



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université ABOU-BEKR BELKAID Tlemcen

Faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers

Département de biologie.

Laboratoire :

Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique.

(Lapsab)

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

Master en Biologie

Option : Biochimie Appliquée

*Etude phytochimique et évaluation de l'activité
antibactérienne des extraits de *Frédolia aretioides* de la
région de Béchar.*

Soutenu le 28/09/2013

Réalisé par : M^{lle} BENMANSOUR FATIMA ZAHRA.



Présidente : M^{me} Boucherit-Otmani Zahia

Professeur, Université de Tlemcen

Examineur : Mr Rahmoun Mohammed Nadjib

Maitre Assistant A, Université de Tlemcen

Promoteur : Mr Boucherit Kebir

Professeur, Centre universitaire de Naama

Année Universitaire : 2013 – 2014.

Dédicaces

A mes parents, pour leur patience infinie, leur soutien sans faille et leur amour sans limite. Je ne vous remercierai jamais assez pour tous les sacrifices que vous avez faits pour moi. Ce mémoire est autant le fruit de vos efforts que de mon travail.

A mes très chers frères Raouf et Taquiyeddine, pour leur humour, leurs taquineries et leurs précieux conseils, et à mon beau-frère Djalal.

A mon unique sœur Soumia, qui n'a cessé de m'encourager tout le long de mes études et à Mansouria et Ophélie, mes sœurs de cœur !

A ma deuxième moitié, Nabil pour son aide précieuse, sa gentillesse et sa tendresse.

A mes adorables nièces Djazia, Imane et la petite Leïla, que Dieu vous garde et vous protège.

A ma grand-mère Ma-Zhor qui m'a encouragé jusqu'au bout.

A mes défunts grands-parents : Mima, Hbib et Baba que Dieu ait pitié de leurs âmes.

A la famille BENMANSOUR, SALMI et NEGADI.

A ma très chère amie Narimen pour les moments inoubliables qu'ont a passé ensemble.

A la promotion de Biochimie Appliquée 2013.

A toutes mes amies et à toute personne qui me connaît.

Téma.

Remerciements

*J'adresse tout d'abord tous mes remerciements et ma reconnaissance à **Mr Boucherit Kebir**, Professeur au centre universitaire de Naama pour avoir accepté de m'encadrer, pour m'avoir dirigé et soutenu tout le long de mon travail.*

*J'exprime aussi mes plus vifs remerciements à **Mme Boucherit-Otmani Zahia**, Professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid , Tlemcen pour ses précieuses orientations, sa remarquable gentillesse et pour m'avoir fait l'honneur de bien vouloir présider ce Jury.*

*A **Mr Rahmoun Mohammed Nadjib**, Maitre assistant de classe A à la faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid , Tlemcen pour avoir bien voulu examiner ce modeste travail.*

*Un remerciement particulier à **Melle Bentabet Nesrine**, doctorante en biochimie à l'université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen pour son aide orécieuse au quotidien, pour le partage de ses expériences, pour sa disponibilité et sa gentillesse.*

A tous mes professeurs qui ont façonné mes connaissances au fil des années, je leur suis profondément reconnaissante, qu'ils trouvent ici mes sentiments de la plus haute estime.

*A tous les étudiants en post graduation pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble et spécialement **Kamila, Imane, Houria et Rabiha**.*

Table des matières.

Première partie : synthèse bibliographique.....	01
Deuxième partie : Matériel et méthodes	06
1. Matériel biologique	07
2. Matériel végétal.....	07
3. Méthodes	08
3.1. Etude phytochimique.....	08
3.1.1. Tests phytochimiques des extraits de <i>Fredolia aretioïdes</i>	08
a- Alcaloïdes.....	08
b- Polyphénols.....	08
c- Stérols et triterpènes.....	09
d- Saponosides.....	09
e- Composés réducteurs.....	09
f- Coumarines.....	09
3.1.2. Dosage des polyphénols totaux.....	10
3.2. Etude de l'activité antibactérienne.....	10
3.2.1. Préparation des différents extraits de <i>Fredolia aretioïdes</i>	10
a- Préparation de l'extrait brut aqueux.....	10
b-Préparation de l'extrait eau /méthanol.....	10
c-Préparation de l'extrait des tanins.....	10
3.2.2. Calculs des rendements en extraits.....	11
3.2.3. Evaluation de l'activité antibactérienne de <i>Fredolia aretioïdes</i>	11
a- Technique de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode des disques)....	11
b- La méthode de la microdilution en milieu liquide (CMI)	12
c-Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	12
Troisième partie : Résultats et discussion.....	13
1. Etude phytochimique.....	14
1.1.Les tests phytochimiques.....	14
1.2.Dosage des polyphénols totaux.....	15
2. Les rendements des extraits	16
3. Etude de l'activité antibactérienne.....	18
3.1.La technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton (méthode des disques)....	18

3.2.Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI et Bactéricides (CMB)	21
a. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI)	21
b. Les concentrations minimales bactéricides (CMB)	24
Quatrième partie : Conclusion et perspectives.....	27
Cinquième partie : Références bibliographiques.....	29

Synthèse Bibliographique

Le monde végétal rassemble plus de 380 000 espèces, dont plus des deux tiers sont des plantes vertes. Les végétaux présentent des organisations et des modes de vie d'une surprenante diversité, résultat de trois milliards d'années d'évolution (**Fortin, 2006**).

Au sein de ce monde, les plantes vertes constituent le groupe le plus vaste, environ 278 000 espèces différentes. Les quatre principales subdivisions du groupe des plantes vertes sont les mousses, les fougères, les conifères et les plantes à fleurs. Ces dernières sont de loin les plus nombreuses, avec près de 234 000 espèces (**Fortin, 2006**).

La flore africaine en général, regorge d'une importante réserve de plantes à caractère aromatique et médicinal (**Badiaga, 2011**).

Les plantes sont dites médicinales, lorsqu'un de leurs organes possède des activités pharmacologiques pouvant conduire à des emplois thérapeutiques [(**kassel, 1996**) ; (**Clément, 2005**)]. Ces plantes portent à la fois sur les plantes endémiques dites « sauvages » ou de « cueillettes » et sur les plantes cultivées. Les plantes endémiques représentent encore 60 à 70% des drogues du marché européen (**Bezanger et coll., 1975**).

Parmi les utilisateurs potentiels de ces plantes, la médecine et la pharmacopée traditionnelles, viennent en tête avec ceux qui les pratiquent, à savoir 80% du tiers monde (**Sofowora, 2010**).

Les plantes constituent par excellence, les principaux moyens médicamenteux pour des soins pratiqués en santé publique. **Kerharo et Adam (1950)** rapportent qu'en médecine traditionnelle, certains organes de plantes, telles que les feuilles, les écorces et les racines sont utilisées dans le traitement d'affections courantes comme la bronchite, la trachéobronchite, etc., et ils trouvent aussi des applications en médecine dentaire.

Plusieurs plantes sont réputées pour leurs bien thérapeutiques, surtout pour leurs effets antiseptique et antibactérien, comme le Romarin, la Sauge, le Thym, l'Ail, l'Anis, la Camomille, l'Eucalyptus, le Grenadier, l'Oranger doux, etc. (**Lucienne, 2010**).

Les plantes renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme appelées métabolites secondaires. On distingue ainsi deux groupes de métabolites: les métabolites primaires et les métabolites secondaires (**Marc et coll., 2004**).

Les métabolites secondaires ont des intérêts multiples. Ils sont mis à profit en thérapie comme anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants, antibactériens, anticancéreux, antifongiques, diurétiques... (**Hartmann, 2007**).

