

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE & BIOCHIMIE

N°:



DOMAINE : SCINCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : SCIENCE BIOLOGIQUE

OPTION : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

**Mémoire Présenté Pour L'obtention
Du Diplôme De Master Académique**

Par : Maouche Khawla

Houiche Cherifa

Rehabi Sami

Tiaiba Abdenaim

Intitulé

Evaluation l'activité antibactérienne de *Ruta Chalepensis*

Soutenu devant le jury composé de :

Dr. KHERBACHE Abdallah

Université Mohamed Boudiaf M'sila

Président

M^R SELLOUM Mounir

Université Mohamed Boudiaf M'sila

Rapporteur

Dr. HENDEL Noui

Université Mohamed Boudiaf M'sila

Examineur

Année universitaire :2023/2024

Remerciement

À la fin de notre cycle de formation.nous tenons à exprimer nos vies gratitudes– à<<**ALLAh**>> de tout puissant de nous avoir donner la force,la santé et la courage dans notre chemin d'étude.

Nos profond remerciement vont à monsieur << **Selloum Mounir** >>qu'an a eu l'honneur d'avoir comme encadreur avec patience et ses efforts interminable Nos sincères remerciements aussi à toute les professeurs de la faculté de microbiologie.Aussi une grande remerciement à les jurés:
Dr. Hendel Noui , Dr. Kherbache Abdallah .

L'équipe des ingenieurs de laboratoire de la faculté des sciences de l'université de msila.

Dédicace

Louanges à <<ALLAh>> qui, par Sa grâce, accomplit les bonnes actions

Je tiens à exprimer mes remerciements et ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué à mon parcours éducatif et personnel.

Je réserve à ma chère famille des remerciements des plus sincères pour les sacrifices et le soutien qu'elle m'a apportés. Je remercie aussi vivement mes professeurs dévoués qui n'ont ménagé aucun effort pour me guider et me conseiller.

Ma gratitude va également à mes camarades et amis qui m'ont accompagné au cours des différentes étapes de ma vie, et m'ont apporté aide et réconfort dans les moments heureux comme dans les épreuves.

Je mesure pleinement le dévouement de chacun et la valeur de leurs contributions précieuses dans la réalisation de mes ambitions. C'est pourquoi je présente ma plus profonde reconnaissance à tous ceux qui ont activement participé à mon développement et à mon épanouissement.

Sami

Sommaire

Résumé	i
Liste des abréviations	ii
Liste des figures	iii
Liste des tableaux	iv
Introduction	1
Partie Bibliographique	
Chapitre I. Généralités sur plante (<i>Ruta chalepensis</i>)	2
I.1. Description botanique	2
I.2. Distribution générale de <i>Ruta chalepensis</i>	4
I.3. Phytochimie de <i>Ruta chalepensis</i>	5
I.4. Intérêt thérapeutique et toxicité de <i>Ruta chalepensis</i>	7
Chapitre II. Les différentes techniques	10
II.1. Les différentes méthodes de préparation d'Extraction	10
IV.5. Les méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits des plantes.....	11
IV.6. La concentration minimale inhibitrice CMI.....	12
Chapitre III. Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens	14
III.1. Les bactéries	14
Partie Pratique	
Chapitre IV. Matériel et Méthode	18
IV.1. Échantillonnage.....	18
IV.2. Méthode	19
IV.3. Dosage des polyphénols.....	21
IV.4. Dosage des flavonoïdes.....	21
IV.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne	22
IV.6. Méthodes de réalisation du teste de l'activité antibactérienne de l' extrait.....	22
IV.7. Méthode de détermination (CMI) sur milieu liquid.....	24
Chapitre V. RESULTATS ET DISCUSSION	24
V.1. Extraction dosage des polyphenols et flavonoides.....	24
V.2. Activité antimicrobienne	26
V.3. Test de CMI.....	29
Conclusion	31
Références Bibliographiques	32
Annexes	37

ملخص

الهدف من هذا العمل هو تقييم النشاط المضاد للميكروبات للمستخلص الميثانولي المائي من نبات الفيجل ، وهو نبات يستخدم تقليدياً في الجزائر. أولاً، قمنا بقياس مردود المستخلص الميثانولي المائي، وتم تقييم المحتوى الكلي لمتعدد الفينول و الفلافونويد في المستخلص. كان المستخلص الميثانولي المائي غنياً بمتعدد الفينول الكلي ($108.60 \pm 11.34 \mu\text{gEAG}/\text{mg}$) والفلافونويدات ($9.72 \pm 0.68 \mu\text{gEQ}/\text{mg}$ المستخلص). تم تقييم التأثير المضاد للبكتيريا للمستخلص الميثانولي المائي باستخدام طريقة الانتشار القرصي (المضادات الحيوية)، حيث قام مستخلص الفيجل بتثبيط نمو ثلاث سلالات بكتيرية بشكل ملحوظ: *E. coli* - *S. aureus* - *P. aeruginosa* بأقطار تثبيط بلغت 11 مم و 10.67 مم و 9.67 مم على التوالي ودعمت هذه النتائج بالنتائج المتحصل عليها من خلال اختبار التركيز الأدنى المثبط النشاط البكتيري والتي كانت كالتالي :

E. coli=62,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, *S. aureus* et *P. aeruginosa*=125 $\mu\text{g}/\text{ml}$, et

B.cereus=250 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

الكلمات المفتاحية : الفيجل - متعدد الفينول - فلافونويدات - مستخلص مائي كحولي - نشاط مضاد للبكتيريا

Abstract

The aim of this work is to evaluate the antimicrobial activity of the hydro-methanolic extract of *Ruta chalepensis*, a plant traditionally used in Algeria. Firstly, we measured the yield of the hydro-methanolic extract, and assessed the extract's total polyphenol and flavonoid content. The hydro-methanolic extract was rich in total polyphenols ($108.60 \pm 11.34 \mu\text{gEAG/mg}$) and flavonoids ($9.72 \pm 0.68 \mu\text{gEQ/mg}$ extract). The antibacterial effect of the hydro-methanolic extract was evaluated using the disk diffusion method (antibiogram). *Ruta chalepensis* extracts significantly inhibited the growth of three selected bacterial strains: *Escherichia coli*, *staphylococis aureus* and *pseudomonas aerugenosa*, with inhibition zones of 11 mm, 10.67 mm and 9.67 mm respectively, while the *Bacillus cereus* strain was resistant to the extract. This result was confirmed by a MIC test on the strains tested, which gave the following values:

E. coli=62.5 $\mu\text{g/ml}$, *S. aureus* and *P. aerugenosa*=125 $\mu\text{g/ml}$, and *B. cereus*=250 $\mu\text{g/ml}$

Key words: *Ruta chalepensis* -polyphenols- Flavonoides- Hydroalcoholic extract -Antibacterial activity

Résumé

Dans ce travail a pour l'objectif d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'extrait hydro-méthanolique de de *Ruta chalepensis*, une plante a usage traditionnelle en Algérie. Dans un premier temps, nous avons mesuré le rendement de l'extrait hydro- méthanolique, la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes d' extraits a été évaluée. L'extrait hydro- méthanolique a montré une richesse en polyphenols totaux ($108.60 \pm 11,34 \mu\text{gEAG/mg}$), en flavonoïdes ($9,72 \pm 0,68 \mu\text{gEQ/mg}$ d'extrait). L'effet antibactérien de l' extrait hydro- méthanolique a ete évalué par la méthode de diffusion sur les disques (antibiogramme), les extraits de *Ruta chalepensis* ont inhibe significativement la croissance de trois souches bactériennes qui sont *Escherichia coli* , *Staphylococcus aureus* et *pseudomonas aeruginosa* choisie avec des zones d'inhibition respectivement 11 mm ,10,67mm et 9,67 mm par contre la souche de *Bacillus cereus* possède une résistance contre l'extrait.Cette résultats est confirmé par un teste CMI sur les souches testés qui donne les valeurs suivantes :

E. coli=62,5 $\mu\text{g/ml}$, *S. aureus* et *P. aeruginosa*=125 $\mu\text{g/ml}$, et *B. cereus*=250 $\mu\text{g/ml}$

Mots clés : *Ruta chalepensis* -polyphenols- Flavonoides- Extrais hydroalcoolique -Activité Antibactérienne

Liste des abréviations

PTZ : Pentylentetrazole

DMSO : Dimethyl sulfoxyde

E.H.M : extrait hydro-méthanolique

AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium

EBr : Extrait brut

EQ: Equivalent de quercetin

EAG: Equivalent d'acide gallique

Na₂CO₃: Carbonate de sodium

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

Liste des figures

Figure I.1. <i>Ruta chalepensis</i>	2
Figure I.2. Répartition géographique de la distribution de <i>Ruta chalepensis</i> ..	5
Figure I.3. Structure chimique de la Rutine.	6
Figure II.1. Principe de la méthode de diffusion par disque.	12
Figure II.2. méthode de détermination de la CMI.	12
Figure II.3. Représentation graphique du protocole de micro-dilution de bouillon recommandé par CLSI.	14
Figure III.1. L'espèce bactérienne <i>Staphylococcus aureus</i>	15
Figure III.2. L'espèce bactérienne <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
Figure III.3. L'espèce bactérienne <i>Escherichia coli</i>	17
Figure IV.1. Localisation de Bou Saada par rapport à l'Algé	18
Figure IV.2. Le broyage et le tamisage de la plante.	19
Figure IV.3. protocole de préparation de extrait.	20
Figure V.1. Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux.	25
Figure V.2. Courbe d'étalonnage des flavonoïdes totaux.	26
Figure V.3. Les zones d'inhibition de extrait et l'ATB sur les souches étudiée.	27

Liste des tableaux

Tableau I.1.Principales caractéristiques des différentes parties de <i>Ruta chalepensis</i>	4
Tableau V.1.Rendement (%) aspect et couleur des extraits bruts secs de <i>Ruta chalepensis</i>	24
Tableau V.2.Teneur en polyphénols totaux de l'extrait brute de R. chalepensis.	25
Tableau V.3.Teneur en flavonoïdes d'extrait brute de <i>R. chalepensis</i>	26
Tableau V.4.Les diamètres des zones d' inhibition de l' ampicilline.	29
Tableau V.5.Valeurs des CMI et CMB des bactéries vis-à-vis a extraite de <i>Ruta chalepensis</i>	29

Introduction

Introduction

De puis son existence sur terre l'homme reconnaissait et utilisait les plantes pour sa nutrition, et pour les traitements de diverses maladies. Depuis quelques années, d'après l'Organisation mondiale de la santé (OMS), plus de 80% de la population mondiale utilise la médecine traditionnelle pour faire face à des problèmes de santé. ([Bohui et al., 2018](#)). Les plantes sont un bien précieux pour la plupart des communautés, en particulier pour les pays en développement qui en dépendent pour leurs soins de santé essentiels et leur subsistance. Elles utilisent la plupart des espèces végétales au quotidien. Tant en lignes qu'en herbes en tant que médicaments ([Attou, 2011](#)). En Afrique le pouvoir thérapeutique de la plante était connu de la population de façon empirique ([Kpètèhoto et al., 2017](#)). Ces plantes doivent leurs pourvoir thérapeutique aux substances, dites actives qu'elles renferment. ([Bohui et al., 2018](#)). Aujourd'hui, entre 20 000 et 25 000 plantes sont employées dans le domaine de la thérapie humaine. De nombreuses personnes utilisent ces plantes médicinales en premier lieu en raison de leur facilité d'accès par rapport aux médicaments modernes. ([Ganfon et al., 2019](#)).

