



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Microbiologie

قسم الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Étude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique d'une plante Algérienne de la famille des Fabaceae

Présenté par : SEGHAOUIL Mounir

Le : 10/06/2024

Jury d'évaluation :

Président: ABDELAZIZ Ouidad (Grade MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : BENSAID Sara Ouissem (Grade MCB -U Constantine 1 Frères Mentouri)

Examineur: BELAOUIRA Randa (Grade MCB - UConstantine 1 Frères Mentouri).

Année universitaire
2023 - 2024

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Allah, le clément et le miséricordieux qui m'a donné la force et la patience de mener à bien ce modeste travail.

En second lieu, je voudrais exprimer mes sincères reconnaissances envers Mme **BENSAID Sara Ouissem**, Maître de Conférence classe B à l'université des Frères Mentouri Constantine 1, pour avoir accepté de superviser et orienter mon mémoire. Je tiens également à la remercier pour sa patience, son investissement en temps, et sa gentillesse.

Je voudrais également exprimer mes vifs remerciements à Mme **ABDLAZIZ Ouided** Maître de Conférence classe B à l'université des Frères Mentouri Constantine 1, pour le grand honneur qu'elle nous fait, en acceptant de présider le jury et Mme **BELAOUIRA Randa** Maître de Conférence classe B à l'Université des frères Mentouri Constantine 1, d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce mémoire.

Je remercie également le professeur **SEGHIRI Ramdane** pour m'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.

Je remercie sincèrement Dr **FADEL Hamza** Maître de Conférence classe A à l'Université des frères Mentouri Constantine 1, pour la récolte du matériel végétal et je n'oublie pas de remercier le Professeur **REBBAS khellaf** de l'université de M'sila pour l'identification de la plante étudiée.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers tous les membres de l'unité de recherche VARENBIOMOL, spécialement envers Mr **HAZMOUNE Hicham** et Mme **TEBBOUB Naouel**, ainsi qu'envers Mme **SEDRATI Soumia**, ingénieur du laboratoire 8 du département de microbiologie, pour leur disponibilité, leur gentillesse et leur précieuse aide.

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes chers parents, pour leurs sacrifices et leurs soutiens tout au long de mes études

À Ma mère :

qui représente pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

À Mon père :

pour ses efforts fournis jour et nuit pour mon éducation, ma formation et mon bien être.

À toute ma grande famille: SEGHAOUIL et MIZOUA mes chers amis

A mes enseignants

A tous ceux qui me sont chers Je dédie ce modeste mémoire.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	2
CHAPITRE I. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE	
I.1. Famille des Fabaceae	3
I.1.1. Description botaniques des Fabaceae	3
I.1.2. Classification des Fabaceae	4
I.1.3. Répartition géographique des Fabaceae	5
I.1.4. Utilisation traditionnelle de la famille Fabaceae.....	5
I.1.5. Intérêt biologique de la famille Fabaceae	5
I.1.6. Intérêts écologiques et économiques	6
I.1.7. Toxicité des Fabaceae.....	6
I.2. Activité Antibactérienne	7
I.2.1. Généralité.....	7
I.2.2. Catégories des bactéries (Gram positifs/ Gram négatifs)	7
I.2.3. Souches bactériennes testées.....	8
I.2.3.1. <i>Escherichia coli</i>	8
I.2.3.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
I.2.3.4. <i>Bacillus Spizizenii</i>	19
I.2.4. Nature de l'activité antibactérienne	22
I.2.5. Mode d'action contre les bactéries	22
I.3. Activité antifongique	22
I.3.1. Généralités	22
I.3.2. Souche fongique testée	23
I.3.2.1. <i>Candida albicans</i>	23
I.3.2.2. <i>Alternaria alternata</i>	26
I.3.3. Mode d'action contre les fongiques	29
I.3.3.1. Inhibition de la formation de paroi cellulaire	29

I.3.3.2. Rupture de la membrane cellulaire	30
I.3.3.3. Dysfonctionnement de la mitochondrie fongique.....	30
I.3.3.4. Inhibition de la division cellulaire	30
I.3.3.5. Inhibition de la synthèse ARN / ADN ou synthèse protéique	30
I.3.3.6. Inhibition des pompes d'efflux	30
I.4. Les Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne	31
I.4.1. Méthodes par diffusion	31
I.4.1.1. Méthodes de diffusion des disques sur milieu solide.....	31
I.4.1.2. Méthode du puits ou cylindre	31
I.4.2.3. Méthode de dilution	31

Chapitre II: Matériels et méthodes

II.4.1 Choix du matériel végétal.....	32
II.4.2. Matériel végétal	32
II.4.3. Protocole expérimental d'extraction.....	32
II.4.4. Chromatographie planaire sur Couche Mince (CCM)	34
II.2. Analyse quantitative des extraits de la plante étudiée	34
II.2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	34
II.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux	35
II.3. Évaluation des propriétés antibactériennes et antifongiques des extraits étudiée	35
II.3.1. Principe.....	35
II.3.2. Technique utilisée	36
II.3.3. Matériel biologique	36
II.3.4. Milieux de culture	36
II.3.5. Préparation de l'inoculum	36
II.3.6. Ensemencement	37
II.3.7. Préparation des différentes concentrations de l'extrait acétate d'éthyle	37
II.3.8. Imprégnation des disques	37
II.3.9. Dépôt des disques.....	37

II.3.10. Incubation	38
II.3.11. Lecture des résultats	38
Chapitre III : Résultats et discussions	
III.1.Étude phytochimique de plante étudiée.....	39
III.1.1. Rendements de l'extraction.....	39
III.1.2. Chromatographie planaire sur Couche Mince (CCM).....	40
III.2. Analyse quantitative des extraits de la plante étudiée	41
III.2.1. Dosage des polyphénols totaux	41
III.2.2. Dosages des flavonoïdes totaux.....	42
CONCLUSION GENERALE.....	50

Liste des abréviations

AcOEt : Acétate d'éthyle

AlCl₃ : trichlorure d'aluminium

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléotidique

ATCC : American type culture collection

ATP : Adénosine-Triphosphate

CCM : chromatographie sur couche mince

CHCl₃ : chloroforme

CMI : concentration minimale inhibitrice

DMSO : diméthyl-sulfoïde

EQ : équivalent de quercétine

FCR : Folin-ciocalteu

H₂S: sulfure d'hydrogène

MeOH : méthanol

µg : microgramme

µl : microlitre

µm : micromètre

mm : millimètre

nm : nanomètre

ONPG : Ortho-nitrophényl-β-galactoside

R : Rendement

Subsp : Sous-espèce

U/V : Ultra-violet

Ufc/ml : unité formant colonie /millilitre

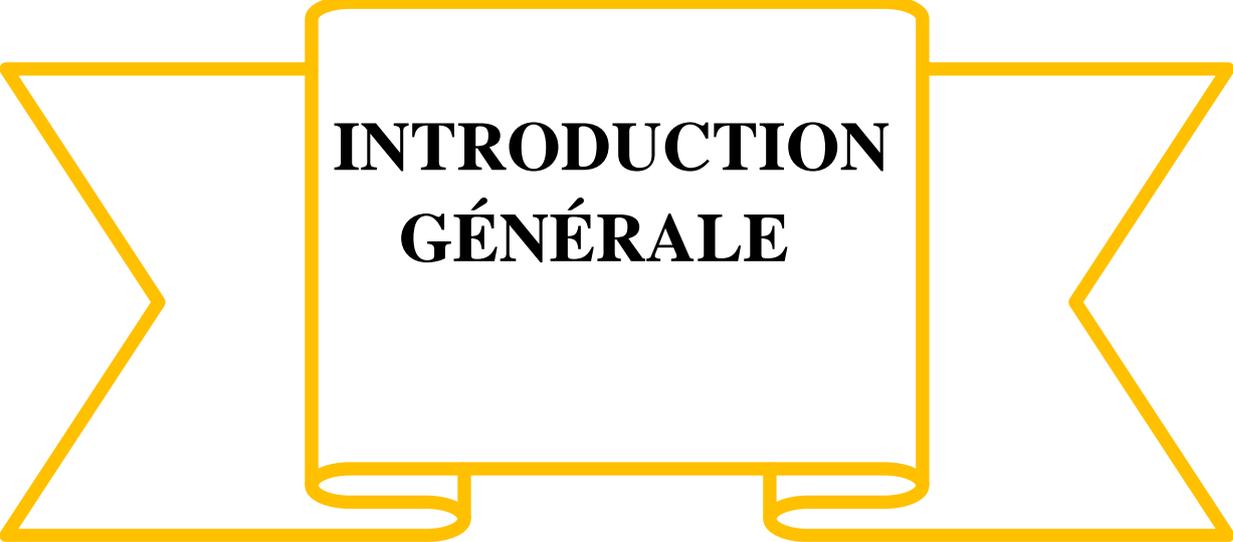
Liste des figures

Figure I.1: Carte de répartition de la famille des Fabaceae.	5
Figure I.2: <i>Escherichia coli</i> sous microscope électronique.	9
Figure I.3: <i>Escherichia coli</i> sur gélose MacConkey.....	9
Figure I.4: <i>Staphylococcus aureus</i> au microscope.....	14
Figure I.5: Aspect macroscopique de <i>Staphylococcus aureus</i>	14
Figure I.6: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en microscope.....	17
Figure I.7: Aspect macroscopique de souches de <i>Pseudomonas</i> spp. (A) observé à l'oeil nu,(B) observé sous lumière UV à 350 nm.	17
Figure I.8: Vue macroscopique et microscopique de la bactérie <i>Bacillus subtilis</i>	21
Figure I.9: <i>Candida albicans</i> observé au microscope optique.....	24
Figure I.10: <i>Candida albicans</i> on Sabouraud Dextrose Agar at 48 hours at 30C.....	25
Figure I.11: Aspect macroscopique d' <i>Alternaria alternata</i>	28
Figure I.12: Aspect microscopique d' <i>Alternaria alternata</i>	28
Figure II.1: Organigramme de l'extraction de l'espèce étudiée.	33
Figure II.2: Témoin positif antibactérien et antifongique.	37
Figure III.1 : Plaques CCM de l'extrait CHCl ₃ sous lampe UV (365 nm), UV (254 nm) et révélées avec de l'anisaldéhyde respectivement.	40
Figure III.2: Plaques CCM de l'extrait acétate d'éthyle sous lampe UV (365 nm), UV (254nm) et révélées avec de l'anisaldéhyde respectivement.	40
Figure III.3: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	41
Figure III.4: Courbe d'étalonnage de la quercétine.	42
Figure III.5: Activité antimicrobienne de l'extrait CHCl ₃ contre les souches <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> , <i>Bacillus Spizizenii</i> et <i>Candida albicans</i>	43

Figure III.6: Activité antimicrobienne de l'extrait AcOEt contre les souches <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus Spizizenii</i> et <i>Candida albicans</i>	44
Figure III.7: Activité antibactérienne de l'extrait CHCl ₃ contre les souches <i>Escherichia coli</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
Figure III.8: Activité antibactérienne de l'extrait AcOEt contre les souches <i>Escherichia coli</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
Figure III.9: Activité antifongique de l'extrait CHCl ₃ et AcOEt contre la souche <i>Alternaria alternata</i>	45

Liste des tableaux

Tableau I.1: Classification systématique des Fabaceae.....	4
Tableau I.2: Classification d' <i>Escherichia coli</i>	8
Tableau I.3: Certains caractères biochimiques d' <i>Escherichia coli</i>	10
Tableau I.4: Classification taxonomique de l'espèce <i>S. aureus</i>	12
Tableau I.5: Certains caractères biochimiques de <i>Staphylococcus aureus</i>	13
Tableau I.6 : Classification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
Tableau I.7: Classification de <i>Bacillus subtilis</i>	20
Tableau I.8: Divers tests biochimiques pour <i>B. subtilis</i>	20
Tableau I.9: Position systématique de <i>Candida albicans</i>	23
Tableau I.10: Position systématique de <i>Alternaria alternata</i>	27
Tableau III.1: Les masses et les rendements des extraits obtenus	39
Tableau III.2: Teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux des extraits de la plante étudiée.....	42
Tableau III.3: Valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition des différentes concentrations de l'extrait chloroforme vis-à-vis les six souches testées	47
Tableau III.4: Valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition des différentes concentrations de l'extrait acétate d'éthyle vis-à-vis les six souches testées.	48



**INTRODUCTION
GÉNÉRALE**

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'interaction entre les êtres humains, les animaux et les plantes remonte naturellement aux débuts de la vie sur terre. À cette époque, les plantes étaient une source vitale d'abri, d'oxygène, de nourriture et de médicaments pour les formes de vie supérieures (Mamedov, 2012).

Actuellement, les plantes médicinales sont utilisées comme remèdes pour les maladies humaines car ils en contiennent des centaines, voire des milliers de composés chimiques actifs appelés métabolites secondaires (Boudjouref *et al.*, 2018).

Les maladies infectieuses causées par les bactéries et les champignons affectent des millions de personnes dans le monde entier, et causent de lourdes pertes au niveau économique. Des recherches scientifiques ont validé l'efficacité de diverses plantes médicinales contre une gamme étendue de micro-organismes pathogènes, incluant les bactéries, les virus, les champignons et les parasites. Ces études ont joué un rôle crucial dans la prise de conscience et dans l'essor de l'utilisation des plantes médicinales dans la médecine contemporaine (Kuete et Efferth, 2010).

La famille des Fabaceae se distingue par une diversité remarquable, en faisant l'un des groupes de plantes les plus importants. Elles sont utilisées par les humains comme cultures, engrais verts et fourrages. De plus, ces plantes ont la capacité de synthétiser toute une gamme de produits naturels, dont des arômes, des colorants, et elles revêtent également une grande importance à des fins médicinales (Ahmad *et al.*, 2016).

Plusieurs recherches portant sur des espèces de cette famille ont révélé leurs propriétés antibactériennes contre diverses souches de bactéries pathogènes telles qu'*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* et *Streptocoque pyogène* (Boureghida *et al.*, 2023).

L'objectif de cette étude est de quantifier les composés polyphénoliques et flavonoïdes dans la plante étudiée, ainsi que de tester les activités biologiques des extraits organiques et mettant particulièrement l'accent sur leur activité antifongique et antibactérienne.

Dans ce contexte, notamment dans le cadre du programme de recherche sur les plantes médicinales, notre attention s'est portée sur l'étude d'une espèce médicinale faisant partie de la famille des Fabacées.

Ce travail est structuré en trois chapitres :

chapitre 1: Il se consacre à une étude bibliographique de la famille des Fabacées, abordant la description botanique, l'utilisation traditionnelle ainsi que l'intérêt biologique,

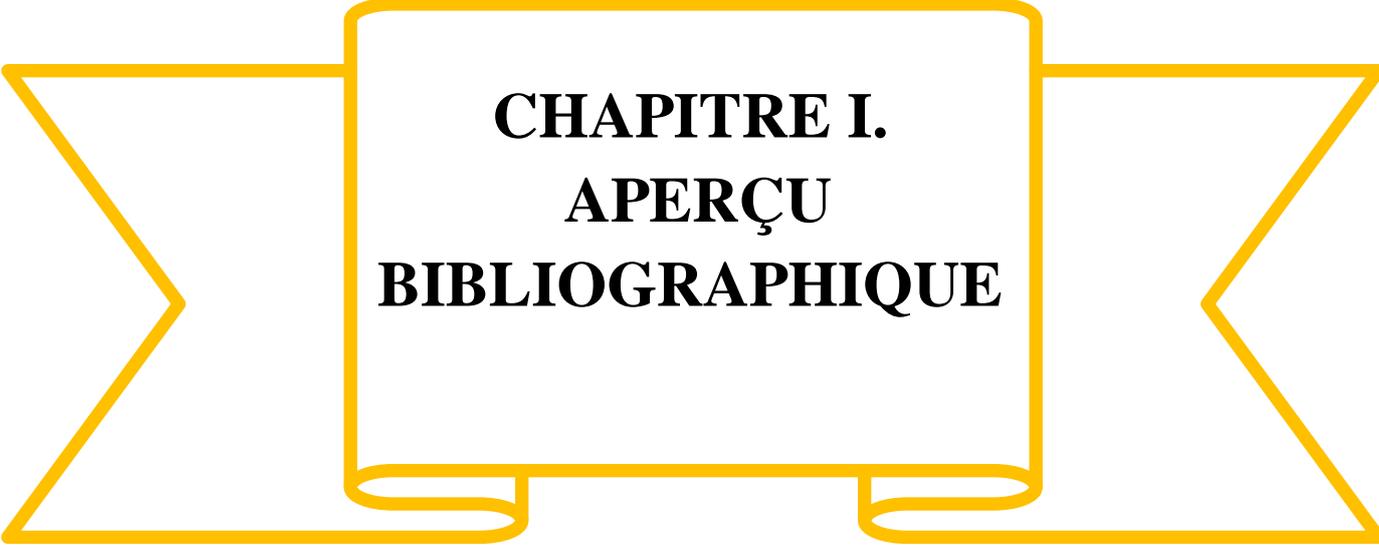
INTRODUCTION GÉNÉRALE

écologique et économique de cette famille. Ensuite, des informations détaillées sont fournies sur les souches bactériennes et fongiques testées.

chapitre 2: ce chapitre comprend tous les détails expérimentaux entrepris tout au long de ce travail: l'étude phytochimique, le dosage des composés phénoliques et flavonoïdes et l'évaluation de la sensibilité de six souches microbiennes par rapport aux différents extraits de la plante étudiée.

chapitre 3: Il est dédié à la présentation et à la discussion des résultats phytochimiques, le dosage des composés phénoliques et flavonoïdes et des tests microbiologiques effectués sur les extraits de cette plante.