Ces métabolites secondaires sont classés en plusieurs composants chimiques dont les plus répandus sont les terpènes, les alcaloïdes et les polyphénols [(Cuendet, 1999) ; (Vermerris, 2006)]. Chaque classe renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une large gamme d'activité biologique (Li *et coll.*, 2007).

Les plantes ont été employées traditionnellement sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. Il reste difficile de définir la réserve biochimique responsable de l'action, bien que certains effets pharmacologiques prouvés sur l'animal aient été attribués à des composés tels que les alcaloïdes, les terpènes et les composés polyphénoliques (Bruneton, 1999).

De nombreuses espèces de grande importance pour la santé des populations méritent d'être étudiées scientifiquement pour leur meilleure utilisation. Ceci pourra constituer une excellente alternative aux problèmes de résistance et de cytotoxicité des antimicrobiens (Tim et Andrew, 2005).

L'analyse des cas de maladies émergentes a révélé que les bactéries sont responsables de plus de 50% des maladies (Jones *et coll.*, 2008). Malheureusement, les maladies infectieuses bactériennes ont tendance à s'émerger, comme par exemple la tuberculose qui émerge toujours malgré la découverte de streptomycine en 1944 (Berche, 2007).

Face aux obstacles que présente l'utilisation des anti-infectieux, il est indispensable de rechercher de nouvelles substances antimicrobiennes efficaces de large spectre d'action. Une des stratégies pour cette recherche consiste à explorer les plantes utilisées en médecine traditionnelle (Biyiti *et coll.*, 2004).

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries. Cette propriété les distingue des antiseptiques (Bergogne-Berezin et Dellamonica, 1995).

La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents a entraîné la sélection de souches multi-résistantes. Ces dernières deviennent un problème réel d'extrême importance à travers le monde (Goulet *et coll.*, 2009), d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouvelles voies et surtout vers les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouveaux médicaments (Billing et Sherman, 1998).

La flore algérienne regorge de plusieurs espèces de plantes encore peu ou pas étudiées, mais dotées de réelles propriétés pharmacologiques. C'est le cas le *Citrullus colocynthis*, *Juniperus phoenicea*, *Rosmarinus officinalis*, *Péganum harmala*, *Tetraclinis articulata*, *Zyzyphus lortus*... [(Graham *et coll.*, 2000) ; (Bnouham *et coll.*, 2002) ; (Gonzales-Tejero *et coll.*, 2008)]

Les ressources végétales spontanées du Sahara Algérien constituent une flore d'environ 500 espèces de plantes supérieures dont une partie reste de nos jours utilisée par les populations comme plantes médicinales (**Ozenda, 1983**).

C'est pour cela qu'on s'intéresse à l'étude de la plante *Fredolia aretioïdes*, qui est une plante endémique d'Algérie et du Maroc commune dans le Sahara au nord ouest du Tafilalet, Tinghir au Maroc, à travers Béni-Ouenif, Ain Sefra et Béchar dans le désert d'Algérie (**Khedache, 1999**).

L'espèce *Fredolia aretioïdes* appelée plus communément Degaa, El selig ou bien le chou-fleur de Bou Hamama, appartient à la famille des chénopodiacées, qui est une famille largement répandue dans les habitats salins tempérés, en particulier dans les régions littorales de la mer méditerranée, les steppes arides et les déserts. C'est une plante adaptée à la sécheresse due au climat ou à la salinité du sol ce qui explique la richesse de cette plante en ions alcalins (Na^+ , k^+ ...) (**Mulas, 2004**).

Les plantes appartenant à cette famille sont traditionnellement utilisées pour traiter non seulement le diabète (*Fredolia aretioïdes*, *Atriplex halimus*, *Salsola tetragona*, *Chenopodium ambrosioides*) mais aussi d'autres maladies comme les irritations du foie et de la vésicule biliaire, les infections cutanées d'origine bactériennes, etc (**Ghourri et coll., 2013**).

Fredolia aretioïdes a la forme d'un arbuste vigoureux cylindrique, d'un mètre de hauteur. Ses branches sont très compactes avec de nombreuses petites feuilles de couleur bleu-vert très serrées, coriaces et de formes charnues qui ne dépassent pas les 5 mm. Le fruit est un akène entouré par de petites ailes transparentes du périanthe persistant, comprimé dorsalement. La floraison a lieu en automne.

Elle se trouve sur les rochers et plateaux caillouteux (reg et hamada), de forme particulière ronde. Les petites feuilles charnues ainsi que les longues racines rampantes à travers les crevasses verticales permettent à la plante de s'épanouir dans des conditions climatiques sévères où les précipitations annuelles ne dépassent pas les 100 mm par an [(**Trabut, 1935**); (**Quezel et Santa, 1962**); (**Benhouhou et Saadoun, 1986**); (**Ozenda, 1991**); (**Baba Aissa, 1999**)] (Photo N°1 et 2).



Photo N°1:

Photo de la partie aérienne de la plante
Fredolia aretioïdes.



Photo N°2:

Photo des racines de la plante de
Fredolia aretioïdes.

Selon **Cosson et Durieu (1885)**, cette plante est utilisée en médecine traditionnelle. Ses feuilles sont préparées sous forme d'infusion ou bien de décoction alors que les racines uniquement sous forme de décoction. Elle est utilisée en tant qu'antirhumatismal, diurétique, hypoglycémiant et antidote aux poisons. L'écorce de la racine est utilisée comme bois de chauffage.

Cosson et Durieu (1885), ont classé notre plante dans la systématique comme suit :

Domaine	:	Eucaryote
Règne	:	Plante
Sous règne	:	Viridaeplantae
Embranchement	:	Magnoliophyta
Sous embranchement	:	Euphyllophytina
Classe	:	Magnoliopsida
Sous classe	:	Caryophyllidae
Ordre	:	Caryophyllales
Sous ordre	:	Chenopodineae
Famille	:	Chenopodiaceae
Genre	:	<i>Fredolia</i>
Espèce	:	<i>aretioïdes</i>
Nomenclatures botanique	:	<i>Fredolia aretioïdes</i>

Matériel

Et

Méthodes

Dans le cadre de l'évaluation de l'activité antimicrobienne des plantes médicinales algériennes, au cours de notre étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antibactérienne de certains extraits des racines et des feuilles de *Fredolia aretioïdes*.

1. Matériel végétal :

Le matériel végétal est constitué par les feuilles (**Photo N°1**) et les racines (**Photo N°2**) de *Fredolia aretioïdes*, récolté dans la Wilaya de Bechar, située dans le sud-ouest d'Algérie, entre Février et Mars 2013. La partie aérienne et la racine ont été débarrassées du sable collé. Après, les différents organes du matériel végétal ont été séchées à l'ombre et à température ambiante (**Brunneton, 1999**).

Après séchage, les deux parties ont été finement broyées à l'aide d'un broyeur mécanique et conservées dans des bocaux hermétiques, à sec et à l'abri de l'humidité.

2. Matériel biologique :

Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits de *Fredolia aretioïdes*, nous avons choisi des souches bactériennes de références. Ces dernières sont disponibles au laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique.

