l'environnement (sols, eaux, air etc.) [73].

*S. aureus* sont des 0 de 0.8 – 1  $\mu\text{m}$  de diamètre à Gram positif. Ils sont immobiles, capsulés et ne forme pas de spore. Ils sont anaérobies facultatif, cultivés à une température optimale de 37°C (avec un range de +10°C à 45°C), un pH optimal de 7.5 et sont halotolérant (7.5% de NaCl). En milieu liquide les souches sont sous forme isolés ou en diplocoque. Ce pendant sur milieu gélosé (gélose ordinaire) ils se présentent en forme de grappe de raisin avec des colonies

## Chapitre II. Aperçu sur les souches testées

de 1 mm de diamètre, ronde, lisse, bombées et pigmenté en jaune-doré ou jaune-citron ou non-pigmenté [69,70].

*S. aureus* ont un métabolisme respiratoire et fermentaire. Ils sont catalase-positifs (qui les distinguent des bactéries du genre *Streptococcus*), oxydase-négatifs et coagulase-positifs. Ce dernier permet d'identifier et de différencier *S. aureus* des autres espèces de *staphylocoques*. *S. aureus* secrète également hémolysines positif [78].

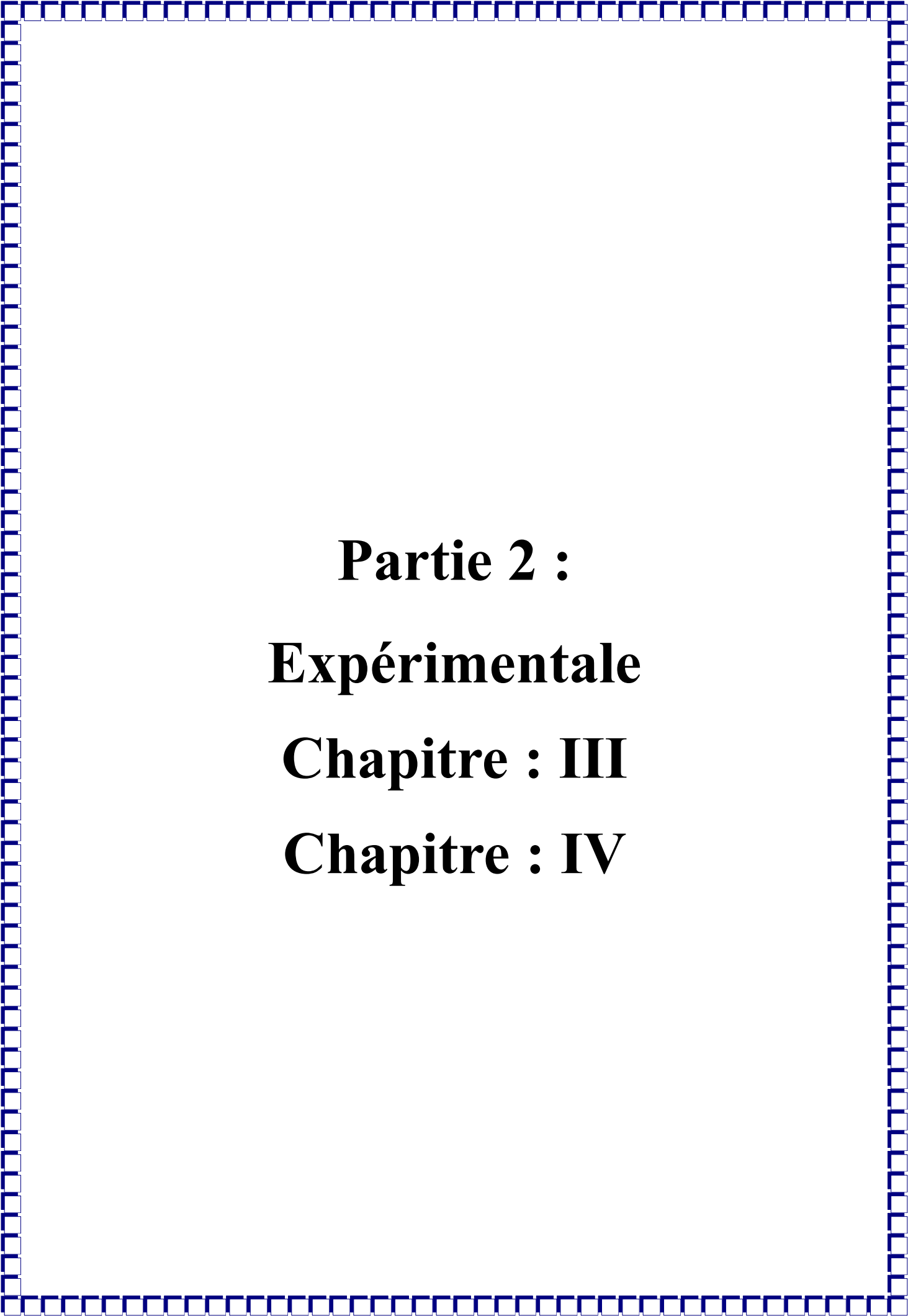
La pathogénicité de *S. aureus* est due aux facteurs de virulences tels que: les acides teichoïques, les protéines de la paroi cellulaire (Le facteur d'agglutination, la protéine de liaison à la fibronectine et la protéine de liaison au collagène), la protéine A, la toxine- $\alpha$ , la coagulase, les enterotoxines (impliquées dans l'empoisonnement alimentaire) etc. Ces facteurs, aide *S. aureus* à adhérer, à échapper au système immunitaire et à induire des dommages chez l'hôte. Parmi les infections à *S. aureus* on retient :

- La toxicose : Intoxication due à la consommation des aliments contenant des enterotoxines secrétées par *S. aureus*.
- Les infections invasives : dissémination du germe après pénétration via la peau ou les muqueuses dans les autres organes du corps ainsi provoquer des infections locales purulente tel que les furoncles, sinusite, infection des plaies ou des pneumonies ou des septicémies [68].

La mise en évidence de *S. aureus* dans les laboratoires implique : un examen microscopique des Cocci Gram positif en grappe de raisin dans l'échantillon. Isolement par culture sur gélose au sang et identification par les tests de catalase et coagulase. Dans le cas d'échantillons mixtes (contaminés), des milieux de culture sélectifs (tels que le milieu CHAPMAN) sont nécessaires pour le dépistage de *S. aureus* [67].

Le traitement dépend du type et de la gravité de l'infection. Les infections cutanées mineures telles que les boutons, les furoncles et des abcès peuvent souvent être traitées avec des antibiotiques topiques. Des antibiotiques oraux ou intraveineux peuvent être nécessaires pour les infections plus graves telles que la pneumonie ou les septicémies. Dû à la résistance de la majorité des souches de *S. aureus* à la pénicilline, sa recommandation est devenue restreint. Suivant sont présentés quelque antibiotique à usage efficace : la Clindamycine et la Doxycycline pour des Infections de la peau et des tissus mous et la Vancomycine et la Daptomycine en cas d'infections profondes (Bactériémie, pneumonie) [69].





**Partie 2 :**  
**Expérimentale**  
**Chapitre : III**  
**Chapitre : IV**

## Chapitre III. Matériels et méthodes

Ce chapitre est subdivisé en trois grandes parties : la première comporte la description de nos travaux d'extraction des feuilles de la plante *Mitracarpus scaber* réalisé au sein de l'unité de recherche VARENBIOMOL de la faculté des sciences exactes (Université Constantine 1), les tests chromatographiques sur plaques CCM et le screening phytochimique. La deuxième partie est consacrée à la quantification des polyphénols et des flavonoïdes. La troisième partie est destinée à l'évaluation du pouvoir antimicrobien des différents extraits de la plante étudiée. Cette dernière partie a été réalisée au laboratoire de microbiologie de la faculté de la science de la nature et de la vie SNV de l'université Constantine 1.

### 1. Étude phytochimique de l'espèce *Mitracarpus scaber*

#### 1.1 Choix du matériel végétal

Le choix de la plante *Mitracarpus scaber* était beaucoup plus basé sur ces applications en tant qu'agent antibactérien et antifongique dans la médecine traditionnelle dans certains pays de l'Afrique notamment au Niger, au Sénégal, au Mali, au Nigéria etc. En effet, elle est très connue pour soigner divers infections cutanées (causées par certaines espèces microbiennes telles que *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*). Plusieurs investigations ont démontré ses propriétés antibiotiques, antimycosiques, antidiabétiques et antidiarrhéiques [37].

#### 1.2. Matériel végétal

Les feuilles fraîches de *Mitracarpus scaber* ont été récoltées en Décembre 2022 dans un jardin local dans la ville de Niamey au Niger.

Les feuilles fraîches sont ensuite séchées à température ambiante et à l'abri de la lumière. En fin de séchage, les feuilles sont transportées en Algérie dans des sacs en polythène noirs pour des études phytochimiques et microbiologiques.



**Figure 14** : Images de l'espèce *Mitracarpus scaber*

## Chapitre III. Matériels et méthodes

### 1.3. Préparation des extraits végétaux de *Mitracarpus scaber*

La technique d'extraction utilisée est une extraction assistée par ultrasons. Cette dernière a été optée pour quatre raisons :

- Temps d'extraction réduit ;
- Utilisation des faibles quantités de solvant ;
- Extraction à basse température ;
- Obtention d'un rendement élevé [79].

L'appareil à ultrasons utilisé est de type bain à ultrason avec de l'eau comme solvant. Le matériel contenant le mélange à traiter est placé dans le bain et le système est soumis aux ondes ultrasonores. Les ondes ultrasonores générées par l'appareil interagissent avec le solvant et crée l'effet de cavitation de microbulles. L'implosion des microbulles en contact avec le matériel végétal va engendrer la rupture de la paroi cellulaire végétale ce qui va permettre la pénétration du solvant à l'intérieur de la matrice cellulaire et induire la libération de son contenu. Augmentant de ce fait la surface de contact entre les deux phases, solide et liquide et le transfert des composés soluble vers la phase liquide [80].



**Figure 15 :** Extraction dans un bain à ultrasons

Une prise d'essai de 350g de la poudre des feuilles de la plante obtenue après broyage est introduite dans un bocal puis soumise à l'épuisement successif par des solvants de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole, le chloroforme puis l'acétate d'éthyle et en dernier le méthanol. Un volume de 1200ml d'éther de pétrole est ajouté à la prise d'essai et le mélange est placé dans l'appareil à ultrasons pour une extraction d'une durée de 30 min à une température de 35°C déterminé sur l'appareil. À la fin de l'extraction, le mélange est filtré, le filtrat obtenu est concentré à sec par évaporation sous pression réduite à une température de 35°C à l'aide d'un évaporateur rotatif de type Büchi. L'extrait éther de pétrole obtenu est pesé

## Chapitre III. Matériels et méthodes

puis stocké jusqu'à utilisation. Le résidu de filtration est gardé pour servir aux extractions suivantes.



**Figure 16 :** Filtration des extraits



**Figure 17 :** Évaporation des extraits

Tous les extraits sont obtenus selon le même mode opératoire. Les solvants ainsi que les volumes utilisés pour l'extraction sont consignés dans le tableau 8.