Enfin, ce mémoire se conclut par une conclusion générale.

A yellow outline graphic of a banner or ribbon, centered on the page. It has a rectangular central section with rounded corners and two pointed ends extending outwards. The text is centered within the rectangular section.

**CHAPITRE I.
APERÇU
BIBLIOGRAPHIQUE**

CHAPITRE I. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

Dans le but de valoriser les plantes utilisées en médecine traditionnelle, notre travail a été réalisé sur une espèce appartenant à la famille des Fabacées.

Ce chapitre renferme des généralités bibliographiques sur la famille Fabaceae et un aperçu sur les caractéristiques des souches bactériennes et fongiques testées.

I.1. Famille des Fabaceae

Les Fabacées ou Légumineuses, avec 19500 espèces répandues dans le monde entrent après les Astéracées la seconde famille des Triporées. Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds; les formes herbacées dans les régions tempérées. Seul un carpelle persiste : il est à l'origine d'une gousse appelée (légume) par les premiers botanistes. Les Légumineuses sont remarquables par leur androcée et leur fleur souvent zygomorphe singulière (**Dupont et Guignard, 2015**).

Les Fabacées peuvent être subdivisées en 3 sous-familles des : papilionodae, caesalpinioideae et mimosoideae (**Ahmad et al., 2016**).

Cette famille présente des caractéristiques extrêmement diverses, incluant l'un des groupes les plus importants du règne végétal en raison de leur utilisation par les humains. Les légumineuses sont largement cultivées comme cultures, engrais verts et fourrages. De plus, ces plantes jouent un rôle essentiel dans la synthèse d'une variété de produits naturels tels que des arômes, des toxines, des colorants, et possèdent également une grande valeur médicinale (**Ahmad et al., 2016**).

I.1.1. Description botaniques des Fabaceae

Cette famille, l'une des plus importantes du règne végétal est caractérisée par:

- **des feuilles:** alternes, souvent composées pennées, trifoliées ou digitées, rarement entières (*Ulex*); présence de stipules, parfois plus larges que les folioles (*Pisum*), ou épineuses (*Robinia*) ; folioles parfois transformées en vrilles.
- **des fleurs :** zygomorphes, hermaphrodites; calice à 5 sépales plus ou moins soudés, parfois bilabie (*Ulex*); corole à 5 pétales typiques (1 supérieur dorsal = étendard, 2 latéraux= ailes, 2 intérieurs souvent soudés= carène) androcée à 10 étamines dont souvent 9 étamines soudées et 1 libre; gynécée à un seul carpelle et ovaire supère.
- **inflorescence:** une fleur solitaire, un racème, une ombelle ou un corymbe.
- **fruit:** une gousse (structure typique de la famille), contenant parfois peu de graines (arachide), voire une graine solitaire (pois chiche) (**Martin, 2014**).

CHAPITRE I. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

I.1.2. Classification des Fabaceae

Selon la classification réalisée en 2009, les Fabacées comportent trois sous-familles: Faboideae (Papilionoideae), Caesalpinioideae et Mimosoideae (Haston *et al.*, 2009). après de longues discussions dans la communauté phylogénétique des légumineuses, les Fabacées ont été subdivisées en six sous-familles au lieu de trois: Cercidoideae avec 12 genres et 335 espèces, Detarioideae avec 84 genres et 760 espèces, Duparquetioideae avec 1 genre et 1 espèce, Dialioideae avec 17 genres et 85 espèces, Caesalpinioideae avec 148 genres et 4400 espèces et Papilionoidea avec 503 genres et 14000 espèces (Azani *et al.*, 2017).

Tableau I.1: Classification systématique des Fabaceae (Heywood, 1996).

	Classification réalisée en 2009	Classification réalisée en 2017
Règne	Plantae	Plantae
Embranchement	Spermatophyta	Spermatophyta
Sous embranchement	Angiospermae	Angiospermae
Classe	Eudicotyledonae	Eudicotyledonae
Sous-classe	Rosidae	Rosidae
Ordre	Eurosidiae I	Eurosidiae I
Sous-ordre	Fabales	Fabales
Famille	Fabaceae (Leguminosae)	Fabaceae (Leguminosae)
Sous-famille	Faboideae Mimosoideae Caesalpinioideae	Duparquetioideae Cercidoideae Detarioideae Dialioideae Caesalpinioideae Papilionoideae

I.1.3. Répartition géographique des Fabaceae

La famille Fabaceae est cosmopolite. Elle est particulièrement concentrée dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées chaudes comme en Afrique du Sud ou le pourtour méditerranéen. Les régions tropicales abritent essentiellement des espèces ligneuses, tandis que les régions tempérées sont riches en espèces herbacées (figure I.1) (Heywood, 1996).

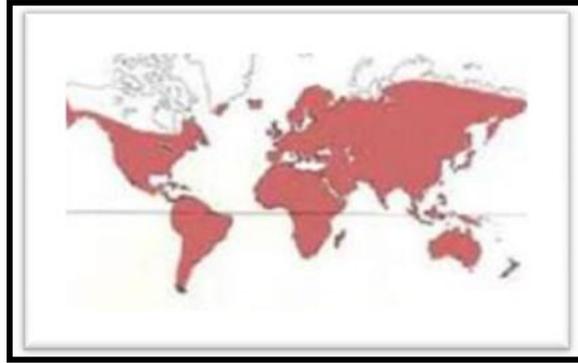


Figure I.1: Carte de répartition de la famille des Fabaceae (Heywood, 1996).

I.1.4. Utilisation traditionnelle de la famille Fabaceae

Les espèces de la famille Fabacées ont été utilisées pendant de nombreuses années dans la médecine traditionnelle pour traiter le rhumatisme, l'arthrite, l'inflammation, le néoplasme, les hémorroïdes, la bronchite, l'asthme, les infections des voies urinaires et les maladies du foie (Demir *et al.*, 2019).

I.1.5. Intérêt biologique de la famille des Fabaceae

Plusieurs activités biologiques ont été signalées pour les espèces de cette famille, y compris l'activité analgésique, anti-inflammatoire, antiulcéreuse, anticancéreuse, antidiabétique et antirhumatisme (Ahmad *et al.*, 2016).

Une étude menée sur le potentiel antimicrobien des extraits de plantes appartenant à cette famille a souligné qu'elles peuvent être considérées comme des agents antimicrobiens prometteurs. Ils ouvrent une nouvelle voie pour des recherches plus approfondies visant à trouver de nouveaux antibiotiques complémentaires contre les bactéries Gram positives et/ou négatives et les agents antifongiques (Obistioiu *et al.*, 2021).

I.1.6. Intérêts écologiques et économiques

C'est une famille qui a une grande importance économique. Les légumineuses riches en graines (jusqu'à 70% du poids sec) représentent, d'une part, une source de protéines végétales pour l'alimentation humaine : *Phaseolus* (haricots), *Pisum sativum* (pois), *Lens culinaris* (lentilles), *Vicia faba* (fève), *Cicer arietinum* (pois chiche), *Glycine max* (soja). Par ailleurs, un certain nombre d'espèces à graines oléagineuses comme l'*Arachis hypogaea* L., une herbe qui permet d'obtenir l'huile d'arachide; on consomme aussi les graines, qui sont les cacahuètes. De même, le *Glycine max* (L.) Merr. (Soja), dont l'huile est de plus en plus consommée. D'autre part, beaucoup de Fabacées sont cultivées comme plantes fourragères, destinées à l'alimentation animale, sous forme de prairies « naturelles » à *Trifolium repens* (trèfles) et *Lotus* ou « artificielles » à *Onobrychis Viciifolia* Scop. (Sainfoin), et surtout *Medicago sativa* à (luzernes) (Spichiger, 2004; Botineau, 2010).

Certains *Dalbergia* spp. d'Afrique, de Madagascar, d'Asie, produisent des bois précieux (ébène d'Afrique, palissandres, bois de rose). Alors que, certaines espèces (*Spartium junceum*, *Crotalaria juncea*, ou chanvre du Bengale) fournissent des fibres textiles d'autre part, les copals (résines) provenant en particulier du *Hymenaea courbaril* L., source du copal du Brésil, et de *H. verrucosa* Gaertn, de l'Est de l'Afrique, source du copal de Madagascar, sont utilisés dans l'industrie des vernis (Botineau, 2010).

De plus, l'agriculture utilise très largement les Fabacées dans la rotation culturale du fait de leur capacité à fixer l'azote atmosphérique grâce à leurs nodules racinaires contenant des bactéries fixatrices d'azotes (rhizobiums) (Judd, 2002). Il s'ensuit une symbiose entre la plante infestée et la bactérie : celle-ci fixe l'azote atmosphérique en empruntant l'énergie nécessaire dans les sucres fournis par la plante, et en retour, la plante utilise l'ammoniac synthétisé par la bactérie (Botineau, 2010).

I.1.7. Toxicité des Fabaceae

Des intoxications se produisent de façon directe ou indirecte par certains métabolites secondaires présents dans certaines espèces de la famille Fabacées (Botineau, 2010):

- Des intoxications hépatiques et cardio-pulmonaires, dues à la présence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques dans des espèces du genre *Crotalaria*, en particulier *Crotalaria retusa*, suite à la consommation de céréales contaminées par les graines, ou suite à l'utilisation de ces plantes pour soigner des troubles grippaux ou asthmatiques.

CHAPITRE I. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

- La principale allergie alimentaire est celle à l'arachide (*Arachis hypogaea*) à cause des allergènes présents dans les graines (cacahuètes), mais aussi dans l'huile et le beurre d'arachide.

I.2. Activité Antibactérienne

I.2.1. Généralité

Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité, Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser (**Haddouchi et Benmansour, 2008**).

Un certain nombre de bactéries sont capables de pénétrer à travers les muqueuses et la peau après des lésions cutanées ou à travers les follicules pileux, provoquant des infections bactériennes, ces infections se manifestent sous forme de purulences locales qui peuvent ensuite se généraliser sous forme d'infection sanguine.

Au cours des dernières années, les infections locales ont considérablement augmenté. Dans le passé, les antibiotiques étaient utilisés à des fins thérapeutiques, mais de nombreuses bactéries pathogènes y sont désormais résistantes à ces antibiotiques, les produits naturels issus de plantes médicinales peuvent offrir une nouvelle source d'agents antibactériens (**Brantner et Grein, 1994**).

I.2.2. Catégories des bactéries (Gram positifs/ Gram négatifs)

Les bactéries sont classées en deux familles, Gram positif et Gram négatif, caractérisées par des différences fondamentales au niveau de leurs enveloppes (**Silhavy et al., 2010**).

Les membranes internes ou cytoplasmiques des deux groupes de bactéries sont similaires (**Yeaman et al., 2003 ; Van Meer et al., 2011**). Cependant, les enveloppes externes sont significativement différentes, bien qu'elles contiennent des éléments communs tel que le peptidoglycane (**Li et al., 2017**). En effet, les bactéries Gram positives sont monodermes. Elles sont constituées d'une seule membrane entourée d'une épaisse couche de peptidoglycane. Au contraire, les bactéries Gram négatives sont didermes. Elles sont constituées de deux membranes séparées d'une fine couche de peptidoglycane (**Gupta, 1998**).

La première étape dans l'identification d'une souche bactérienne inconnue est la coloration de Gram d'une jeune culture (16-24 h) cette procédure fournit des informations utiles sur la forme et la taille des cellules, et fait la distinction entre Gram positif et Gram négatif (**Gregersen, 1978**):

a) **Les bactéries à gram positif** : apparaissent alors mauves au microscope.

b) Les bactéries à gram négatif : apparaissent alors roses au microscope.

I.2.3. Souches bactériennes testées

I.2.3.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli est décrite en 1885 par un pédiatre allemand: Theodor Escherich, dans les selles d'un enfant souffrant de diarrhée, en 1893, un vétérinaire danois postulait que l'espèce *E.coli* comprenait différentes souches certaines étant pathogènes, d'autres non. Aujourd'hui l'espèce *E. coli* se subdivise en plusieurs souches dont la plupart sont inoffensives et seules quelques-unes sont pathogènes entraînant des gastroentérites, infection urinaire, méningites ou septicémie (Mainil, 2013; Kaper *et al.* , 2004).

➤ Habitat

E.coli, un anaérobie facultatif à Gram négatif, non sporulé, est un habitant des intestins et des excréments d'animaux à sang chaud et de reptiles, *E. coli* se trouve dans le microbiote intestinal, qui comprend plus de 500 espèces de bactéries totalisant 10^{10} à 10^{11} cellules par gramme de contenu intestinal, bien que les bactéries anaérobies dans l'intestin surpassent *E.coli* de 100/1 à 10 000/1, *E. coli* est l'organisme aérobie prédominant dans le tractus gastro-intestinal, comme *E. coli* peut transiter dans l'eau et les sédiments, il est souvent utilisé comme indicateur de la pollution fécale de l'eau ; en utilisant des calculs intuitifs (Tenailon *et al.*, 2010).

➤ Position systématique

La position systématique d'*Escherichia coli* est résumée comme suivant (Basavaraju, et Gunashree, 2022) :

Tableau I.2: Classification d'*Escherichia coli* (Basavaraju, et Gunashree ,2022).

Règne	Bacteria
Embranchement	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Enterobacterales
Famille	Enterobacteriaceae
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>Escherichia coli (E. coli)</i>

➤ Caractères morphologiques

E. coli est un bacille, donc de forme cylindrique (bâtonnets) ou coccobacillaire, gram négatif, uniformément coloré, non sporulé, de 2µm à 3µm de long sur 0.7µm de large, il se présente soit seul ou groupé, le plus souvent par deux (diplobacilles), très rarement ils sont rencontrés en amas. Ils sont mobiles grâce à une ciliature péritriche (Figure I.2, I.3) (Soumaila, 2012).

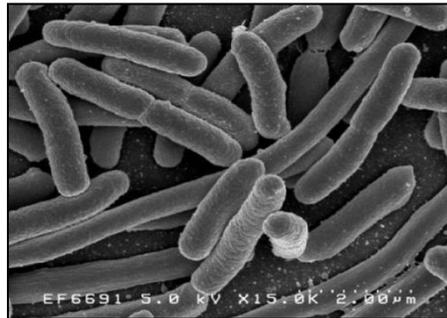


Figure I.2: *Escherichia coli* sous microscope électronique (Ignasse, 2022).



Figure I.3. *Escherichia coli* sur gélose MacConkey (AEMIP, 2019).

➤ Caractères cultureux

E. coli pousse sur milieu ordinaire à une température optimale de 37°C. Incubées 24 heures sur gélose agar à 37°C, les colonies sont convexes, lisses et incolores, elles ont en général un diamètre compris entre 1 et 3 mm avec une structure granulaire et une marge intacte. La surface est brillante et la consistance gluante (Soumaila, 2012).

➤ Caractères biochimiques

L'espèce *Escherichia coli* possède des caractères biochimiques spécifiques permettant de la distinguer. Les principales caractéristiques se représentent dans le tableau suivant :

CHAPITRE I. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau I.3:Certains caractères biochimiques d'*Escherichia coli* (Soumaila, 2012).

Caractère	<i>Escherichia coli</i>
Rouge de méthyle	+
Désaminase	-
Voges-Proskauer	-
Lactose	+
ONPG	+
Mannitol	+
Production d'Indole	+++
Uréase	-
Acétoïne	-
Utilisation du citrate	-
Production de H ₂ S	-
Gaz à partir de glucose	+
Saccharose	+
Salicine	+

(+) : Résultat positif (-) : Résultat négatif

➤ Le pouvoir pathogène

Les souches d'*Escherichia coli* peuvent provoquer des pathologies :

- extra-intestinales : infections urinaires, diverses infections intra-abdominales, pulmonaires, cutanées et des tissus mous, méningite du nouveau-né (MNB) et bactériémie;
- intestinales: diverses formes de diarrhée, y compris le syndrome hémolytique et urémique (SHU).

Ces infections peuvent être très fréquentes (infections urinaires), associées à une morbidité élevée (insuffisance rénale dans le SHU de l'enfant, séquelles neurologiques dans le MNB) et à une mortalité élevée (~15% dans les bactériémies). L'incidence des infections

CHAPITRE I. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

extra-intestinales augmente chez l'homme, et nous connaissons régulièrement de grandes épidémies de SHU, comme celle de 2011 en Europe (**Denamur et al., 2021**).