Il s'agit de :

✓ Quatre (4) souches à Gram positif :

Enterococcus faecalis ATCC 25212

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Staphylococcus aureus methicillin resistant ATCC 43300

Bacillus cereus ATCC 25212

✓ Quatre (4) souches à Gram négatif :

Escherichia coli ATCC 25933

Enterobacter cloacae ATCC 13047

Acinetobacter baumannii ATCC 19606

Klebsiella pneumoniae ATCC 70603

3. Méthodes :

3.1. Etude phytochimique :

3.1.1. Tests phytochimiques des extraits de *Fredolia aretioïdes* :

a- Alcaloïdes

Nous avons placés 10g de poudre de *Fredolia aretioïdes* dans 50 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 10 %. Après une macération de 24 heures suivie d'une filtration, nous avons complété le filtrat à 50 mL avec de l'eau distillée.

Ensuite, dans deux tubes à essai nous avons introduit 1 mL de filtrat et ajouté 5 gouttes de réactif de Mayer dans le premier tube et 5 gouttes de réactif de Wagner dans le second. L'apparition d'un précipité indique la présence d'alcaloïdes (**Mojab et coll., 2003**).

b- Polyphénols

Pour la mise en évidence des tanins, des flavonoïdes et des anthocyanes, nous avons préparé un infusé à 5% pendant 15 minutes.

❖ Tanins

Dans un tube à essai, nous avons introduit 5 mL d'infusé à 5 % et ajouté 1 mL d'une solution aqueuse de trichlorure ferrique ($FeCl_3$) à 1 %. En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.

➔ Tanins catéchiqes

A 5 mL d'infusé à 5%, nous avons ajouté 5 ml d'acide chloridrique concentré. L'ensemble est porté à ébullition pendant 15 min puis filtré sur papier filtre. En présence des tanins catéchiqes, il se forme un précipité rouge soluble dans l'alcool isoamylique.

➔ Tanins galliques : réaction de Stiasny

A 30 mL d'infusé à 5 %, nous avons ajouté 15 mL de réactif de Stiasny (10 mL de formol à 40 % et 5 mL d'acide chloridrique concentré), puis nous avons chauffé au bain-marie à 90 °C pendant 15 min environ. Après filtration, nous avons ajouté goutte à goutte une solution de trichlorure ferrique ($FeCl_3$) à 1 % (**Karumi et coll., 2004**).

❖ Anthocyane

A l'infusé à 5 %, nous avons ajouté 5 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 10 % puis de l'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) à 25%. Si la coloration s'accroît par acidification, puis vire au bleu-violacée en milieu basique, cela permet de conclure la présence d'anthocyanes (**Bruneton, 1999**).

➔ Flavonoïdes

5 mL d'infusé à 5% sont ajoutés à 2 mL d'acide chloridrique concentré (HCl) et 0,2g de copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose orangée, rose violacée ou rouge indique la présence des flavonoïdes.

✦ Leucoanthocyanes

Nous avons effectué la réaction à la cyanidine sans ajouter les copeaux de magnésium et chauffé au bain-marie pendant 15 min. En présence des leucoanthocyanes, il se développe une coloration rouge cerise ou violacée. Les catéchols donnent une teinte brun-rouge (**Malec et Pamelio, 2003**).

c- Stérols et triterpènes

1 g de poudre de *Frédolia arétioides* est ajouté à 20 mL d'éther et laissés macérer pendant 24 heures. Après évaporation à sec de 10 mL de l'extrait, nous avons dissous le résidu dans 1 mL d'anhydride acétique et 1 mL de chloroforme. Ensuite, nous avons ajouté 1 mL d'acide sulfurique concentré. La formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet dans la zone de contact des deux liquides témoigne de la présence des stérols et triterpènes [(**Bruneton, 1999**) ; (**Edeoga et coll., 2005**)].

d- Saponosides

Nous avons préparé un décocté à 1% pendant 15 minutes. Ensuite, dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, nous avons reparti successivement 1,2,...10 mL de la solution décoctée. Le volume final est ajusté à 10 mL avec de l'eau distillée. Chaque tube est agité dans le sens de la longueur pendant 15 secondes. Après avoir laissé les tubes au repos pendant 15 minutes, nous avons mesuré la hauteur de la mousse dans chacun d'eux.

Le tube dans lequel la hauteur de la mousse dépasse 1 cm indique la présence des saponosides qui est calculée par la formule suivante (**Dohou et coll., 2003**)

$$I = \text{Hauteur de mousse (en cm) dans } X^{\text{ème}} \text{ tube} * 5/0,0X$$

e- Composés réducteurs

A 5 mL de la solution décoctée à 10 %, nous avons ajouté 1 mL de réactif de Fehling (0,5 mL de réactif A et 0,5 mL de réactif B mélangés en extemporané). Un test est jugé positif s'il y a apparition d'un précipité rouge brique après chauffage (**Trease et Evans, 1987**).

f- Coumarines

1g de la poudre végétale est placé dans un tube en présence de quelques gouttes d'eau distillée. Les tubes sont recouverts avec le papier imbibé de NaOH dilué et sont portés à ébullition. Toute fluorescence jaune témoigne de la présence des coumarines après examen sous ultra-violet (**Bruneton, 1999**).

3.1.2. Dosage des polyphénols totaux:

L'extrait eau/méthanol (macération 48 heures et évaporation à sec) est solubilisé dans le méthanol à une concentration de 1 g/L pour le dosage des polyphénols totaux. Le taux de polyphénols totaux des extraits de la plante étudiée est déterminé par spectrophotométrie en utilisant le réactif de Folin Ciocalteu. La coloration produite dont l'absorption maximum est comprise entre 700 et 760 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux. Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par **Vermerius et Nicholson (2006)**.

0.1 mL de l'échantillon est mélangé avec 2 mL d'une solution de carbonate de sodium à 2% ; Après agitation et d'incubation pendant 5 minutes, 100 µL du réactif de Folin Ciocalteu à 1N sont additionnés. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la lecture des DO (densités optiques) est faite à 700 nm contre un blanc. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions expérimentales en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à des concentrations finales allant de 0,1 à 1 mg/mL.

3.2. Etude de l'activité antibactérienne:

3.2.1. Préparation des différents extraits de *Fredolia aretioïdes* :

a- Préparation de l'extrait brut aqueux

Nous avons utilisé la technique d'extraction sous reflux continue. 10g de poudre des deux parties de *Fredolia aretioïdes* sont mises en contact avec 100mL d'eau distillée. L'opération est répétée trois (03) fois en renouvelant le solvant toutes les 30 minutes. Les trois (03) fractions sont réunies puis filtrées et évaporées à sec.

b- Préparation de l'extrait eau /méthanol :

Pour la préparation de l'extrait eau/méthanol, nous avons utilisé le protocole **d'Upson et ses collaborateurs (2000)**. 5g de poudre végétale sont laissées macérer pendant 48h dans 50mL de méthanol à 70% en renouvelant le solvant toutes les 24 heures. Après filtration, le filtrat est évaporé sous vide à sec en utilisant un rotavapeur.

c- Préparation de l'extrait des tanins :

L'extraction des tannins des feuilles et racines de la plante *Fredolia aretioïdes* est réalisé selon la méthode de **Zhang et coll., 2008**. Les broyats de la matière végétal (2.5 g) ont été extraites par 50 mL du mélange acétone/eau (35/15 : V/V) durant trois jours à température ambiante. La solution obtenue est filtrée et évaporée à 40°C par un rotavapeur type bouché R-200 pour éliminer l'acétone. Puis la phase aqueuse est lavée par le dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides. Après élimination de la phase organique, la phase aqueuse a été traitée

trois fois avec l'acétate d'éthyle (V/V). Les 3 phases organiques obtenues sont réunies et évaporées à sec à 40°C par un rotavapeur. La phase aqueuse restante est traitée trois fois par le n-butanol. Les phases n-butanol sont évaporées à sec, afin de récupérer l'extrait sous forme de poudre.