**Tableau 8 :** Volumes des solvants utilisés

Solvants	Éther de pétrole	Chloroforme	Acétate d'éthyle	Méthanol
Volumes (ml)	1200	1100	1100	1100

La figure suivante résume les différentes étapes de l'extraction assistée par ultrasons jusqu'à l'obtention des extraits bruts (figure 18)

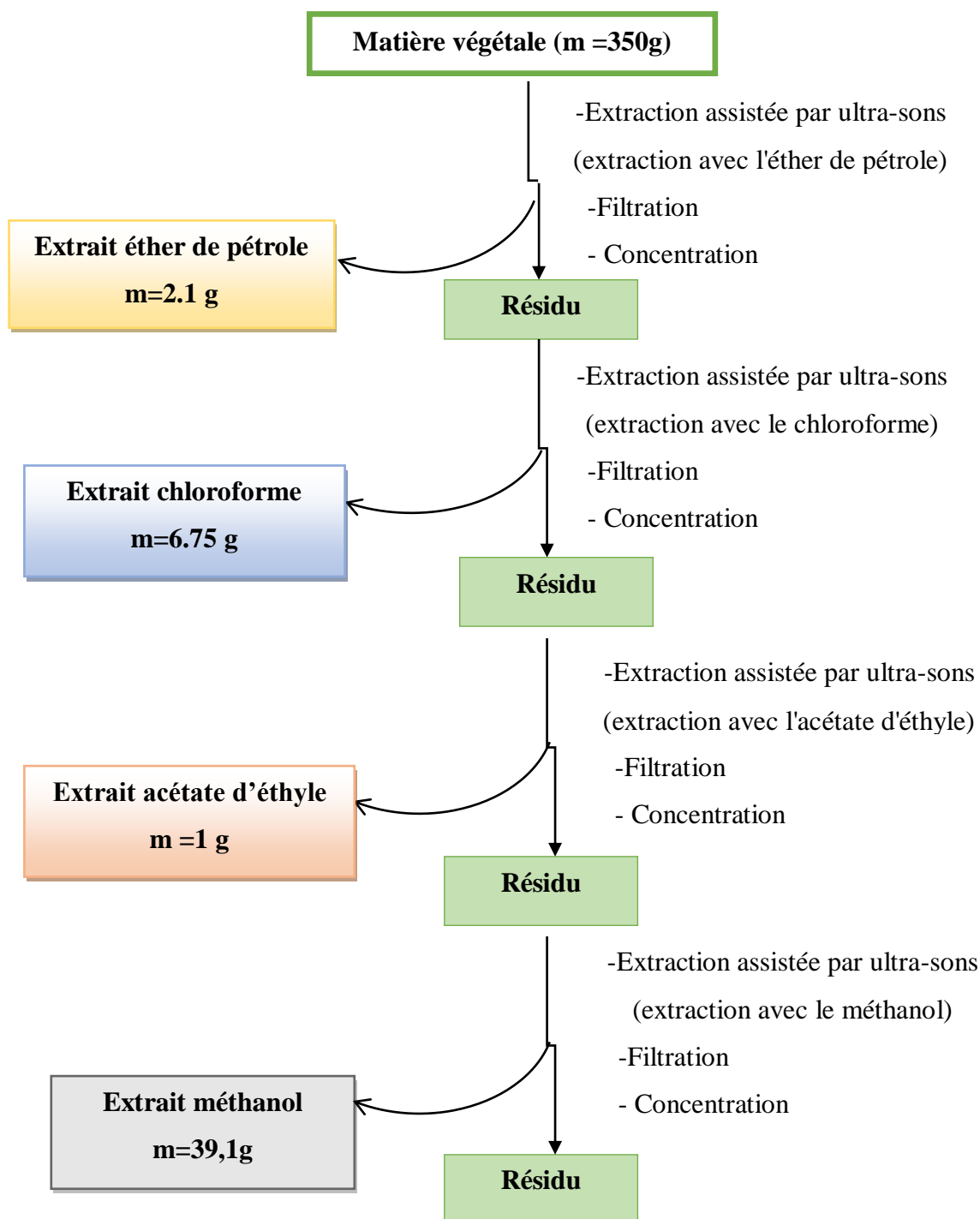


Figure 18 : Organigramme de l'extraction de *de Mitracarpus scaber*

### 1.4. Chromatographie planaire sur Couche Mince (CCM)

L'ensemble des extraits ont subi une analyse par chromatographie analytique sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'Aluminium, pour mettre au point l'éluant ou le système d'éluion qui donnerait une idée sur le nombre de produits de chaque extrait et donc pouvoir choisir l'extrait à étudier ultérieurement.

## Chapitre III. Matériels et méthodes

Pour cela, les quatre phases (éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et méthanol) sont analysées sur des plaques analytiques de gel de silice éluées par plusieurs systèmes afin de sélectionner le meilleur système de séparation qui s'est avéré être le mélange (CHCl<sub>3</sub>/Acétone, 10 : 0,1) pour l'extrait éther de pétrole, (CHCl<sub>3</sub>/Acétone, 10 : 0,1) pour l'extrait chloroforme, (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10 : 0,1) pour l'extrait acétate d'éthyle et (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 6 : 4) pour l'extrait méthanol.

Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 nm) puis révélées avec de l'anisaldéhyde et chauffées à 100°C.

### 1.5. Screening phytochimique

Le screening phytochimique est une série de test qui permet de mettre en évidence qualitativement les composés chimiques d'un produit végétal. Ces tests sont basés sur des réactions de coloration ou de précipitation plus ou moins spécifique de chaque groupe chimique.

#### 1.5.1. Alcaloïdes

*Test de Wagner:* quelques mg d'extrait sont dissouts dans 5ml de HCl (1.5%) puis filtré. Le filtrat est ensuite traité avec le réactif de Wagner (1,7 g d'iode avec 2 g d'iodure de potassium sont dissous dans 5ml d'eau et complétés avec l'eau jusqu'à l'obtention de 100 ml de solution). La formation d'un précipité brun indique la présence d'alcaloïdes [81].

#### 1.5.2. Anthraquinones

Quelques mg d'extrait sont dilués dans un mélange chloroforme/éther de pétrole (1:1, v/v) ensuite quelques gouttes de la soude NaOH (10%) ont été ajoutées. La présence d'une couleur rouge indique la présence d'anthraquinone [82].

#### 1.5.3. Polyphénols

Quelques gouttes de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2% ont été ajoutées à 2ml de chaque extrait. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée indique la présence de polyphénols [83].

#### 1.5.4. Tannins

Les tannins sont des polymères de polyphénols. Ils sont subdivisés en tannoïdes (tannins hydrolysables) et tannins vrais (tannins non hydrolysables ou condensés).

## Chapitre III. Matériels et méthodes

Quelques gouttes d'une solution aqueuse de  $\text{FeCl}_3$  à 2% ont été ajoutées à 2 ml de chaque extrait. La formation d'une coloration bleu-noir ou vert-noir indique la présence respective des tannoïdes ou des tannins vrais [84].

### 1.5.5. Flavonoïdes

**Test de Shinoda** : chaque extrait a été dissout dans 5 ml d'éthanol à 96% (v/v) puis traitée avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique HCl concentré et 0,5g de copeau de magnésium. La formation d'une coloration rose ou magenta après 1 ou 2 min indique la présence des flavonoïdes [85].

### 1.5.6. Saponosides

Pour rechercher les saponosides, nous avons versé, dans un tube à essai, 10 ml de l'extrait total aqueux. Le tube a été agité pendant 15 s puis laissé au repos durant 15 min. La présence d'une mousse persistante indique la présence de saponosides [83].

### 1.5.7. Stérols

**Test de Liebermann** : quelques mg de chaque extrait ont été dissout à chaud dans 1 ml d'anhydride acétique. Après refroidissement de la solution 0,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré ont été ajoutés. Une coloration violette qui vire au bleu puis au vert indique une réaction positive [84].

### 1.5.8. Protéines

**Test de Biuret** : 3 gouttes d'une solution aqueuse de  $\text{CuSO}_4$  à 2% ont été ajoutées à chaque extrait (dissout dans 2 ml de NaOH aqueux à 20%). L'apparition d'une coloration violette parfois rougeâtre, indique la présence des protéines [84].

### 1.5.9. Terpènes

Chaque extrait est additionné de 0.5ml d'anhydride acétique et 0,5ml de chloroforme. Après dissolution, les solutions ont été transférées dans des tubes à essai. Ensuite un volume de 1 ml d'acide sulfurique concentré a été ajouté. La réaction est effectuée à froid. La formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet avec un surnageant coloré en vert ou en violet indique la présence des terpènes [86].

## 2. Analyse quantitative des extraits de *Mitracarpus scaber*

Des déterminations quantitatives des principaux composés phénoliques ont été effectuées sur les quatre extraits de l'espèce *Mitracarpus scaber*: extrait éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et l'extrait méthanol.

### 2.1. Dosage des polyphénols totaux

#### ➤ Principe

Le dosage des polyphénols totaux des extraits est réalisé selon la méthode décrite par Singleton, *et al.* (1999), basé sur la réaction avec le réactif de Folin-Ciocalteu [87].

Le réactif de Folin-Ciocalteu, constitué d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolibdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), est réduit en mélange d'oxydes de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ) lors de l'oxydation des phénols. La coloration bleue issue de la réaction est proportionnelle à la quantité totale en polyphénols présent dans l'échantillon. Elle est quantifiée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760 nm [87].

#### ➤ Protocole expérimental

Un volume de 125  $\mu$ l de chaque extrait (1 mg/ml dans le méthanol), ont été introduits dans des tubes à essais, puis 500  $\mu$ l d'eau distillée et 125  $\mu$ l de réactif de Folin-Ciocalteu (FCR) à 10% sont ajoutés et incubés pendant 3 minutes à température ambiante, ensuite 1250  $\mu$ l de carbonate de sodium (2%) et 1 ml d'eau distillée ont été ajoutés respectivement au milieu réactionnel. Le mélange est incubé à température ambiante à l'obscurité pendant 90 minutes. L'absorbance de toutes les solutions a été mesurée au spectrophotomètre à 760 nm contre le blanc sans extrait. Toutes les mesures ont été réalisées en triple.

#### ➤ Expression des résultats

La quantité en polyphénol total est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, déterminée avec le standard étalon de l'acide gallique (50-500  $\mu$ g/ml) et les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique (EAG) par 1g d'extrait.

### 2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

#### ➤ Principe

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la réaction au chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) décrite par Djeridane, *et al.* (2006). Le réactif  $AlCl_3$  forme en effet avec les groupements hydroxyles du flavonoïde un complexe très stable de coloration jaune qui absorbe à une longueur d'onde de 430 nm [88].

#### ➤ Protocole expérimental



## Chapitre III. Matériels et méthodes

Un volume de 1ml de chaque extrait (1mg /ml dans le méthanol) est mélangé à 1ml de  $AlCl_3$  à 2%. Après 15 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance du mélange obtenu est directement mesurée au spectrophotomètre UV- visible à 430 nm contre le blanc sans extrait. Toutes les mesures ont été réalisées en triple.

### ➤ Expression des résultats

La quantité en flavonoïdes totaux des extraits est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, réalisée avec un standard étalon (la quercétine) à différentes concentrations (10-60  $\mu$ g/ml) et les résultats sont exprimés en mg équivalant de quercétine (EQ) par 1g d'extrait.

## 3. Évaluation des propriétés antimicrobiennes des extraits de *Mitracarpus scaber*

### 3.1. Matériel biologique

L'activité antimicrobienne des extraits a été évaluée sur cinq souches gracieusement fournies par le laboratoire de microbiologie de la faculté SNV de l'Université des Frères Mentouri Constantine 1. Les souches comprenaient :

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Aspergillus niger*.

### 3.2. Milieux de culture

Les tests antibactériens ont été réalisés sur le milieu Mueller Hinton gélose et la gélose Sabouraud pour les tests antifongiques. Ces milieux gélosés sont fondus à l'autoclave à 121°C pendant 15 min et maintenu en surfusion. Ensuite ils sont repartis dans des boîtes de pétri stérile convenablement marqué et laisser refroidir à température ambiante avant d'être inoculer par les souches.

### 3.3. Préparation de l'inoculum

Une culture préalable de 18-24h a été préparé à partir de chacune des suspensions des souches testées fourni afin d'obtenir des suspensions de culture jeune de chaque souche pour servir d'inoculum. Ces cultures jeunes ont été préparées dans le bouillon nutritif pour les bactéries et le bouillon Sabouraud pour *Candida albicans* ATCC 10231. Pour *Aspergillus niger* une suspension sporale a été préparée pour servir d'inoculum. Cette dernière a été

## Chapitre III. Matériels et méthodes

obtenue en ajoutant à une culture mycelliale d'*Aspergillus niger* sur gélose Sabouraud de l'eau physiologique.