En Algérie se trouve un grand gramme de climats très variée grâce à leur situation géographique. Possède un ensemble considérable d'espèces de la plantes médicinales. IL existé plus de 3139 espèces dites par QUEZEI et SANTA à 1962. Permis ces plantes, on choisies l'espace *Ruta chalepensis*. Notre choix est justifié par le fait que celle -ci est très utilisé dans la population algérienne comme médicament et anti - infectant.

ce travail est constitué deux partie :

- La première section est une étude bibliographique qui vise à fournir des renseignements sur la plante étudiée. Les souches bactériennes en évaluation, ainsi que les méthodes d'extraction qui permettent leur utilisation.
- Dans la seconde partie, l'attention s'est portée sur les équipements et les techniques employés dans cette étude. Les techniques utilisées pour extraire l'extrait végétal, évaluer son activité antibactérienne et évaluer la concentration minimale d'inhibitions CMI, ainsi que réaliser un dosage colorimétrique.
- Discussion les résultats de cette étude.
- afin de terminer par une conclusion sur L'ensemble des résultats de cette étude.

Partie Bibliographique
Chapitre I : Généralités sur
plante (*Ruta chalepensis*)

Chapitre I. Généralités sur plante (*Ruta chalepensis*)

I.1. Description botanique

L'espèce *Ruta chalepensis* est relativement répandue dans toute l'Algérie septentrionale. ([Baba Aissa, 1999](#)), à l'est de l'Afrique, au sud de l'Europe et au sud-ouest de l'Asie ([Mioulane, 2004](#)).

Ruta chalepensis est une plante herbacée à tige ligneuse à la base, pouvant atteindre 1 m ([Baba Aissa, 1999](#)). Les feuilles sont aromatiques, ovales, larges, pennatiséquées et bleu-vert, avec de nombreux lobes oblongs, lancéolés ou aborales, mesurant entre 6 et 12 cm de long. Des fleurs en coupe de couleur jaune foncé de 1 à 2 cm de diamètre s'épanouissent en été et portent quatre ou cinq pétales frangés de longs poils. Elles sont assemblées en cymes lâches. ([Mioulane, 2004](#)) (fig .I.1).



Figure I.1. *Ruta chalepensis* ([Duke et al., 2008](#)).

I.1.1. Position systématique

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta (plantes vasculaires)

Super division : Spermatophyta (plantes à graine)

Division : Magnoliophyta (plantes à fleurs)

Sous division : Angiospermae

Classe : Magnoliopsida (dicotylédons)

Sous classe : Rosidae

Super ordre : Rutanae

Ordre : Sapindales

Famille : Rutaceae

Genre : *Ruta*





Espèce : *Ruta chalepensis* ([Bonnier, 1999](#)).

I.1.2. Caractéristiques des différentes parties de la plante

Les lobes de la capsule rapprochés et non séparés, ainsi que les pétales dentées et ciliées à leurs bord, sont les principales caractéristiques qui distinguent cette espèce des autres ([Lamarck, 1804](#)).

Le (tab .I.1) résume les caractéristiques propres à chaque organe de la plante :

Tableau I.1. Principales caractéristiques des différentes parties de *Ruta chalepensis*.

Organe	Caractéristiques
Tiges 	<ul style="list-style-type: none"> Les tiges sont droites, rameuses, cylindriques, dures et glabres, et ils ont un verre glauque (Lamark, 1804).
Feuilles 	<ul style="list-style-type: none"> Leur forme est cunéiforme, glauque et parfois presque linéaire. (Lamark, 1804). La couleur est verte-bleuâtre, le goût est amer et l'odeur est forte, ce qui est assez désagréable (Tounsi et al., 2011). Les schisolysigènes sont des glandes à huiles (Gravot, 2002).
Fleurs 	<ul style="list-style-type: none"> Ils ont une taille d'environ un centimètre de diamètre (Brener & Friedman, 1985). Leur calice est court, glabre, ovale et à cinq divisions ; leur corole est jaune avec cinq pétales concaves, ondulées, denticulées et ciliées à leurs bords. (Lamark, 1804). Elles ont huit à dix étamines (8 à 10) et un ovaire supérieur (Günaydin & Savci, 2005).
Fruits 	<ul style="list-style-type: none"> Les follicules à graines noires sont les fruits (Lièvre, 2004). On les retrouve sous la forme de capsules globuleuses d'un diamètre d'environ six (6) à neuf (9) millimètres (Lamnauer & Batanouny, 2005).

I.2. Distribution générale de *Ruta chalepensis*

Ruta chalepensis est une plante spontanée, largement répandue en Afrique du nord et plus particulièrement en Algérie (Fig .I.2). Il est courant de la trouver dans les roches, les champs et

les coteaux secs. En Algérie, on peut également cultiver cette plante dans les jardins ([Merghache et al., 2009](#)).

De manière générale, on la retrouve également en Europe du sud et dans les pays subtropicaux. Cette plante convient aux régions à environ 1000 mètres au-dessus du niveau de la mer, où les précipitations et la lumière du soleil sont modérées ([Joy et al., 2001](#)).

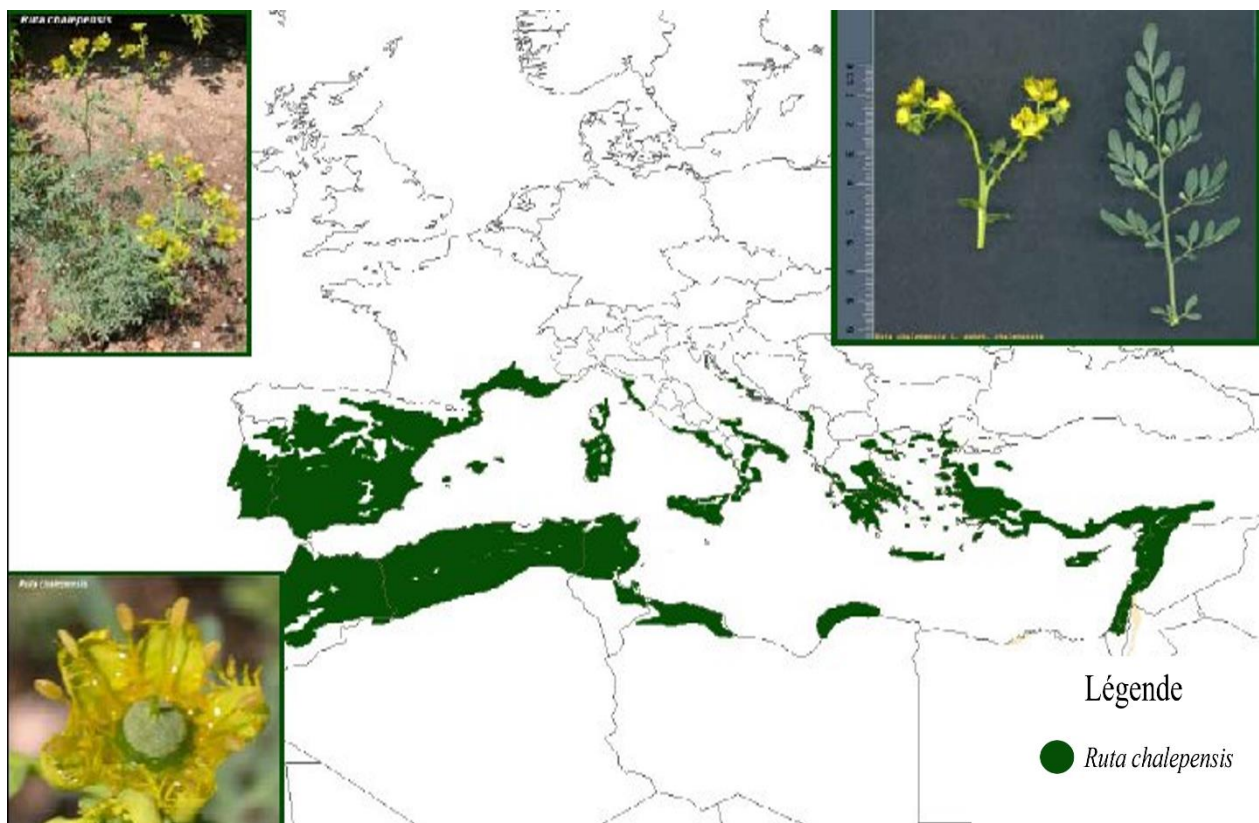


Figure I.2. Répartition géographique de la distribution de *Ruta chalepensis*. ([Mansion & Salvo, 2005](#)).

I.3. Phytochimie de *Ruta chalepensis*

Les végétaux génèrent de nombreux métabolites secondaires ([Daayf & Lattanzio, 2008](#)). De cette manière, l'effet de la phytothérapie sur le corps sera influencé par la composition chimique de ces plantes et leur concentration en métabolites ([Zeghad, 2009](#)).

Les polyphénols

Le groupe des composés phénoliques est le plus abondant et le plus répandu dans le monde des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues ([Lugasi, 2003](#)). La coloration et l'aroma, ainsi que l'astringence des plantes, sont influencées par la concentration et les modifications des phénols. Ces substances sont responsables de 2 à 3% de la matière organique des plantes, et dans certains cas, de 10% ([Walton & Brown, 1999](#)).

Ces composés sont principalement utilisés chez les végétaux pour protéger contre les pathogènes et les herbivores et réduire les dégâts causés par les radiations UV ([Lebham, 2005](#)).

Des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont un groupe de composés polyphénoliques produits naturellement par les plantes et trouvés dans un large éventail de produits alimentaires d'origine végétale (fruits et légumes) ([Ren et al., 2003](#)).

Ruta chalepensis produit majoritairement un flavonoïde qui est la rutine (2- 5%): Toutes les parties de la plante renferment ce glucoside (Fig .I.3) qui est aussi appelé « vitamine P » isomère de la Quercétine ([Attou, 2011](#)).

Les composants phénoliques principaux comprennent les acides phénoliques, les flavonoïdes qui constituent plus de la moitié des polyphénols, les tanins et les coumarines ([King & Young, 1999](#)).

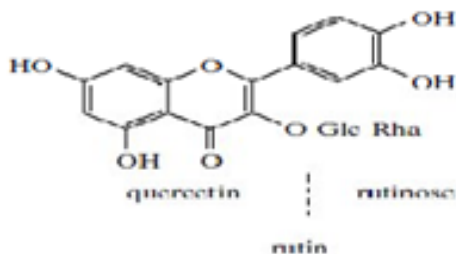


Figure I.3. Structure chimique de la Rutine ([Attou, 2011](#))

I.4. Intérêt thérapeutique et toxicité de *Ruta chalepensis*

I.4.1. Intérêt thérapeutique

Une plante utilisée comme médicament répond également à la définition de médicament. Elle est à la fois un produit fini destiné à la consommation et une matière première pour l'obtention de préparations galéniques ou de substances actives ([Lamnaouer, 2002](#)).

Ruta chalepensis figure parmi les plantes médicinales les plus couramment employées pour des traitements ([Bnina et al., 2010](#)).

I.4.1.1. Dans la médecine traditionnelle :

Ruta chalepensis est employée dans la médecine traditionnelle de beaucoup de pays pour le traitement d'une série de maladies ([Mansour S. Al-Said et al., 1990](#)).

- La rue est très utilisée en Algérie à des fins diverses: Fébrifuge ; anti venin local ; dans le traitement des nausées, des vomissements, des constipations et du paludisme ; pour soigner les anémies, les douleurs oculaires, auditives, l'asthme ainsi que les névroses ([Attou, 2011](#)).
- La décoction de la partie aérienne de la plante est utilisée en Arabie Saoudite comme analgésique, antipyrétique et pour traiter les rhumatismes et les troubles mentaux.
- Dans la médecine indienne, elle est recommandée pour le traitement des douleurs musculaires, des troubles menstruels et d'autres saignements.
- En Chine, on utilise une décoction de la racine de *Ruta* pour traiter le rhume. Les enfants reçoivent des feuilles de cette plante infusées avec du vinaigre afin de traiter les convulsions et autres troubles nerveux.
- En Afrique, on utilise une décoction aqueuse des feuilles pour traiter les fièvres ([Mansour S. Al-Said et al., 1990](#)).

I.4.1.2. Dans la médecine moderne (études expérimentales):

Ruta chalepensis et plus précisément son extrait éthanolique a été étudié pour son effet anti-inflammatoire, antipyrétique, analgésique, anticonvulsivant, antispasmodique ainsi que pour d'éventuelles effets hématologiques ([Mansour S. Al-Said et al., 1990](#)).