3.2.2. Calculs des rendements en extraits:

Le rendement en extrait brut est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait brut sec et la masse du matériel végétal broyé à traiter.

$$R = (M1/M2) \times 100$$

R : rendement en extrait brut sec exprimé en %.

M1 : masse en grammes de l'extrait brut sec.

M2 : masse en grammes du matériel végétal broyé.

3.2.3. Evaluation de l'activité antibactérienne de *Fredolia aretioïdes* :

L'activité antibactérienne des différents extraits de *Fredolia aretioïdes* a été évaluée par deux méthodes de référence:

- La technique de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode des disques);
- La méthode de microdilution en milieu liquide pour déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et les Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) selon la technique de Charbet.

Il faut noter que le DMSO à la concentration finale utilisée, n'exerce aucune activité vis-à-vis des souches testées.

a- Technique de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode des disques) :

Pour la préparation de l'inoculum, chaque culture bactérienne est ensemencée en stries sur une gélose nutritive pour obtenir des colonies bien isolées. Après une incubation à 37°C pendant 24 heures, quelques colonies sont transférées à l'aide d'une anse de platine dans un tube à essai contenant de l'eau physiologique. Les densités optiques sont ajustées à l'aide d'un spectrophotomètre «SPECORD 200 plus» à une longueur d'onde de 625 nm. La densité optique doit être comprise entre 0,08 et 0,1 l'équivalent de 10^8 UFC/mL (CLSI, 2006).

L'inoculum ainsi préparé est dilué au 1/100^{ème} dans de l'eau physiologique. La densité optique finale obtenue de l'inoculum doit être équivalente à 10^6 UFC/mL. Les boîtes de Pétri contenant le milieu Muller Hinton gélosé sont ensemencées par écouvillonnage (EUCAST, 2003).

Des disques de 6 mm de diamètre sont préparés en extemporané à partir de papier filtre stérile, puis imprégnés avec les extraits à tester (20µL pour chaque disque). Les disques sont placés aseptiquement sur la gélose inoculée préalablement. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures. L'activité antibactérienne est déterminée par mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des disques. L'activité antibactérienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et est exprimé en millimètre (EUCAST, 2003).

b- La méthode de la microdilution en milieu liquide (CMI) :

Le bouillon Muller Hinton (MHB) supplémenté en cations est largement utilisé comme milieu standard pour la microdilution en plaque. Il permet une meilleure croissance de la plupart des bactéries pathogènes non exigeantes, en plus de son faible effet antagoniste vis-à-vis des antibiotiques (EUCAST, 2003). La microplaque à 96 puits permet de déterminer les CMI des différents extraits végétaux. Dans les puits des colonnes 1 à 12, nous avons introduit à l'aide d'une micropipette 100µL de bouillon Muller Hinton (MHB). Ensuite, 100µL de l'extrait végétal est ajouté dans le 2ème puits (qui servira de témoin négatif) et 100µL dans le 3ème puits. A partir de ce dernier, nous avons procédé à des dilutions de 100µL de puits à puits à l'aide d'une micropipette. Le facteur de $\frac{1}{2}$ est pris en considération dans le calcul des concentrations des produits à tester. Chaque puits contient 100µL de bouillon et le produit testé en dilution. Ensuite, nous avons additionné 100µL de l'inoculum (10^6 UFC/mL) dans les 96 puits sauf ceux de la colonne 2 (témoin négatif). Le puits 1 sert de témoin positif (100µL du bouillon et 100µL de l'inoculum). La microplaque est couverte et incubée à 37°C de 18 à 20 heures. La lecture se fait à l'œil nue sachant que la CMI est la plus faible concentration de la substance testée, à laquelle aucun trouble visuel n'est observé. Nous avons utilisé comme antibiotique de référence la gentamycine à partir d'une solution mère d'une concentration de 5,12 mg/mL.

c-Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) :

La CMB est définie comme étant la plus faible concentration de l'antibiotique qui détruit 99,9% de la concentration cellulaire finale. Après la détermination de la CMI, les deux puits contenant les concentrations en substance antibiotique strictement supérieures à la CMI ont servi pour la détermination de la CMB. Pour ce faire, un échantillon de 20µL de chaque puits (ne présentant pas de croissance) sont transférés dans des boîtes de Pétri contenant du Muller Hinton Agar (MHA).

Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte correspondant à la CMB compte un nombre de colonies inférieur à 3 (EUCAST, 2003).

Résultats

Et

Discussion

1. sEtude phytochimique :

1.1. Les tests phytochimiques :

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

Les résultats des tests phytochimiques effectués sur les deux parties (aérienne et racine) de la plante étudiée «*Fredolia aretioides*» sont représentés dans le **tableau N°1**.

Dans les deux parties de la plante (aérienne et racines), la recherche des tanins, des composés réducteurs, des alcaloïdes, des saponosides, des coumarines, des stérols et triterpènes ainsi que des anthocyanes s'est montrée positive. Les coumarines sont retrouvées dans chaque partie suite à l'apparition d'une fluorescence sous la lumière UV mais à une faible intensité. Le test des flavonoïdes a révélé une faible présence d'anthocyanes dans la partie aérienne et dans les racines. Les tanins galliques ont été mis en évidence suite à la réaction de coloration et cela en forte concentration.

Pour les alcaloïdes, leur présence est plus importante dans les racines que dans la partie aérienne. Nous remarquons aussi une forte présence de saponosides avec une formation de mousse qui dépassent les 3 cm de hauteur et cela dans chaque partie de la plante.

Tableau N°1 : Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans les deux parties de *Fredolia aretioides*.

Métabolites secondaires		Partie racine	Partie aérienne
Alcaloïdes		+++	++
Tanins	Galliques	+++	+++
	Catéchiques	-	-
Anthocyanes		++	+
Réaction à la cyanidine		-	-
Leuco anthocyanes		-	-
Composés réducteurs		+++	+++
Coumarines		+	++
Stérols et triterpènes		+++	+++
Saponosides		+++	+++

Réaction fortement positive : +++
 moyennement positive : ++

Réaction faiblement positive : + Réaction
 négative : -

1.2. Dosage des polyphénols totaux :

L'estimation quantitative des polyphénols totaux a été réalisée en utilisant le Folin-Ciocalteu et l'acide gallique a été utilisé comme standard (Li *et coll.*, 2007).

En se basant sur les valeurs d'absorbance des deux solutions d'extraits ayant réagi avec le réactif de Folin Ciocalteu et comparées à la solution étalon en équivalent d'acide gallique, les résultats de l'analyse colorimétrique des composés phénoliques totaux sont représentés dans le **tableau N° 2**.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par 100 grammes de la matière végétale sèche (mg GAE/100g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (**figure N°1**).