### 3.4. Ensemencement

Il a été réalisé par inondation de la surface de la gélose avec l'inoculum suivi d'un étalement par écouvillonnage. Chaque souche a été ensemencée sur dix boîtes.

### 3.5. Préparation des différentes concentrations des extraits

Les extraits ont été dissous dans le diméthyl-sulfoxyde (DMSO). 0,4g de chaque extrait a été dissout dans 1ml de DMSO. Ensuite une série de dilution par moitié a été réalisée pour avoir respectivement les concentrations : 400mg/ml, 200mg/ml, 100mg/ml, 50mg/ml et 25mg/ml. Le DMSO a été utilisé comme témoin négatif. Tandis qu'une crème antifongique a été utilisée comme témoin positif pour les champignons (figure 19) et des disques de sélénite acide de sodium pour les bactéries.



Figure 19 : Témoin positif fongique

### 3.6. Imprégnation des disques

Les disques blancs stérile de 6mm de diamètre préalablement préparé ont été imprégnés avec 20  $\mu$ l de chaque dilution des extraits et du témoin négatif.

### 3.7. Dépôt des disques

Les disques sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérile. Un appui léger est effectué pour augmenter le contact des disques à la gélose. Sur les six boîtes ensemencées par chaque souches, quatre comportaient les disques des différentes concentrations des extraits, dont trois boîtes avec quatre disques chacune et une boîte avec trois disques. Pour les deux boîtes restantes, une était pour le témoin négatif et témoin positif, et une pour le test de contrôle de croissance de la souche.

### 3.8. Incubation

Les souches bactériennes ont été incubées à 37°C pendant 18-24h. Les souches fongiques: *Candida albicans* ATCC 10231a été incubée à 30°C pendant 18-24h et *Aspergillus niger* à 30°C pendant 48h.

### 3.9. Lecture des résultats

Les résultats sont lus par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques avec une règle graduée en cas de sensibilité.

## Chapitre IV. Résultats et discussions

Ce chapitre présente l'analyse et la discussion des résultats obtenus. Il est subdivisé en trois grandes parties. Une partie consacrée à l'analyse et à la discussion des résultats obtenus lors de l'étude phytochimique des feuilles de *Mitracarpus scaber* et une deuxième partie pour l'analyse quantitative des extraits de cette plante. La dernière partie apporte l'analyse et la discussion des résultats obtenus lors des tests microbiologiques des différents extraits de la plante.

### 1. Étude phytochimique de l'espèce *Mitracarpus scaber*

#### 1.1. Rendements des extractions

Les rendements de l'extraction ont été calculés pour les 3 extraits de *Mitracarpus scaber* selon la formule suivante :

$$R (\%) = \frac{P_2 - P_1}{P_0} \times 100$$

R : rendement

P<sub>2</sub> : poids extrait et conteneur

P<sub>1</sub> : poids conteneur

P<sub>0</sub> : poids de l'échantillon de la plante

Le tableau 9 résume les masses et les rendements des extraits obtenus.

**Tableau 9 :** Les masses et les rendements des extraits obtenus

Extraits	Éther de pétrole	Chloroforme	Acétate d'éthyle	Méthanol
Masse de la plante (g)	350g			
Masse de l'extrait (g)	2,1	6,75	1	39,1
Rendement (%)	0,6	1,93	0,29	11,17

Le rendement d'extraction dépend de plusieurs paramètres tels que: le solvant, la température, le temps d'extraction et la composition de l'échantillon [89].

Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanol présente le rendement le plus important qui est 11,7%. Alors que le plus minimum a été obtenu dans le cas de l'extrait éther de pétrole qui est de 0,29%.

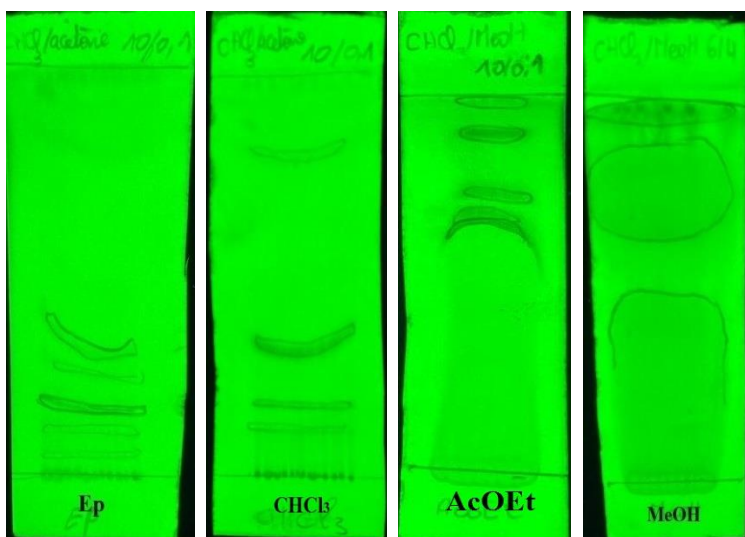
L'extraction des quatre extraits a été faite dans les mêmes conditions (température et temps d'extraction). La différence en taux de matière extractible dépend en effet du degré de solubilité des composés de la plante dans le solvant d'extraction utilisé. Cela signifie que dans ce cas les composés de *Mitracarpus scaber* sont plus solubles dans le méthanol que dans les trois autres solvants utilisés.

## Chapitre IV. Résultats et discussions

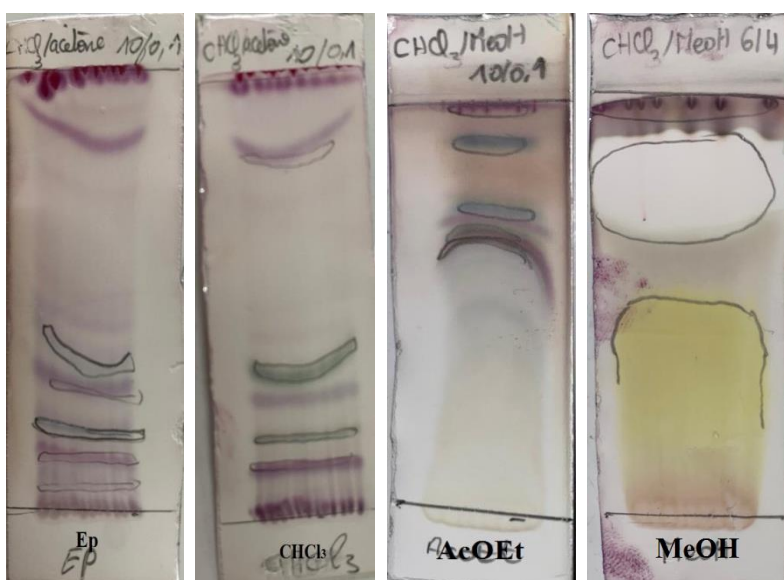
Les résultats obtenus dans le cas de l'extrait méthanolique sont très proche de ceux obtenus par Namadina et *al.* (2020) qui ont obtenus un rendement de 16,4% pour l'extrait méthanolique de la plante entière de *Mitracarpus scaber* [3].

### 1.2. Chromatographie planaire sur Couche Mince (CCM)

Les figures suivantes (figure 20 et 21) montrent les résultats de cette analyse chromatographique.



**Figure 20 :** Plaques CCM des extraits sous lampe UV (254 nm)



**Figure 21 :** Plaques CCM des extraits révélés avec de l'anisaldéhyde

Selon les figures 20 et 21, On constate que les quatre extraits sont bien séparés avec les systèmes choisis mais ils ne sont pas assez riches en composés naturels.

## Chapitre IV. Résultats et discussions

Les deux extraits éther de pétrole et chloroforme possèdent presque la même composition. On remarque aussi que l'extrait méthanol contient des composés majoritaires qui absorbent sous lampes UV 254nm.

### 1.2. Screening phytochimique

Le criblage phytochimique donne un aperçu qualitatif des différents constituants phytochimiques présents dans les extraits de plante. Ce qui orienterait à la sélection particulière d'un extrait pour une étude plus approfondie.

Les tests de caractérisation réalisés sur les différents extraits des feuilles de *Mitracarpus scaber* ont donné les résultats illustrés dans la figure 22 et le tableau 10.