➤ **Diagnostic bactériologique**

E. coli est une entérobactérie, c'est - à - dire qu'il s'agit d'un bacille à Gram négatif, oxydase négative, aéroanaérobie, cultivant rapidement sur milieux ordinaires, fermentant le glucose avec production de gaz, possédant une nitrate réductase (**Berche et al., 1988**).

➤ **Traitement**

E. coli reste dans l'ensemble sensible aux principaux antibiotiques tels que l'ampicilline et les aminosides, la colistine tétracyclines et le triméthoprim - sulfaméthoxazole. Cependant, un certain nombre de souches peuvent acquérir des résistances multiples aux antibiotiques. Le choix de l'antibiothérapie dépend essentiellement de la sensibilité *in vitro* de la souche isolée et des propriétés pharmacologiques des antibiotiques en fonction de la localisation de l'infection.

Le traitement des diarrhées à *E. coli* est essentiellement basé sur la réhydratation du malade.

Le traitement est habituellement basé sur l'utilisation d'un seul antibiotique non résorbable par la muqueuse digestive et administré par voie buccale. Les dérivés des furanes ou certains sulfamides sont habituellement utilisés avec succès.

Le traitement des infections urinaires vise à stériliser les urines rapidement et à éviter les surinfections ou les rechutes. Il est nécessaire d'utiliser des antibiotiques bactéricides à bonne diffusion urinaire, tels que notamment le triméthoprim - sulfaméthoxazole, les dérivés des quinolones ou l'ampicilline. La durée du traitement est d'au moins 7 jours pour une cystite et doit être prolongé en cas de pyélonéphrite (15-21 jours).

Enfin les septicémies à *E. coli* doivent être traitées en urgence par voie parentérale, en utilisant au moins deux antibiotiques bactéricides et synergiques tels que l'association d'un aminoside (gentamycine) et d'une pénicilline type ampicilline. La durée de ce traitement est en général prolongée 2 à 3 semaines (**Berche et al., 1988**).

I.2.3.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une espèce à Gram positif qui forme des grappes irrégulières ressemblant à des raisins. Il est immobile, non sporulé et catalase positif, Il se développe rapidement et abondamment dans des conditions aérobies (**Foster, 2002**).

CHAPITRE I. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

Il existe plusieurs méthodes pour identifier *S. aureus*, par exemple la réaction en chaîne de la polymérase et l'hybridation in situ par fluorescence de l'acide nucléique peptidique, bien que la plus connue et la plus utilisée soit la culture bactérienne (**Ondusko et Nolt, 2018**).

➤ **Habitat**

L'habitat naturel de *Staphylococcus aureus* chez l'homme est la peau et le nasopharynx, Cela peut provoquer une grande variété d'infections touchant la peau et les tissus mous, les sites endovasculaires et les organes internes (**Foster, 2002**). Chez les animaux endothermes, les niches écologiques naturelles de cette espèce sont la cavité nasale et la peau (**Charlier et al., 2009**).

➤ **Position systématique**

Tableau I.4:Classification taxonomique de l'espèce *S. aureus* (**Gajdacs, 2019**).

Règne	Bacteria
Phylum	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Bacillales
Famille	Staphylococcaceae
Genre	<i>Staphylococcus</i>
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

➤ **Caractères biochimique**

Les caractéristiques biochimiques de *S. aureus* se représentent dans le tableau suivant:

CHAPITRE I. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau I.5: Certains caractères biochimiques de *Staphylococcus aureus* (Bhunja, 2008).

Caractère	<i>Staphylococcus aureus</i>
Catalase	+
Coagulation	+
Hémolyse	+
Sensibilité à la lysostaphine	+
Production de l'hyaluronidase	+
Production de thermonucléase	+
Mannitol	+
Acétoïne	+
Glucose	+

(+) : **Résultat positif** (-) : **Résultat négatif**

➤ **Caractères morphologiques**

Staphylococcus aureus est une bactérie cocci à Gram positif (1 µm de diamètre) qui se présente au microscope comme des grappes de raisin en raison de trois divisions planes incomplètes. Ils ne sont pas sporulés, ne sont pas mobiles et produisent des colonies jaune doré. La paroi cellulaire de *S. aureus* contient trois composants principaux : le peptidoglycane comprenant des unités répétitives de *N*-acétylglucosamine β-1,4 liées à l'acide *N*-acétylmuramique et la protéine A, qui est liée de manière covalente au peptidoglycane (Figure I.4, I.5) (Bhunja, 2008).

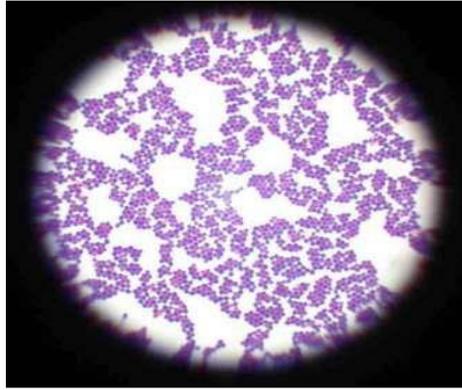


Figure I.4: *Staphylococcus aureus* au microscope (Mahmoud, 2020).



Figure I.5: Aspect macroscopique de *Staphylococcus aureus* (Chen, 2014).

➤ Le pouvoir pathogène

Staphylococcus aureus est l'un des pathogènes bactériens les plus répandus, provoquant un nombre difficile à estimer d'infections cutanées non compliquées et probablement de centaines de milliers à des millions d'infections invasives plus graves dans le monde chaque année. C'est l'un des principaux agents responsables de pneumonies et d'autres infections des voies respiratoires, d'infections du site chirurgical, de prothèses articulaires et d'infections cardiovasculaires, ainsi que de bactériémies nosocomiales.

La bactériémie à *S. aureus* est responsable d'un plus grand nombre de décès que le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), la tuberculose et l'hépatite virale.

D'autres infections, comme les infections cutanées modérément graves, y compris les furoncles, les abcès et les infections de plaies, ne mettent généralement pas la vie en danger, mais peuvent s'accompagner d'une morbidité et d'une douleur importantes (Cheung *et al.*, 2021).

➤ Diagnostic bactériologique

Le diagnostic d'une infection à *staphylocoque* repose essentiellement sur la mise en évidence du germe dans les produits pathologiques par l'examen microscopique direct et l'isolement en culture (**Berche et al., 1988**).

➤ Traitement

Les infections à staphylocoques posent des problèmes thérapeutiques parfois difficiles du fait de la fréquence des souches polyrésistantes aux antibiotiques. Près de 90% des souches de *S. aureus* sont résistantes à la pénicilline G, et un pourcentage parfois important de souches résistent à d'autres antibiotiques tels que les tétracyclines (60 à 80 %) l'érythromycine, la lincomycine, voire les aminosides. Ces résistances sont en règle de nature plasmidique, dues à la sécrétion d'enzymes qui inactivent les antibiotiques avant qu'ils ne puissent détruire les bactéries (pénicillinases...).

Un autre type de résistance, d'origine chromosomique, est lié à une modification du site d'action de l'antibiotique. Il en est ainsi pour la résistance à la méticilline (20-30% des souches de *S. aureus*), qui entraîne une résistance croisée *in vivo* à toutes les autres pénicillines et céphalosporines.

Enfin, certaines souches de *S. aureus* sont dites tolérantes à la méticilline, par déficit des enzymes autolytiques. Ces souches nécessitent, pour être lysées des concentrations d'antibiotiques très nettement supérieures aux concentrations inhibitrices bactériostatiques. Il existe enfin une sensibilité pratiquement constante de *S. aureus* à la vancomycine, à la pristinamycine et à la rifampicine (**Berche et al., 1988**).

I.2.3.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie Gram-négative, en forme de bâtonnet, asporogène et monoflagellée. Elle a un aspect perlé et une odeur de raisin ou de tortilla.

P. aeruginosa se développe entre 25 et 37 °C, et sa capacité à se développer à 42 °C permet de la distinguer de nombreuses autres espèces de *Pseudomonas*. *P. aeruginosa* est un microorganisme omniprésent qui a la capacité de survivre dans des conditions environnementales variées. Il provoque des maladies non seulement chez les plantes et les animaux, mais aussi chez l'homme, causant de graves infections chez les patients immunodéprimés atteints de cancer et chez les patients souffrant de brûlures graves et de fibrose kystique (**Wu et al., 2015**).

CHAPITRE I. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

➤ Habitat

Les bacilles à Gram négatif du genre *Pseudomonas* sont des habitants communs du sol, de l'eau douce et des environnements marins (**Michel-Briand et Baysse ,2002**).

Le bacille pyocyanique, ou *Pseudomonas aeruginosa*, est une bactérie saprophyte de l'environnement, qui peut cependant vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et des animaux (**Veron ,1983**).

➤ Position systématique

Tableau I.6 :Classification de *Pseudomonas aeruginosa* (**Merradi, 2021**).

Domaine	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Pseudomonadales
Famille	Pseudomonadaceae
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

➤ Caractères biochimique

Les espèces de *Pseudomonas* sont des bactéries chimio-organotrophes avec un métabolisme strictement respiratoire, qui utilisent l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons en aérobiose. Elles sont oxydase positive, pour certaines espèces elles réduisent le nitrate en anaérobiose avec synthèse d'une nitrate-réductase. Elles sont aussi caractérisées par la diversité des substrats hydrocarbonés utilisés comme source de carbone et d'énergie (**avril et al., 2000**).

➤ Caractères morphologiques

P. aeruginosa a la structure générale des bacilles Gram négatif, mais la membrane externe de sa paroi est décollée du peptidoglycane, la liaison entre ces deux feuillets étant assurée par des lipoprotéines. Autour du noyau et du cytoplasme, on observe de l'intérieur vers l'extérieur :

CHAPITRE I. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

- la membrane cytoplasmique, qui contient entre autres la majorité des enzymes de phosphorylation et les aldoses deshydrogénases responsables du métabolisme oxydatif des sucres;
- le peptidoglycane ou muréine, feuillet résistant, assurant la forme de la cellule (équilibre avec la pression osmotique interne), et constituant une sorte de grillage à mailles grossières autour de la membrane cytoplasmique;
- l'espace périplasmique, qui contient des enzymes périplasmiques capables d'hydrolyser divers composés ou macromolécules;
- enfin la membrane de la paroi et les constituants superficiels, structures particulièrement importantes puisqu'elles sont en contact avec le milieu extérieur et sont donc responsables de diverses propriétés biologiques de la bactérie (Figure I.6, I.7) (Veron ,1983).



Figure I.6: *Pseudomonas aeruginosa* en microscope (ScholarRx, 2022).



Figure I.7: Aspect macroscopique de souches de *Pseudomonas* spp. (A) observé à l'œil nu, (B) observé sous lumière UV à 350 nm (Tihar, 2021).

➤ Le pouvoir pathogène

Pseudomonas aeruginosa est devenu un agent pathogène important au cours des deux dernières décennies. Il provoque entre 10070 et 20070 infections dans la plupart des hôpitaux.

CHAPITRE I. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

Les infections à *Pseudomonas* sont particulièrement fréquentes chez les patients souffrant de brûlures, de fibrose kystique, de leucémie aigüe, de greffes d'organes et de toxicomanie par voie intraveineuse (**Bodey et al., 1983**).

Les infections à *P. aeruginosa* peuvent être classées en deux catégories :

- **Infection communautaire** : principalement broncho - pneumopathie évoluant sur un mode chronique dans la mucoviscidose et les dilatations de bronches ; otite externe (dont formes malignes), endophtalmie après traumatisme.
- **Infection nosocomiale** : pneumopathie acquise sous ventilation mécanique (PAVM), infection ostéoarticulaire sur matériel, infection urinaire sur sonde, infection cutanée secondaire à des brûlures, bactériémie sur matériel (**Chagneau et al., 2022**).

➤ Diagnostic bactériologique

La diagnostique bactériologique repose sur l'isolement du bacille pyocyanique par culture. Le germe peut être facilement isolé à partir du revêtement cutané-muqueux ou il s'est implanté: frottis cutanés, plaies chirurgicales, selles, urine, etc. Sous les formes disséminées, on peut également le mettre en évidence dans le sang ou à partir d'une cavité fermée et de tissus (méninges, articulations, abcès, biopsies osseuse). (**Berche et al., 1988**).

➤ Traitement

La pneumonie à *P. aeruginosa* est souvent une maladie grave qui met en jeu le pronostic vital. La prise en charge de cette infection représente un défi thérapeutique difficile pour les médecins des soins intensifs, car le niveau croissant de résistance de ces microorganismes à la plupart des classes d'agents antimicrobiens conduit fréquemment à un échec clinique.

La gamme d'antibiotiques traditionnels dotés d'une activité antipseudomonas comprend les aminosides, la ticarcilline, les uréidopénicillines, la ceftazidime, le céfépime, l'aztréonam, les carbapénèmes (à l'exception de l'ertapénème), la ciprofloxacine et la lévofloxacine.

Le choix d'antibiotiques adéquats est crucial pour augmenter le taux de survie. La nouvelle génération d'antibiotiques ne semble pas offrir d'avantages significatifs par rapport à

CHAPITRE I. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

l'arsenal traditionnel d'agents antimicrobiens. Pour les patients infectés par des souches multirésistantes, il existe très peu d'options cliniques. La colistine est apparue comme une alternative viable pour les patients infectés par ces souches. Pour savoir si la thérapie combinée avec la colistine offre des avantages supérieurs à la monothérapie, il faudra procéder à de futurs essais randomisés (El Solh et Alhajhusain ,2009).

I.2.3.4. *Bacillus Spizizenii*

Bacillus subtilis subsp. *spizizenii* est une sous-espèce de *B. subtilis* subsp. *subtilis*, elle portait son nom du bactériologiste américain J. Spizizen, dont les études fondamentales sur *B. subtilis* ont fait de cette espèce un organisme modèle de la génétique bactérienne.

Les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques sont les mêmes que celles de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (Nakamura *et al.*, 1999).

Bacillus subtilis est un bacille étiré et enchaîné d'une taille de 0,8-0,7/2-3 µm, gram positif, aérobic, non encapsulé, mobile et porteur de spores, largement répandu dans la nature. Les colonies de cette bactérie ont une surface blanche ou légèrement jaunâtre, rugueuse et opaque, et se développent à des températures mésophiles comprises entre 25 et 35 °C. En outre, sa forme active se présente généralement sous la forme de spores. Grâce à ses spores, elle dispose d'un ensemble de stratégies qui lui permettent de survivre dans des conditions difficiles. Par exemple, la formation d'endospores contre le stress permet à la bactérie d'être compatible avec la pauvreté alimentaire, les situations acides, alcalines ou osmotiques, ou les conditions oxydatives de la chaleur ou de l'éthanol (Saleh *et al.*, 2014).

➤ **Habitat**

B. subtilis peut être isolé dans de nombreux environnements terrestres et aquatiques, ce qui donne l'impression que cette espèce est omniprésente et largement adaptée à la croissance dans divers environnements de la biosphère (Earl *et al.*,2008) .

CHAPITRE I. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

➤ Position systématique

Tableau I.7: Classification de *Bacillus subtilis* (Kovács ,2019).

Règne	Bacteria
Phylum	Firmicutes
Ordre	Bacillales
Famille	Bacillaceae
Genre	<i>Bacillus</i>
Espèce	<i>Bacillus subtilis</i>

➤ Caractères biochimique

Tableau I.8: Divers tests biochimiques pour *B. subtilis* (Saleh et al., 2014).

Caractère	<i>Bacillus subtilis</i>
Mobilité	+
Utilisation du citrate	+
Voges-Proskauer	+
Uréase	-
Production d'Indole	-
Maltose	+
Xylose	+
Glucose	+

(+) : **Résultat positif**

(-) : **Résultat négatif**

➤ Caractères morphologiques

Bacillus subtilis est une bactérie Gram positive en forme de bâtonnet capable de former des endospores. La forme générale du bâtonnet de *B. subtilis* est maintenue pendant la croissance végétative et la sporulation. Au cours de la croissance végétative, les cellules de *B. subtilis* s'étendent le long de l'axe long tout en maintenant une épaisseur constante de la paroi cellulaire et, contrairement aux cellules d'*Escherichia coli*, un diamètre cellulaire constant. La division cellulaire implique la synthèse d'une paroi transversale (septum) au milieu de la cellule, qui est ensuite clivée pour permettre la séparation des deux cellules filles (Carballido-López, 2007).

Les populations de *B. subtilis* poussent sur une surface d'agar, elles peuvent avoir des changements profonds dans l'architecture des colonies en fonction de la composition du milieu, la température d'incubation et la teneur en gélose du milieu solide (Figure I.8) (Aguilar *et al.*, 2007).