• **Effet anti-inflammatoire** : L'effet anti-inflammatoire de *Ruta chalepensis* a été évalué par ([Mansour S. Al-Said et al., 1990](#)), selon deux modèles inflammatoires, induits par l'injection de sel de sodium de carraghénane et l'administration sous-cutanée de granules stérilisés de coton chez des rats albinos ; les résultats obtenus ont montré que l'extrait éthanolique de *Ruta chalepensis* produit une inhibition significative des œdèmes de pattes des rats carraghénane-induits, ainsi qu'une inhibition des granulomes induits par les granules de coton chez les rats testés à une dose de 500mg/kg .

• **Effet analgésique** : L'induction de la douleur par la chaleur a été utilisée et le temps de réaction à la douleur a été enregistré.

Les résultats des études sur l'activité analgésique des extraits de *Ruta chalepensis* semblent indiquer que la plante n'a pas d'activité analgésique, ce qui ne justifie pas son utilisation dans la médecine traditionnelle pour traiter la douleur ([Mansour S. Al-Said et al., 1990](#)).

• **Effet antipyrétique** : D'après ([Mansour S. Al-Said et al., 1990](#)), *Ruta chalepensis* a également une activité antipyrétique remarquable ; en effet, son extrait éthanolique a réussi à réduire considérablement l'hyperthermie causée par la levure chez des souris, passant d'une température de 36,5°C à une température de 32°C en 60 minutes après avoir été administré à une dose de 500mg/kg. Par conséquent, ces résultats confirment l'efficacité antipyrétique de cette plante connue dans la médecine traditionnelle.

• **Effet anticonvulsivant** : le Pentylentetrazole (PTZ) a été employé par ([Gonzalez-Trujano et al., 2006](#)), dans le but de provoquer des convulsions chez des souris et d'analyser l'effet anticonvulsivant de la rue.

L'étude a révélé que l'extrait éthanolique de *Ruta*, à des doses allant de 300 à 1000 mg/kg a retardé de manière significative le début de la première convulsion induit par PTZ. Ces résultats viennent donc renforcer le fait que les feuilles de cette plante infusées avec du vinaigre soient données aux enfants pour le traitement des convulsions dans la médecine traditionnelle.

• **Effet hématologiques** : L'extrait de *Ruta chalepensis* a été étudié par ([Mansour S. Al-Said et al., 1990](#)), pour ses effets sur les paramètres sanguins (temps de prothrombine et fibrinogène) à

une dose de 500 mg/kg pour justifier l'utilisation de la plante dans le traitement des désordres hématologiques. Les résultats obtenus suite au protocole expérimental, ont indiqué que *Ruta chalepensis* n'induit aucun changement de ces paramètres de coagulation.

• **Effet antispasmodique :** ([Moazedi et al., 2009](#)), Les résultats ont été obtenus en évaluant l'effet spasmodique de la plante sur l'intestin de rats sains, dont les contractions ont été causées par une solution de KCl, et en ajoutant des concentrations cumulatives d'extrait de *Ruta* au milieu expérimental.

Cette étude a révélé que les extraits des feuilles de *Ruta chalepensis* ont un effet antispasmodique dose-dépendant sur l'iléum des rats à une dose efficace de 0,04 mg/ml.

I.4.2. Toxicité de *Ruta chalepensis*

- La phototoxicité, due à la richesse en Furanocoumarines (psoralènes), est l'effet toxique le plus connu de *Ruta chalepensis* et d'autres espèces du même genre. Effectivement, ces plantes provoquent une dermatite aiguë qui ressemble à une brûlure du premier ou du deuxième degré, en raison du contact des feuilles dures et de l'exposition au soleil. Secondairement, l'hyperpigmentation de la peau peut persister pendant un certain temps ([July, 2007](#)).
- En règle générale, l'empoisonnement par la rue est causé par le fait d'utiliser cette plante pour provoquer un avortement. Il est recommandé aux femmes enceintes de ne pas consommer d'extraits de rue, même en petites quantités, car des recherches sur les animaux ont démontré que ces extraits peuvent causer des malformations fœtales ([July, 2007](#)). Effectivement, l'infusion aqueuse des parties aériennes de *Ruta chalepensis* pendant la période d'organogénèse chez des souris enceintes a entraîné des changements morphologiques importants, un retard dans le développement des organes (thymus) et des réflexes, un gain de poids, ainsi que des modifications histologiques du placenta et des fœtus ([Zeichen de Sa et al., 2000](#)).

Chapitre II : Les différentes techniques

Chapitre II. Les différentes techniques

II.1. Les différentes méthodes de préparation d'Extraction

II.1.1. Décoction

Il a été effectué un essai de log de poudre de chaque plante dans un ballon contenant. L'ensemble de 100 ml d'eau distillée a été chauffé pendant 30 minutes, puis après refroidissement et filtrage, il a été concentré dans un évaporateur rotatif sous vide à une température de 50°C. Ensuite, on a placé l'extrait à l'étuve à une température de 46°C pendant 24 heures. Les essais ont été pesés puis conservés dans un flacon stérile hermétiquement fermé ([Bohui et al., 2018](#)).

II.1.2. Macération

L'extraction est basée sur la séparation solide-liquide, avec un solvant organique ou de l'eau comme phase liquide ([Cacique et al., 2020](#)) Il s'agit d'une méthode d'extraction très simple qui présente l'inconvénient suivant (d'un temps d'extraction long et d'une faible teneur en campements thermolabiles dr. rachmat Hidayat 2020 P.69) ([Hidayat & Wulandari, 2021](#)).

La macération consiste en une longue période de contact à froid. Des fragments de la plante séchées pour extraire les composés solubles ([FAYE et al., 2022](#)).

Une prise d'essai est utilisée pour extraire des éléments actifs de diverses parties de la plante par macération. Un ballon contenant 100 ml d'eau distillée a été rempli de 10g de poudre de plante, puis l'ensemble a été agité magnétiquement pendant 24 heures à température ambiante. Une fois filtré, le filtra a été concentré dans un évaporateur rotatif sous vide à une température de 50°C. Par la suite, l'extrait a été placé à l'étuve à une température de 46°C pendant 24 heures. Les poudres obtenues ont été pesées avant d'être stockées dans un flacon hermétiquement fermé et sterile ([Bohui et al., 2018](#)). on a 02 méthodes e macération : macération aqueuse ; macération hydroalcooliques.

II.1.3. Infusion

Les infusions fraîches sont préparées en faisant macérer le matière végétale pendant une courte période dans de l'eau froide ou bouillante. Il s'agit de solutions diluées du constituant facilement soluble de la drogue brute ([Handa, 2008](#)). Un ballon contenant 100ml d'eau distillée bouillante a été rempli de 10g de poudre de plante. L'ensemble a été conservé pendant une durée de 30 minutes jusqu'à ce qu'il refroidisse. Une fois filtré, le filtrat a été concentré dans un évaporateur rotatif sous vide à une température de 50°C. Ensuite, l'extrait a été placé dans l'étuve à une

température de 46°C pendant une durée de 24 heures. Après avoir pesé la poudre, elle a été conservée dans un flacon stérile hermétiquement fermé ([Bohui et al., 2018](#)).

II.1.4. Extraction par hydrodistillations

La méthode implique de plonger la matière première dans un bain d'eau et de la faire bouillir, généralement à pression atmosphérique. Il est possible de procéder à la distillation avec ou sans cohobage des eaux aromatiques obtenues après la décantation ([Boukhatem et al., 2019](#)).

II.1.5. Extraction Soxhlet

Pour cette approche, l'échantillon à extraire est placé dans un échantillon poreux ou une cartouche en cellulose qui est placée au centre de la cavité. Le solvant d'extraction est chauffé dans le ballon et se vaporise dans la chambre d'extraction. Lorsque le liquide atteint le sommet du tube siphon, il se condense goutte à goutte et est vidé dans le ballon inférieur. Le processus se déroule. Ce procédé nécessite une quantité de solvant plus faible par rapport à la macération ([Kallel et al., 2021](#)).

IV.5. Les méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits des plantes

IV.5.1. Méthode de diffusion sur disque

En 1949, Schroeder et Messing ont développé la méthode de diffusion sur disque, également connue sous le nom de méthode de Vincent ou technique de l'aromatogramme. Il s'agit d'un examen similaire à un antibiogramme où les antibiotiques sont substitués par des essences aromatiques, préalablement choisies et identifiées ([Bachiri et al., 2016](#)).

Cette méthode consiste à saturer les disques de papier filtrant stérilisés de 6 mm avec un extrait de plante stérilisé filtré à la concentration désirée. Ensuite, on dépose les disques imprégnés sur la surface d'un milieu d'agar solide approprié tel que Mueller Hinton. Les organismes d'essai ont été préalablement inoculés dans les médias. Pour les plaques de diffusion d'inoculation, la taille standard de l'inoculum est de 1×10^8 UFC / ml de bactéries, ce qui correspond à la norme de turbidité McFarland 0.5. Le disque en papier est imprégné de l'extrait végétal par certains chercheurs avant de placer les plaques inoculées, tandis que d'autres préfèrent le faire après. Par la suite, les plaques sont placées en incubation pendant 24 heures à une température de 37°C (pour les bactéries) et 48 heures à une température de 25°C (pour les champignons). Après l'incubation, on mesure le diamètre de la zone au millimètre entier le plus proche au point où la croissance diminue considérablement de 80% ([Das et al., 2010](#)) (fig .II.1).

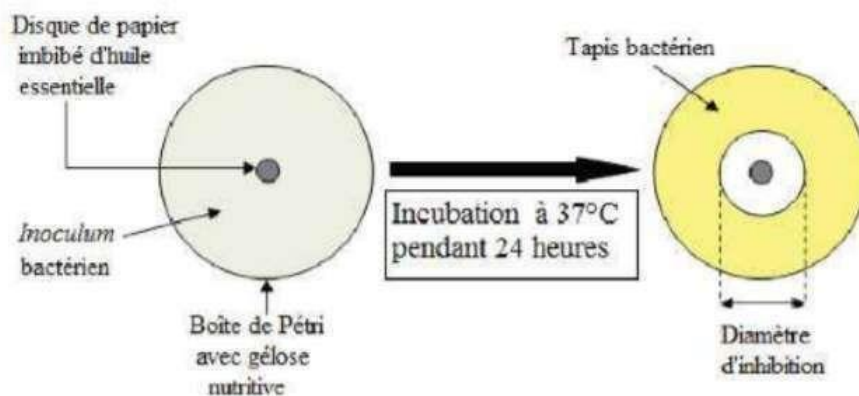


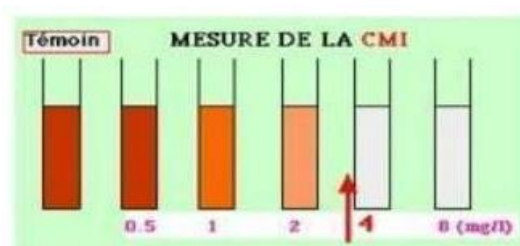
Figure II.1. Principe de la méthode de diffusion par disque ([Ganou, 1993](#)).

IV.5.2. Technique de diffusion en puits

Cette technique est basée sur le principe de la diffusion sur disque. Il s'agit de creuser un trou de 6 à 8 mm de diamètre dans la structure géologique. Le puits d'agar perforé contient ensuite un volume constant d'extrait végétal, puis il est incubé à une température et une durée optimales en fonction du microorganisme testé ([Das et al., 2010](#)).

IV.6. La concentration minimale inhibitrice CMI

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), correspond à la plus faible concentration d'antimicrobiens qui inhibera la croissance visible des microorganismes après une incubation durant la 18-24 ([Andrews, 2001](#)). Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories: "sensible" ; "résistante" ; "intermédiaire" ([Genné & Hans, 2003](#)) (fig .II.2).



Dans cet exemple : CMI=4mg/L

Figure II.2. méthode de détermination de la CMI.