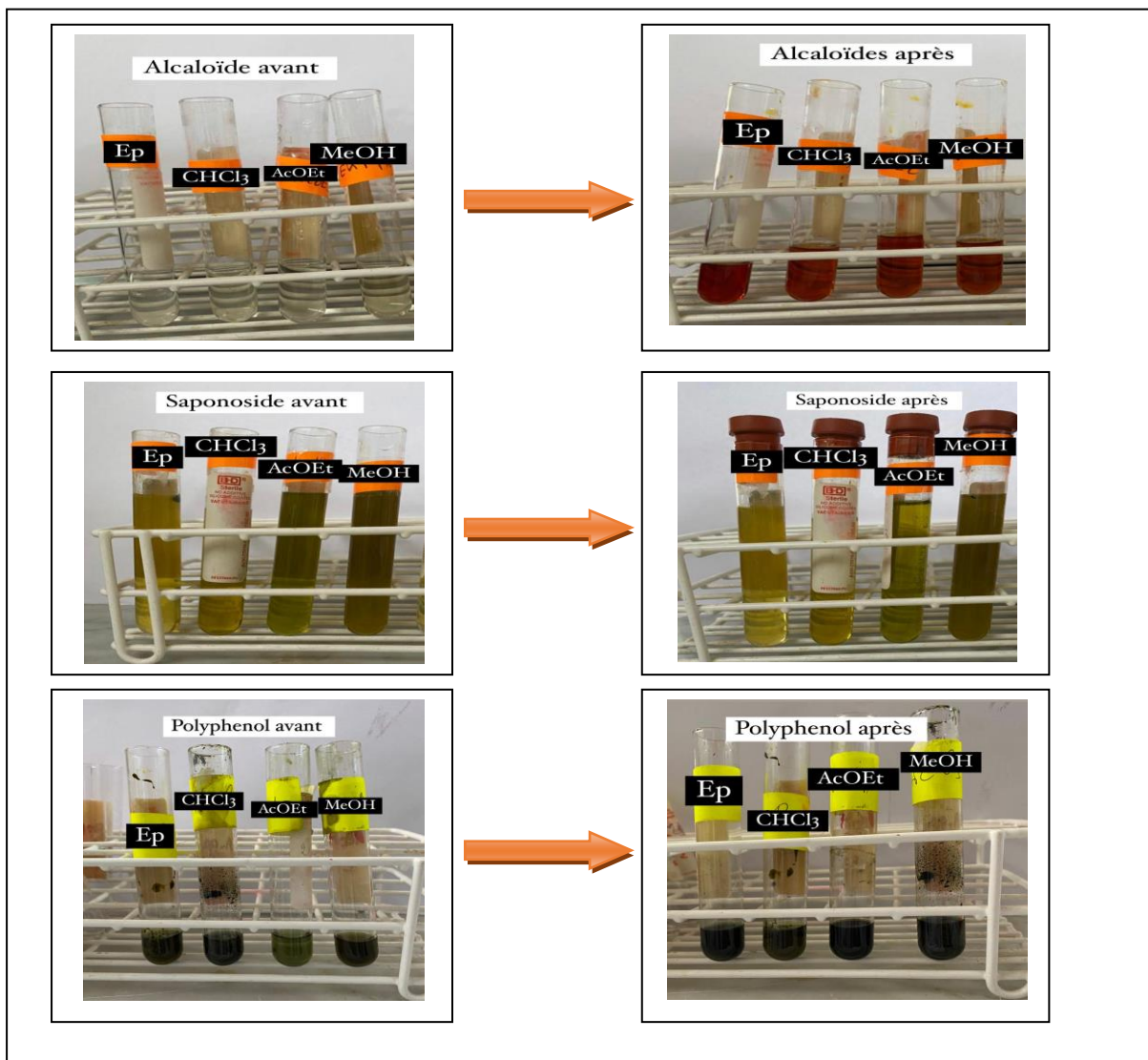


Figure 22 : Schéma indiquant les résultats des tests de screening phytochimique

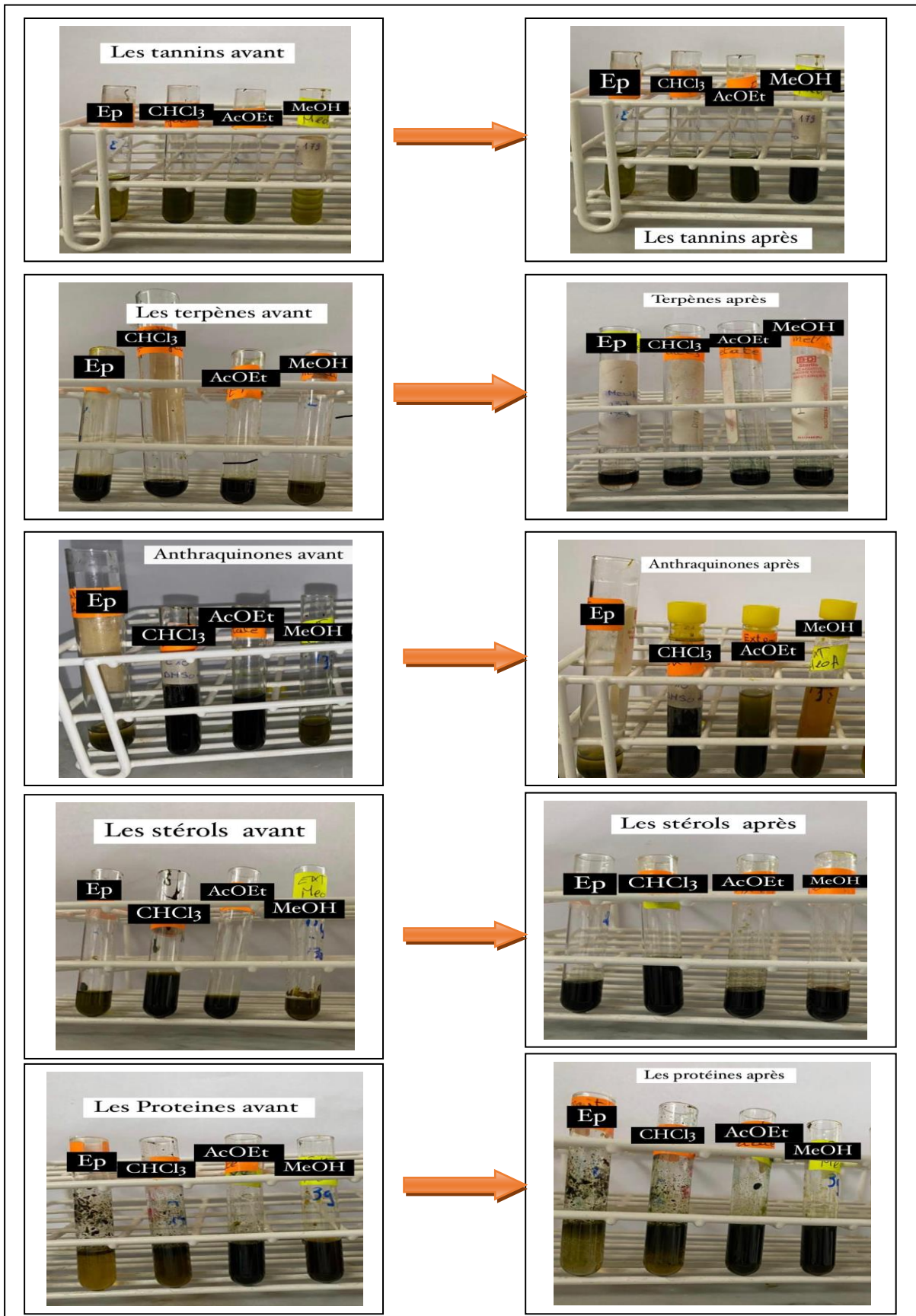


Figure 22 : Schéma indiquant les résultats des tests de screening phytochimique (suite)

## Chapitre IV. Résultats et discussions

**Tableau 10** : Profil phytochimique des différents extraits de *Mitracarpus scaber*

	Ep	CHCl <sub>3</sub>	AcoEt	MeOH
<b>Alcaloïdes</b>	-	-	-	-
<b>Flavonoïdes</b>	-	+	+	++
<b>Saponosides</b>	-	-	-	-
<b>Polyphénols</b>	-	+	+	++
<b>Tannins</b>	-	-	-	+
<b>Terpènes</b>	++	++	+	+
<b>Anthraquinones</b>	-	-	-	+
<b>Stérols</b>	-	-	-	-
<b>Protéines</b>	-	-	-	-

++ : Fortement positif ; + : Moyennement positif; - : négatif

Ces résultats montrent la présence dans les feuilles de *Mitracarpus scaber* des flavonoïdes, des polyphénols, des tanins, des terpènes et des anthraquinones, tandis que les saponosides, les alcaloïdes, les stérols et les protéines sont absents. Cependant, les terpènes révèlent être présents dans tous les extraits alors que les anthraquinones et les tanins ne sont présents que dans l'extrait méthanolique. De plus l'extrait méthanolique montre une meilleure composition en métabolite secondaire que les autres extraits.

Ces résultats sont en cohérence avec ceux obtenus par des études menées au Nigeria par Aboh et *al.* (2014) qui ont détectés la présence des phénols, terpènes, tanins, saponosides, flavonoïdes et des résines dans les extraits des parties aériennes de la plante [90]. Des travaux effectués par Ameh et *al.* (2011) ont permis de mettre en évidence la présence des anthraquinones et l'absence des alcaloïdes et des saponosides dans l'extrait étudié [91]. Dans le même contexte, des travaux similaires dirigés par Namadina et *al.* (2020) ont permis de détecter la présence des flavonoïdes, triterpènes, des stéroïdes, des tanins, des glycosides et des phénols dans les extraits de la plante entière, alors que les anthraquinones étaient absentes [3].

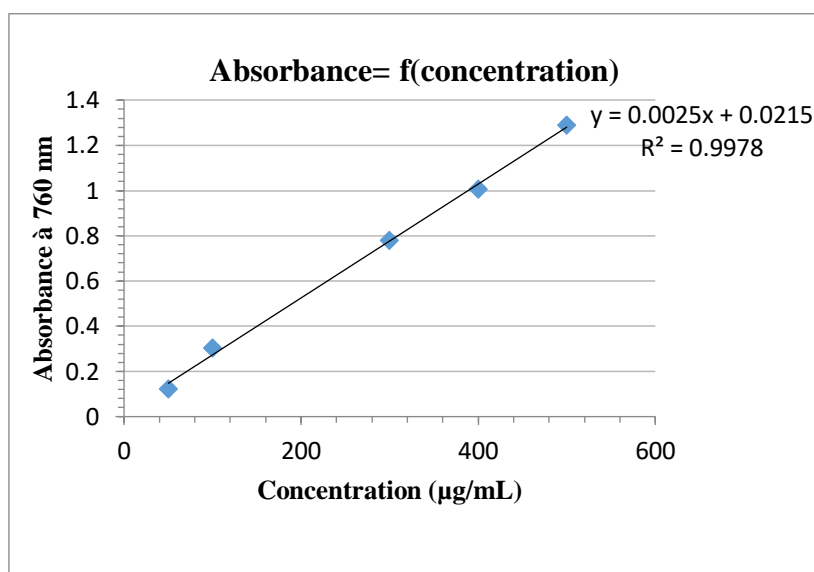
En effet cette variation des éléments phytochimiques rapporté peut être due à l'origine géographique, au stade phénologique, aux conditions climatiques, à la méthode de séchage, à la méthode d'extraction utilisée ou au solvant d'extraction choisi ou aussi à la partie de la plante utilisée [6].



### 2. Analyse quantitative des extraits de *Mitracarpus scaber*

#### 2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits de *Mitracarpus scaber* a été réalisé par la méthode spectrophotométrique de Folin-Ciocalteu (FCR). La teneur en polyphénols totaux est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait, en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée par l'acide gallique ( $y = 0,002x + 0,021$ ) avec  $R^2 = 0,997$  (figure 23).



**Figure 23 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

La teneur en polyphénols totaux des extraits a été déterminée par extrapolation de l'absorbance de chaque extrait sur la courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Les résultats représentés dans le tableau III.3 montrent que l'extrait acétate d'éthyle est l'extrait le plus riche en polyphénols avec une teneur de  $108,71 \pm 3,25$  mg EAG/g d'extrait, suivi par l'extrait méthanolique avec une teneur de  $101,37 \pm 2,58$  mg EAG/g d'extrait. Cependant, la teneur la plus minimale est observée dans le cas de l'extrait éther de pétrole avec une valeur de  $64,52 \pm 1,44$  mg EAG/g d'extrait.

La teneur en polyphénols totaux des différents extraits obtenus lors de cette étude est plus ou moins proche que celle obtenue par Namadina et al. (2020) qui ont trouvé dans le cas de l'extrait méthanolique de la plante entière de *Mitracarpus scaber* une teneur en polyphénols de  $97,0 \pm 0,60$  mg EAG/g d'extrait [3]. Cependant, Ouadja et al. (2018) ont trouvé pour l'extrait méthanolique de la plante entière une teneur en polyphénols de  $31,58 \pm 2,42$  mg/g

## Chapitre IV. Résultats et discussions

d'extrait et une teneur de  $14,63 \pm 0,44$  mg EAG/g d'extrait pour l'extrait chloroforme [92]. Ces résultats sont largement inférieurs à ceux obtenus dans notre étude.

### 2.2. Dosages des flavonoïdes totaux

La détermination quantitative des flavonoïdes est réalisée par la méthode de trichlorure d'aluminium, elle est basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-ion aluminium ayant une absorbance maximale à 430 nm.

La quercétine a été utilisée comme étalon. La teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en mg équivalent de quercétine par g d'extrait (EQ/g). Les résultats sont déterminés à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine d'équation: ( $y = 0,056x - 0,061$ ) avec  $R^2 = 0,998$  (figure 24).

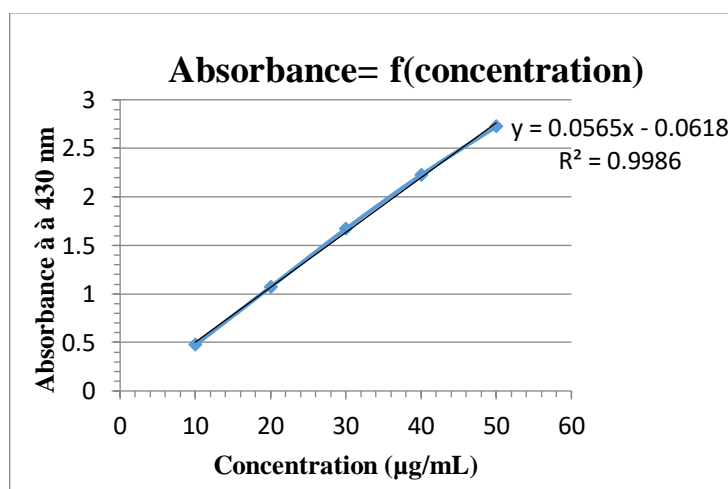


Figure 24 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

D'après le tableau III.3, l'extrait acétate d'éthyle est l'extrait le plus riche en flavonoïdes avec une teneur de  $51,90 \pm 0,71$  EQ/g d'extrait, suivi par l'extrait méthanolique et l'extrait chloroforme ( $47,60 \pm 3,55$  et  $45,73 \pm 2,25$  EQ/g d'extrait respectivement). Cependant, la teneur la plus minimale est obtenue dans le cas de l'extrait éther de pétrole avec une teneur de  $8,49 \pm 0,80$  EQ/g d'extrait.