Figure I.8: Vue macroscopique et microscopique de la bactérie *Bacillus subtilis* (Rani et Singh, 2021)

➤ Le pouvoir pathogène

B. subtilis est une bactérie non pathogène qui existe en tant que flore normale dans le système gastro-intestinal humain. Peu de rapports ont été présentés sur la pathogénèse de *B. subtilis* chez l'homme:

- elle produit une toxine extracellulaire appelée Subtilisine qui provoque des réactions allergiques chez l'homme;
- cette bactérie peut contaminer les aliments, mais elle est rarement à l'origine d'intoxications alimentaires;

CHAPITRE I. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

- quelques rapports ont également été présentés sur l'endocardite chez les nourrissons;
- chez les patients dont le système immunitaire est affaibli, il provoque une bactériémie;
- il s'agit de l'un des principaux facteurs de contamination des milieux de laboratoire;
- dans les hôpitaux, elle est considérée comme l'un des agents pathogènes de l'infection nosocomiale ; par exemple, les patients subissant une intervention chirurgicale peuvent être infectés par des infections secondaires dues à la propagation des spores de cette bactérie (Saleh *et al.*, 2014)..

I.2.4. Nature de l'activité antibactérienne

- **Une activité létale (bactéricide)** :c'est la propriété de tuer les bactéries dans des conditions définies.
- **Une inhibition de la croissance (bactériostatique)** :c'est l'inhibition momentanée de la multiplication d'une population (Hammer *et al.*, 1999).

I.2.5. Mode d'action contre les bactéries

Les extraits possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches bactériennes, mais d'une manière générale leur action se déroule en trois phases (Dorman, 2000):

- attaque de la paroi bactérienne par l'extrait végétal, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

I.3. Activité antifongique

I.3.1. Généralités

La découverte d'agents antifongiques possédant une activité sélective contre la cellule fongique eucaryote reste un défi scientifique important. Le besoin médical croissant d'agents antifongiques sûrs et efficaces découle de l'augmentation rapide des mycoses systémiques opportunistes (Oh *et al.*, 2000).

CHAPITRE I. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

Les plantes produisent un grand nombre de métabolites secondaires, dont beaucoup ont une activité antifongique. De même, la médecine traditionnelle a utilisé de nombreux extraits de plantes pour traiter les infections fongiques et beaucoup d'entre eux ont été testés pour leur activité antifongique *in vitro*. Sachant que les plantes développent leur propre défense contre les pathogènes fongiques, elles apparaissent comme une source intéressante de composés antifongiques (Aqil *et al.*, 2010).

I.3.2. Souche fongique testée

I.3.2.1. *Candida albicans*

C. albicans est un pathogène opportuniste qui existe comme commensal chez la plupart des individus. Bien qu'il puisse provoquer des infections superficielles, son importance médicale majeure réside dans le fait qu'il est un pathogène grave des hôtes immunodéprimés. Outre son importance médicale, il possède deux propriétés biologiques très intéressantes : sa capacité à passer d'une morphologie cellulaire de levure à une morphologie cellulaire mycélienne et sa capacité à subir une transition phénotypique (Chu *et al.*, 1993).

➤ Habitat

Candida albicans est un champignon commensal dimorphe habituellement présent dans les plantes saines, la peau humaine, les muqueuses et le tractus génital (Kashem et Kaplan, 2016).

➤ Position systématique

Tableau I.9: Position systématique de *Candida albicans* (Benmansour, 2012).

Règne	Champignon
Division	Eumycota
Phylum	Deuteromycotina
Classe	Blastomycete (levures asexuées)
Ordre	Moniliales
Famille	Moniliaceae
Genre	<i>Candida</i>
Espèce	<i>Candida albicans</i>

➤ Caractères biochimique

Cette espèce possède la propriété de fermenter le glucose et le maltose, mais pas le lactose, ni le raffinose, ni le saccharose. La fermentation du tréhalose est irrégulière. Il existe également dans ces cellules des activités enzymatiques de type phosphatase, oxydase, catalase et peroxydase (Reiss *et al.*, 1992).

➤ Caractères morphologiques

C. albicans se présente le plus souvent sous forme de levure ou de filament. Les levures sont des cellules ovales bourgeonnantes uniques, d'un diamètre de plusieurs microns. En revanche, les filaments sont des cellules allongées attachées bout à bout. Les filaments hyphales ont généralement un diamètre d'environ 2 µm, ont des parois parallèles et ne présentent pas de constriction au niveau des jonctions septales. Par contre, les filaments pseudohyphes, en revanche, ont généralement un diamètre un peu plus large (2,8 µm), n'ont pas de parois parallèles et présentent des constriction au niveau des jonctions septales.

On sait que les cellules de *C. albicans* subissent une transition morphologique réversible de la levure aux pseudohyphes et aux filaments hyphes en réponse à une variété de signaux environnementaux, dont beaucoup se trouvent dans l'hôte. Ces indices comprennent la température corporelle (37 °C), le sérum, un rapport CO₂/O₂ élevé, un pH supérieur à 6,5, les alcools, certains acides aminés (par exemple, la proline) et une variété d'hormones humaines.

Les chlamydospores représentent la troisième morphologie de *C. albicans*. Ces cellules sont plus rondes et plus grandes que les levures, ont des parois très épaisses et se forment généralement à l'extrémité des filaments hyphales en réponse à des niveaux réduits de nutriments dans le milieu de croissance (Kadosh, 2017).

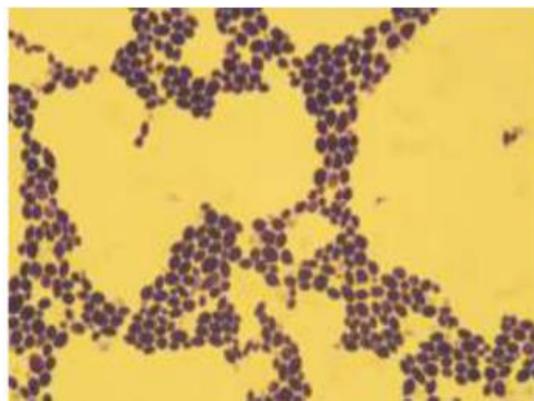


Figure I.9: *Candida albicans* observé au microscope optique (Arzmi *et al.*, 2015).



Figure I.10: *Candida albicans* on Sabouraud Dextrose Agar at 48 hours at 30C (Yuri, 2009).

➤ Le pouvoir pathogène

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 (Moulinier, 2003).

➤ Diagnostic de la candidose

Le diagnostic d'une infection à *candida* se fait soit par examen microscopique, soit par culture :

Pour l'identification par microscopie optique, un grattage ou un écouvillon de la zone affectée est placé sur une lame de microscope. Une seule goutte de solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à 10 % est ensuite ajoutée à l'échantillon. Le KOH dissout les cellules de la peau mais laisse les cellules de *Candida* intactes, ce qui permet de visualiser les pseudohyphes et les cellules de levure bourgeonnantes typiques de nombreuses espèces de *Candida*.

• Pour la méthode de culture: un écouvillon stérile est frotté sur la surface de la peau infectée. L'écouvillon est ensuite strié sur un milieu de culture. La culture est incubée à 37 °C pendant plusieurs jours, pour permettre le développement de colonies de levure. Les caractéristiques (telles que la morphologie et la couleur) des colonies peuvent permettre un premier diagnostic de l'organisme à l'origine des symptômes de la maladie (Shrivastava ,2021).

➤ Traitement de la candidose

En milieu clinique, la candidose est généralement traitée par des antimycotiques. Les antifongiques couramment utilisés pour traiter la candidose sont le clotrimazole topique, la nystatine topique, le fluconazole et le kétoconazole topique. Par exemple, une dose unique de

CHAPITRE I. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

fluconazole (comprimé de 150 mg pris par voie orale) a été signalée comme étant efficace à 90 % pour traiter une infection vaginale à levures. Cette dose n'est efficace que pour les infections vaginales à levures, et d'autres types d'infections à levures peuvent nécessiter un dosage différent. Dans les infections graves, l'amphotéricine B, la caspofungine ou le voriconazole peuvent être utilisés. Le traitement local peut comprendre des suppositoires vaginaux. Le violet de gentiane peut être utilisé pour le muguet de l'allaitement, mais lorsqu'il est utilisé en grande quantité, il peut provoquer des ulcérations de la bouche et de la gorge chez les bébés qui allaitent, et a été lié au cancer de la bouche chez l'homme et au cancer du tube digestif d'autres animaux (Shrivastava ,2021).

I.3.2.2. *Alternaria alternata*

Alternaria alternata, l'espèce la plus courante du genre *Alternaria*, est un champignon dont les spores sont présentes dans le monde entier dans deux environnements principaux. Tout au long de l'année, les spores sont présentes dans les constituants organiques du sol. Du printemps à l'automne, elles deviennent aéroportées et sont donc encore plus omniprésentes. Habituellement considéré comme un contaminant saprophyte, l'*Alternaria* est aujourd'hui considéré comme responsable d'un certain nombre de maladies. En outre, l'*Alternaria* est un allergène important, et le rôle des allergies à l'*Alternaria* dans le développement et l'exacerbation de l'asthme est de plus en plus reconnu par la médecine. (Kustrzeba-Wójcicka *et al.*, 2014).

➤ **Habitat**

Les champignons *A. alternata* sont présents de manière cosmopolite dans divers environnements, où ils obtiennent des nutriments de deux manières. Les espèces saprophytes se trouvent dans les plantes, dans le sol et dans les denrées alimentaires. Les espèces parasites s'attaquent aux plantes, aux animaux et à l'homme, provoquant le développement de l'alternariose.

Les conditions d'humidité de 84-89 et 97 % facilitent à la fois la croissance du champignon *A. alternata* et la production de mycotoxines. Les spores ont besoin d'un climat sec, chaud et venteux pour être transportées dans l'air et se disséminer, de sorte que le nombre de spores dans l'air atteint son maximum pendant les après-midi ensoleillés de la fin de l'été et du début de l'automne, et tombe à zéro pendant l'hiver. Bien qu'*A. alternata* puisse survivre à des températures comprises entre 2 et 32 °C, sa température optimale se situe aux alentours de 20 °C (Kustrzeba-Wójcicka *et al.*, 2014).

➤ Position systématique

Tableau I.10: Position systématique de *Alternaria alternata* (Kustrzeba-Wójcicka et al., 2014).

Règne	Fungi
Phylum	Ascomycota
Classe	Dothideomycetes (Euascomycetes)
Ordre	Pleosporales
Famille	Pleosporaceae
Genre	<i>Alternaria</i>
Espèce	<i>Alternaria alternata</i>

➤ Caractères biochimique

L'*Alternaria alternata* est un champignon nécrotrophe connu pour causer des maladies chez diverses plantes, notamment les crucifères comme le brocoli et le chou, ce champignon produit des mycotoxines qui jouent un rôle crucial dans sa pathogénicité. des études biochimiques ont montré que les isolats résistants au procymidone présentent une croissance mycélienne et une sporulation réduites par rapport aux isolats sensibles, de plus, ces isolats présentent souvent une résistance croisée à d'autres fongicides comme le fludioxonil et l'iprodione (Wang et al., 2021).

➤ Caractères morphologiques

A. alternata, qui appartient à la famille des moisissures noires pigmentées qui doivent leur teinte à la mélanine, forme des colonies à croissance rapide dans des couleurs sombres allant du gris au brun olive. Les surfaces des colonies matures peuvent paraître « floues », « duveteuses à laineuses » ou « semblables à du daim » (Kustrzeba-Wójcicka et al., 2014).

Les observations microscopiques montrent que les hyphes bruns septés forment des conidiophores également septés. Les conidies, isolées ou formant des chaînes, sont simples et grandes, avec une taille de 45-50×36µm. Il a été noté que, dans les habitats naturels, les conidies sont plus grandes, plus uniformes et ont des extrémités allongées par rapport à celles cultivées sur milieu gélosé. Les extrémités sont plus courtes dans les conidies cultivées dans des conditions plus fraîches et plus sèches. Les cellules sont entourées de parois cellulaires constituées de chitine et de β-1,3-glucanes.

CHAPITRE I. APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE

A. alternata produit des spores sèches et relativement grandes ($25-56 \times 8-17 \mu\text{m}$) qui ressemblent à un bec, sont allongées et cloisonnées transversalement. Les spores se séparent du conidiophore dans l'air sec, à la fois passivement et sous l'influence de rafales de vent plus fortes. Comme le note Rotem, il est difficile de distinguer une espèce d'*Alternaria* des autres car « les différences microscopiques entre les espèces d'*Alternaria* ne sont pas significatives, et le caractère de chaque espèce varie en fonction des conditions de croissance ». Les mesures suivantes s'appliquent généralement : largeur maximale de la spore de 5-13 à 6-24 nm, avec une moyenne de 9 à 17 nm ; longueur de la spore de 16-37 à 35-110 nm, avec une moyenne de 37 à 69 nm ; nombre de sept transversaux de 0 à 23 ; longueur du bec de 4 à 90 nm ; et longueur du conidiophore de 20 à 300 nm (Figure I.11,12) (Kustrzeba-Wójcicka *et al.*, 2014).



Figure I.11: Aspect macroscopique d'*Alternaria alternata* (Laurence, 2012).

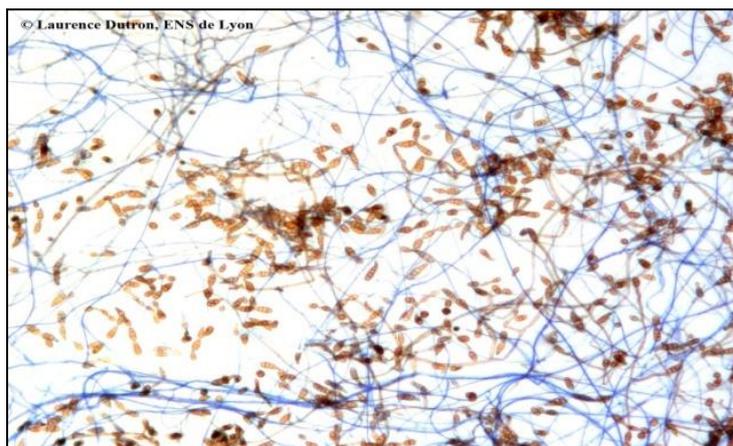


Figure I.12: Aspect microscopique d'*Alternaria alternata* (Laurence, 2012).

➤ **Le pouvoir pathogène**

Alternaria se trouve généralement dans les fruits et légumes frais, il peut parfois être présent dans les conserves, les jus ou les sauces préparés à partir de produits endommagés. Les espèces d'*Alternaria* produisent de nombreux métabolites toxiques pour les plantes, dont certains sont également toxiques pour les animaux et les humains.

Des études ont montré que les allergies dues à *Alternaria* varient selon les régions géographiques (**Kustrzeba-Wójcicka et al., 2014**).

L'agent pathogène *Alternaria* provoque principalement deux maladies sur les agrumes: la maladie des taches brunes et la pourriture noire, ces deux maladies commencent par des taches nécrotiques d'une coloration brune foncée à noire sur le fruit et se manifestent par des taches nécrotiques noires sur les feuilles qui peuvent suivre les nervures, elles peuvent se produire également sur les rameaux sous forme de lésions noires, la pourriture noire d'*Alternaria* infecte surtout l'extrémité pédonculaire des fruits, elle est considérée comme une maladie mondiale, produisant la pourriture interne de tous les agrumes commerciaux la plupart de ces maladies de pré-récolte s'expriment lorsqu'elles trouvent des conditions propices à leur développement dans la période post-récolte (**Achetbiet et al., 2021**).

➤ **Diagnostic**

Le diagnostic de la sensibilisation à *Alternaria alternata* est entravé par la variabilité et la complexité des extraits fongiques, et donc la simplification des procédures de diagnostic avec des allergènes purifiés doit être poursuivie (**Asturias et al., 2005**).

➤ **Traitement**

Plusieurs stratégies de gestion ont été proposées pour lutter contre les alternarioses des agrumes, les pratiques culturales, la thérapie thermique, la résistance des plantes hôtes, l'utilisation des extraits des plantes, la lutte biologique et l'utilisation de fongicides synthétiques sont les principales méthodes adoptées pour lutter contre cette maladie (**Achetbiet et al., 2021**).

I.3.3. Mode d'action contre les fongiques

I.3.3.1. Inhibition de la formation de paroi cellulaire

La paroi cellulaire fongique est principalement constituée de β -glucanes. Si la synthèse de ces composés est inhibée, l'intégrité de la paroi cellulaire va se perturber.

I.3.3.2. Rupture de la membrane cellulaire

Les ergostérols sont essentiels pour la membrane cellulaire. Si ces stérols sont liés par des médicaments antifongiques, ou si leur synthèse est inhibée par des inhibiteurs de la biosynthèse de l'ergostérol, l'intégrité de la membrane cellulaire va se rompre. La membrane devient alors étanche.

I.3.3.3. Dysfonctionnement de la mitochondrie fongique

L'inhibition du transport d'électrons mitochondrial entraînera une réduction du potentiel membranaire mitochondrial. L'inhibition peut se produire via l'inhibition des pompes à protons dans la chaîne respiratoire, entraînant une réduction de la production d'ATP et la mort cellulaire subséquente.

I.3.3.4. Inhibition de la division cellulaire

L'inhibition de la division cellulaire peut se produire par l'inhibition de la polymérisation des microtubules, inhibant ainsi la formation du fuseau mitotique.