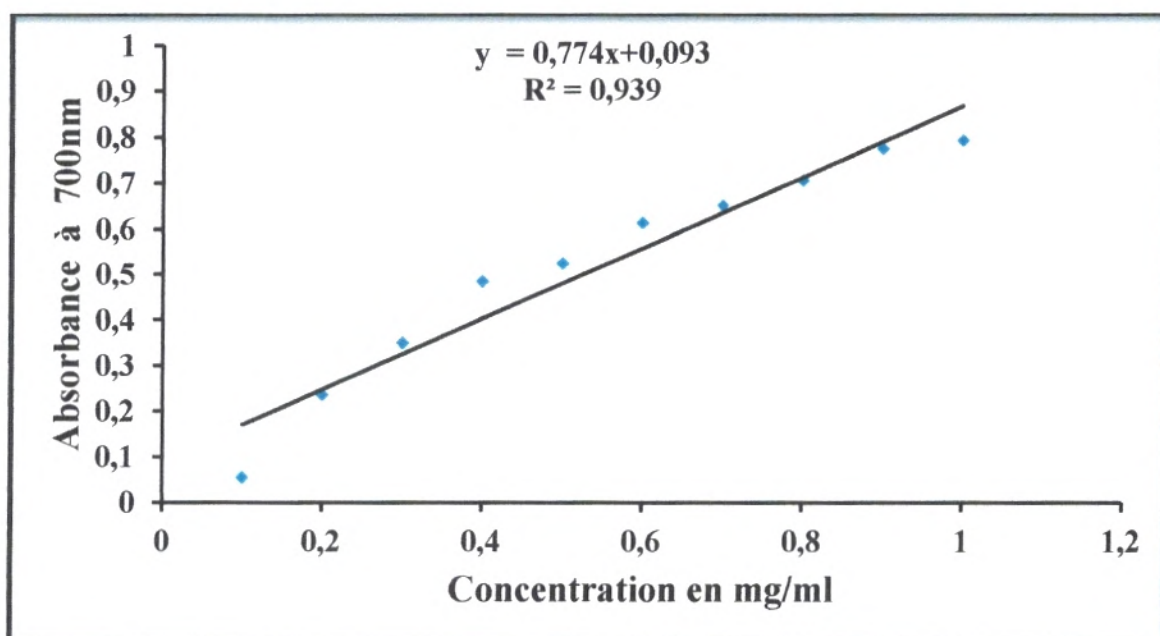


Figure N°1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Tableau N°2 : Teneur en polyphénols des extraits de *Fredolia aretioides* exprimée en mg Equivalent d'Acide Gallique par gramme d'extrait

	Partie aérienne	Racines
Polyphénols totaux mg EAG/100g E	140,77	338,870

Nous avons remarqué dans les deux parties de la plante étudiée que la teneur en polyphénols est variable, or la valeur la plus importante est celle des racines qui est égale à 338,87 mg GAE/100g alors que celle des la partie aérienne est de l'ordre de 140,77 mg GAE/100g.

Ces résultats sont compatibles avec ceux représentés dans le **tableau N°3** où nous observons que le rendement des racines est supérieur à celui de la partie aérienne. Ceci incite à croire que les racines sont plus riches en polyphénols à savoir les tanins que la partie aérienne.

Selon une étude faite par **Rached et coll., (2010)**, la teneur des phénols totaux dans les racines de *Fredolia aretioides* est de l'ordre de 110,92±6.34mg GAE/100g avec une teneur négatif dans les feuilles. Ce taux est nettement inférieur et différent de nos résultats qui sont plus élevés dans les deux parties de la plante. Ceci peut être due à la période de récolte qui a été faite pendant le mois de Juin pour les études de **Rached** et son équipe (2010) alors que notre plante a été récoltée au mois de Février.

Le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement d'une plante à autre, cela peut être attribué à plusieurs facteurs :

- Facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies... etc. (**Ebrahimi et coll., 2008**).
- Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante (**Miliauskas et coll., 2004**).
- La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux (**Lee et coll., 2003**).

2. Les rendements des extraits :

Les extractions des différents composés les plus abondants dans notre plante nous ont permis de calculer le rendement de chaque extrait notamment les extraits bruts aqueux, eau/méthanol mais aussi ceux des tannins (fraction acétate d'éthyle et n-butanol). Le rendement qui a été déterminé par rapport à 100 g de matière végétale sec et broyé est exprimé en pourcentage. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau N°3** et la **Figure N°2**.

Tableau N°3 : Rendements des extraits des deux parties de la plante *Fredolia aretioides*.

Extraits	Rendement %	
	Partie racine	Partie aérienne
Brut : aqueux	59,2%	23,3%
Brut : eau/méthanol	63,8%	12,15%
Spécifique : Tanins fraction Acétate d'éthyle	13,4%	11,5%
Spécifique : Tanins fraction n-Butanol	10,2%	23,6%

Les rendements en extraits bruts sont plus élevés. Le taux le plus important est celui de l'extrait brut eau/méthanol de la partie racine avec 63,8% suivi de l'extrait brut aqueux de la même partie avec 59,2% et l'extrait aqueux de la même partie (23,3%). Ceci nous permet d'en déduire que les racines sont plus riches en métabolites secondaires (tanins, alcaloïdes...) que la partie aérienne.

Pour l'extrait spécifique des tanins, nous remarquons que la fraction n-butanol de la partie aérienne a donné un rendement plus élevé que celui de la partie racines (23,6% et 10,2% respectivement). Ces résultats couplés à ceux des tests phytochimiques, nous permettent de conclure que les racines de notre plante sont riches en métabolites secondaires essentiellement en polyphénols (Tanins).

3. Etude de l'activité antibactérienne :

3.1. La technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton (méthode des disques) :

La technique de diffusion des disques sur milieu solide est une technique qualitative basée sur la mesure des diamètres d'inhibitions en mm. Cette mesure est transcrite dans différents symboles proportionnels à l'activité (**Biyiti et coll., 2004**). En effet, les extraits obtenus ont été testés sur des souches bactériennes de référence (Gram+ et Gram-).

Les résultats des tests qualitatifs de l'activité antibactérienne des extraits de *Fredolia aretioides* obtenus sont regroupés dans les **tableaux N° 5 et 6**. Les valeurs indiquées sont les moyennes des triplicatas pour chaque test.

Les résultats obtenus avec les différents extraits des racines de *Fredolia aretioides* montrent clairement que les souches sont plutôt sensibles aux deux fractions acétate d'éthyle et n-butanol avec des diamètres de zone d'inhibition qui varient entre 9 et 20 mm. La souche *Staphylococcus aureus methicillin resistant* ATCC 43300 et *Escherichia coli* ATCC 25933 sont très sensibles à la fraction n-butanol.

La fraction acétate d'éthyle a un réel effet antibactérien sur la totalité des souches bactériennes de références en donnant des diamètres d'inhibition variables (9-14mm). Les extraits bruts aqueux et eau/méthanol quant à eux, n'ont aucun effet sur la majeure partie des souches sauf vis-à-vis d'*Acinetobacter baumannii*, de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603 et d'*Enterobacter cloacae* (9mm).

Tableau N°5: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits de la partie racines de *Fredolia aretioides*.

Extractions Souches	Brut Aqueux	Brut Eau/Méthanol	Fraction Acétate d'éthyle	Fraction n-butanol
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	/	8	14	11
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 25212	/	8	14	9
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	8	8	13	10
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	9	/	9	20
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25933	/	/	12	14
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	9	9	10	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70603	8	9	10	9
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	/	9	11	9

Diamètre de disque inclus.

/ : Pas d'effet.

Tableau N°6: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits de la partie aérienne de *Fredolia aretioides*.

Souches	Extraits			
	Brut Aqueux	Brut Eau/Méthanol	Fraction Acétate d'éthyle	Fraction n-butanol
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	/	8	9	/
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 25212	/	/	/	/
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	/	12	11	11
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	/	/	10	/
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25933	/	10	12	/
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	/	13	9	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70603	/	13	10	8
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	/	8	7	/

En se basant sur les résultats illustrés dans le **tableau N° 6** nous pourrions déduire que :

- *Staphylococcus aureus* methicillin resistant ATCC 43300 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sont sensibles vis-à-vis de la fraction acétate d'éthyle de la partie aérienne de notre plante.
- *Bacillus cereus* ATCC 25212 est sensible à tous nos extraits sauf à l'extrait brut aqueux.
- L'extrait eau/méthanol a une bonne activité antibactérienne, contrairement aux résultats obtenus avec les racines.
- La fraction n-butanol, n'a donné aucun résultat positif sauf pour *Bacillus cereus* ATCC 25212 (11 mm de diamètre).