La teneur en flavonoïdes totaux de l'extrait méthanol est supérieure à celle déjà rapporté dans la littérature par Namadina et al. (2020) qui ont trouvé dans le cas de l'extrait méthanolique de la plante entière de *Mitracarpus scaber* une teneur de  $21,40 \pm 0,60$  mg/g en flavonoïdes [3].

## Chapitre IV. Résultats et discussions

**Tableau 11** : Teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux des extraits de *Mitracarpus scaber*

Extraits	Teneur des polyphénols (mg EGA/g)	Teneur des flavonoïdes (mg EQ/g)
Éther de pétrole	64,52±1,44	8,49±0,80
Chloroforme	83,92±2,08	45,73±2,25
Acétate d'éthyle	108,71±3,25	51,90±0,71
Méthanol	101,37±2,58	47,60±3,55

Cette différence en teneur des composés polyphénols et flavonoïdes peut s'expliquer par la différence dans la méthode d'extraction employée, la partie de la plante utilisée ou aussi les conditions climatiques [92, 93]. Une étude comparative des différents organes de la plante *Mitracarpus scaber* (feuilles, tiges, racines et graines) réalisée par Thibaut et al. (2020) a démontré que les feuilles étaient les plus riches en composé polyphénoliques ( $488,291 \pm 1,205 \mu\text{g GAE/g}$ ) et flavonoïdes ( $1,6236 \pm 0,0317 \%$ ) du fait qu'elles sont les plus exposées au rayonnement solaire [94]. En effet les feuilles sont très riches en chloroplastes. Les chloroplastes via les chlorophylles et leurs ultrastructures participent à la transformation de l'énergie lumineuse en énergie organique. Ils sont aussi très connus pour être siège de diverses réactions tel que le cycle de Calvin, le cycle des pentoses phosphate, la réaction enzymatique de synthèse d'acide gras etc. et cela leur permettent de disposer facilement des groupements chimiques nécessaires pour la synthèse des composés polyphénoliques et flavonoïdes [93].

### 3. Évaluation des propriétés antimicrobiennes des extraits de *Mitracarpus scaber*

Lors de cette étude, nous avons testé l'action des différents extraits (éther de pétrole, chloroforme et méthanol) vis-à-vis de quelques souches microbiennes.

Les résultats obtenus dans le tableau 12 montrent que pour l'extrait éther de pétrole on a beaucoup plus de zone d'inhibition sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suivi d'*Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231 et puis *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, pas d'effet sur *Aspergillus niger*. Le plus grand diamètre d'inhibition a été observé sur *Escherichia coli* ATCC 25922 (13mm).

## Chapitre IV. Résultats et discussions

**Tableau 12 :** Valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition des différentes concentrations de l'extrait d'éther de pétrole vis-à-vis des cinq souches

	Témoin négatif (DMSO)	Témoin positif	Ep (SM)	Ep (1/2)	Ep (1/4)	Ep (1/8)	Ep (1/16)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	26,5	-	-	7	7	13
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	32	8	7	6	9	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	25	-	-	-	-	8
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	13	7	7	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	15	-	-	-	-	-

Ep(SM) : Solution Mère 400mg/ml, Ep (1/2) : 200mg/ml, Ep (1/4) : 100mg/ml, Ep (1/8) : 50 mg/ml, Ep (1/16) : 25 mg/ml, - pas de zone d'inhibition

C'est pour l'extrait chloroforme seulement qu'on a pu avoir un effet antibactérien avec toutes les concentrations d'un même extrait sur une souche qui est *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853(diamètre compris entre 6 et 29,5mm). A noter que le plus grand diamètre d'inhibition pour l'extrait chloroforme a été observé avec cette même souche (29,5mm). Il a aussi un effet assez remarquable sur *Escherichia coli* ATCC 25922 avec un intervalle de diamètre entre 7,5 et 18,5mm. Pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, il y'a aucun effet observé et une seule d'inhibition pour *Candida albicans* ATCC 10231 quand à *Aspergillus niger*, il a développé une résistance après 24h pour la concentration 200mg/ml (tableau 13)

**Tableau 13 :** Valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition des différentes concentrations de l'extrait chloroforme vis-à-vis des cinq souches

	Témoin négatif (DMSO)	Témoin positif	CHCl <sub>3</sub> (SM)	CHCl <sub>3</sub> (1/2)	CHCl <sub>3</sub> (1/4)	CHCl <sub>3</sub> (1/8)	CHCl <sub>3</sub> (1/16)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	26,5	7,5	13,5	9	-	18,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	32	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	25	6	16	8	22	29,5
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	13	-	-	-	8	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	15	-	R	-	-	-

CHCl<sub>3</sub>(SM) : Solution Mère 400mg/ml, CHCl<sub>3</sub> (1/2) : 200mg/ml, CHCl<sub>3</sub> (1/4) : 100mg/ml, CHCl<sub>3</sub> (1/8) : 50 mg/ml, CHCl<sub>3</sub> (1/16) : 25 mg/ml, - pas de zone d'inhibition, R: résistante

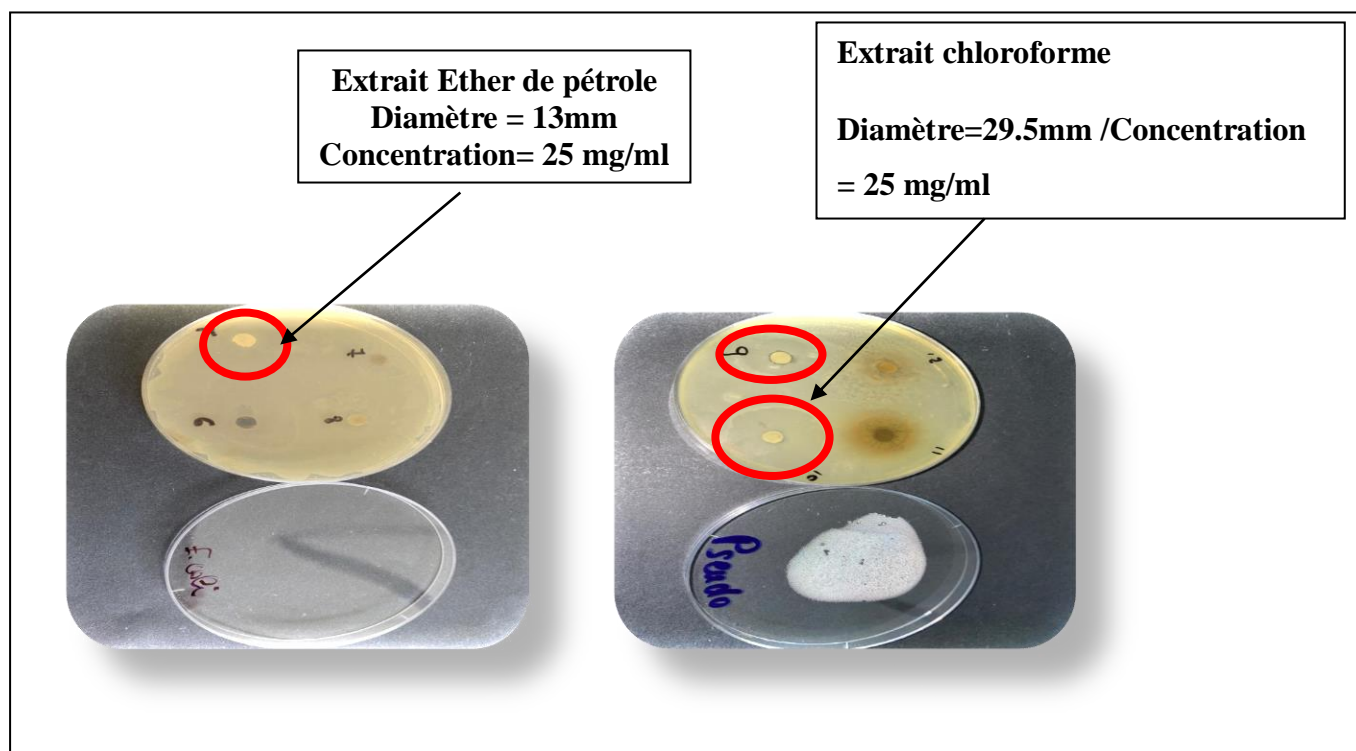
## Chapitre IV. Résultats et discussions

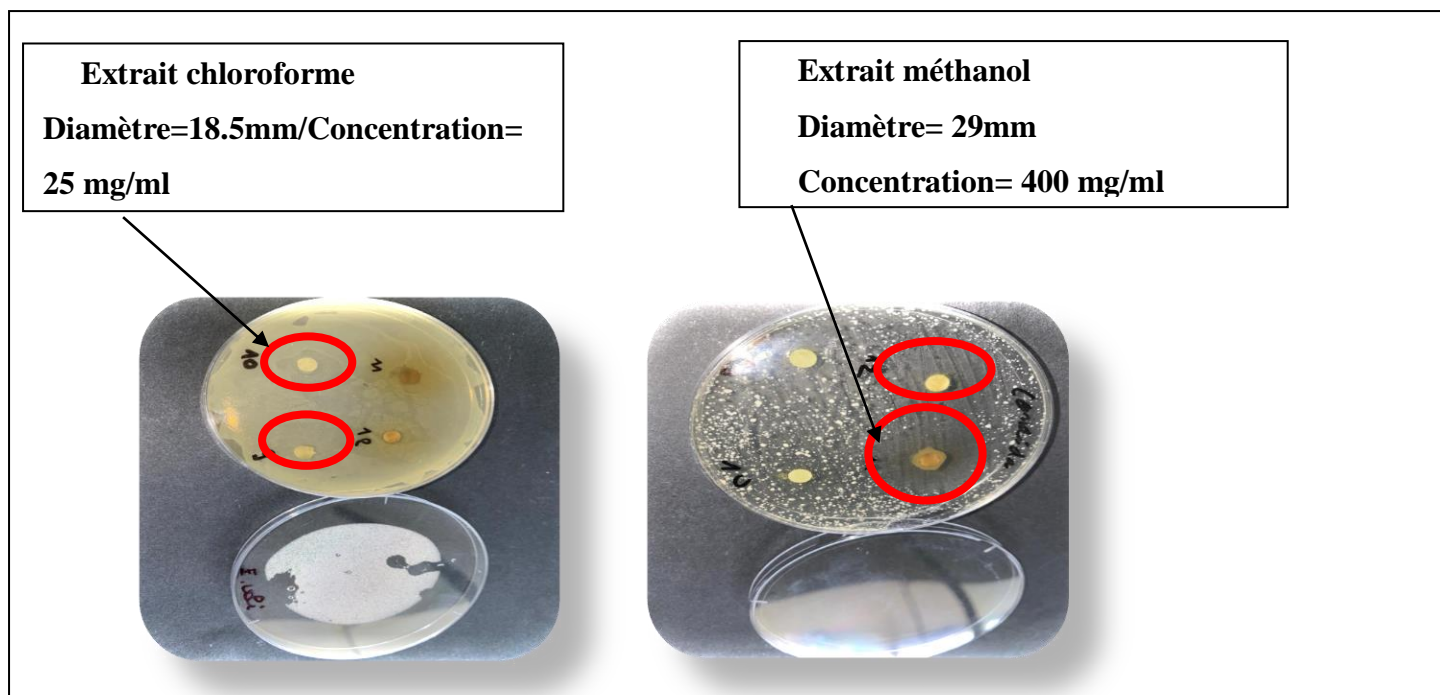
L'extrait méthanol a montré une inhibition presque sur toutes les souches sauf pour *Aspergillus niger* qui a développé une résistance après 24h (pour les concentrations 400mg/ml et 200mg/ml). Mais le plus grand diamètre d'inhibition a été observé sur *Candida albicans* ATCC 10231 (29 mm pour la solution mère). A noter que c'est l'extrait qui a eu plus de zone d'inhibition parmi tous les trois (tableau 14).