IV.6.1. Méthodes de détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice

Les méthodes de dilution sont les plus appropriées pour la détermination des valeurs de concentration minimales CMI d'un extrait, d'une huile essentielle ou d'une substance pure ([Rios et al., 1988](#)) Puisque elles permettent d'évaluer la concentration de l'agent antimicrobien testé dans la gélose (dilution d'agar) ou dans le bouillon (microdilution ou macrodilution). Il est possible d'utiliser ces techniques afin de quantifier l'activité antimicrobienne in vitro contre les bactéries et les champignons ([Balouiri et al., 2016](#)).

IV.6.2. La dilution en bouillon

La méthode de référence la plus couramment utilisée est la technique standardisée de dilution en milieu liquide développée par le « Comité national pour les normes de laboratoire clinique » NCCLS ou plus récemment appelée CLSI « Institut de normes clinique et de laboratoire » ([Abbes et al., 2012](#)). La dilution en bouillon peut être réalisée dans des tubes à essai contenant plus de 1,0 ml (généralement 2 ml) (macrodilution) ou dans des volumes plus petits à l'aide de plaques de microtitration de 96 puits (microdilution) ([Jorgensen & Turnidge, 2015](#)).

IV.6.2.1. La méthode de microdilution

Il s'agit d'une méthode plus facile et plus abordable que celle de la macrodilution au bouillon. Elle est désormais reconnue comme la méthode de test de sensibilité internationale de référence ([Schwalbe et al., 2007](#)). Le fonctionnement de cette méthode consiste à utiliser un émulsifiant ou un solvant dans le milieu d'essai afin de garantir le contact entre les microorganismes d'essai et l'agent tout au long de l'expérience. Les principaux agents sont le tween 80, le tween 20, l'éthanol et le DMSO. Après une incubation de 18 à 24 heures, on peut mesurer la turbidité de manière visuelle ou par spectrophotométrie, ou encore en utilisant un indicateur de viabilité cellulaire (par exemple, des sels de tétrazolium ou du colorant de résazurine) ([Elshikh et al., 2016](#); [Wilkinson, 2006](#))(fig .II.3).

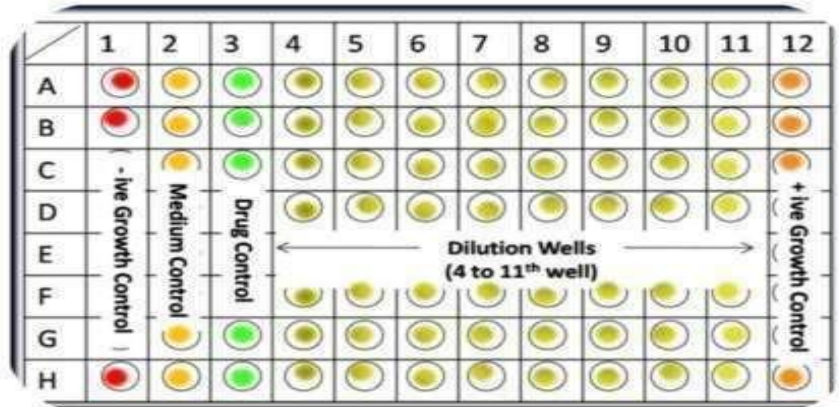


Figure II.3. Représentation graphique du protocole de micro-dilution de bouillon recommandé par CLSI (Pandey *et al.*, 2016).

Chapitre III :
Micro-organismes utilisés
dans les tests antimicrobiens

Chapitre III. Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens

III.1. Les bactéries

Bacillus cereus

Les *Bacillus* sont des bactéries gram-positives qui se présentent sous forme d'endospores, qu'elles soient aérobies, anaérobies ou facultatives. Ils présentent une diversité métabolique, et certaines espèces sont thermophiles. La pathogénicité de *B. cereus*, qu'elle soit intestinale ou non intestinale, est intimement associée à la production d'exoenzymes destructrices/réactives pour les tissus. La maladie de *Baccillus cereus* se manifeste sous deux formes : diarrhéique et émétique ([Manaselis et al., 2011](#)).

La résistance aux antibiotiques des isolats a été évaluée par rapport à 13 antibiotiques : oxacilline, chloramphénicol, ciprofloxacine, clindamycine, érythromycine, gentamicine, imipénème, pénicilline, rifampine, sulfaméthoxazole/triméthoprim, tétracycline et vancomycine. la plupart des isolats ont montré une sensibilité aux autres antibiotiques. La sensibilité la plus élevée a été observée pour la gentamicine (100 %), tandis que 97 et 95 % des isolats étaient sensibles à la clindamycine et au chloramphénicol.

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus est un coccus à coloration de Gram positive. Il mesure de 0,5 à 1 µm de diamètre, immobile, aéro-anaérobie facultatif et possède une catalase et une coagulase (fig .III.1). Agent pathogène commensal souvent présent sur la peau, les narines et les muqueuses des individus sains, représente une cause mondiale commune d'infection humaine et acquiert facilement une résistance aux antimicrobiens par mutation ou transfert horizontal de gènes de résistance provenant d'autres bactéries. La bactérie *S. aureus* produit un certain nombre de facteurs de virulence considérés comme importants pour les infections cutanées notamment des protéines cytolytiques, des facteurs super antigéniques, des molécules utilisées pour l'évasion immunitaire et des protéines ancrées dans la paroi cellulaire

les souches de *S. aureus* qui synthétisent le PBP-2A peuvent se développer en présence de nombreux antibiotiques, et ces souches de *SARM* sont résistantes à de nombreux antibiotiques. Les souches de *SARM* ont tendance à être résistantes à la méthicilline, à la nafcilline, à l'oxacilline et aux céphalosporines ([Taylor & Unakal, 2017](#)).



Figure III.1. L'espèce bactérienne *Staphylococcus aureus* ([Anses, 2011](#)).

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie de la famille des Pseudomonadaceae en forme de bâtonnet, aérobie stricte, Gram négatif, cytochrome-oxydase positive, mobile par cils polaires produisant les pigments de fluorescéine et de pyocyanine. Les cellules de *P. aeruginosa* mesurent de $0,5 - 1 \mu\text{m} \times 1,5 - 4 \mu\text{m}$ (Fig .III.2). *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène nosocomial majeur, en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose et dans les services de réanimation. Ces souches sont définies par la résistance à au moins trois des quatre principales classes d'antibiotiques anti-Pseudomonas

(pénicillines/céphalosporines/monobactames, carbapénèmes, aminosides et fluoroquinolones).

P. aeruginosa est capable de s'adapter à l'environnement défavorable de ses hôtes en sécrétant divers facteurs de virulence, qui contribuent au succès de l'infection et à l'apparition de maladies. Premièrement, le lipopolysaccharide (LPS) est un composant structural de surface important pour protéger le feuillet externe et les cellules hôtes de position et l'endotoxicité du lipide A dans le LPS permet des lésions tissulaires, En l'absence d'une définition standardisée, la multirésistance chez *P. aeruginosa* est habituellement décrite comme la résistance ou la diminution de la sensibilité à au moins trois classes d'antibiotiques actifs sur les souches sauvages : (1) β -lactamines hors carbapénèmes (pénicillines, céphalosporines et monobactames) ; (2) carbapénèmes ; (3) fluoroquinolones et (4) aminosides.

Cette bactérie transforme une grande diversité de substances organiques et présente une résistance à divers antibiotiques et produits désinfectants. Cette bactérie opportuniste, *P. aeruginosa*, est très présente dans l'environnement. Elle se trouve dans les eaux, les plantes et le sol ([Organization, 2006](#)) .



Figure III.2.L'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* ([Organization, 2006](#)).

Escherichia coli

Il s'agit d'un bacille facultatif à Gram négatif aérobie-anaérobie de la famille des entérobactéries (Enterobacteriaceae) qui colonise le tube digestif humain et animal ([Bidet, 2019](#)). Bacille à coloration de Gram négative, oxydase négative, mesurant de 2 à 4 μm de long et d'un diamètre d'environ 0,6 μm , généralement mobile grâce aux flagelles ([Anses, 2019](#)). (fig .III.3)

Les maladies intestinales seront décrites par les sous-types d'*E. coli* responsables, notamment *Escherichia coli* entérotoxigène, *Escherichia coli* entérohémorragique, *Escherichia coli* producteur de shigatoxines *Escherichia coli* entéroinvasive, *Escherichia coli* entéro-pathogène et *Escherichia coli* entéroagré-gative. Les maladies extra-intestinales seront décrites en fonction de la maladie clinique ([Mueller & Tainter, 2023](#)).

La résistance aux antimicrobiens a également été observée chez les animaux, où les antimicrobiens sont utilisés pour le traitement et la prophylaxie des maladies infectieuses. Comme chez l'homme, l'utilisation d'antimicrobiens entraîne une incidence accrue de résistance chez les bactéries pathogènes et endogènes.



Figure III.3.L'espèce bactérienne *Escherichia coli* ([Anses, 2019](#)).

Partie Pratique
chapiter IV :Matériel et
Méthodes

Chapitre IV. Matériel et Méthode

Ce travail a été réalisé au niveau des laboratoires de la faculté des sciences M'SILA

IV.1. Échantillonnage

La plante utilisée dans notre étude (*Ruta chalepensis*) a été récoltée -une façon aléatoire dans la région de Bousaada (**Djebel Messaad**), Wilaya de Msila au mois de Mars et l'année 2024 (Fig .IV.1)



Coordonnées géographiques de BouSaada

Latitude: 35.2193

Longitude: 4.18167

35° 13' 9" Nord, 4° 10' 54" Est

Figure IV.1. Localisation de Bou Saada par rapport à l'Algérie

Microorganismes utilisés

Les germes qui ont été choisis pour réaliser la teste de l'activité antibactérien du extrait sont
 1-*Escherchia coli* 2-*Pseudomonas aeruginosa* 3- *Staphylococcus aureus* 4- *Bacillus*

IV.2. Méthode

Préparation de la matière végétale et extraction :

La partie aérienne de la plante récolté à été nettoyé et séché à une température ambiante et à l'ombre en suite broyé à l'aide d'un moulin électrique, pour obtenir une broyat poudre fin de plante puis tamise (fig .IV.2.)



A) : Ruta chalepensis sèche, avant le broyage et le tamisage.

B) : Ruta chalepensis après le broyage.

C) : Ruta chalepensis sous forme poudre.

Figure IV.2. Le broyage et le tamisage de la plante.

Ensuite une extraction sélective à été réalisée selon le la méthode de ([Bayaga et al., 2020](#)) avec quelque modifications. Dans le but de séparer le maximum de Compose actives contenant dans la plante, un solvant hydroalcoolique méthanol / eau. Une quantité de 50 g de la poudre de plante macéré dans 500 ml du système solvant Méthanol/eau 70/30 (V/V) pendant 24 h sous agitation magnétique à une température ambiante, les macéras obtenus ont été filtré une fois sur une toile à bluter puis une fois sur un papier Wattman

Le Premier filtra récupérer dans un féole conservé dans 4°C et à l'abri de la lumière les résidus de filtration. Est renvoyé dans un féole ou un bucher contenant 500ml de système solvant Méthanol/eau (70/30) (V/V) est Macéré pendant 24h pour obtenir le deuxième filtrat qui est mélange avec la première d'une même Méthode réalisé pour obtenu le troisième filtrat.