3.2. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et Bactéricides (CMB) :

La CMI est un critère d'importance majeure. Elle est jugée comme la plus faible concentration à laquelle nous observons une réduction importante de la croissance bactérienne (aucun trouble n'est observé). Ces concentrations nous permettent de comparer l'activité de nos extraits avec celle de l'antibiotique de référence choisi. Ce dernier doit être actif sur toutes les souches testées. Sa préparation s'effectue dans de l'eau distillée stérile selon **EUCAST (2003)**.

Notre choix s'est porté sur la gentamycine préparée à une concentration mère de 5120µg/ml.

a- Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) :

Les racines de *Fredolia aretioides* sont très riches en métabolites secondaires (tanins, alcaloïdes...). Après avoir effectué nos tests, des différents extraits sur les 8 souches bactériennes (**tableau n°7**), nous avons remarqué que :

Certaines souches sont moins sensibles par rapport à d'autres. C'est le cas de *Staphylococcus aureus methicillin resistant* ATCC 43300 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603 qui sont très sensibles aux extraits de *Fredolia aretioides*, présentant des CMI entre 0,625 et 5,75 mg/mL. L'extrait brut aqueux a une faible activité inhibitrice avec des CMI qui varient entre 41,5 et 100 mg/mL. L'extrait hydrométhanolique a une meilleure activité antibactérienne que l'extrait aqueux. Cet extrait a donné de très bons résultats vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, de *Staphylococcus aureus methicillin resistant* ATCC 43300 et de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603 avec des CMI égales à 5,75 ; 2,875 et 0,7187 mg/mL respectivement.

Les bactéries réagissent de différentes manières. Certaines peuvent présenter une résistance et d'autres une très forte sensibilité vis-à-vis d'une seule et même substance.

Tableau N°07: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) (mg/mL) des extraits de la partie racines de *Fredolia aretioides* vis-à-vis des souches bactériennes.

Extraits Souches	Brut Aqueux	Brut Eau/Méthanol	Fraction Acétate d'éthyle	Fraction n-butanol	Gentamycine (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	50	5,75	20	12,5	0,19±0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 25212	100	50	25	19	0,78±0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	41,5	23	2,5	2,5	0,19±0
<i>Staphylococcus aureus MRSA</i> ATCC 43300	2,734	0,718	0,625	1,25	0,39±0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25933	100	11,5	2,5	12,5	0,32±0,11
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	41,5	23	2,5	1,25	0,65±0,22
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70603	5,47	2,87	2,5	5	4,166±1,80
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	41,5	46	2,5	2,5	2,603±0,90

Tableau N°08: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) (mg/mL) des extraits de la partie aérienne de *Fredolia aretioides* vis-à-vis des souches bactériennes.

Extraits Souches	Brut Aqueux	Brut Eau/Méthanol	Fraction Acétate d'éthyle	Fraction n-butanol	Gentamycine (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	100	12,5	19	50	0,19±0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 25212	100	25	11,5	20	0,78±0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	/	46	0,593	12,5	0,19±0
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	6,25	5,75	4,75	3,125	0,39±0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25933	100	25	9,5	25	0,32±0,11
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	83	23	9,5	12,5	0,65±0,22
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70603	12,5	5,75	9,5	6,25	4,166±1,80
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	/	25	19	12,5	2,603±0,90

A partir des résultats présentés dans le **tableau N° 8**, nous pouvons dire que l'extrait brut aqueux est très actif vis-à-vis de *Staphylococcus aureus methicillin resistant* ATCC 43300 (6,25 mg/ml). Ce dernier montre une faible activité vis-à-vis des autres souches bactériennes. *Bacillus cereus* ATCC 25212 est très sensible vis-à-vis de l'extrait acétate d'éthyle avec une CMI égale à 0,593. Les autres souches bactériennes sont plus ou moins sensibles à différents extraits et à différents degrés.

Ces résultats nous permettent de conclure que :

-*Acinetobacter baumannii* est très sensible à l'extrait n-butanol des racines et à l'extrait acétate d'éthyle des racines.

- Les extraits acétate d'éthyle et n-butanol de la partie aérienne sont un peu moins actifs vis-à-vis d'*Acinetobacter baumannii*.
- Les extraits aqueux et hydrométhanoliques sont les moins actifs avec des CMI qui varient entre 23, 41.5 et 83 mg/mL.
- Les deux fractions (acétate d'éthyle et n-butanol) de l'extrait spécifique des tanins des racines de *Fredolia aretioides* sont les seuls extraits pour lesquels *Enterobacter cloacae* montre une sensibilité.
- Bacillus cereus* ATCC 25212 s'est montrée très sensible à l'extrait acétate d'éthyle de la partie aérienne.
- Staphylococcus aureus* ATCC 25923 montre une sensibilité vis-à-vis de l'extrait eau/méthanol de la partie aérienne et sensible à l'extrait acétate d'éthyle des racines de la plante étudiée.
- Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603 est très sensible tout d'abord à l'extrait acétate d'éthyle des racines et à l'extrait eau/méthanol des la même partie.
- Staphylococcus aureus methicillin resistant* ATCC 43300 est la souche ayant été la plus sensible à nos extraits surtout à l'extrait acétate d'éthyle des racines avec une CMI de 0,625 mg/mL et à l'extrait eau méthanol de la même partie de *Frédolia arétioides* avec 0,7187mg/mL.
- Malgré la grande sensibilité de cette souche vis-à-vis de nos extraits, la gentamycine reste un antibiotique ayant un effet inhibiteur encore meilleur que celui des extraits de notre plante.

b- Les concentrations minimales bactéricides (CMB) :

À partir des résultats obtenus et illustrés dans les tableaux N° 9 et N°10, nous pouvons dire que :

- L'extrait n-butanol des racines de *Fredolia aretioides* est le plus bactéricide vis-à-vis d'*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, d'*Enterobacter cloacae* ATCC 13047 et de *Bacillus cereus* ATCC 25212.
- L'extrait acétate d'éthyle des racines s'est montré le plus bactéricide pour *Bacillus cereus* ATCC 25212, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Staphylococcus aureus methicillin resistant* ATCC 43300, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603 et *Escherichia coli* ATCC 25933.
- Les extraits aqueux des deux parties de la plante sont les moins actifs vis-à-vis des différentes souches bactériennes de référence utilisées.

- Les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides montrent que la majorité des extraits de *Fredolia aretioides* possèdent une assez bonne activité antibactérienne, mais qui reste inférieure à la gentamycine.

Tableau N°09: Concentrations minimales bactéricides (CMB) (mg/mL) des extraits de la partie racines de *Fredolia aretioides* vis-à-vis des souches bactériennes.

Extraits Souches	Brut Aqueux	Brut Eau/Méthanol	Fraction Acétate d'éthyle	Fraction n-butanol	Gentamycine (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	100	11,5	20	25	0,19±0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 25212	100	50	50	19	0,78±0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	41,5	46	5	5	0,19±0
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	5,46	1,43	1,25	2,5	1,56±0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25933	100	11,5	5	12,5	0,32±0,11
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	83	46	2,5	1,25	0,78±0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70603	10,94	5,75	5	10	8,33±3,6
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	41,5	46	5	5	5,20±1,8

Tableau N°10: Concentrations minimales bactéricides (CMB) (mg/mL) des extraits de la partie aérienne de *Fredolia aretioides* vis-à-vis des souches bactériennes.