**Tableau 14 :** Valeur des diamètres moyens de la zone d'inhibition des différentes concentrations de l'extrait méthanol vis-à-vis des cinq souches

	Témoin négatif (DMSO)	Témoin positif	MeOH (SM)	MeOH (1/2)	MeOH (1/4)	MeOH (1/8)	MeOH (1/16)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	26,5	-	7	22,5	9,5	7
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	32	-	12	11	8,5	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	25	15,5	7	-	-	7,5
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	13	29	21,5	7,5	7,5	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	15	R	R	-	-	-

MeOH (SM) : Solution Mère 400mg/ml, MeOH (1/2) : 200mg/ml, MeOH (1/4) : 100mg/ml, MeOH (1/8) : 50 mg/ml, MeOH (1/16) : 25 mg/ml, - pas de zone d'inhibition, R: résistante





**Figure 25 :** Photographie montrant l'action des extraits de *M. scaber* sur les souches testées

D'après les résultats obtenus (tableau 12, 13, 15 et figure 25), chacun des trois extraits de *Mitracarpus scaber* a montré une activité bien définie sur la croissance d'au moins une des quatre souches testées (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Candida albicans* ATCC 10231).

Il a été découvert que les activités biologiques des extraits de plantes dépendent des solvants [3].

Bisignano et al (2000) ont montré que l'activité antifongique de l'extrait méthanol de *Mitracarpus scaber* contre *C. albicans* peut être liée à la présence de dérivés d'acétophénone. En effet, parmi les composés isolés, la 4- méthoxyacétophénone et la 3,4,5-triméthoxyacétophénone ont présenté une activité très élevée par rapport à la substance de référence 5-flucitosine utilisé lors de leurs études [43].

Les résultats obtenus indiquent donc que l'activité antimicrobienne des extraits de *M. scaber* pourrait être attribuée aux composés phénoliques et alcaloïdes. En effet les alcaloïdes sont des substances organiques avec des structures moléculaires alcalines complexes avec une activité pharmacologique élevée à faible concentration. Parmi ces propriétés pharmacologiques figuraient les propriétés antimicrobiennes [92]. La présence de composés

## Chapitre IV. Résultats et discussions

phénoliques dans cette plante peut justifier son utilisation pour le traitement des infections cutanées causées par *S. aureus* et *C. albicans*. De plus, parmi les composés isolés, le psoralène est utilisé pour la prise en charge du vitiligo, du psoriasis et du mycosis fongöide. Par ailleurs, d'autres auteurs, Moulis et *al.* (1992) ont rapporté l'activité antifongique de la pentalongine, un pigment naphthoquinoïde isolé des parties aériennes fraîches de *Mitracarpus scaber* [43].

Nous pouvons noter une certaine concordance avec les résultats obtenus par Namadina et *al* (2020) pour l'extrait méthanolique sur *C. albicans* ATCC 10231 avec des diamètres de zones d'inhibition allant de 14 à 8 mm (100-50-25-12,5 mg/ml) étant donné qu'ils ont mis 0,1 ml de volume d'extrait dans les puits [3].

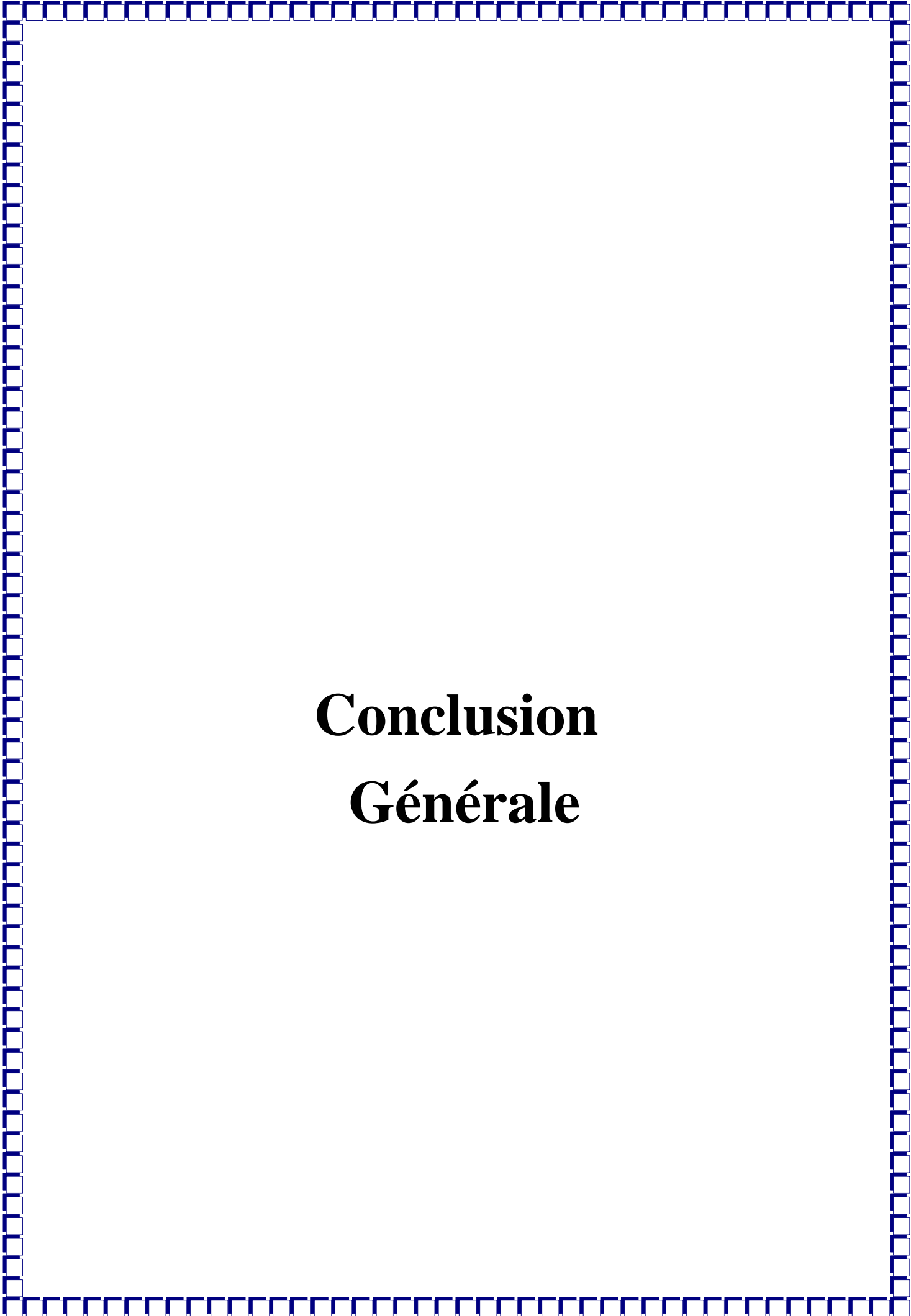
Un effet bactériostatique a été observé sur *S. aureus* ATCC 25923 avec l'extrait méthanolique d'après les études de Ouadja et *al* (2018) [92]. De même, à 50 mg/ml, l'extrait chloroforme et l'extrait aqueuse a inhibé la croissance de *S. aureus* ATCC 25923 et *C. albicans*. Ouadja et *al* ont trouvés aussi pour l'extrait chloroforme des CMI de 50mg/ml sur *C. albicans* ATCC et plus de 50mg/ml pour *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *E. coli* 25922 [92].

De plus, Bisignano et *al.* (2000) ont également testé des extraits totaux de méthanol et ont trouvé des CMI de 31,25 µg/ml sur *S. aureus* ATCC 25923 et de 62,50 µg/ml sur *C. albicans* [43].

Ouadja et *al* (2018) ont trouvé pour l'extrait chloroforme des CMI de 50mg/ml sur *C. albicans* ATCC et plus de 50mg/ml pour *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *E. coli* 25922 [92].

Le séchage et le stockage des extraits influenceraient la qualité des extraits. La plante fraîche de *M. scaber* contient du harounoside, une molécule à activité antimicrobienne alors qu'elle était absente de la plante sèche [92].

De même, Karou et *al.* (2015) ont montré que la conservation des extraits avait un impact négatif sur leur qualité pharmacologique. En effet, l'auteur a démontré que les phénols en contact avec l'oxygène subissent une auto-oxydation et donnent des polymères insolubles de haut poids moléculaire qui pénètrent la paroi bactérienne [92].



# **Conclusion Générale**



## Conclusion générale

Au terme de ce travail visant à évaluer la sensibilité de *Mitracarpus scaber* vis-à-vis de certaines souches: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231 et *Aspergillus niger*, il ressort que cette plante possède des vertus pouvant justifier son utilisation en médecine traditionnelle.

En effet, les études phytochimiques montrent la richesse de cette plante en diverse molécules telles que les flavonoïdes, les terpènes, les tanins et les anthraquinones qui pourraient être à l'origine de son effet antibactérien.

Après l'extraction des feuilles de *Mitracarpus scaber* avec différents solvants en utilisant la méthode d'extraction assistée par ultrasons, nous avons eu les rendements suivants : 0,6% pour l'extrait éther de pétrole, 1,93% pour chloroforme, 0,29% pour acétate d'éthyle et 11,17% pour le méthanol.

Une analyse quantitative des polyphénols et des flavonoïdes totaux a été effectuée sur les quatre extraits de *Mitracarpus scaber*. Les résultats montrent que l'extrait acétate d'éthyle est l'extrait le plus riche en composés phénoliques suivi par l'extrait méthanolique avec des teneurs considérables. Ce résultat affirme que la plante étudiée est une source importante de composés phénoliques et flavonoïques.

En ce qui concerne l'effet antibactérien des extraits de *Mitracarpus scaber*, de grands diamètres de zone d'inhibition ont été obtenus à savoir 13mm de l'extrait éther de pétrole sur *Escherichia coli* ATCC 25922, 29,5mm de l'extrait chloroforme sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et 29mm de l'extrait méthanolique sur *Candida albicans* ATCC 10231.

En perspective, nos résultats obtenus restent préliminaires et méritent d'être exploités en faisant des études plus poussées :

- Déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMB) ;
- Essayer de faire les tests de sensibilité avec le mélange hydroalcoolique.
- Poursuivre l'étude phytochimique de l'espèce étudiée afin d'isoler les métabolites secondaires contenus dans les différents extraits et de déterminer leurs structures.
- Évaluer l'activité des produits isolés afin de confirmer ou d'infirmer l'activité biologique attribuée à cette plante.

## **Conclusion générale**

---

- Évaluer ces extraits pour d'autres activités biologiques.



# **Références**

## **Bibliographiques**

## Références bibliographiques

- [1] Kporou, K. E., Kra, M. A. K., Ouattara, S., & Guede-guina, F. (2009). Évaluation de la sensibilité de *Candida albicans* aux extraits de *Mitracarpus scaber* une *rubiaceae* codifiée misca. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, (78), 12 - 23.
- [2] Irowa, U. P., Idemudia, I. B., Imarhiagbe, E. E., & Ekhaïse, F. O. (2020). Antibacterial activities, phytochemical screening and chromatographic studies of *Mitracarpus scaber* (girdlepod) leaf extracts. *SAU Science-Tech Journal*, 5(1), 30-42.
- [3] Namadina, M. M., Mukhtar, A. U., Musa, F. M., Sani, M. H., Haruna, S., Nuhu, Y., & Umar, A. M. (2020). Phytochemical, antifungal and acute toxicity studies of *Mitracarpus scaber* Zucc. whole plant extracts. *ChemSearch Journal*, 11(2), 73-81.
- [4] Tuo, F. N., Koffi, K. J., Kouassi, A. F., Kone, M., Adama, B., & Bogaert, J. (2017). Étude de la diversité, de l'endémisme et de la distribution spatiale des *Rubiaceae* de Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 11(2), 777-797.
- [5] Oghenejobo, M., Uvieghara, K. E., & Omughele, E. (2013). Antimicrobial activities and phytochemical screening of the leaf extract of *Mitracarpus scaber*. *Sch Acad J Biosci*, 1(6), 227-230.
- [6] Musa, F. M., Haruna, N. F. G., Nuhu, A. M., Ibrahim, B., & Abdulkadir, S. (2021). Antimicrobial Activity of *Mitracarpus scaber* Leaf Extract against Some Human Pathogenic Microorganisms. *African Scientist*, 22(1).
- [7] Létard, J. C., Canard, J. M., Costil, V., Dalbiès, P., Grunberg, B., Lapuelle, J., & Commissions nutrition et thérapies complémentaires du CREGG. (2015). Phytothérapie—Principes généraux. *Hegel*, 5(1), 29-35.
- [8] Sofowora, A. (2010). Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. KARTHALA Editions, 22.
- [9] Guillaume, D., & Charrouf, Z. (2005). Saponines et métabolites secondaires de l'arganier (*Argania spinosa*). *Cahiers Agricultures*, 14(6), 509-516.
- [10] Gontier, E. (2001). Metabolic engineering of plant secondary metabolism Edited by R. Verpoorte and AW Alfermann, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. ISBN: 0792363604; NLG 300-USD 147-GB 91. *Plant Science*, 1(161), 201.
- [11] Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur.
- [12] Chira, K., Suh, J.-H., Saucier, C. & Teissède, P.-L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6: 75-82.