I.3.3.5. Inhibition de la synthèse ARN / ADN ou synthèse protéique

Si l'agent antifongique pénètre dans la cellule, par exemple via un transport actif sur des ATPases, et interfère avec l'ARN, il peut provoquer une synthèse d'ARN défectueuse et une inhibition de la transcription de l'ADN. L'inhibition de la synthèse des protéines est également une cible antifongique connue

I.3.3.6. Inhibition des pompes d'efflux

Les pompes à efflux sont présentes dans toutes les cellules vivantes et leur fonction est de transporter des substances toxiques hors de la cellule. Ce transport inclut souvent le transport du médicament accumulé hors de la cellule fongique. La surexpression des pompes d'efflux peut conduire à une pharmacorésistance. En inhibant les pompes d'efflux, on pense que la résistance aux médicaments peut être réduite (**Habduche et Ghernouth ,2018**).

I.4. Les Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

I.4.1. Méthodes par diffusion

I.4.1.1. Méthodes de diffusion des disques sur milieu solide

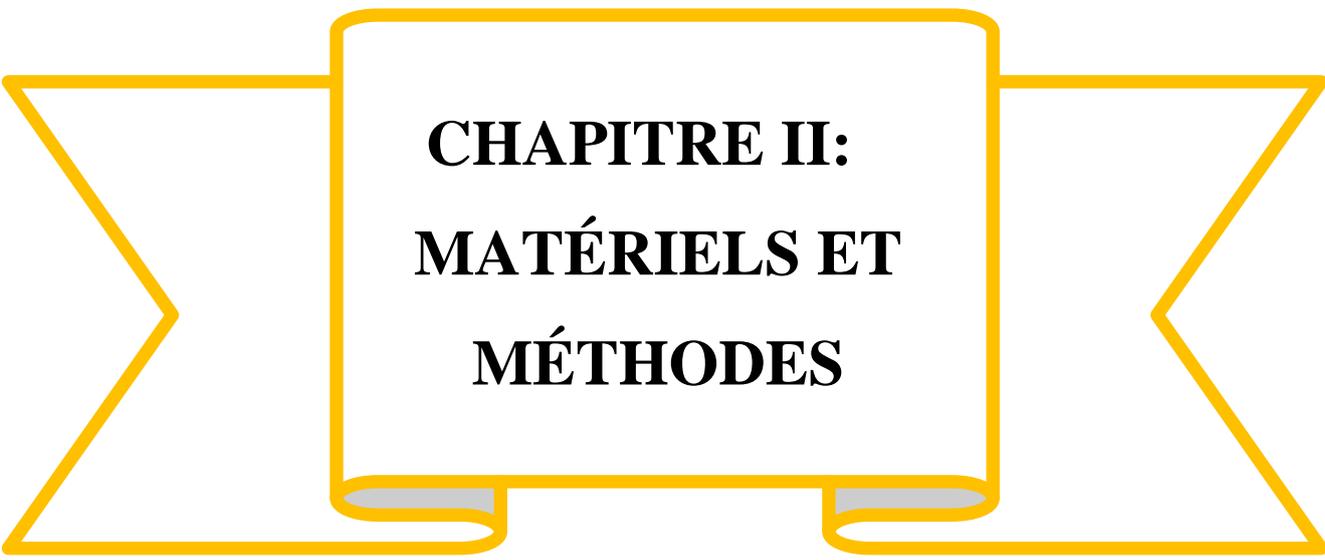
La méthode de diffusion sur disque est basée sur le principe selon lequel un disque imprégné d'antibiotique, placé sur une gélose préalablement inoculée avec la bactérie testée, capte l'humidité et l'antibiotique diffuse radialement vers l'extérieur à travers le milieu gélose, produisant un gradient de concentration d'antibiotique. La concentration de l'antibiotique au bord du disque est élevée et diminue progressivement à mesure que la distance par rapport au disque augmente jusqu'à un point où il n'est plus inhibiteur pour l'organisme, qui se développe alors librement. Une zone ou un anneau transparent se forme autour d'un disque antibiotique après incubation si l'agent inhibe la croissance bactérienne (**Tendencia,2004**).

I.4.1.2. Méthode du puits ou cylindre

Proposé par Cooper et Woodman en 1946, reprise par Shroder et Messing (1949), elle mesure une diffusion radiale du produit à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable. Elle consiste à découper un tronc circulaire vertical dans la gélose et d'y verser une solution du produit à tester de concentration connu. Le produit diffusant radialement créant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne ou fongique (**AZIZA et ABDICHE ,2014**).

I.4.2.3. Méthode de dilution

Les produits à tester peuvent également être directement mélangés en concentrations connues au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide, sans oublier que les techniques de dilution exigent une dispersion homogène. Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes et après incubation on note la présence ou l'absence de culture; la lecture peut être visuelle ou spectrophotométrique car le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (**AZIZA et ABDICHE ,2014**).

A yellow ribbon graphic with a central rectangular box containing text. The ribbon has pointed ends on the left and right sides and a folded appearance at the bottom.

**CHAPITRE II:
MATÉRIELS ET
MÉTHODES**

Ce chapitre est subdivisé en trois parties : la première comporte la description de nos travaux d'extraction de la partie aérienne de la plante étudiée, réalisé au sein de l'unité de recherche VARENBIOMOL de la faculté des sciences exactes (Université Constantine 1) et les tests chromatographiques sur plaques CCM. La deuxième partie est consacrée à la quantification des polyphénols et des flavonoïdes des deux extraits: extrait chloroforme, et acétate d'éthyle. La troisième partie est destinée à l'évaluation du pouvoir antimicrobien de l'extrait chloroforme et acétate d'éthyle 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.

II.1. Étude phytochimique de l'espèce étudiée

II.4.1 Choix du matériel végétal

La sélection de cette plante a été basée sur les critères cités ci-dessous :

- peu d'études phytochimiques abordée sur l'espèce étudiée jusqu'à ce jour;
- elle est très utilisée en médecine traditionnelle;
- compléter une étude réalisée auparavant dans l'unité de recherche VARENBIOMOL.

II.4.2. Matériel végétal

L'espèce sélectionnée a été récoltée dans la région de Batna (Nord-Est de l'Algérie) durant le mois de Mai 2022 et a été authentifiée par Pr. Khellaf Rebbas (département de biologie, Université de M'sila, Algérie).

Les parties aériennes (tiges, feuilles et fleurs) ont été séchées à l'abri de la lumière, coupées en petits morceaux, broyées et pesées (825g).

II.4.3. Protocole expérimental d'extraction

La poudre du matériel végétal est mise à macérer à température ambiante dans un mélange hydroalcoolique (méthanol/eau ; 70/30 ; v/v). Cette macération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas de 24 à 48 heures.

Après concentration à une température de 35 °C, l'extrait méthanolique est dilué avec de l'eau distillée (400 ml pour 1kg de matière végétale sèche) et laissé au repos pendant une nuit. Après filtration, la solution a subi des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate

CHAPITRE II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. Les trois phases organiques ainsi obtenues (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont filtrées, concentrées à sec par évaporation sous pression réduite; à l'aide d'un évaporateur rotatif de type Büchi.

La figure II.1 résume les différentes étapes de l'extraction jusqu'à l'obtention des extraits bruts.

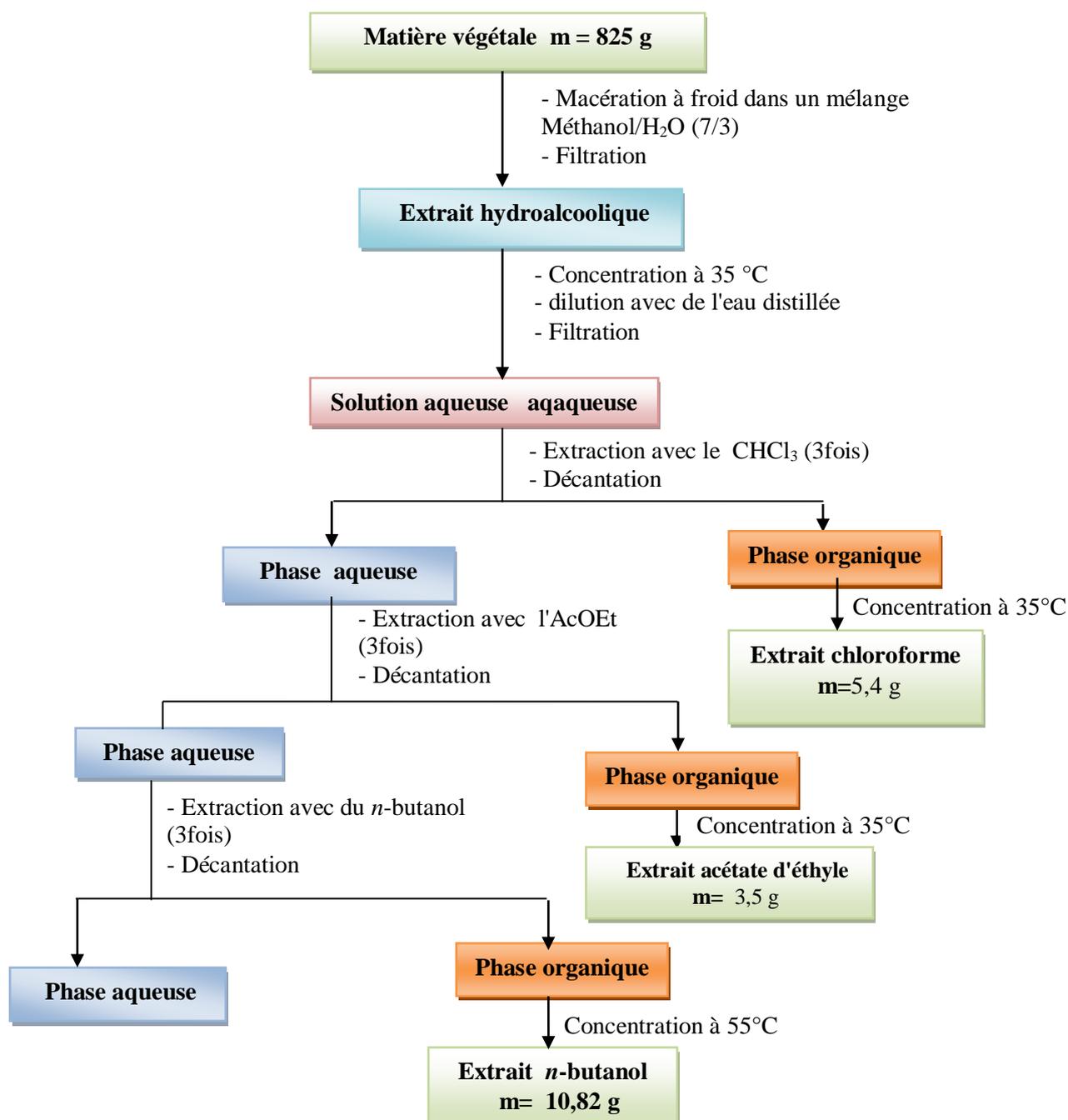


Figure II.1: Organigramme de l'extraction de l'espèce étudiée.

II.4.4. 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.

Pour cela, les trois extraits (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont analysées sur des plaques analytiques de gel de silice éluées par plusieurs systèmes afin de sélectionner le meilleur système de séparation.

Les plaques sont visualisées sous lumière UV 254 nm et 365nm puis révélées avec de l'anisaldéhyde et chauffées à 100°C

II.2. Analyse quantitative des extraits de la plante étudiée

Des déterminations quantitatives des principaux composés phénoliques ont été effectuées sur les deux extraits de l'espèce étudiée: chloroforme et acétate d'éthyle.

II.2.1. Dosage des polyphénols totaux

➤ Principe

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

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 (**Singleton et al., 1999**).

➤ Protocol expérimental

Un volume de 125 µl de chaque extrait (1 mg/ml dans le méthanol), ont été introduits dans des tubes à essais, puis 500 µl d'eau distillée et 125 µl de réactif de Folin-Ciocalteu (FCR) à 10% sont ajoutés et incubé pendant 3 minutes à température ambiante, ensuite 1250 µl 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, déterminé avec le standard étalon de l'acide gallique (50-500 µg/ml) et les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique (EAG) par 1g d'extrait.

II.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

➤ Principe

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la réaction au chlorure d'aluminium (AlCl_3) décrit par Djeridane, *etal.* (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 (Djeridane *et al.*, 2006).

➤ Protocole expérimentale

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 (10-80 µg/ml) et les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine (EQ) par 1g d'extrait.

II.3. Évaluation des propriétés antibactériennes et antifongiques des extraits étudiée

II.3.1. Principe

Le principe repose sur une confrontation entre un microorganisme et les extraits d'une plante. L'inhibition de la croissance microbienne permet de conclure sur l'activité antimicrobienne des extraits testés.

II.3.2. Technique utilisée

Nous avons opté pour la méthode de diffusion en milieu gélosé (aromatogramme). Cette dernière consiste à utiliser des disques de papier imprégnés par des différents échantillons à tester, puis les déposer à la surface d'un milieu nutritif uniformément ensemencée avec une suspension du microorganisme à étudier. La lecture des antibiogrammes est faite par la mesure des diamètres autour des disques des halos d'inhibition.

II.3.3. Matériel biologique

L'activité antimicrobienne de l'extrait chloroforme et acétate d'éthyle a été évaluée sur six 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* NCTC 10.538
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Pseudomonas aeruginosa* NCIMB 8626
- *Bacillus Spizizenii* ATCC 66 33
- *Candida albicans* ATTC 10 231
- *Alternaria alternata*

II.3.4. 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.

II.3.5. 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* ATTC 10 231.

CHAPITRE II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Pour *Alternaria alternata* une suspension sporale a été préparée pour servir d'inoculum. Cette dernière a été obtenue en ajoutant à une culture mycelliale d'*Alternaria alternata* sur gélose Sabouraud de l'eau physiologique. Toutes les souches utilisées ont été préparées avec une opacité équivalente à 10^7 UFC/ml.

II.3.6. 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 trois boîtes.

II.3.7. Préparation des différentes concentrations de l'extrait acétate d'éthyle

Les extraits chloroforme et acétate d'éthyle 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, 12,5 mg/ml, 6,25 mg/ml, 3,125 mg/ml. Le DMSO a été utilisé comme témoin négatif. Tandis qu'une crème antifongique a été utilisée comme témoin positif pour les champignons et la gentamycine pour les bactéries. (Figure II.2.)



Figure II.2: Témoin positif antibactérien et antifongique.

II.3.8. Imprégnation des disques

Les disques blancs stériles de 6mm de diamètre préalablement préparés ont été imprégnés avec 15 μ l de chaque dilution de l'extrait chloroforme et l'extrait acétate d'éthyle, du témoin négatif et des témoins positifs.

II.3.9. Dépôt des disques

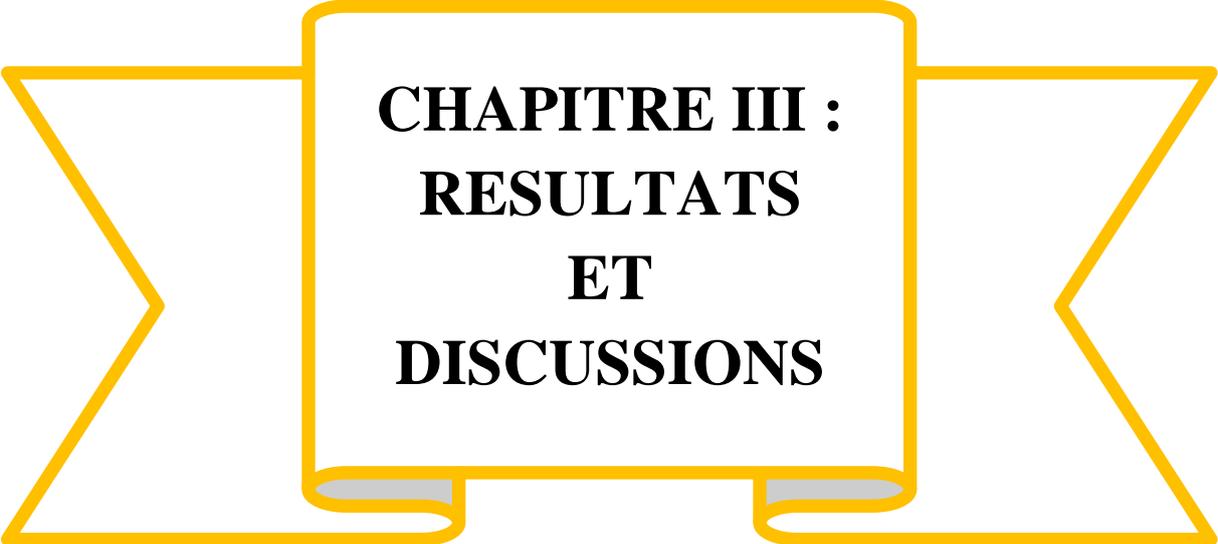
Les disques sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérile. Un appui léger est effectué pour augmenter le contact des disques à la gélose.