- les 03 Extrait sont mélangés et évaporés au rotavapeur sous vide. à 40°C puis séchés à L'étuve à 40°C .l' extrait Secs obtenue est conservé au réfrigérateur dans des flacons sombre (pour Évite l'oxydation de lumière) pour les têtès.(Fig .IV.3) (annexe .II.III.IV.V)

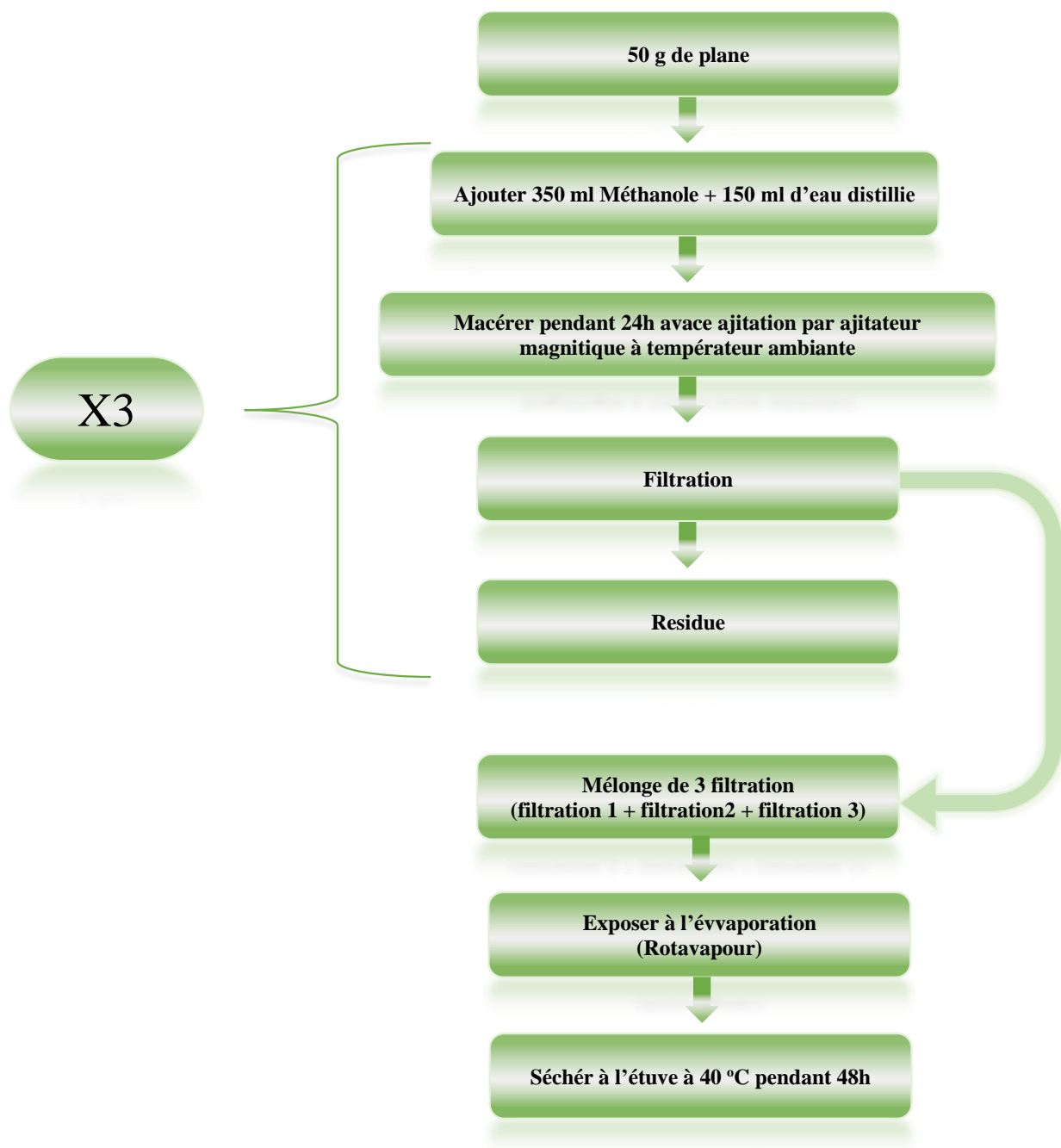


Figure IV.3. protocole de préparation de extrait.

Calcul du rendement en extrait sec :

Est réalisée après évaporation à sec par la formule suivante

$$\text{Taux d'Extraction (\%)} = \frac{[P1-P0]}{E} * 100$$

P1 : Poids de L'extrait après Evaporation

P0 : Poids initial du cristalliseur ou de la Boite de Pétri

E : Poids de l'Échantillon initial

IV.3. Dosage des polyphénols

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait brut de *Ruta chalepensis* a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu ([Li et al., 2007](#)). On combine 100µl de l'extrait avec 0,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu récemment préparé (10 fois dilué). Une heure plus tard, on ajoute 400µl de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à une teneur de 7,5 %. Il est nécessaire de maintenir l'ensemble à température ambiante et dans l'obscurité pendant 2 heures, puis de le lire à l'aide d'un spectrophotomètre à 765nm. On a calculé la concentration totale des polyphénols en utilisant l'équation de régression de la droite d'étalonnage établie avec l'acide gallique préparé dans du méthanol (0-160 µg/ml).

Le résultat est exprimé en microgrammes équivalent d'acide gallique par milligrammes du poids d'extrait (µg EAG / mg).

IV.4. Dosage des flavonoïdes

La méthode de trichlorure d'aluminium ([Bahorun et al., 1996](#)) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans EBr de *Ruta chalepensis*. La solution d'AlCl₃ 6H₂O (2% dans le méthanol) est ajoutée à 1 ml d'échantillon ou de standard (préparés dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction, on peut mesurer l'absorbance à une longueur d'onde de 430 nm. Une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-14 µg/ml) permet de déterminer la concentration des flavonoïdes, qui est exprimée en microgrammes d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

IV.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne de l'extrait *Ruta chalapensis* a été testée vis à vis des souches microbiennes. Cette étude a été réalisée par la technique de diffusion sur gélose (méthode de disques)

Préparation de milieu culture

Les souches bactériennes à tester qui sont trouvées dans des Boîtes contenant gélose nutritive, sont cultivées dans des tubes de bouillon nutritif et incubées à l'étuve pendant 24 heures à 37°C à fin d'obtenir une culture jeune des bactéries.

l'ensemencement dans gélose nutritive

À l'aide d'une anse de platine réculture les bactéries à tester dans des Boîtes contenant un gélose nutritive, et incubées à l'étuve pendant 18 heures à 37°C à fin d'obtenir des cultures jeunes de 18 heures.

Préparation de suspension bactérienne

À l'aide d'une anse de platine, prélevés quelques colonies, et ont été mis dans 10 ml d'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne est bien homogénéisée à l'aide d'un vortex. La concentration des inocula est évaluée et exprimée par la mesure de densité optique à une longueur d'onde de 625 nm pour atteindre des concentrations entre 10^7 et 10^8 germes/ml (des suspensions microbiennes d'une densité optique de 0.5 McFarland).

IV.6. Méthodes de réalisation du test de l'activité antibactérienne de l'extrait

La méthode choisie pour évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait de *Ruta Chalapensis* est la méthode de diffusion sur disque : aromatoگرامme - L'aromatoگرامme est réalisée selon la méthode de ([Hoekou et al., 2016](#)).

Différentes dilutions ont été préparées, la poudre de l'extrait est solubilisée dans un mélange de diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'eau distillée stérile (1/9 v/v). On prend 500 mg de poudre d'extrait solubilisé dans un mélange de 100 µl de DMSO + 900 µl d'eau distillée stérile.

Préparation des disques Les disques sont fabriqués manuellement à partir du papier absorbant Wattman, à l'aide d'un perforateur. Les disques à un diamètre de 6 mm, ensuite, ces disques sont récupérés dans un tube à essai et stérilisés à l'autoclave pendant 30 minutes à 120°C. Puis stockés à une température ambiante.

IV.6.1. Préparation de boîte de Pétri et des milieux de culture

Les boîtes de Pétries sont préparées dans une zone stérile. La gélose de Muller -Hinton et la gélose nutritif sont stérile et prêtes à l'usage ont été coulés dans les boîtes de Pétries.

IV.6.2. L'ensemencement des souches

L'ensemencement est réalisé par d'écouvillon stérile, à partir de suspension bactériennes fraîchement préparée. Il consiste à flotter pour l'étaler sur la totalité de la surface de gélose Muller -Hinton par des stries en séries. En tournant la boîte à environ 90° après chaque application pour obtenir une distribution uniforme de forme tapis de suspension, 04 boîtes pour chaque souches .

IV.6.3. Le dépôt des disques

Toujours dans la zone stérile et à l'aide d'un pince stérile. Des disques du papier Wattman stérile sont déposés sur la gélose précédemment inoculé avec les microorganismes. Dans chaque boîte nous mettant 04 disques. L'un pour le témoin et 03 autres pour l'extrait. Puis à l'aide d'une micro pipette nous prenons 30 µl de l'extrait diluée et imbibée dans le disque. Le disque de témoin imbibé par 30 µl de l'eau distillée stérile. la quatrième boîte pour chaque souche est utilisée pour les disques d'anti -biotique médical comme référence de comparaison. Les boîtes sont incubées à l'incubateur pendant 24 h à 37°C. La lecture s'effectue par la mesure du diamètre d'inhibition autour des disques imbibés par l'extrait.

IV.7. Méthode de détermination (CMI) sur milieu liquid

La CMI a été déterminée comme précédemment décrite par ([Boniface et al., 2010](#)). Brièvement, 100 µl de bouillon Mueller Hinton contenant du rouge de phénol à 0,02 g/l ont été distribués dans chaque puit d'une microplaque à 96 puits. 100 microlitres de la solution mère de l'extrait ont ensuite été ajoutés à chacun des puits de la première colonne (A, C, D, E, F, G, H) de la microplaque sauf celui de la seconde rangée (B). Dans chaque rangée, des dilutions successives de 2 puits par puits ont été effectuées jusqu'au 12ème puits, et les 100 µl du dernier puits ont été évacués. Par la suite, on a ajouté 100 µl de bouillon Mueller Hinton sans rouge de phénol dans le premier puit de la seconde rangée, puis on a procédé à des dilutions successives, toujours de raison 2. L'extrait sera à une concentration d'environ (100mg/ml) pour chaque premier puits de la plaque.

Tous les puits ont étéensemencés, sauf ceux de la première rangée, en y introduisant 100 µl de suspension bactérienne à 10^6 (UFC/ml), densité égale à l'échelle 2 de Mc Ferland. Dans les puits de la première rangée, on a utilisé du bouillon Muller Hinton sans rouge de phénol au lieu de la suspension bactérienne. La microplaque a enfin été recouverte avec le couvercle puis incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures. La première rangée représente le témoin négatif tandis que la seconde, le témoin positif.

Lors de la lecture, l'apparition d'une teinte jaune témoigne d'une prolifération bactérienne. La couleur rouge initiale persistante indique l'absence de développement des germes.

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre V. RESULTATS ET DISCUSSION

V.1. Extraction dosage des polyphenols et flavonoides

V.1.1. Rendement d'extraction

Le résultat de cette expérimentation a permis l'obtention d'un extrait avec un aspect poudreux et de couleur noire verdâtre , Un poids de 9g avec un rendement de 18% (Tab.V.1.)

Tableau V.1.Rendement (%) aspect et couleur des extraits bruts secs de *Ruta chalepensis*.

L'extrait	Aspect	couleur	Poids de L'extrait sec (g)	Rendement %
E.H.M	crystallin	noir verdâtre	9	18

Le rendement d'extraction représenté dans la Figure V.1. est très élevé par rapport à celui mentionné dans les travaux de ([Mansour S Al-Said et al., 1990](#)) qui ont trouvés un rendement de 3,75% ; l'étude la plus proche à notre travail est l'étude de ([Attou, 2011](#)), d'une manière générale Le rendement d'extraction de *Ruta chalepensis* est inclus entre (8% -23,76%) qui varie selon les stations de récolte et la partie utilisé de la plante .

Les valeur importantes du rendement peuvent être expliqué par l'usage du mélange du solvant d'extraction (eau /méthanol) qui a une polarité importante.

Dosage des polyphénols totaux

La détermination de la teneur en polyphénols totaux de l'extraits a été réalisée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu qui s'est réduit, lors de l'oxydation des phénols. Cette méthode a été choisie en vue de sa fiabilité et la disponibilité du réactif. Une courbe d'étalonnage (fig .V.1) est effectuée avec l'acide gallique, le standard le plus représentant de cette famille de composés.