## Références bibliographiques

- [13] Cai, Y. Z., Sun, M., Xing, J., Luo, Q., & Corke, H. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life sciences*, 78(25), 2872-2888.
- [14] Kothe, H. W. (2007). *1000 plantes aromatiques et médicinales*. Terres éd.335p.
- [15] Dikkala, P. K., Kakarlapudi, J., Rokalla, P., Vedantam, S. K., Kaur, A., Kaur, K., ... & Sridhar, K. (2023). Computational screening of phytochemicals for anti-diabetic drug discovery. In *Phytochemistry, Computational Tools and Databases in Drug Discovery*. Elsevier; 285-311.
- [16] Morot-Gaudry, J. F., Moreau, F., Prat, R., Maurel, C., & Sentenac, H. (2021). *Biologie végétale: Nutrition et métabolisme*. 3ème édition. Dunod, 256.
- [17] Faye, P. G., Ndiaye, E. M., Ndiaye, B., Cisse, O. I. K., Ayessou, N. C., & Cisse, M. (2022). Effet de la macération, de l'infusion et la décoction sur l'extraction aqueuse des polyphénols des feuilles séchées de *Combretum Micranthum*. *Afrique SCIENCE*, 21(3), 114-126.
- [18] Chemat, F., Abert-Vian, M., & Zill-e-Huma, Y. J. (2009). Microwave assisted separations: green chemistry in action. In *Green chemistry research trends*. Nova Science Publishers, New York, NY, 33-62.
- [19] Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B. K., Noci, F., Koutchma, T., & Brunton, N. (2011). Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International*, 44(7), 1875-1887.
- [20] Chemat, F., & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(4), 813-835.
- [21] Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.
- [22] Kaabouche, Z. (2010). Cours et exercices de chromatographie. Université Mentouri Constantine. 57,65-66, 70,72.
- [23] Sall, F. (2022). Étude monographique des quatre rubiacées du Sénégal. *Borreria verticillata* (L.) G.F.W.Mey., *Mitragyna inermis* (Wild.° K. Schum, *Sarcocephalus latifolius* (Sm.) Bruce et *Mitracarpus scaber* Zucc. Université Cheikh Anta Diop De Dakar.1,3.
- [24] Robbrecht, E. (1988). Tropical woody *Rubiaceae*. *Opera Botanica Belgica*, 1(272), 599-602.
- [25] Kamila, P. K., Das, P. K., Mallia, M., Kalidass, C., Pati, J., & Panda, P. C. (2020). *Gynochthodes cochinchinensis* (DC.) Razafim. & B. Bremer (*Morindeae: Rubioideae*:

## Références bibliographiques

*Rubiaceae*): an addition to the woody climbers of India. *Journal of Threatened Taxa*, 12(3), 15395-15399.

[26] Davis, A. P., Govaerts, R., Bridson, D. M., Ruhsam, M., Moat, J., & Brummitt, N. A. (2009). A global assessment of distribution, diversity, endemism, and taxonomic effort in the Rubiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 96(1), 68-78.

[27] Auger, R. & Laporte-Cru, J. (1985). Flore du domaine atlantique du sud-ouest de la France et des régions de plaines. Bordeaux : CNDP.

[28] Heywood, H. (1996). Les plantes à fleurs. Paris : Nathan. 335.

[29] Marouf, A. (2000). Dictionnaire de Botanique : les phanérogames. Paris : Dunod. 256.

[30] Adjanohoun, E.J. ; Alyi, A.M., Ake assi L., Baniakina, J., Chibon, P., Cusset, G., et al. (1980). Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Niger. Paris, ACCT éd, 105.

[31] Kerharo, J., & Adam, J. G. (1974). La pharmacopée sénégalaise traditionnelle: plantes médicinales et toxiques, 1011.

[32] Esseng, M. E. (2007). Étude de la phytochimie et des activités antibactériennes et antifongiques de cinq plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel des dermatoses au Mali. Thèse de Doctorat : Pharmacie. Bamako : université de Bamako, 175.

[33] Abizi, G., Shcherazade, O. S. F., Méa, B. A. N., Koffi, S., Kouakou, J. K., & Kouassi, E. B. (2022). Evaluation of the Cutaneous Toxicity of the Aqueous Extract of the Aerial Parts of *Mitracarpus scaber* (Rubiaceae) in Rats (*Rattus norvegicus* Strain Wistar). *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 25(5), 18-29.

[34] Salamero, J., Marnotte, P., Le Bourgeois, T., & Carrara, A. (1997). Practical identification key for 14 Rubiaceae weed species of western and central Africa.

[35] Burkill, H. M. (1997). The useful plants of west tropical Africa. Richmond : Royal Botanic Gardens Kew. Vol 4. Families M-R. 969 p

[36] Jegede, A., Kunle, O.F., Ibrahim, J.A., Ugbabe, G., & Okogun, J.I. (2021). Evaluation of the medicinal profiles of fresh and powdered leaf of *Mitracarpus vilosus* (S.W) D.C. *International Scholars Journals*, 9 (1), 001-003.

[37] Ekalu, A. (2021). Medicinal uses, phytochemistry, and pharmacological activities of *Mitracarpus* species (Rubiaceae): A review. *Scientific African*, 11, e00692.

[38] Sanogo, R., Germanò, M. P., De Pasquale, R., Keita, A., & Bisignano, G. (1996). Selective antimicrobial activities of *Mitracarpus scaber* Zucc. against *Candida* and *Staphylococcus* sp. *Phytomedicine*, 2(3), 265-268.

## Références bibliographiques

- [39] Benjamin, T. V., Anucha, T. C., & Hugbo, P. G. (1986). An approach to the study of medicinal plants with antimicrobial activity with reference to *Mitracarpus scaber*. *The State of Medicinal Plants Research in Nigeria*, 243-245.
- [40] Harouna, H., Faure, R., Elias, R., Debrauwer, L., Saadou, M., Balansard, G., & Boudon, G. (1995). Harounoside a pentalongin hydroquinone diglycoside from *Mitracarpus scaber*. *Phytochemistry*, 39(6), 1483-1484.
- [41] Okunade, A. L., Clark, A. M., Hufford, C. D., & Oguntimein, B. O. (1999). Azaanthraquinone: an antimicrobial alkaloid from *Mitracarpus scaber*. *Planta medica*, 65(05), 447-448.
- [42] Ekpendu, T. O. E., Adesomoju, A. A., Ekundayo, O., Okogun, J. I., & Laakso, I. (1993). Constituents of the volatile oil of *Mitracarpus scaber* Zucc. *Flavour and fragrance journal*, 8(5), 269-271.
- [43] Bisignano, G., Sanogo, R., Marino, A., Aquino, R., 'angelo, V. D., Germano, M. P., ... & Pizza, C. (2000). Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. *Letters in applied microbiology*, 30(2), 105-108.
- [44] Audoin, C., Zampalégré, A., Blanchet, N., Giuliani, A., Roulland, E., Laprévotte, O., & Genta-Jouve, G. (2018). MS/MS-guided isolation of clarinoside, a new anti-inflammatory pentalogin derivative. *Molecules*, 23(5), 1237.
- [45] Moulinier, C. (2003). Parasitologie et mycologie médicales: éléments de morphologie et de biologie. Editions Médicales Internationales, 796.
- [46] Perfect, J., Cox, G. M., Lee, J. Y., Kauffman, C. A., De Repentigny, L., Chapman, S. W., ... & Stevens, D. A. (2001). The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, 33(11), 1824-1833.
- [47]<https://alchetron.com/cdn/aspergillus-niger-088e86ff-66ec-4c25-bc2f-15233c36f00-resize-750.jpeg> . (Consulté le 07/05/2023)
- [48][https://4.bp.blogspot.com/-1jVx7WtWCFc/TfEUDn8yb\\_I/AAAAAAAAAGhc/\\_B1d91PwZ4w/s1600/Aspergillus\\_niger\\_4.jpg](https://4.bp.blogspot.com/-1jVx7WtWCFc/TfEUDn8yb_I/AAAAAAAAAGhc/_B1d91PwZ4w/s1600/Aspergillus_niger_4.jpg) (Consulté le 07-05-2023)
- [49] Yokoyama, K., Wang, L., Miyaji, M., & Nishimura, K. (2001). Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section Nigri inferred from mitochondrial cytochrome b gene. *FEMS Microbiology letters*, 200(2), 241-246.
- [50] Chabasse, D., Guiguen, C., & Contet-Audonneau, N. (1999). Mycologie médicale. Elsevier Masson. Edition MASSON, Paris, 324.

## Références bibliographiques

- [51] Leyral G., Vierling E. (2007). Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaires. 4eme édition. 290.
- [52] Masayuki M., Katsuya G. (2010). *Aspergillus: molecular biology and genomics*. Edition Caister Academic Press, Norfolk (England).
- [53] Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C., & Van Dijck, P. W. (2002). On the safety of *Aspergillus niger*—a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 59, 426-435.
- [54] Sanjay G. R. (2021). *MD Wayne State University School of Medicine*. <https://www.msdmanuals.com/fr/professional/maladies-infectieuses/mycoses/aspergillose> (Consulté le 14-06-2023).
- [55] Chu, W. S., Magee, B. B., & Magee, P. T. (1993). Construction of an SfiI macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *Journal of bacteriology*, 175(20), 6637-6651.
- [56] [https://www.infectiousdiseaseadvisor.com/wp-content/uploads/sites/16/2021/01/Candida-albicans\\_G\\_185108191.jpg](https://www.infectiousdiseaseadvisor.com/wp-content/uploads/sites/16/2021/01/Candida-albicans_G_185108191.jpg) (Consulté le 09-05-2023)
- [57] <https://img.passeportsante.net/1000x526/2021-06-04/i107944-candida-albicans.jpeg> (Consulté le 09-05-2023)
- [58] Bouchara, J. P., Pihet, M., De Gentile, L., Cimon, B., & Chabasse, D. (2010). Les levures et levuroses-Cahier de Formation, Biologie Médicale.
- [59] Gräser, Y., Volovsek, M., Arrington, J., Schönian, G., Presber, W., Mitchell, T. G., & Vilgalys, R. (1996). Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(22), 12473-12477.
- [60] Duarte, M. C. T., Figueira, G. M., Sartoratto, A., Rehder, V. L. G., & Delarmelina, C. (2005). Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 97(2), 305-311.
- [61] Sanjay G. R. (2021). *MD Wayne State University School of Medicine*. <https://www.msdmanuals.com/fr/accueil/infections/infections-fongiques/candidose> (Consulté le 10-05-2023)
- [62] Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2015). 8ème édition. *Medical Microbiology*. Elsevier Health Sciences.
- [63] Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woelverton, C. J. (2013). Microbiologie. De Boeck Supérieur.