II.3.10. Incubation

Les souches bactériennes ont été incubées à 37°C pendant 24h. Les souches fongiques: *Candida albicans* ATTC 10 231 a été incubée à 30°C pendant 24h et *Alternaria alternata* à 30°C pendant 48h.

II.3.11. 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.

A yellow ribbon graphic with a central rectangular box containing text. The ribbon has a folded appearance at the bottom.

**CHAPITRE III :
RESULTATS
ET
DISCUSSIONS**

CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Ce chapitre détaille l'analyse et la discussion des résultats obtenus à partir de différentes étapes. Tout d'abord, une évaluation du rendement d'extraction par macération de la partie aérienne de la plante étudiée, qui appartient à la famille des Fabacées. Ensuite, une description des résultats des tests chromatographiques réalisés sur plaques CCM. Par la suite, une discussion des résultats du dosage des composés polyphénoliques et flavonoïdes totaux. La dernière partie apporte l'analyse et la discussion des résultats obtenus lors des tests microbiologiques des deux extraits obtenus de la plante étudiée.

III.1. Étude phytochimique de la plante étudiée

III.1.1. Rendements de l'extraction

Les rendements de l'extraction ont été calculés pour les deux extraits obtenus de la plante étudiée qui appartient à la famille de Fabacées selon la formule suivante :

$$R (\%) = (P_2 - P_1 / P_0) \times 100$$

R : rendement

P₂ : masse de l'extrait et du conteneur

P₁ : masse du conteneur

P₀ : masse de la plante sèche

Le tableau suivant résume les masses et les rendements des extraits obtenus :

Tableau III.1: Les masses et les rendements des extraits obtenus

Extraits	Chloroforme	Acétate d'éthyle
Masse de la plante (g)	825 g	
Masse de l'extrait (g)	5,4 g	3,5 g
Rendement (%)	0,65	0,42

Les résultats obtenus montrent que l'extrait chloroforme présente un rendement plus au moins élevé que l'extrait acétate d'éthyle qui sont 0,65% et 0,42% respectivement.

L'extraction des deux 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 la plante étudiée sont plus solubles dans le chloroforme que dans l'acétate d'éthyle.

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

La chromatographie sur couche mince CCM est utilisée pour le suivi et le contrôle des purifications. Elle permet la vérification de la pureté des produits naturels isolés. Cette analyse peut être effectuée en phase normale ou en phase inverse sur des plaques d'aluminium. Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. La phase mobile est en général constituée d'un mélange binaire de solvants selon le type de séparation.

Dans notre cas, les deux extraits chloroforme et acétate d'éthyle sont analysés 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 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:0,2) pour l'extrait chloroforme et ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:0,5) pour l'extrait acétate d'éthyle et pour avoir une idée sur la composition de chaque extrait en composés naturels.

Les plaques CCM obtenues sont visualisées sous lumière UV (365 nm) et (254 nm) puis révélées avec de l'anisaldéhyde et chauffées à 100°C.

Les figures suivantes (figure III.1 et III.2) montrent les résultats de cette analyse chromatographique :

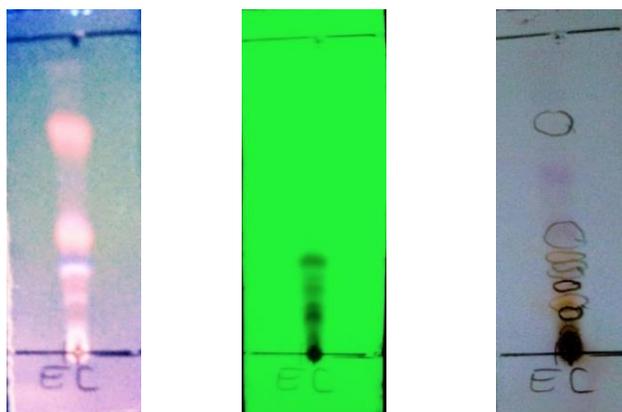


Figure III.1 : Plaques CCM de l'extrait CHCl_3 sous lampe UV (365 nm), UV (254 nm) et révélées avec de l'anisaldéhyde respectivement.

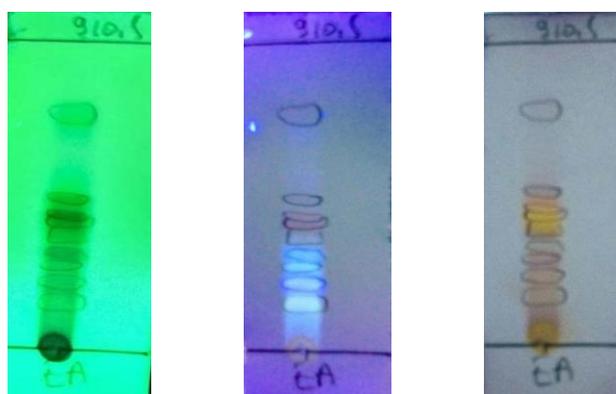


Figure III.2:Plaques CCM de l'extrait acétate d'éthyle sous lampe UV (365 nm), UV (254nm) et révélées avec de l'anisaldéhyde respectivement.

Selon les figures III.1 et III.2, on constate que le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ est convenable pour la séparation des deux extraits analysés. On remarque également la présence de plusieurs taches dans l'extrait acétate d'éthyle ce qui permet de conclure que l'extrait acétate d'éthyle est plus riche que l'extrait chloroforme en composés naturels.

III.2. Analyse quantitative des extraits de la plante étudiée

III.2.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux dans les deux extraits chloroforme et acétate d'éthyle obtenus à partir de la plante étudiée a été réalisée 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 ($y = 0,0021x + 0,022$) avec $R^2 = 0,998$ (figure III.3).

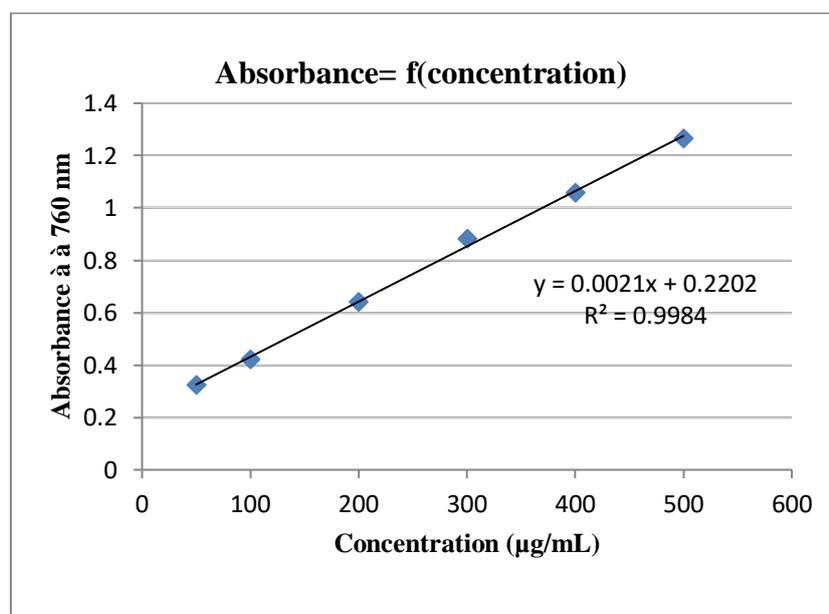


Figure III.3: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

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.2 montrent que l'extrait acétate d'éthyle est l'extrait le plus riche en polyphénols avec une teneur de $60,91 \pm 1,25$ mg EAG/g d'extrait, que l'extrait chloroforme avec une teneur de $23,5 \pm 0,98$ mg EAG/g d'extrait.

III.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: ($y = 0,032x - 0,183$) avec $R^2 = 0,991$ (figure III.4).

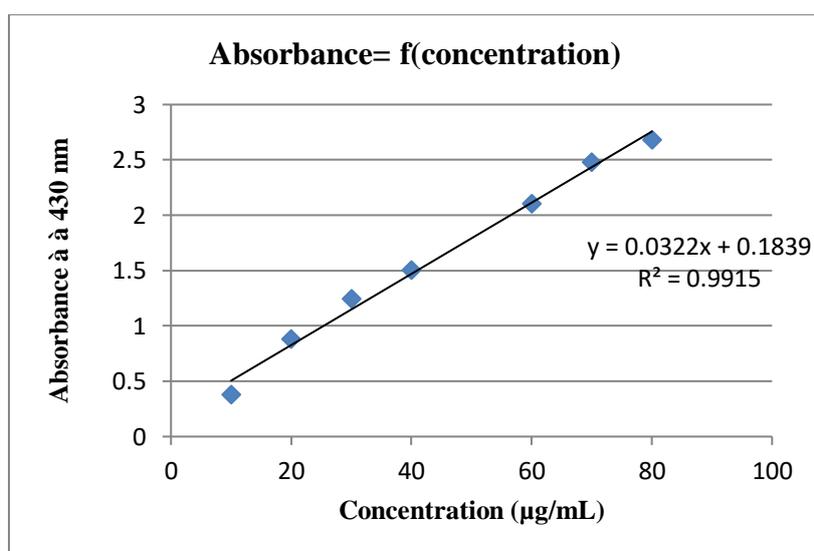


Figure III.4: Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Les résultats obtenus dans le tableau montrent que l'extrait acétate d'éthyle est l'extrait le plus riche en flavonoïdes avec une teneur de $51,72 \pm 0,97$ EQ/g d'extrait, que l'extrait chloroforme avec une teneur de $12,53 \pm 0,25$ EQ/g d'extrait.

Tableau III.2: Teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux des extraits de la plante étudiée

Extraits	Teneur des polyphénols (mg EGA/g)	Teneur des flavonoïdes (mg EQ/g)
Chloroforme	$23,5 \pm 0,98$	$12,53 \pm 0,25$
Acétate d'éthyle	$60,91 \pm 1,25$	$51,72 \pm 0,97$

La variation dans l'analyse quantitative des deux extraits peut être attribuée à la polarité du solvant et au rapport soluté/solvant utilisé dans le processus d'extraction (Abdallah *et al.*, 2024).

III.3. Évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique de la plante étudiée

Dans cette étude, nos extraits acétate d'éthyle et chloroforme ont été testés *in vitro* pour évaluer leur activité antibactérienne et antifongique vis-à-vis de six souches de microorganismes.

L'activité antimicrobienne contre les microorganismes analysés dans la présente étude a été évaluée qualitativement et quantitativement en fonction de la présence ou l'absence de zones d'inhibition, le diamètre de la zone et la concentration minimale inhibitrice (CMI), par rapport à la gentamycine et à la mycocide utilisés comme des médicaments antibiotique et antifongique de référence.

Les résultats révèlent que les plus grandes zones d'inhibition marqués ont été enregistré pour l'extrait acétate d'éthyle contre les bactéries Gram(+) *Staphylococcus aureus* et *Bacillus Spizizenii* et contre la levure *Candida albicans* avec des diamètres d'inhibition de l'ordre de $12,5\pm 0,7$ mm, $15,5\pm 0,7$ mm et $12,5\pm 0,7$ mm respectivement (figure III.6.), suivi par des activités légèrement moins importante pour l'extrait chloroforme contre les mêmes souches avec des diamètres d'inhibition de l'ordre de $9,5\pm 0,7$ mm, $10,5\pm 0,7$ mm et $10,5\pm 0,7$ mm respectivement (figure III.5.).

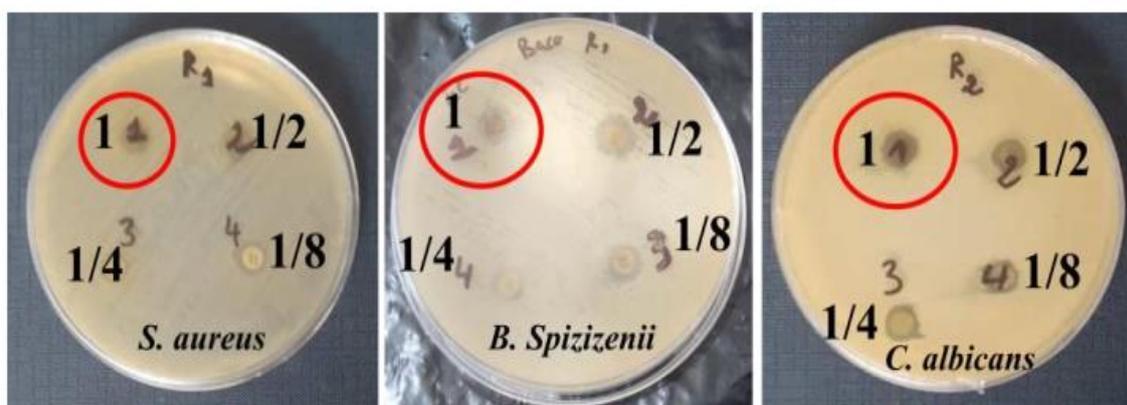


Figure III.5: Activité antimicrobienne de l'extrait CHCl_3 contre les souches *Staphylococcus aureus*, *Bacillus Spizizenii* et *Candida albicans*.

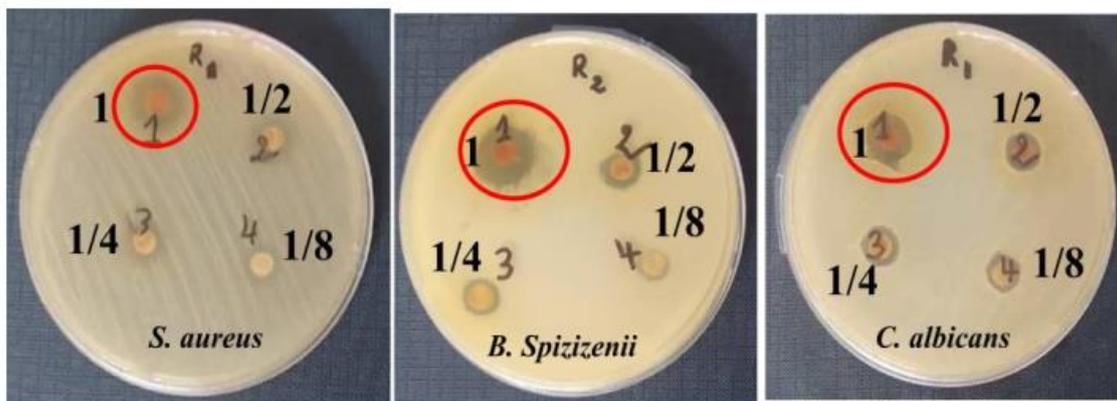


Figure III.6: Activité antimicrobienne de l'extrait AcOEt contre les souches *Staphylococcus aureus*, *Bacillus Spizizenii* et *Candida albicans*.

Les résultats de l'activité antibactérienne montrent que ces deux extraits CHCl_3 et AcOEt ne présentent aucune zone d'inhibition de croissance à différentes concentrations vis à vis les deux souches à Gram négatif *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Figure III.7 et III.8).

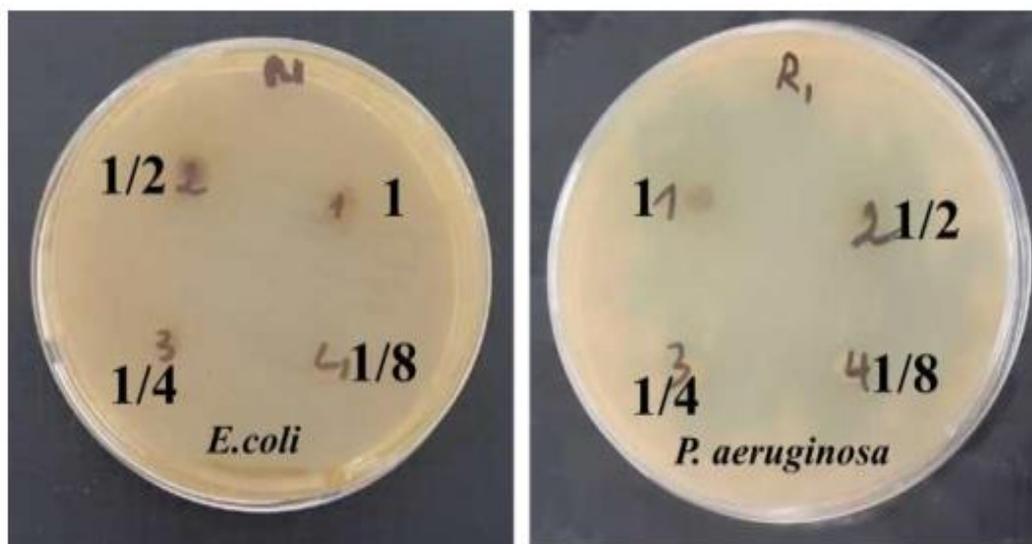


Figure III.7: Activité antibactérienne de l'extrait CHCl_3 contre les souches *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

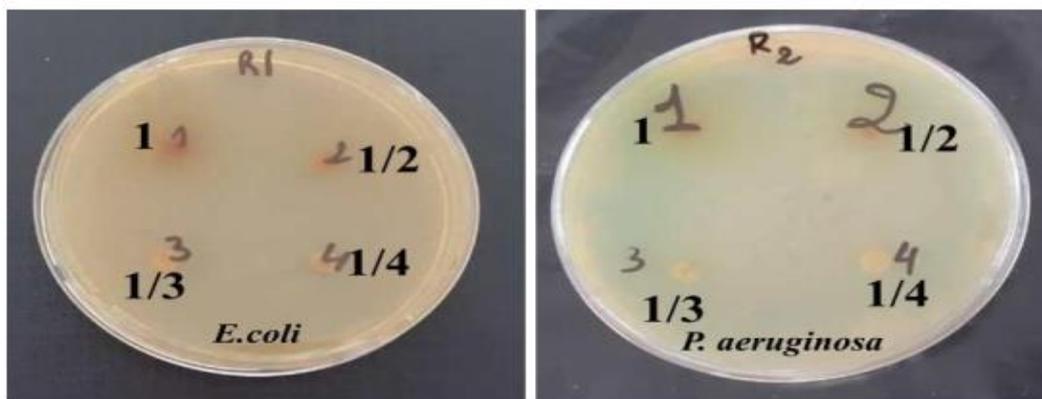


Figure III.8: Activité antibactérienne de l'extrait AcOEt contre les souches *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les résultats de l'activité antifongique montrent que les deux extraits testés ne présentent également aucun effet sur la souche *Alternaria alternata* à différentes concentrations testées (Figure III.9).