Extraits Souches	Brut Aqueux	Brut Eau/Méthanol	Fraction Acétate d'éthyle	Fraction n-butanol	Gentamycine (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	100	25	19	100	0,19±0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 25212	100	25	11,5	20	0,78±0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	/	92	1,187	25	0,19±0
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	12,5	11,5	9,5	6,25	1,56±0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25933	100	25	19	50	0,32±0,11
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	83	46	19	12,5	0,78±0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70603	25	11,5	19	12,5	8,33±3,6
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	/	50	38	25	5,20±1,8

Conclusion

Et

Perspectives

Le présent travail portant sur l'étude phytochimique et l'activité antibactérienne des extraits de *Fredolia aretioïdes* nous a permis de tirer un certain nombre de conclusions : Dans les deux parties de la plante (aérienne et racines), la recherche des tanins, des composés réducteurs, des alcaloïdes, des saponosides, des coumarines et des anthocyanes s'est montrée positive.

La teneur en polyphénols est variable. Elle est plus importante dans les racines (338,87 mg GAE/ 100g) par rapport à la partie aérienne (140,77 mg GAE/100g).

Les racines présentent une meilleure activité antibactérienne que la partie aérienne. Ceci peut être expliqué par le fait que les racines sont plus riches en polyphénols. Sachant que les flavonoïdes et les tanins possèdent théoriquement une activité antibactérienne.

L'extrait aqueux de notre plante présente la plus faible activité antibactérienne. Les souches bactériennes les plus sensibles à nos extraits sont : *Staphylococcus aureus* methicillin resistant ATCC 43300 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603. Les CMB calculées montrent que nos extraits possèdent une bonne activité antibactérienne, mais qui reste moins efficace que la gentamycine.

Ces résultats constituent une première étape dans la recherche de substances naturelles biologiquement actives. Il serait tout d'abord intéressant d'approfondir les investigations phytochimiques et biologiques de cette plante afin d'isoler les molécules responsables des activités observées, ce qui permettra d'élargir l'arsenal thérapeutique des médicaments à base de plantes. Ces produits ont l'avantage d'avoir un faible coût pour des populations à faible pouvoir économique et qui, de surcroît, sont très sensibles à la valorisation de sa médecine traditionnelle.

Il serait donc intéressant d'approfondir cette étude par :

- Une étude de l'activité antifongique de *Fredolia aretioïdes*.
- Des extractions sélectives des différentes familles chimiques.
- Tester les différentes molécules isolées *in-vivo* afin de trouver des applications thérapeutiques de ces molécules actives.

Références

Bibliographiques

1. **Baba Aissa F. (1999)** Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Edition Edas. 368p.
2. **Babiaga M.,(2011).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* SMITH : une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat. Faculté des sciences et techniques. Université de Bamako Mali.
3. **Benhouhou S. S., Saadoun N. (1986)** Contribution à l'étude de la flore de la région de Béni-Abbès. Thèse de graduation. Université d'Alger. 241p.
4. **Berche P., (2007)** Une histoire des microbes. John Libbey, Paris ; 103-106.
5. **Bergogne-Berezin E., Dellamonica P., (1995)** Antibiothérapie en pratique clinique. Masson. F ISBN: 2-2258-4969-2. 486p.
6. **Bezanger-beauquesne L., Pinkas M., et Torek M., (1986).** Les plantes dans la thérapeutique moderne. Paris : Maloine, p382.
7. **Billing J., Sherman P.W.(1998)** Antimicrobial functions of spices: why some like it hot.
8. **Biyiti L.F., Meko D.J.L., Tamze V. et Amvam Zollo P.H. (2004).** Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales Camerounaises, Pharm. Méd. Trad. Afr. ;13 :11-20.
9. **Bnouham M., Merkhfi H., Legssyer A., Ziyat. (2002)** Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. Int. J. Diabetes Metab, 10: 33-50.
10. **Bruneton J., (1999).** Pharmacognosie – Phytochimie- Plantes médicinales, 3e Édition. Éditions Tec & Doc et médicales internationales. F 94234 Cachan, Paris (France) ; 1120 pp.
11. **Clément R.-P. (2005)** Aux racines de la phytothérapie: entre tradition et modernité (1re partie). Phytothérapie ; 4: 171-175.
12. **Clinical and Laboratory Standards Institute., (2006)** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, approved standard, M2-A9, 9th ed., CLSI, Wayen, PA.
13. **Cosson E., Durieu M. C. (1885)** Notes sur nouvelles espèces d'Algérie. Bull. Soc. Bot. France, 2 : 305.
14. **Cuendet, M., Pezzuto, J.M. (2000)** The role of cyclooxygenase and lipoxygenase in cancer chemoprevention, Drug Metabolism and Drug Interactions, 17, 109-157..
15. **Dohou W., Yamni K., Idrissi Hassani L.M., Bado A. et Guira N., (2003).** Screening phytochimiques d'une endémique ibère-macrowave, *Thymelaea lythroides*. 142: 61-78.

16. Duraffourd C., D'Hervicourt L., Lapraz J.C. (1990). Cahiers de phytothérapie clinique. Examen de laboratoire galénique Eléments Thérapeutiques Synergiques. 2eme Edition Masson. Paris. p87.
17. Ebrahimi N.S., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A., Yousefzadi M. (2008) Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phonological stages. Food chemistry., 110 : 927-931.
18. Edeoga H.O., Okwu D.E. et Mbaebie B.O., (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants, African Journal of Bioltechnology ; 4 :685-688.
19. European Committes for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of European Society of Clinical Microbiologie and Infectious deseases (ESCMID) (2003) Determination on minimum inhibitory concentration(MICs) of antibactérial agents by broth dilution. Clinical Microbiology and Unfectious; 9 (8) : 1-7.
20. Fortin J., (2006). Les plantes : comprendre la diversité du monde végétal. Québec. Canada : édition Québec Amérique. ISBN: 2-7644-0839-0. 128p.
21. Ghourri mohamed, Lahcen Zidane, Allal Douira (2013). Usage des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Sahara marocain. *Journal of Animal & Plant Sciences* ; Vol 17, 1 : 2388-2411.
22. Gonzalez-Tejero M. R., Casares- Porcel M., Sanchez-Rojas C.P., Ramiro-Gutierrez J.M., Molero-Mesa J., et coll., (2008) Medicinal plants in the mediteranean area : synthesis of the results of the project Rubia. *J. Ethnopharmacol*, 116: 341-357
23. Goulet H., Daneluzzi V., Dupont C., Heym B., Almeida K., Auvert B., Elkharrat D., et Rouveix E. (2009) Evaluation de la qualité des perceptions d'antibiotiques dans le service d'accueil des urgences d'un CHU en région parisienne. *Médecine et Maladies Infectieuses* ; 39 : 48-54.
24. Graham J.G., Quinn M.L., Fabricant D.S., Farnsworth N.R., (2000) Plants used against cancer extension of the work of Jonathan Hartwell. *J. Ethnopharmacol*, 73 : 347-377.
25. Hartmann T. (2007) From waste products to ecochemicals : fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemisty*, 68 : 2831-2846.
26. Joffin J.N., Leyral G., (2006). Microbiologie Technique. Tome 1, Dictionnaire des techniques. 4^{ème} Edition A.S.M Washington II, 967-971.