## Références bibliographiques

- [64] Basavaraju, M., & Gunashree, B. S. (2022). *Escherichia coli*: An Overview of Main Characteristics. *Escherichia coli*.
- [65] Sabourin, C. (2022). Comment *Escherichia coli* se joue du système immunitaire. *www.pourquoidocteur.fr*. <https://www.pourquoidocteur.fr/Articles/Question-d-actu/35006-Comment-Escherichia-coli-joue-systeme-immunitaire> (Consulté le 12-05-2023)
- [66] Kreft, M. E. (2019). The Universe of *Escherichia coli* [Working Title]. In *Intech Open eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73717> (Consulté le 21/05/2023)
- Erjavec, M. S. (Ed.). (2019). *The Universe of Escherichia coli*. BoD—Books on Demand.
- [67] Gillespie, S., & Hawkey, P. M. (2006). Principles and Practice of Clinical Bacteriology. John Wiley & Sons.
- [68] Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., & Zinkernagel, R. M. (2005). Medical microbiology. Thieme.
- [69] Ryan, K. J., Ahmad, N., Alspaugh, J. A., Drew, W. L., Lagunoff, M., Pottinger, P., Reller, L. B., Reller, M. E., Sterling, C. R., & Weissman, S. (2018). *Sherris Medical Microbiology, Seventh Edition*. McGraw Hill Professional.
- [70] Minor, L. L., & Véron, M. (1989). *Bactériologie médicale*. Médecine Sciences Flammarion.
- [71] Jyothi, H., Kumar, S., & Vandana, R. (2011). Production of L-glutaminase by *Pseudomonas* VJ-6. *Research Journal of Biotechnology*, 6(3).
- [72] Rath, S., & Padhy, R. N. (2015). Surveillance of acute community acquired urinary tract bacterial infections. *Journal of Acute Disease*, 4(3), 186–195.
- [73] Delarras, C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire: Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. *Éditions Médicales Internationales, Lavoisier*.
- [74] Farzin, A., Rahman, M. M., & Mollika, F. A. (2023). *Pseudomonas aeruginosa*: The Alarming Pathogen of Hospital Acquired Infection.
- [75] Grace, D., & Fetsch, A. (2018). *Staphylococcus aureus*—A foodborne pathogen: Epidemiology, detection, characterization, prevention, and control: An overview. *Staphylococcus aureus*, 3-10.
- [76] Collins, F. (2017). *Staphylococcus aureus* – NIH Director's Blog. NIH Director's Blog. <https://directorsblog.nih.gov/tag/staphylococcus-aureus/>. (Consulté le 05-06-2023)
- [77] Chen, S., Yu, K., Ling, Q., Huang, C., Zheng, J., Cheng, Q., Zhu, M., Li, N., & Chen, M. (2014). One Case about the Diagnosis and Treatment of Right-Sided Infective Endocarditis without Any Inducement. *Case Reports in Clinical Medicine*, 3(12), 631–635.

## Références bibliographiques

- [78] Gnanamani, A., Hariharan, P., & Paul-Satyaseela, M. (2017). *Staphylococcus aureus*: Overview of bacteriology, clinical diseases, epidemiology, antibiotic resistance and therapeutic approach. *Frontiers in Staphylococcus aureus*, 4(28), 10-5772.
- [79] Stevanato, N., & da Silva, C. (2019). Radish seed oil: Ultrasound-assisted extraction using ethanol as solvent and assessment of its potential for ester production. *Industrial Crops and Products*, 132, 283-291.
- [80] Deng, Y., Wang, W., Zhao, S., Yang, X., Xu, W., Guo, M., Xu, E., Ding, T., Ye, X., & Liu, D. (2022). Ultrasound-assisted extraction of lipids as food components: Mechanism, solvent, feedstock, quality evaluation and coupled technologies – A review. *Trends in Food Science and Technology*, 122, 83–96.
- [81] Jean, B. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4ème édition. Lavoisier.
- [82] Rizk, A. M. (1982). Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterrapia. Elsevier BV Amsterdam*, 52(2), 35-42.
- [83] N'Guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G., Traoré, D., & Aké-Assi, L. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 6(1).
- [84] Bekro, Y. A., Mamyrbekova, J. A., Boua, B. B., Bi, F. T., & Ehile, E. E. (2007). Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Sciences & nature*, 4(2), 217-225.
- [85] Harborne, J. B., & Baxter, H. (1999). The handbook of natural flavonoids. John Wiley and Sons. 1838.
- [86] Crété, P. (1965). Précis de botanique. Masson, 4ème Édition, 429.
- [87] Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.
- [88] Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*, 97(4), 654-660.
- [89] Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*, 22(3), 296-302.

## Références bibliographiques

- [90] Aboh, M. I., Olayinka, B. O., Adeshina, G. O., & Oladosu, P. (2014). Antifungal activities of phyto compounds from *Mitracarpus villosus* (Sw.) DC from Abuja, Nigeria. *J Microbiol Res*, 4(2), 86-91.
- [91] Ameh, S. J., Obodozie, O., Gamaniel, K., Abubakar, M., & Garba, M. (2011). Herbal drug regulation illustrated with Niprifan® antifungal phytomedicine. *Modern Approaches to Quality Control*, 367-382.
- [92] Ouadja, B., Anani, K., Djeri, B., Ameyapoh, Y. O., & Karou, D. S. (2018). Evaluation of the phytochemical composition, antimicrobial and anti-radical activities of *Mitracarpus scaber* (Rubiaceae). *Journal of medicinal plants Research*, 12(28), 493-499.
- [93] Ben salah, I., Smaoui, A., 1, Mahmoudi, H., Ouerghi, Z. (2021). Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur les teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante chez *Ephedra alata alenda*. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 14(10), 23-30.
- [94] Thibaut, B. G., Karime, C. W., Anoubilé, B., Landry, K. A., & Barthélemy, A. K. (2020). Comparative Studies of the Phytochemical and Antioxidant activities of the leaves, stems, roots, and seeds extracts of *Mitracarpus scaber* Zucc (Rubiaceae). *Mediterranean Journal of Chemistry*, 10(7), 668-675.

## ملخص

يركز هذا العمل على دراسة النشاط المضاد للبكتيريا والفطريات في *Mitracarpus scaber* , وهو نبات يستخدم في الطب التقليدي في إفريقيا لعلاج العديد من الأمراض بما في ذلك الأمراض الجلدية.

بدأ عملنا بعملية الاستخلاص بواسطة الموجات فوق الصوتية باستخدام مذيبات ذات قطبية متزايدة (إيثر البترول ، الكلوروفورم ، أسيتات الإيثيل والميثانول) ثم الفحص الكيميائي النباتي باستخدام طرق تحليلية . بعد ذلك ، تم إجراء تحليل كمي للمركبات الفينولية الرئيسية على المستخلصات الأربعة ، وأخيرًا ، أجرينا اختبارات الحساسية بطريقة انتشار القرص.

تم الكشف عن وجود مركبات الفلافونويد, الفينولات, التربينات, الثاينيات و النثراكينون في أوراق *Mitracarpus scaber*, بينما غابت السابونوزيدات والقلويدات والستيرويدات والبروتينات.

تم تحديد إجمالي الفينولات والفلافونويدات في مستخلصات النبتة بواسطة الطرق اللونية. أظهرت النتائج محتوى معتبر من البوليفينولات و الفلافونويدات في مستخلص أسيتات الإيثيل.

أظهرت نتائج اختبارات الحساسية التي تم الحصول عليها وجود نشاط جيد للمستخلصات على السلالات المختلفة المختبرة باستثناء *Aspergillus niger* الذي طور المقاومة بعد 24 ساعة. بالنسبة لمستخلص الكلوروفورم ، يمكن أن يكون لدينا تأثير مضاد للجراثيم مع جميع تراكيز نفس المستخلص وهذا على نفس السلالة وهي *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (قطرها بين 6 و 29.5 مم) ولكن لا توجد منطقة تأثير بالنسبة ل *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. كان للمستخلص الميثانولي أكبر تأثير ويبدو أنه الأكثر فاعلية على *Candida albicans* ATCC 10231 (7.5-29 مم) و *Escherichia coli* ATCC 25922 (أكبر قطر تم الحصول عليه 22.5 مم)

**الكلمات المفتاحية:** الطب التقليدي - مضاد للبكتيريا ، مضاد للفطريات - *Mitracarpus scaber* - الاستخلاص بمساعدة الموجات فوق الصوتية .

## Summary

The present study focused on the antibacterial and antifungal activity of *Mitracarpus scaber*, a plant used in traditional African medicine for the treatment of a number of diseases, particularly skin disorders.

Our work was started with an ultrasound-assisted extraction using different solvents (petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and methanol), followed by phytochemical screening using standard analytical methods. Next, a quantitative analysis of the extracts and, finally, sensitivity tests using the disk diffusion method.

Flavonoids, polyphenols, terpenes, tannins and anthraquinones were detected in *Mitracarpus scaber* leaves, while saponosides, alkaloids, sterols and proteins were absent.

Quantification of total polyphenols and total flavonoids in extracts was performed by colorimetric methods. This step showed a content of polyphenols and flavonoids more important in the AcOEt extract.

Sensitivity tests revealed significant activity of the extracts on the various strains tested, except for *Aspergillus niger*, which developed resistance after 24h. For the chloroform extract, we found an antibacterial effect with all concentrations of the same extract on the same strain: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (diameter between 6 and 29,5mm), but no zone of inhibition on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 for this extract. However, the methanolic extract had the highest zone of inhibition and would appear to be the most effective on *Candida albicans* ATCC 10231 (7,5-29mm) and *Escherichia coli* ATCC 25922 (22.5mm largest diameter obtained on this strain).

**Key words:** Traditional medicine, Antibacterial, Antifungal, *Mitracarpus scaber*, ultrasound-assisted extraction.

## Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

**Filière : Biotechnologie**

**Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique**

### **Etude phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne d'une plante médicinale *Mitracarpus scaber***

#### **Résumé**

Le présent travail portant sur l'étude de l'activité antibactérienne et antifongique de *Mitracarpus scaber*, une plante utilisée dans la médecine traditionnelle en Afrique pour le traitement de plusieurs maladies notamment des affections cutanées.

Notre travail a été débuté par une extraction assistée par ultrasons en utilisant des solvants de polarité croissante (éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et méthanol) puis un criblage phytochimique à l'aide de méthode analytique suivi d'une analyse quantitative des extraits et pour finir nous avons fait les tests de sensibilité par la méthode de diffusion en disque sur gélose.

Des flavonoïdes, des polyphénols, des terpènes, des tanins et des anthraquinones ont été détectés dans les feuilles de *Mitracarpus scaber* alors que les saponosides, les alcaloïdes, les stérols et les protéines étaient absentes. La quantification des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux des extraits a été réalisée par les méthodes colorimétriques. Cette étape a montré un contenu en polyphénols et en flavonoïdes plus important dans l'extrait AcOEt.

Les tests de sensibilité révèlent une activité importante des extraits sur les différentes souches testées sauf pour *Aspergillus niger* qui a développé une résistance après 24h. Pour l'extrait chloroformique nous avons pu avoir un effet antibactérien avec toutes les concentrations du même extrait et cela sur une même souche qui est *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (diamètre compris entre 6 et 29,5mm) mais pas de zone d'inhibition sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pour cet extrait. Cependant l'extrait méthanolique a eu le plus de zone d'inhibition et il semblerait être le plus efficace sur *Candida albicans* ATCC 10231 (7,5-29mm) et *Escherichia coli* ATCC 25922 (22,5mm plus grand diamètre obtenu sur cette souche).

**Mot clés :** Médecine traditionnelle, Antibactérienne, Antifongique, *Mitracarpus scaber*, extraction assistée par ultrasons.

**Membre du jury :** **Encadreur: Bensaid S.O** (M-C-B- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Co-encadreur: Abdelaziz O** (M-C-B- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Examineur 1: Meghnous O** (M-C-B- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Examineur 2: Achoub H** (M-C-B) - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Présenté par :** ALASSAN Hamidou Hamza

BEY Dounia

SENE Ndeye Oumy

**Année universitaire : 2022 -2023**