Figure III.9: Activité antifongique de l'extrait CHCl₃ et AcOEt contre la souche *Alternaria alternata*.

Concernant l'extrait chloroforme, la valeur la plus faible de CMI est observée sur *Bacillus Spizizenii* qui est de 6,25mg/ml ensuite sur *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 qui est de 50 mg/ml (tableau III.3).

Ainsi pour l'extrait acétate d'éthyle, les résultats ont révélé que les bactéries Gram+, étaient sensibles à cet extrait avec des valeurs des CMI de 6,25mg/ml et 25 mg/ml pour les souches bactériennes *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et *Bacillus Spizizenii* ATCC 66 33 respectivement (tableau III.4).

CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

On peut conclure que la sensibilité de *Staphylococcus aureus* et de *Bacillus Spizizenii* pourrait être due à la structure de la membrane et de la paroi cellulaire extérieure. La résistance importante des bactéries Gram (-) pour nos extraits pourrait probablement être attribuée à leurs membranes extérieures qui entourent la paroi de la cellule et qui limitent la diffusion des composés hydrophobes par les lipopolysaccharides de couverture. Par contre, pour les bactéries Gram (+), l'absence de cette barrière permet le contact direct des constituants des composés phénoliques isolés avec les phospholipides bicouches de la membrane cellulaire, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité aux ions et le passage des constituants ou une altération des systèmes enzymatiques bactériens intracellulaires vitaux (Abdallah *et al.*, 2019).

En ce qui concerne l'activité antifongique, la CMI enregistrée sur *Candida albicans* ATTC 10 231 est plus faible pour l'extrait chloroforme (25 mg/ml) que l'extrait acétate d'éthyle (50 mg/ml).

Le pouvoir antifongique des deux extraits de cette plante pourrait être préconisé dans le traitement des infections fongiques à *Candida albicans*.

CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau III.3: Valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition des différentes concentrations de l'extrait chloroforme vis-à-vis les six souches testées .

	<i>Escherichia coli</i> NCTC 10.538	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCIMB 8626	<i>Bacillus Spizizenii</i> ATCC 66 33	<i>Candida albicans</i> ATTC 10 231	<i>Alternaria alternata</i>
SM	-	9,5±0,7	-	10,5±0,7	10,5±0,7	-
1/2	-	8,5±0,7	-	10,5±0,7	10±0,0	-
1/4	-	8±0,0	-	9,5±0,7	9±0,0	-
1/8	-	7,5±0,7	-	7,5±0,7	8±0,0	-
1/16	-	-	-	7,5±0,7	7,25±0,3	-
1/32	-	-	-	7,5±0,7	-	-
1/64	-	-	-	6,5±0,7	-	-
1/128	-	-	-	-	-	-
Témoin négatif (DMSO)	-	-	-	-	-	-
Témoin positif	21	25	30	29	31	-

CHCl₃(SM) : Solution mère 400mg/ml, **CHCl₃ (1/2)** : 200mg/ml, **CHCl₃ (1/4)** : 100mg/ml, **CHCl₃ (1/8)** : 50 mg/ml, **CHCl₃ (1/16)** : 25 mg/ml, **CHCl₃ (1/32)**: 12.5mg/ml, **CHCl₃ (1/64)** : 6.25mg/ml, **CHCl₃ (1/128)** : 3.125mg/ml, - pas de zone d'inhibition, R: résistante.

CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau III.4: Valeurs des diamètres moyens de la zone d'inhibition des différentes concentrations de l'extrait acétate d'éthyle vis-à-vis les six souches testées.

	<i>Escherichia coli</i> NCTC 10.538	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCIMB 8626	<i>Bacillus Spizizenii</i> ATCC 66 33	<i>Candida albicans</i> ATTC 10 231	<i>Alternaria alternata</i>
SM	-	12,5±0,7	-	15,5±0,7	12,5±0,7	-
1/2	-	10,5±0,7	-	10,5±1,4	11±0	-
1/4	-	9,5±0,7	-	8±1,4	10±0,0	-
1/8	-	8±0,0	-	7±1,4	9±0,0	-
1/16	-	8±0,0	-	7±0,0	-	-
1/32	-	7,5±0,7	-	-	-	-
1/64	-	6,5±0,7	-	-	-	-
1/128	-	-	-	-	-	-
Témoin négatif (DMSO)	-	-	-	-	-	-
Témoin positif	21	25	30	29	31	-

AcOEt (SM) : Solution mère 400mg/ml, **AcOEt (1/2)** : 200mg/ml, **AcOEt (1/4)** : 100mg/ml, **AcOEt (1/8)** : 50 mg/ml, **AcOEt (1/16)** : 25 mg/ml, **AcOEt (1/32)**: 12.5mg/ml, **AcOEt (1/64)** : 6.25mg/ml, **AcOEt (1/128)** : 3.125mg/ml, - pas de zone d'inhibition, R: résistante.

CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Une étude comparative avec l'espèce *Erinacea anthyllis* qui appartient à la même famille étudiée montre que l'extrait AcOEt de cette dernière manifestent une activité antibactérienne seulement contre la souche de Gram positif *Staphylococcus aureus* et ne présentent aucune zone d'inhibition de croissance vis à vis les souches de Gram négatif (Mouffouk, 2017). Une autre étude sur l'activité antibactérienne de l'espèce *Pongamia pinnata* Linn appartenant à la famille des Fabaceae a montré que l'extrait de chloroforme de cette plante a inhibé la croissance de *S. aureus* (Gram+), mais elle a un effet léger ou négligeable sur *E. coli*, *P. aeruginosa* (Gram-) (Arote et al., 2009). Ces données sont en accord avec nos résultats obtenus pour les deux extraits testés.

Ces résultats sont intéressants car nous traitons avec un extrait et non un produit pur; par conséquent, l'activité antimicrobienne peut être due à des composés différents et liés à la présence de métabolites bioactifs.

De ce fait, une étude plus approfondie sera nécessaire sur la purification du principe actif de ces extraits, afin d'ouvrir la voie au développement de nouveaux médicaments potentiels pour traite des infections fongiques et bactériennes opportunistes résistantes.



**CONCLUSION
GENERALE**

Conclusion générale

Bien que l'industrie pharmaceutique ait fait d'énormes progrès dans le domaine des médicaments synthétiques, la médecine à base de plantes traditionnelles demeure une source privilégiée de remèdes. Les plantes médicinales continueront à être une source primordiale de composés thérapeutiques, fournissant une abondance de métabolites secondaires naturels bioactifs.

Au cours du présent travail, une plante médicinale appartenant à la famille des Fabaceae a été évalué pour leur sensibilité à l'égard de certaines souches: *Escherichia coli* NCTC10.538, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomona saeruginosa* NCIMB 8626, *Bacillus Spizizenii* ATCC 66 33, *Candida albicans* ATTC 10 231 et *Alternaria alternata*.

Après l'extraction de la partie aérienne de la plante étudiée avec trois solvants de polarité croissante, nous avons eu les rendements suivants : 0,65% pour l'extrait chloroforme et 0,42% pour l'extrait acétate d'éthyle.

Une partie de ce mémoire est dédiée à l'évaluation de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits chloroforme et acétate d'éthyle obtenus à partir de la plante étudiée par la méthode de Folin-Ciocalteu et trichlorure d'aluminium respectivement.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes révèlent que l'extrait AcOEt de l'espèce étudiée est le plus riche en polyphénols totaux ($60,91 \pm 1,25$ mg EAG/g d'extrait) et en flavonoïdes ($51,72 \pm 0,97$ mg EQ/g d'extrait).

L'activité antibactérienne et antifongique des extraits CHCl_3 et AcOEt de la plante étudiée, ainsi que de la gentamycine et la mycocide utilisés comme contrôles positifs, ont été estimée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé contre quatre souches bactériennes: deux à Gram positif *Bacillus Spizizenii* ATCC 66 33 et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, deux à Gram négatif *Escherichia coli* NCTC 10.538 et *Pseudomonas aeruginosa* NCIMB 8626 et deux souches fongiques: *Candida albicans* ATTC 10 231 et *alternaria alternata*.

Les résultats de l'activité antibactérienne révèlent que l'extrait AcOEt a donné des zones d'inhibition plus importante que l'extrait CHCl_3 contre les bactéries à Gram (+) *Staphylococcus aureus* et *Bacillus Spizizenii* et contre la levure *Candida albicans* alors que ces deux extraits ne présentent aucune zone d'inhibition contre les souches bactériennes à

CONCLUSION GENERALE

Gram négatif *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et même contre le champignon *Alternaria alternata*.

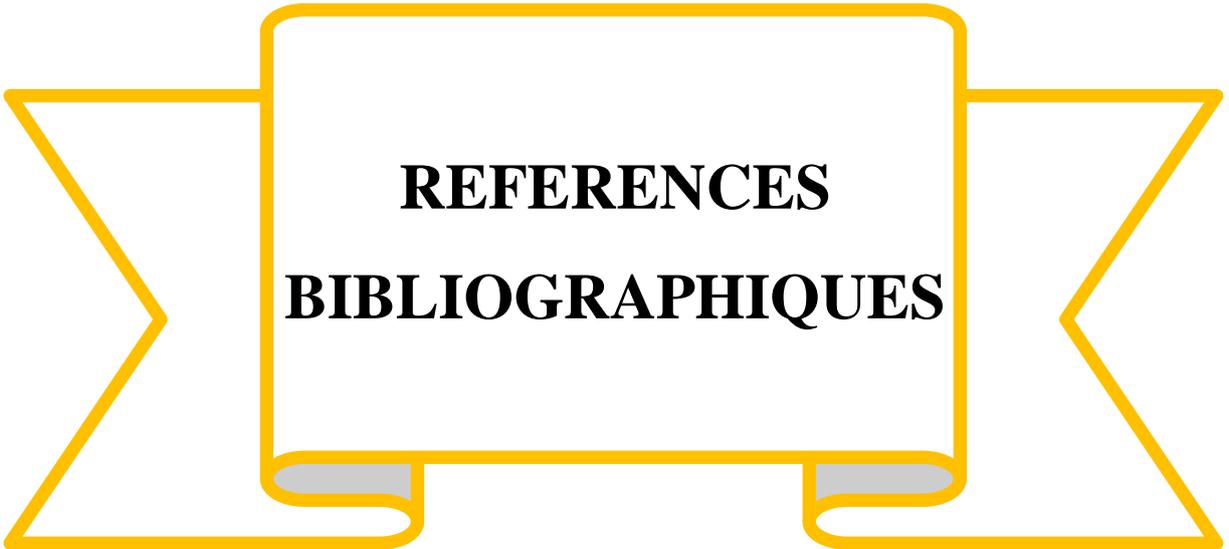
Concernant l'activité antibactérienne, la valeur la plus faible de CMI de l'extrait chloroforme est observée sur *Bacillus Spizizenii* qui est de 6,25mg/ml ensuite sur *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 qui est de 50 mg/ml. Les valeurs des CMI pour l'extrait acétate d'éthyle sont 6,25mg/ml et 25 mg/ml contre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et *Bacillus Spizizenii* ATCC 66 33 respectivement.

En ce qui concerne l'activité antifongique, la CMI enregistrée sur *Candida albicans* ATTC 10 231 est plus faible pour l'extrait chloroforme (25 mg/ml) que l'extrait acétate d'éthyle (50 mg/ml).

Ces résultats suggèrent que cette plante possède des propriétés antimicrobiennes qui pourraient justifier son usage dans la médecine traditionnelle.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue en réalité qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement actives. Au terme de cette investigation, il serait souhaitable d'une part de continuer les tests sur des produits purs après son isolement de cette plante et d'autre part, d'envisager d'autres activités biologiques à savoir : anti-inflammatoire, anti-cholinestérase, antidiabétique, anti-pyrétique, anti-analgésique et anti-cancéreuse,....etc.

Une étude biologique *in vivo* est également souhaitable, pour avoir une vue plus approfondie sur les activités antibactérienne et antifongique des extraits de cette plante.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdallah R., Frikha D., et Sassi S. M. E. S. (2019).** EVALUATION IN VITRO DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE ET ANTIFONGIQUE DE QUATRE ESPECES ALGALES MARINES IN VITRO EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF MARINE ALGAE. *Journal de l'Information Médicale de Sfax*, p :38-44.
- Achetbi H., Amiri S., et Lahlali R. (2021).** Les Alternarioses (*Alternaria* spp.) des agrumes: Diagnostic et méthodes de lutte. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 9(2).
- AEMIP**, Association des Enseignant de Microbiologie et d'Immunologie des Facultés de pharmacie. (2019). https://aemip.fr/?page_id=3618. (Consulté le 03/03/2024)
- Aguilar C., Vlamakis H., Losick R., et Kolter R. (2007).** Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. *Current opinion in microbiology*, 10(6), p :638-643.
- Ahmad F., Anwar F., et Hira S. (2016).** Review on medicinal importance of Fabaceae family. *Pharmacologyonline*, 3, p : 151-157.
- Aqil F., Zahin M., Ahmad I., Owais M., Khan M. S. A., Bansal, S. S., et Farooq S. (2010).** Antifungal activity of medicinal plant extracts and phytochemicals: a review. *Combating fungal infections: problems and remedy*, p :449-484.
- Arote S. R., Dahikar S. B., et Yeole P. G. (2009).** Phytochemical screening and antibacterial properties of leaves of *Pongamia pinnata* Linn.(Fabaceae) from India. *African Journal of Biotechnology*, 8(22),p : 6393.
- Arzmi M. H., Dashper S., Catmull D., Cirillo N., Reynolds E. C., et McCullough M. (2015).** Coaggregation of *Candida albicans*, *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus mutans* is *Candida albicans* strain dependent. *FEMS yeast research*, 15(5), fov038.
- Asturias J. A., Ibarrola I., Ferrer A., Andreu C., López-Pascual E., Quiralte J., ... et Martínez A. (2005).** Diagnosis of *Alternaria alternata* sensitization with natural and recombinant Alt a 1 allergens. *Journal of allergy and clinical immunology*, 115(6), p :1210-1217.
- Avril J. L., Dabernat H., Denis F., et Monteil, H. (2000).** *Bactériologie clinique* (Vol. 3, pp. 557-559). Ellipses, 602p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Azani N., Babineau M., Bailey C. D., Banks H., Barbosa A. R., Pinto R. B., ... et Zimmerman, E. (2017).A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny: The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *taxon*, 66(1), p :44-77.

AZIZA N, ABDICHE N.(2014). Purification, Caractérisation et Evaluation de L'activité Antimicrobienne D'une Nouvelle Molécule Bioactive Ferrocénique Synthétique Chirale.Mémoire de Master : Analyse Protéomique et Santé. Université des Frères Mentouri Constantine 1, 21p

Basavaraju M., et Gunashree B. S. (2022).Escherichia coli: an overview of main characteristics. *Escherichia coli-Old and New Insights*.

BENMANSOUR M (2012). Les Candidoses vulvo-vaginales à Candida albicans: Facteurs de risques, diagnostic mycologique et prévalence spécifique, Thèse de docteur : en pharmacie. UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID FAULTE DE MEDECINE .2p

Berche P., Gaillard J. L., Simonet M., et Simonet M. (1988). Bactériologie: bactéries des infections humaines. Paris : falmmarion Médecine Sciences. 107-110-236-274-275 p.

Bhunja A. K. (2008).*Foodborne Microbial Pathogens : Mechanisms and Pathogenesis*. New York: Springer Science, Business Media LLC. Springer, 126 p.

Bodey G. P., Bolivar R., Fainstein V., et Jadeja L. (1983). Infections caused by Pseudomonas aeruginosa. *Reviews of infectious diseases*, 5(2),p : 279-313.

Botineau, M. (2010). Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Tec & doc. Lavoisier, 597-639 p.