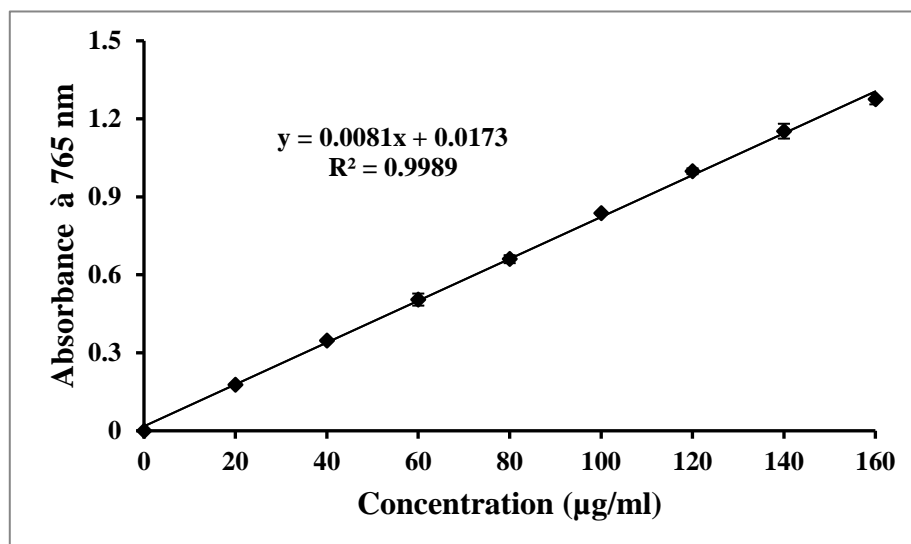


Figure V.1. Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux.

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait de *Ruta chalepensis*, exprimés en µg équivalent d'acide gallique en utilisant la courbe de régression (tab .V.2) :

Tableau V.2. Teneur en polyphénols totaux de l'extrait brute de *R. chalepensis*.

L'extrait	Polyphénols totaux (µgEAG/mg d'extrait)
E.H.M	108.601± 11.349

Le taux des polyphénols totaux enregistrés pour l'extrait hydro-méthanolique est d inférieure à celui cité dans les travaux de ([Ghazghazia et al., 2013](#)) qui a de 1270µgEAG/mg.

- Alors que nos résultats sont plus proche à ceux trouvé dans les travaux de ([Kacem et al., 2014](#)) qui ont trouvés que le teneur en polyphénols totaux de l'extrait aqueux est de l'ordre de 120,5±4,95 µgEAG/mg d'extrait

la différence remarqué entre les résultats est expliqué par les différents facteurs: la région de récolte, la méthode d'extraction, les périodes de récolte et le système du solvant utilisée

Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé en utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl₃) ou la quercétine est utilisé comme standard pour tracer la courbe d'étalonnage (fig .V.2). La teneur en

flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ}/\text{mg}$ d'extrait).

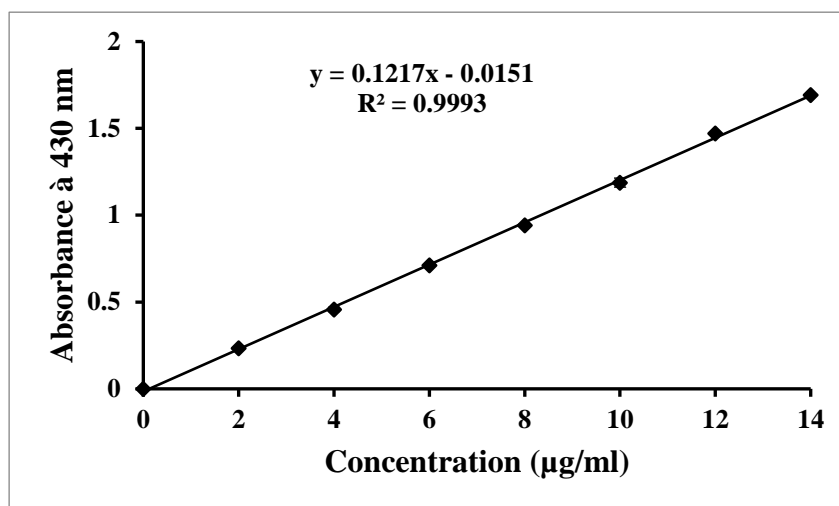


Figure V.2. Courbe d'étalonnage des flavonoïdes totaux.

Tableau V.3. Teneur en flavonoïdes d'extrait brute de *R. chalepensis*

L'extrait	Flavonoïdes ($\mu\text{g EQ}/\text{mg}$ d'extrait)
E.H.M	9.721\pm 0.608

Notre extrait a présenté une teneur en flavonoïdes de $9.721 \pm 0.608 \mu\text{g EQ}/\text{mg}$ d'extrait

Ce résultat est supérieur aux résultats enregistrés par les travaux de ([ketema et al., 2019](#)) qui a mentionné une valeur de $1,125 \pm 0,053 \mu\text{g EQ}/\text{mg}$ d'extrait à partir d'un extrait méthanolique de *Ruta chalepensis*; cette différence est due à la différence entre le type de l'échantillon et le système de solvant utilisé.

V.2. Activité antimicrobienne

V.2.1. Test d'aromatogramme

L'utilisation de la méthode de diffusion sur gélose (méthode de Disque) montre la capacité antimicrobienne de l'extrait (E.H.M) du *Ruta chalepensis* vis-à-vis quatre souches bactériennes. Le diamètre de la zone d'inhibition représente les résultats. La différence de composition chimique de l'extrait est attribuable à la variation de leur activité antimicrobienne.

V.2.2. Test de l'activité antibactérienne

Les résultats exprimés dans la Figure.V.3 montrent que les espèces bactériennes étudiées présentent des degrés de sensibilité différente vis-à-vis d' extrait étudiée. Un extrait est considéré actif si son diamètre d'inhibition est supérieur à 8 mm.([Tsirinirindravo & Andrianarisoa, 2009](#)). (Annexe VI).

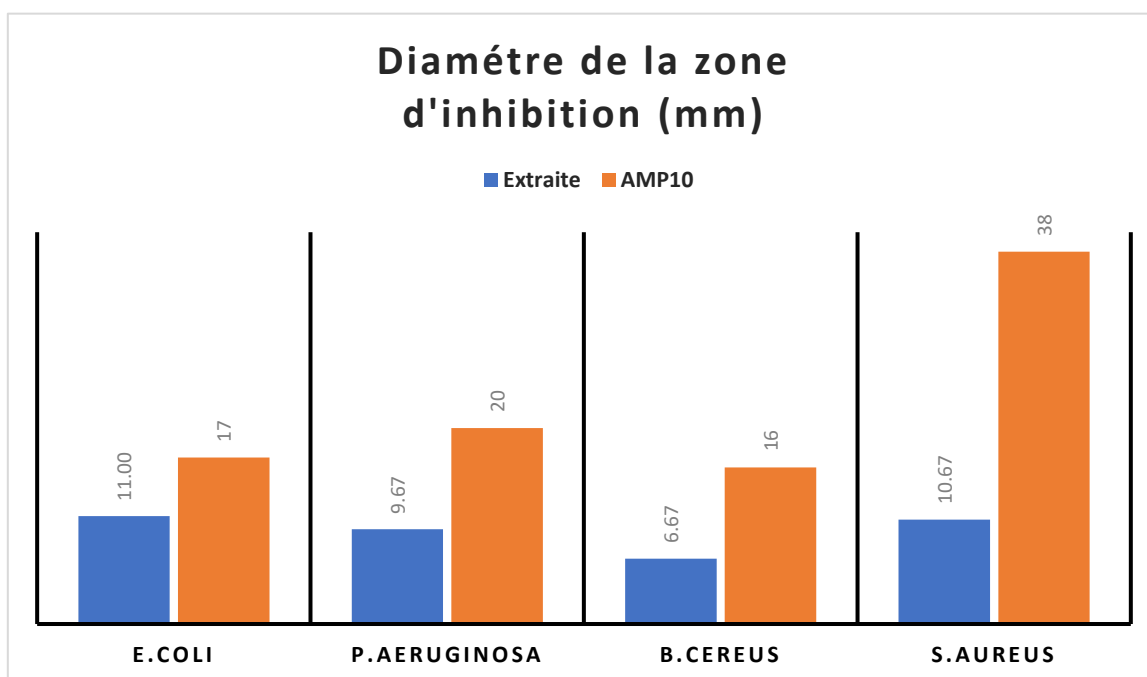


Figure V.3. Les zones d'inhibition de extrait et l'ATB sur les souches étudiée.

Selon la Figure.V.3, on remarque quela plus par des bactéries sont sensibles à l'extraite . La plus grande zone d'inhibition est enregistrée par la souche *Escherichia. coli* (11mm \pm 4.36) suivie par *Staphylococcus. aureus* (10.67mm \pm 1.53), *Pseudomonas aeruginosa* (9.67mm \pm 4.73), *Bacillus.cereus* (6.67 mm \pm 1.15) qui a présenté une résistance avec l'extraite.

Pour mieux expliquer, nous devons présenter nos résultats sous forme d'une comparaison entre les diamètres de la zone d'inhibition obtenus vis avis les souches bacteriennes utilisés et les antibiotiques standards

l'activité varie selon les souches bactériennes testées. Selon la littérature scientifique, les souches bactériennes répondent ou pas aux extraits en fonction de l'existence ou non de zones d'inhibition, trois réponses sont possibles :

- Souche sensible: la dimension du diamètre de la zone d'inhibition est égale ou supérieure à 10mm
- Souche limite (intermédiaire): la dimension du diamètre de la zone d'inhibition inférieure à 10mm
- Souche résistante: absence de zone d'inhibition ([Benhamou, 2012](#))

Donc, quand le diamètre est important, l'extrait donne une bonne activité antibactérienne, la souche est considérée comme plus sensible.

-Dans les travaux similaires de ([Daoudi et al., 2016](#)) Extraits bruts du *Ruta chalepensis*, le résultat la plus remarquable est la grande sensibilité de *Staphylococcus aureus* vis-a-vis de l'extrait obtenu par la partie aérienne, le diamètre d'inhibition étant égal à $27,33 \pm 1,15$ mm .

-Une étude similaire montre que l'extrait de la plante *Ruta chalepensis* exerce une bonne activité antibactérienne Vis -à-vis du *S.aureus* ,*P.aeruginosa* ,*E.coli* ,alors que *B.cereus*. a montré une résistance à cet extrait

selon une étude différente de ([Bnina et al., 2010](#)), *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* sont résistants à l'activité antibactérienne de *Ruta chalepensis*.

On peut aussi déduire que le contenu important en polyphénol chez la plante explique l'effet antibactérien de l'extrait.

Discussion de l'antibiogramme

- l'utilisation de l'antibiogramme dans ce travail est pour le but de prédire la sensibilité des souches bactériennes à un antibiotique. Et pour prendre c'est la sensibilité comme référence de comparaison avec l'effet de l'extrait testé. Cette sensibilité est apparue selon les zones d'inhibition autour des disques d'antibiotiques.

- Nous avons utilisé l'ampicilline dans ce test, Les diamètres des zones d'inhibition de l'ampicilline sont présentés dans le tableau (tab .V.4)

Tableau V.4.Les diamètres des zones d' inhibition de l' ampicilline.

Bactéries / ATB	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B.cereus</i>	<i>S.aureus</i>
AMP10	17	20	16	38

- l'effet de l' extrait sur *E.coli* (11mm) est plus proche à l' effet de l' ampicilline (17mm).

- l' effet de l' ampicilline sur les autres souches testés est très important ou plus supérieur à l' effet de l' extrait.

- cette différenciation noté car l' ampicilline est antibiotique synthétisé artificiellement et bien dosé par contre l' extrait brut de *Ruta chalepensis* a une effet naturel non dosé.