27. Jones K.E., Latel N.G., Levy M.A., Kate E., Nikkita G., Marc A., Storeygrad A., Balk D., Jones L., Daszard P. and Gittelman P., (2008) Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*; 451: 990-993.
28. Kassel D. (1996). Des hommes et des plantes. Histoire et art pharmaceutique. <http://www.ordre.pharmacien.fr>
29. Kerharo J. & Adam J.G., (1950). La pharmacopée sénégalaise traditionnelle, plantes médicinales et toxiques. Vigot- Frères, Paris (France) ; pp. 579-581.
30. Khedache Z. (1999) étude écologique et fonctionnelle de quatre populations de *Fredolia aretioïdes* sur le transect Bechar-Beni-Abbès. Contribution a l'analyse architecturale de *Fredolia aretioïdes* Coss et Moq. These magister USTHB, Alger. 122p.
31. Lee K.W., Kim Y.J., Lee C.Y. (2003) Cacao has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chemistry.*, **51** : 7292-7295.
32. Li H. B., Cheng K. W., Wong C. C., Fan K. W., Chen F. et Jiang Y., (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions on selected microalgae ; *Food and Chemistry* 102 ; p : 771-776
33. Lucienne A.D., (2010) Les plantes médicinales d'Algérie. *Berti* (2^{ème} Edition) ; 6-20.
34. Malec L.S. et Pamelio A.B., (2003). Herbivory effects on the chemical constituents of *Bromus pictus*. *Molecular Medicinal Chemistry*; 1: 30-38.
35. Miliauskas. G., Venskutonis P.R., Van Beek T.A. (2004) screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry.*, **85** : 231-237.
36. Mojab F., Kamalinejab M., Ghaderi N., et Vahidipour H.R., (2003). Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*; 77-82.
37. Mulas M. (2004) Potentialité d'utilisation stratégique des plantes des genres *Atriplex* et *Opuntia* dans la lutte contre la désertification. Short and Medium, Term Priority Environmental Action Programme (SMAP) Février, 91p.
38. Ozenda P. (1991) Flore et végétation du Sahara. Ed CNRS, Paris, 662p.
39. Ponce A.G., Fritz R., del Valle C. Roura S.I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Society of Food Science and Technology (Elsevier)*, **36**: 679-684.

40. Prescott. , Harley., et Klein. (2003). Microbiologie. De Boeck University et Larcier ; 856-863.
41. Quézel P., Santa S. (1962-1963) Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris, 2^{ème} Vol. 1170p.
42. Rached W., Benamar H., Bennaceur M., Marouf A., (2010) Screening of the Antioxidant Potential of Some Algerian Indigenous Plants. *Journal of Biological Sciences*, 10 : 316-324.
Section of Neurobiology and Behavior, Cornell University,
43. Sofowora A., (2010) Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. *Karthala* : Académie suisse des sciences naturelles ; 5-6.
44. Tim T.P.-C. and Andrew J.-L (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 26: 343–356.
45. Trease E., Evans W.C. (1987). *Pharmacognosy*, Billiare Tindall, London.
46. Upson C., ThomasFaulhaber J., Kamins D., Laidlaw D., Schlegel, D., Vroom J., Gurwitz R., vanDam A. (1999). The application visualization system: A computational environment for scientific visualization. *IEEE Computer Graphics and Applications*, 9(4) : 30-42.
47. Vermerris W., Nicholson R. (2006). *Phenolic Compound Biochemistry*, Springer, Dordrecht. ISBN-10 1-4020-5163-8 (HB).
48. Vermerris W.,(2006) *phenolic compound Biochemistry*: Springer.ISBN : 1-4020-5163-8 .273p.
49. Zhang M., Hongfei J., Aiti A., Haizhou L., Chew L.T., Sheng L. (2008a). A Tree Sequence Alignment based Tree-to-Tree Translation Model. *ACLHLT-08*. 559-567.

Résumé

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouveaux agents antibactériens naturels, extraits à partir de plante. Nous nous sommes intéressés à une plante endémique du Sahara Algérien : « *Fredolia Aretioïdes* ».

Cette étude est portée d'une part, sur la détermination qualitative de différentes familles de métabolites secondaires, ensuite le dosage des polyphénols.

D'autre part, l'activité antibactérienne de chacun de ces extraits a été évaluée selon la technique de diffusion sur milieu Mueller Hinton Agar, qui se traduit par une zone d'inhibition de croissance plus ou moins importante selon la sensibilité des bactéries étudiées et par la détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides.

L'analyse phytochimiques a révélé la présence plus ou moins marquée des : composés réducteurs, stérols et triterpènes, alcaloïdes, coumarines, anthocyanes, tanins et saponosides.

La teneur en polyphénols totaux révèle un taux de 140,77mgEAG/100gr E pour la partie aérienne et de 338,87mgEAG/100gr E pour la racine.

L'analyse de l'activité antibactérienne montre que les souches étudiées ont une sensibilité variable vis-à-vis des extraits de *Fredolia Aretioïdes* (un diamètre d'inhibition allant de 7 à 20mm). Cette plante présente une activité antibactérienne intéressante.

Mots clé : *Fredolia Aretioïdes*, métabolites secondaires, activité antibactérienne, CMI, CMB.

Abstract

Our work is part of the search for new antibacterial agents extracts from plant. We were interested in an endemic plant in the Algerian Sahara : *Fredolia Aretioïdes*.

This study begins by qualitative determination of the different families of secondary metabolites. Then, the determination of polyphenols.

As well as the antibacterial activity of each of this extracts was evaluated according to Mueller Hinton Agar scattering technique, resulting in a zone of inhibition of growth more or less important according to the sensibility of studied bacterias, then the determination of minimum inhibitory and bactericidal concentrations.

The phytochemical analysis revealed a presence of more or less marked of : reducing compounds, alkaloids, sterols, terpenes, coumarins, tannins anthocyanins and saponins.

The total polyphenol content reveals a rate of 140,77mgEAG/100gr E to the aerial part and 338,87mgEAG/100gr E to the root.

The analysis of the antibacterial activity showed that strains of bacteria studied have a variable sensibility vis-à-vis extracts *Frédolia Arétioïdes* (with a diameter of inhibition ranging from 7 to 20mm). The plant has an interesting antibacterial activity.

Key words : *Fredolia Aretioïdes*, secondary metabolites, antibacterial activity, MIC, MIB.

ملخص

هذه الدراسة تندرج في إطار البحث عن مواد طبيعية مضادة للبكتيريا المستخلصة من نبات *Fredolia Aretioïdes* المتواجدة في صحراء الجزائر.

ركزت هذه الدراسة من ناحية على تحديد المكونات المختلفة للمركبات الثانوية و على تحديد كمية الفينولات الكلية.

من جهة أخرى، تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لكل عينة من *Fredolia Aretioïdes* حسب تقنية النشر في مستنبت مولر هنتن أجار و تحديد التركيز الأدنى المثبط و المميت للبكتيريا.

قد كشفت تجارب الكيمياء النباتية التي أجريت في هذه الدراسة عن وجود عائلات مختلفة من المركبات الكيميائية التي تتواجد بكميات مختلفة في الساق، الأوراق و الجذور.

يقدر محتوى الفينولات الكلية ب 140,77 مع/100غ في الساق و الأوراق و ب 338,87 مع/ 100 غ.

كما أظهر تحليل نشاط مضادات البكتيريا المدروسة بالنسبة لمستخلصات *Fredolia Aretioïdes* حساسية متغيرة .

يمكننا القول أن لهذا النبات نشاط مضاد للبكتيريا مهم.

الكلمات المفتاحية: *Fredolia Aretioïdes* المركبات الثانوية، النشاط المضاد للبكتيريا