Boudjouref M., Belhattab R., Bouteghrine S. (2018). Antioxidant Activity and Phenolic Content of *Artemisia Campestris* from Two Regions of Algeria, *World Journal of Environmental Biosciences*, 7(2-2018), p :61-66.

Boureghida S., Slougui N., Fadel H., Hazmoune H., et Bicha, S. (2023).Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil from *Erinacea anthyllis* Link (Fabaceae). *Trop J Nat Prod Res*, 7(4), p : 2696-2700.

Brantner A., et Grein E. (1994).Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 44(1), p: 35-40.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Carballido-López R., et Formstone A. (2007).** Shape determination in *Bacillus subtilis*. *Current opinion in microbiology*, 10(6), p :611-616.
- Chagneau C., Floch P., Pasquier C. (2022).** Bactériologie et virologie pratique : paris : De boeck supérieur. p :84, 133
- Charlier C., Cretenet M., Even S., et Le Loir Y. (2009).** Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. *International journal of food microbiology*, 131(1), p: 30-39.
- Chen S., Yu K., Ling Q., Huang C., Zheng J., Cheng Q., Zhu M., Li N., et 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), p: 631–635.
- Cheung G. Y., Bae J. S., et Otto, M. (2021).** Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), p :547-569.
- Chu W. S., Magee B. B., et Magee P. T. (1993).** Construction of an *Sfi*I macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *Journal of bacteriology*, 175(20), p : 6637-6651.
- Demir S., Turan İ., Misir S., et Aliyazicioğlu Y. (2019).** Selective cytotoxic effect of *Dorycnium pentaphyllum* extract on human breast, liver, and lung cancer cells. *KSU TARIM VE DOGA DERGISI-KSU JOURNAL OF AGRICULTURE AND NATURE*, 22(3), p : 473-479
- Denamur E., Clermont O., Bonacorsi S., et Gordon D. (2021).** The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 19(1), p: 37-54.
- 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), p :654-660.
- Dorman H. D., et Deans S. G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), p : 308-316.
- Dupont F., et Guignard J.L. (2015).** Boutanique :les famille de plantes .paris :Elsevier Masson, 207 p .
- Earl A. M., Losick R., et Kolter, R. (2008).** Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in microbiology*, 16(6), p :269-275.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- El Solh A. A., et Alhajhusain, A. (2009).** Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia . *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(2),p : 229-238.
- Foster T. J. (2002).**Staphylococcus aureus. *Molecular Medical Microbiology*, p: 839-888.
- Gajdács M. (2019).** Taxonomy and nomenclature of bacteria with clinical and scientific importance: current concepts for pharmacists and pharmaceutical scientists. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 89(4), p :99-108.
- Gregersen T. (1978).** Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 5, p: 123-127.
- Gupta R. S. (1998).** Protein phylogenies and signature sequences: a reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), p: 1435-1491.
- Habduche M. , et Ghernouth M.(2018) .**Étude de l'activité antifongique de quelques extraits végétaux. Mémoire de Master : Sciences Agronomiques . Université Mohamed BOUDIAF de M'sila. 55p.
- Haddouchi A ., et Benmansour A.(2008).** Huiles essentielles, obtentions, utilisations et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques. *Les technologies de laboratoire*, 3(8).
- Hammer K. A., Carson C. F., et Riley T. V. (1999).**Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology*, 86(6), p :985-990.
- Heywood V.H. (1996).**Flowering Plants of the World : Oxford : Oxford University Press, 141-145; 149-152 p.
- Ignasse J. (2022).** Une ancienne souche d'*E.coli* extraite d'une momie. *Sciences et Avenir*. https://www.sciencesetavenir.fr/archeo-paleo/archeologie/une-ancienne-souche-d-escherichia-coli-extraite-d-une-momie_164276. (Consulté le 03/03/2024)
- Judd W. S., Campbell C. S., Kellogg E. A., et Stevens, P. (2002).** Botanique systématique: une perspective phylogénétique. De Boeck Supérieur. University of Missouri, St. Louis, and Missouri Botanical Garden, 282-288 p.
- Kadosh, D. (2017).** Morphogenesis in *C. albicans*. *Candida albicans: Cellular and molecular biology*, p :41-62.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kaper J. B., Nataro J. P., et Mobley H. L. (2004).** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*, 2(2), p: 123-140.
- Kashem S. W., et Kaplan D. H. (2016).** Skin immunity to *Candida albicans*. *Trends in immunology*, 37(7), p :440-450.
- Kovács Á. T. (2019).** *Bacillus subtilis*. *Trends in microbiology*, 27(8), p: 724-725.
- Kuete V., et Efferth T. (2010).** Cameroonian medicinal plants: pharmacology and derived natural products. *Frontiers in pharmacology*, 1, p : 123.
- Kustrzeba-Wójcicka I., Siwak E., Terlecki G., Wolańczyk-Mędrała A., et Mędrała, W. (2014).** *Alternaria alternata* and its allergens: a comprehensive review. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 47,p : 354-365.
- Laurence B.** Morphologie de la levure *Alternaria alternata*. <https://biologie.ens-lyon.fr/ressources/tp-direct/etude-de-la-morphologie-de-la-levure-alternaria-alternata>. (consulté 20/05/2024) .
- Li J., Koh J. J., Liu S., Lakshminarayanan R., Verma C. S., et Beuerman R. W. (2017).** Membrane active antimicrobial peptides: translating mechanistic insights to design. *Frontiers in neuroscience*, 11, p: 1-18.
- Mahmoud M. A. (2020).** The antimicrobial effect of *Bacillus* secondary metabolites on human pathogen, 22p.
- Mainil J. (2013).** *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary immunology and immunopathology*, 152(1-2), p: 2-12.
- Mamedov, N. (2012).** Medicinal plants studies: history, challenges and prospective. *Med Aromat Plants*, 1(8), p : e133
- Martin P. (2014).** Les familles des plantes à fleurs d'Europe: botanique systématique et utilitaire. Presses universitaires de Namur, 127 p.
- Merradi M. (2021).** *Pseudomonas aeruginosa* au CHU de Batna : Epidémiologie, résistance et Options thérapeutiques. Thèse de doctora : Microbiologie. Université Mustapha Ben Boulaid-Batna 2 ,4p

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Michel-Briand Y., et Baysse C. (2002).**The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, 84(5-6),p : 499-510.
- Mouffouk S.(2017).** Etude chimique de deux plantes : *Euphorbia atlantica* (Euphorbiaceae) et *Erinacea anthyllis* (Fabaceae). Thèse de doctorat : Chimie organique . Université El-Hadj Lakhdar – BATNA(1).247p
- Moulinier C. (2003).** Parasitologie et mycologie médicales: éléments de morphologie et de biologie. Editions Médicales Internationales.796p.
- Nakamura L. K., Roberts M. S., et Cohan F. M. (1999).**Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W 23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 49(3),p : 1211-1215
- Obistioiu D., Cocan I., Tîrziu E., Herman V., Negrea M., Cucerzan A., ... et Alexa, E. (2021).** Phytochemical profile and microbiological activity of some plants belonging to the Fabaceae family. *Antibiotics*, 10(6), p : 662.
- Oh K. B., Chang I. M., Hwang K. J., et Mar W. (2000).**Detection of antifungal activity in *Portulaca oleracea* by a single-cell bioassay system. *Phytotherapy research*, 14(5),p : 329-332.
- Ondusko D. S., et Nolt D. (2018).** Staphylococcus aureus. *Pediatrics in review*, 39(6), p: 287-298.
- Rani A., et Singh P. (2021).**Degradation and decolorization of malachite green dye by *Bacillus subtilis* isolated from dye effluent sample.
- Reiss E., Hearn V. M., Poulain D., et Shepherd M. G. (1992).** Structure and function of the fungal cell wall. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 30(sup1), p :143-156.
- Saleh F., Kheirandish F., Azizi H., et Azizi M. (2014).** Molecular diagnosis and characterization of *Bacillus subtilis* isolated from burn wound in Iran. *Research in Molecular Medicine*, 2(2),p : 40-44.
- ScholarRx.***Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *General microbiology*.Brick exchange. <https://exchange.scholarrx.com/brick/pseudomonas-and-acinetobacter>. (Consulté le 11/03/2024).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Shrivastava B (2021) .Microbiologie médicale: les microorganismes dans les sciences médicales pour le diagnostic et le traitement des maladies .Moldova: scientia scripts.81p.

Silhavy T. J., Kahne D., et Walker S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5), p:1-16

Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299,p : 152-178

Soumaila Garba A. (2012). Caractérisation phénotypique et génétique des Escherichia coli isolés des cas de colibacillose aviaires au Sénégal. Thèse de doctorat : Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie . Université cheikh anta diop de Dakar, 22p.

Spichiger R.E., Savolainen V.V., Figeat M., et Jeanmonod, D. (2004). Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales. Troisième édition, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne, 202-207 p.

Tenaillon O., Skurnik D., Picard B., et Denamur E. (2010).The population genetics of commensal Escherichia coli. *Nature reviews microbiology*, 8(3),p: 207-217.

Tendencia E. (2004). Disk diffusion method. *In Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment* p : 13-29.

Tihar F. B., Kaci H. O. M., HAMID S., Reghmit A. E., et Sahir-Haloune F. (2021). Détermination et caractérisation des sidérophores synthétisés par quelques souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents phyto-bénéfiques. *Revue Nature et Technologie*, 13(01), p: 43.

Veron M. (1983). Biologie de *Pseudomonas aeruginosa*. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 13(6),p : 352-356.

Wang B., Lou T., Wei L., Chen W., Huang L., Ding L., ... et Wang K. (2021). Biochemical and molecular characterization of *Alternaria alternata* isolates highly resistant to procymidone from broccoli and cabbage. *Phytopathology Research*, 3, p: 1-14.

Wu W., Jin Y., Bai F., et Jin S. (2015).*Pseudomonas aeruginosa*. *In Molecular medical microbiology* .p : 753-767

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Van Meer G., et de Kroon A. I. (2011).Lipid map of the mammalian cell. *Journal of cell science*, 124(1), p: 5-8.

Yeaman M. R., et Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological reviews*, 55(1), p: 27-55.

Yuri. (2009). Fun with Microbiologie. <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2009/12/candida-albicans.html>. (Consulté le 14/05/2024)

ملخص

تركز هذه الدراسة على استكشاف الخصائص المضادة للبكتيريا والفطريات لنبات طبي ينتمي إلى الفصيلة Fabaceae . يحظى هذا النبات باهتمام كبير في البحث عن المواد الطبيعية النشطة بيولوجياً، نظراً لاستخدامه التقليدي في علاج الأمراض المختلفة. حتى الآن، تم إجراء عدد قليل من الدراسات الكيميائية النباتية والبيولوجية على هذا النوع.

في هذا العمل، تم الحصول على المستخلصين اللذين تم اختبارهما، الكلوروفورم و اسيتات الإيثيل، عن طريق الاستخلاص باستخدام مذيبات ذات قطبية متزايدة. أظهر التقدير الكمي للفلافونويدات والبولىفينول الكلي باستخدام طريقة القياس اللوني أن كلا المستخلصين غنيان بشكل معتدل بالمركبات الفينولية.

كشف تقييم النشاط المضاد للبكتيريا أن المستخلصين الكلوروفورم و اسيتات الإيثيل أعطيا مناطق تثبيط ضد بكتيريا الجرام (+) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 و *Bacillus Spizizenii* ATCC 66 33 و ضد خميرة *Candida albicans* ATTC 10 231 في حين أنها لا تظهر أي منطقة تثبيط ضد السلالات البكتيرية سالبة الجرام *Escherichia coli* NCTC 10.538 و *Pseudomonas aeruginosa* NCIMB 8626، وحتى ضد الفطر *Alternaria alternata* .

فيما يتعلق بالنشاط المضاد للبكتيريا، لوحظت أدنى قيمة التركيز المثبط الأدنى لمستخلص الكلوروفورم بالنسبة لـ *Bacillus Spizizenii* عند 6.25 ملغ/مل يليها *Staphylococcus aureus* عند 50 ملغ /مل. وبلغت قيم التركيز المثبط الأدنى لمستخلص أسيتات الإيثيل 6.25 ملغ /مل و 25 ملغ /مل ضد *Staphylococcus aureus* و *Bacillus Spizizenii* على التوالي.

أما من حيث النشاط المضاد للفطريات، فقد كان قيمة التركيز المثبط الأدنى المسجل لمستخلص الكلوروفورم (25 ملغ /مل) أقل من مستخلص أسيتات الإيثيل (50 ملغ /مل).

تشير هذه النتائج إلى أن هذا النبات له خصائص مضادة للميكروبات يمكن أن تبرر استخدامه في الطب التقليدي.

الكلمات المفتاحية: Fabaceae ، فلافونويدات، بولىفينولات، مضاد للبكتيريا، مضاد للفطريات.

Abstract

This study aims to investigate the antibacterial and antifungal properties of a medicinal plant belonging to the Fabaceae family. This plant is of great interest in the search for biologically active natural substances due to its traditional use in the treatment of various diseases. Until now, few phytochemical and biological studies have been carried out on this species.

In this study, the two tested extracts, chloroform and ethyl acetate, were obtained by maceration using solvents with increasing polarity. Quantitative estimation of flavonoids and total polyphenols by colorimetric method revealed that both extracts were moderately rich in phenolic compounds.

Evaluation of antibacterial activity revealed that both the CHCl₃ and AcOEt extracts showed inhibition zones against Gram (+) bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Bacillus Spizizenii* ATCC 6633, as well as against the yeast *Candida albicans* ATTC 10231, while they exhibited no inhibition zones against Gram (-) bacterial strains: *Escherichia coli* NCTC 10538 and *Pseudomonas aeruginosa* NCIMB 8626, and even against the fungus *Alternaria alternata*.

Regarding the antibacterial activity, the lowest MIC value of the chloroform extract is observed against *Bacillus Spizizenii* at 6.25 mg/ml, followed by *Staphylococcus aureus* at 50 mg/ml. The MIC values for the ethyl acetate extract are 6.25 mg/ml and 25 mg/ml against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus Spizizenii*, respectively.

Concerning antifungal activity, the MIC recorded against *Candida albicans* is lower for the chloroform extract (25 mg/ml) than the ethyl acetate extract (50 mg/ml). These results suggest that this plant possesses antimicrobial properties that could justify its use in traditional medicine.

Keywords: Fabaceae, Flavonoids, Polyphenols, Antibacterial, Antifungal.

Étude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique d'une plante Algérienne de la famille des Fabaceae

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et Biotechnologie Fongique

Résumé

Cette étude se concentre sur l'exploration des propriétés antibactériennes et antifongiques d'une plante médicinale appartenant à la famille des Fabaceae. Cette plante suscite un vif intérêt pour la recherche de substances naturelles biologiquement actives, étant donné son utilisation traditionnelle dans le traitement de diverses maladies. Jusqu'à présent, peu d'études phytochimiques et biologiques ont été menées sur cette espèce.

Dans ce travail, les deux extraits testés chloroforme et acétate d'éthyle ont été obtenus par macération en utilisant des solvants à polarité croissante. L'estimation quantitative des flavonoïdes et des polyphénols totaux par la méthode colorimétrique a montré que la richesse des deux extraits en composés phénoliques est modérée.

L'évaluation de l'activité antibactérienne révèle que les deux extraits CHCl_3 et AcOEt ont donné des zones d'inhibition contre les bactéries à Gram (+) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et *Bacillus Spizizenii* ATCC 66 33 et contre la levure *Candida albicans* ATCC 10 231 alors qu'ils ne présentent aucune zone d'inhibition contre les souches bactériennes à Gram négatif *Escherichia coli* NCTC 10.538 et *Pseudomonas aeruginosa* NCIMB 8626 et même contre le champignon *Alternaria alternata*.

Concernant l'activité antibactérienne, la valeur la plus faible de CMI de l'extrait chloroforme est observée sur *Bacillus Spizizenii* qui est de 6,25mg/ml ensuite sur *Staphylococcus aureus* qui est de 50 mg/ml. Les valeurs des CMI pour l'extrait acétate d'éthyle sont 6,25mg/ml et 25 mg/ml contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus Spizizenii* respectivement.

En ce qui concerne l'activité antifongique, la CMI enregistrée sur *Candida albicans* est plus faible pour l'extrait chloroforme (25 mg/ml) que l'extrait acétate d'éthyle (50 mg/ml).

Ces résultats suggèrent que cette plante possède des propriétés antimicrobiennes qui pourraient justifier son usage dans la médecine traditionnelle.

Mots-clés : Fabaceae, Flavonoïdes, Polyphénols, Antibactérienne, Antifongique.

Laboratoires de recherche: laboratoire 8 de microbiologie et Varenbiomol -U Constantine1 Frères Mentouri

Président du jury Dr ABDELAZIZ Ouidad MC(B) - U Constantine1 Frères Mentouri

Encadrant : Dr BENSALIM Sara Ouissem MC(B) - U Constantine1 Frères Mentouri

Examineur(s) : Dr BELAOUIRA Randa MC(B) - U Constantine1 Frères Mentouri