V.3. Test de CMI

L'essai des dilutions en série dans les microplaques de 96 puits a révélé des valeurs de CMI allant de 62.5 à 500 µg/ml tableau (tab .V.5), (Annexe VII).

Tableau V.5.Valeurs des CMI et CMB des bactéries vis-à-vis a extraite de *Ruta chalepensis*.

Bactéries Extrait	CMI,CMB /($\mu\text{g/ml}$)	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B.cereus</i>	<i>S.aureus</i>
E.H.M	CMI	62.5	125	250	125
	CMB	125	250	500	250

Nous avons constaté que les valeurs de CMI les plus élevés 250µg/ml sont obtenus par la souche *Bacillus cereus* Ce que nous amené à dire que sont les bactéries les moins sensible vis à vis de l' extrait, alors que les bactéries *E,coli* et *S,aureus* sont la plus sensible vis à vis l' extrait avec des valeurs de CMI moins élevés 62,5 µg/ml -125µg/ml respectivement.

Les résultats de CMI confirme les résultats que nous avons obtenus par la méthode de diffusion sur disque (zone d' inhibition). Dans un travail similaires, ([Chibani et al., 2013](#)) a montré que *Ruta chalepensis* à un effet antibactérien sur *E. coli* avec une CMI= 20µg/ml Ansi des résultats obtenu par ([ketema et al., 2019](#)) montré que l'extrait méthanolique à une activité antibactérienne sur les souches *E.coli*, *S.aureus* et *B.cereus* avec une CMI similaire = 250µg/ml , les résultats des travaux de ([Bnina et al., 2010](#)) déterminer que l'effet antibactérien de *Ruta chalepensis* sur la bactérie *E.coli* à une CMI= 50 µg/ml et sur *S.aureus* à une CMI=30µg/ml.

Les teneurs en polyphenol , flavonoides et d'autres composés qu'ont n'a pas dosés ,font la différence entre ses chiffres d'activiyé biologiques.

Conclusion

Conclusion

Après l'étude des résultats obtenus à travers cette recherche sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait hydro-méthanolique de la plante *Ruta chalepensis*, on peut dire que cette plante contient des composés actifs dotés d'une activité antimicrobienne.

Les résultats ont montré que l'extrait hydro-méthanolique de cette plante est riche en composés phénoliques et flavonoïdiques. Il a également la capacité d'inhiber fortement la croissance de trois souches bactériennes parmi *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

La souche bactérienne *Bacillus cereus* a montré une résistance relative face à l'extrait. L'extrait a également la capacité d'inhiber fortement la croissance de ces souches bactériennes à des concentrations très faibles.

On peut donc dire que l'extrait hydro-méthanolique de la plante *Ruta chalepensis* possède une activité antimicrobienne efficace contre certains types de bactéries pathogènes pour l'homme. Ce qui confirme l'utilisation de cette plante à valeur thérapeutique en médecine traditionnelle.

Perspectives :

Etudes approfondies sur :

- 1- Détermination de la composition chimique des composés actifs dans l'extrait.
- 2- Tester l'activité contre des souches bactériennes et fongiques résistantes aux antibiotiques.
- 3- Réalisation des tests biologiques sur les animaux pour confirmer l'efficacité et la toxicité.
- 4- Développement de nouveaux médicaments naturels à partir de la plante et déposer des brevets sur les composés actifs identifiés.

Ces points permettraient de faire progresser la recherche et de valoriser ses résultats notamment par le développement de nouveaux traitements naturels. L'identification des principes actifs ouvrirait également la voie à leur exploitation industrielle et pharmaceutique.

En résumé, cette étude prometteuse sur *Ruta chalepensis* devrait être poursuivie selon ces axes prioritaires afin de confirmer son potentiel thérapeutique.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- Abbes, S., Trabelsi, H., Amouri, I., Sallemi, H., Nej, S., Fatma, C., Makni, F., & Ayadi, A. (2012). Methods for studying the in vitro susceptibility of *Candida* spp. to antifungals. *Annales de biologie Clinique*,
- Al-Said, M. S., Tariq, M., Al-Yahya, M., Rafatullah, S., Ginnawi, O., & Ageel, A. (1990). Studies on *Ruta chalepensis*, an ancient medicinal herb still used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 28(3), 305-312.
- Al-Said, M. S., Tariq, M., Al-Yahya, M. A., Rafatullah, S., Ginnawi, O. T., & Ageel, A. M. (1990). Studies on *Ruta chalepensis*, an ancient medicinal herb still used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 28(3), 305-312. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-8741\(90\)90081-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-8741(90)90081-4)
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl_1), 5-16.
- Anses. (2011). *Staphylococcus aureus* et entérotoxines staphylococciques. *Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments*, p1.
- Anses. (2019). *Escherichia coli* entérohémorragiques. *Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments*, p1.
- Attou, A. (2011). Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent. Mémoire soutenue publiquement en vue de l'obtention du diplôme de Magister en biologie, Université de Tlemcen.
- Baba Aissa, F. (1999). Encyclopédie des plantes utiles Flore d'Algérie et du Maghreb Ed Librairie Moderne-Rouiba Alger. 243 - 244.
- Bachiri, L., Echchegadda, G., Ibjibjen, J., & Nassiri, L. (2016). Etude phytochimique et activité antibactérienne de deux espèces de Lavande Autochtones Au Maroc: «*Lavandula stoechas* L. et *Lavandula dentata* L.». *European Scientific Journal*, 12(30), 313-333.
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, J., & Pinkas, M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittelforschung*, 46(11), 1086-1089.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
- Bayaga, H. N., Guedje, N. M., Omgba, Y. T., Yissibi, E. P., Nono, B. L. N., Elombat, D. C. A., Fokunang, C., & Essomba, C. N. (2020). Pouvoir antibactérien des extraits aqueux et hydroéthanolique du mélange d'écorces de tronc d'*Albizia gummifera* (JF Gmel.) CA Sm et *Spathodea campanulate* P. Beauv. *Journal of Applied Biosciences*, 154(1), 15881-15887.
- Benhamou, N. (2012). Activité antioxydant des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'ouest et du sud-ouest Algérien. *These doctorat n biologie, Tellement*.
- Bidet, P. (2019). *Escherichiacoli/Shigelle*. p2.

- Bnina, E. B., Hammami, S., Daamii-remadi, M., Jannet, H. B., & Mighri, Z. (2010). Chemical composition and antimicrobial effects of Tunisian *Ruta chalepensis* L. essential oils. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 12, 1-9.
- Bohui, P. S. G., Adima, A. A., Niamké, F. B., & N'Guessan, J. D. (2018). Etude comparative de trois méthodes d'extraction des flavonoïdes totaux à partir des feuilles de plantes médicinales: *Azadirachta indica* et *Psidium guajava*. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 46, 50-58.
- Boniface, Y., Jean-Pierre, N., Philippe, S., Félicien, A., & Dominique, S. (2010). Etude chimique et activités antimicrobiennes d'extraits volatils des feuilles et fruits de *Xylopiya aethiopica* (DUNAL) A. Richard contre les pathogènes des denrées alimentaires. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 29, 19-27.
- Bonnier, G. (1999). *La Grande flore en couleur*; ed: Belin. Tome, 3, 205-206.
- Boukhatem, M. N., Ferhat, A., & Kameli, A. (2019). Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles: revue de littérature. *Une*, 3(4), 1653-1659.
- Brener, S., & Friedman, J. (1985). Phytophotodermatitis induced by *Ruta chalepensis* L. *Contact Dermatitis*, 12(4), 230-232. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1985.tb01121.x>
- Cacique, A. P., Barbosa, É. S., Pinho, G. P. d., & Silvério, F. O. (2020). Maceration extraction conditions for determining the phenolic compounds and the antioxidant activity of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Ciência e Agrotecnologia*, 44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/1413-7054202044017420>
- Chibani, S., Bouratoua, A., Kabouche, A., Laggoune, S., Semra, Z., Smati, F., & Kabouche, Z. (2013). Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Ruta chalepensis* subsp. *angustifolia* from Algeria. *Der Pharm. Lett*, 5(5): 252.
- Daayf, F., & Lattanzio, V. (2008). *Recent advances in polyphenol Research*. Blackwell Publishing, Singapore.
- Daoudi, A., Hrouk, H., Belaidi, R., Slimani, I., Ibijbjen, J., & Nassiri, L. (2016). Valorisation de *Ruta montana* et *Ruta chalepensis*: étude ethnobotanique, screening phytochimique et pouvoir antibactérien. *Journal of Materials and Environmental Science*, 7(3), 685-1063.
- Das, K., Tiwari, R., & Shrivastava, D. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of medicinal plants research*, 4(2), 104-111.
- Duke, J. A., Duke, P.-A. K., & DuCellier, J. L. (2008). *Duke's handbook of medicinal plants of the Bible*. CRC Press Boca Raton, FL.
- Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., & Banat, I. M. (2016). Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology letters*, 38, 1015-1019.
- FAYE, P. G., NDIAYE, E. M., NDIAYE, B., CISSE, O. I. K., AYEISSOU, N. C., & CISSE, M. (2022). Effet de la macération, de l'infusion et la décoction sur l'extraction aqueuse des polyphénols des feuilles séchées de *Combretum Micranthum*. *Afrique SCIENCE*, 21(3), 114-126.
- Ganfou, H., Houvoheou, J.-P., Assanhou, A. G., Bankole, H. S., & Gbenou, J. (2019). Activité antibactérienne de l'extrait éthanolique et des fractions de *Anogeissus leiocarpa* (DC)

- Guill. Et Perr.(Combretaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 13(2), 643-651.
- Ganou, L. (1993). *Contribution à l'étude de mécanismes fondamentaux de l'hydrodistillation des huiles essentielles* Toulouse].
- Genné, D., & Hans, H. (2003). De l'antibiogramme à la prescription d'un antibiotique. *Forum Med Suisse*,
- Ghazghazia, H., Chediab, A., Abderrazakb, M., & Brahimia, H. (2013). Comparaison des contenus en polyphénols et de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de quatre plantes collectées du nord de Tunisie. *Microbiol Hyg Alim*, 25(73), 37-41.
- Gonzalez-Trujano, M. E., Carrera, D., Ventura-Martinez, R., Cedillo-Portugal, E., & Navarrete, A. (2006). Neuropharmacological profile of an ethanol extract of *Ruta chalepensis* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(1), 129-135. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.12.014>
- Gravot, A. (2002). *Étude de P450s impliqués dans la biosynthèse des furocoumarines chez Ruta graveolens* (Publication Number 2002INPLA63N) INPL - Institut National Polytechnique de Lorraine]. Impl
- Gip-be
Univ-lorraine
Theses-ul. <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02019082>
- Günaydin, K., & Savci, S. (2005). Phytochemical studies on *Ruta chalepensis* (Lam.) Lamarck. *Nat Prod Res*, 19(3), 203-210. <https://doi.org/10.1080/14786410310001630546>
- Handa, S. (2008). Suman Preet Singh Khanuja Gennaro Longo. *Dev Dutt Rakesh Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants, international centre for science and high technology trieste*, 37, 169-179.
- Hidayat, R., & Wulandari, P. (2021). Methods of Extraction: Maceration, Percolation and Decoction. *Eureka Herba Indonesia*, 2(1), 68-74. <https://doi.org/https://doi.org/10.37275/ehi.v2i1.15>
- Hoekou, Y. P., Tchacondo, T., Gbogbo, A. K., Agban, A., Pissang, P., Atakpama, W., KAROU, S. D., BATAWILA, K., & AKPAGANA, K. (2016). Activités antimicrobiennes de *Parquetina nigrescens* (Afzel.) Bullock, une plante utilisée en médecine traditionnelle togolaise dans le traitement des infections microbiennes. *Afrique SCIENCE*, 12(5), 182-188.
- Jorgensen, J. H., & Turnidge, J. D. (2015). Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. *Manual of clinical microbiology*, 1253-1273.
- Joy, P., Thomas, J., Mathew, S., & Skaria, B. (2001). Medicinal Plants. *Tropical Horticulture* 2, 449 - 632.
- July, L. (2007). La rue, ruta, plante médicinale, plante magique, plante toxique. *Rev. perubiol*, 13(3), 8 - 19.
- Kacem, M., Simon, G., Ieschiera, R., Misery, L., Elfeki, A., & Lebonvallet, N. (2014). Antioxydant ans anti- inflammatory effet Of *Ruta chalepensis* L, Extraits on Lps _ stimulated RAW 264,7 cells. *P134*

- Kallel, K., Rigane, G., & Bensalem, R. (2021). étude comparative des méthodes d'Extraction appliqués dans d'optimisations des Composés phénoliques dans Les plantes médicinales. p125.
- ketema, a., destaw, e., & sidi, m. (2019). phytochemicals analysis antibioterial and antioxidant activity of the leave extraits of ruta chanpansis p5.
- King, A., & Young, G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American dietetic association*, 99(2), 213-218.
- Kpètèhoto, W. H., Hessou, S., Dougnon, V. T., Johnson, R. C., Boni, G., Houéto, E. E., Assogba, F., Pognon, E., Loko, F., & Boko, M. (2017). Étude ethnobotanique, phytochimique et écotoxicologique de *Ocimum gratissimum* Linn (Lamiaceae) à Cotonou. *Journal of Applied Biosciences*, 109, 10609-10617.
- Lamark, J. P. (1804). *Encyclopédie méthodique, ou par ordre de matière botanique*. Agasse, Paris, 333-335.
- Lamnaouer, D. (2002). Composition chimiques et activités biologiques de quelques plantes médicinales du PNT. 2 - 9.
- Lamnauer, D., & Batanouny, K. (2005). A guide to medicinal plants in North Africa. *IUCN Centre for Mediterranean Cooperation Malaga*, 241 - 244.
- Lebham. (2005). Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer. (IVEM). *Université de Bretagne Occidentale (UBO)*.
- Li, H.-B., Cheng, K.-W., Wong, C.-C., Fan, K.-W., Chen, F., & Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102(3), 771-776.
- Lièvre, K. (2004). *Genetic transformation of Ruta graveolens L. and modification of the furocoumarin pathway*
- Modification de la composition en molécules pharmaceutiques (furocoumarines) de la Rue officinale (Ruta graveolens) par transformation génétique* (Publication Number 2004INPL003N) Institut National Polytechnique de Lorraine]. Inpl
- Univ-lorraine
- Theses-ul. <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750045>
- Lugasi, A. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta biologica szegediensis*, 47(1-4), 119-125.
- Manaselis, G., Connie, R., & Donald, C. (2011). *Diagnostic Microbiologie. 4 éd.USA, 1101, ISBN : 978-1-4160-6165-6.*
- Mansion, G., & Salvo, G. (2005). Dating the origin of plants endemic to the Corso- Sardinian Plate: a window on the biogeography of the Mediterranean Basin. 268 - 280.
- Merghache, S., Hamza, M., & Tabti, B. (2009). Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. de Tlemcen, Algérie. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 5(1), 67 - 81.
- Mioulane, P. (2004). *Encyclopédie universelle des 15000 plantes et fleurs de Jardin. Larousse. ISBN, 7-50.*

- Moazedi, A., Dabir, N., Naseri, M., & Zadkarami, M. (2009). Investigated antispasmodic effect of *Ruta chalepensis* leaf on rat's ileum at present of KCl and different concentrations of calcium chloride. *Journal of Biological Sciences*, 9, 159–164.
- Mueller, M., & Tainter, C. R. (2023). *Escherichia coli* infection. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Organization, W. H. (2006). *Guidelines for safe recreational water environments. Volume 2: Swimming pools and similar environments*. World Health Organization.
- Pandey, M., Pandey, A., Kumar, R., Pathak, A., & Dikshit, A. (2016). A Comparative antimicrobial analysis of *Tridax procumbens* L. various extracts on waterborne bacterial pathogens. *International Current Pharmaceutical Journal*, 5(3), 22-26.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., & Zhang, L. (2003). Flavonoids: Promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*, 23(4), 519-534. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/med.10033>
- Rios, J.-L., Recio, M. C., & Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 23(2-3), 127-149.
- Schwalbe, R., Steele-Moore, L., & Goodwin, A. C. (2007). *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. Crc Press.
- Taylor, T. A., & Unakal, C. G. (2017). *Staphylococcus aureus* infection.
- Tounsi, M. S., Wannas, W. A., Ouerghemmi, I., Msaada, K., Smaoui, A., & Marzouk, B. (2011). Variation in essential oil and fatty acid composition in different organs of cultivated and growing wild *Ruta chalepensis* L. *Industrial Crops and Products*, 33(3), 617-623. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.12.028>
- Tsirinirindravo, L., & Andrianarisoa, B. (2009). Activités antibactériennes de l'extrait des feuilles de *Dalechampia clematidifolia* (Euphorbiaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 3(5).
- Walton, N., & Brown, D. (1999). Chemicals from Plants, Prospectives on plant secondary metabolites. In: Imperial College Press, World Scientific, London.
- Wilkinson, J. M. (2006). Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. *Modern phytomedicine: turning medicinal plants into drugs*, 157-171.
- Zeghad, N. (2009). Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. *Constantine: université Mentouri*.
- Zeichen de Sa, R., Rey, A., Argañaraz, E., & Bindstein, E. (2000). Perinatal toxicology of *Ruta chalepensis* (Rutaceae) in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 69(2), 93-98. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00232-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00232-3)

Annexes

Annexes

Annexe I: Produits et matériels utilisés

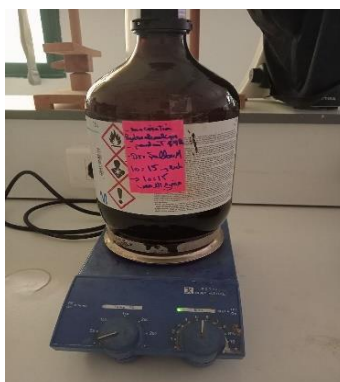
Matériels

- Etuve
- Bain marie (memert, type SV 1422)
- Centrifugeuse (SIGMA 1-6)
- Spectrophotomètre (type spectronic 20 Genvsis TM)
- Rotavapeur (Buchi R-210)
- Balance analytique
- Balance de précision (Kern)
- Agitateur vortex
- Plaque chauffante

Produits

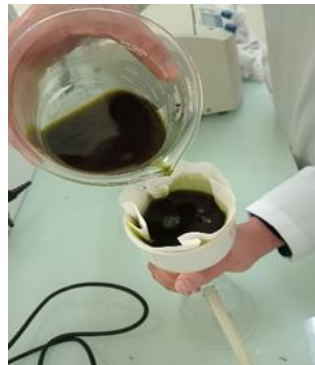
- Methanole (Biochem)
- Ethanole (Biochem)
- Quercétine (Sigma – ALDRICH)
- Acide gallique monohydraté (Sigma – ALDRICH)
- Chlorure de sodium (SHARLAU)
- Acide ascorbique (Sigma – ALDRICH)
- Follin-ciocalteu (Sigma)
- Carbonate de sodium (Sigma – ALDRICH)
- Oxalate de sodium (Sigma – ALDRICH)
- Trichlorure d'aluminium (GRP Rectapur)

Annex II: macération dans l'alcool méthylique pendant 24h

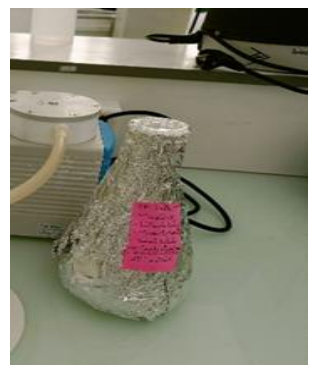


Annexe III : filtration

filtration simple



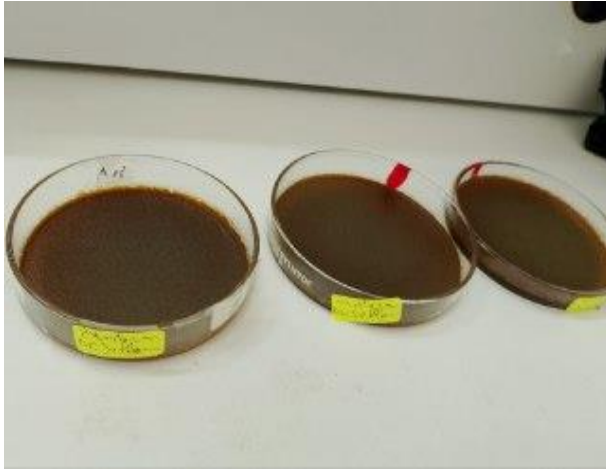
filtration sous vide.



Recueil du filtrat.

Annexe IV : Évaporation d'extrait par rotavapor.

Annexe V: Devisé l'extrait final sur des boites en verre (7 boites en verre) et incubé dans l'étuve pour le séchage à 40°C.

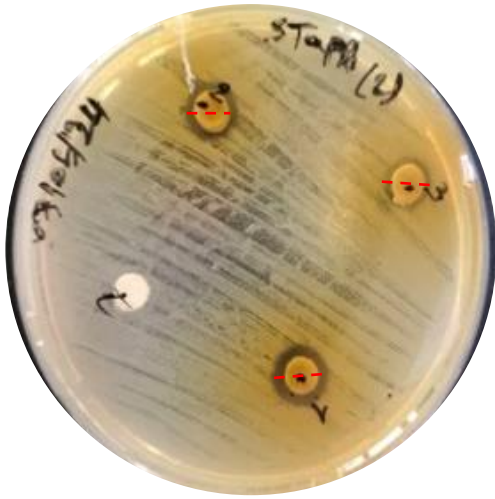
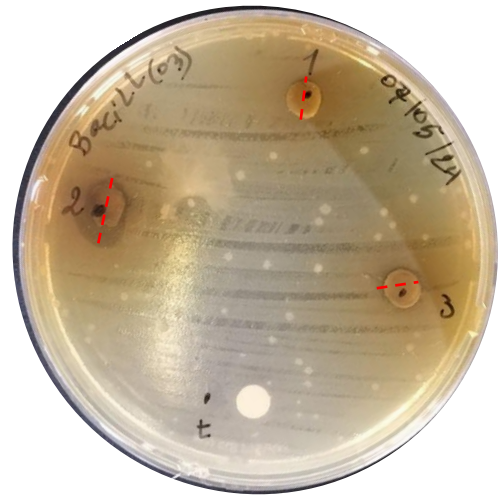
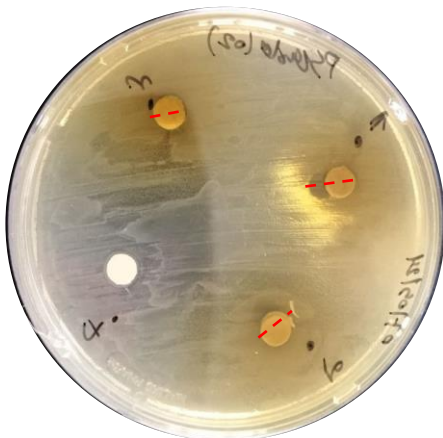
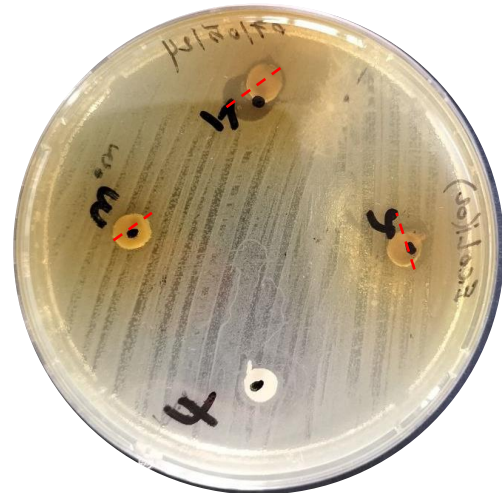


l'extrait sèche dans les boites en ver.



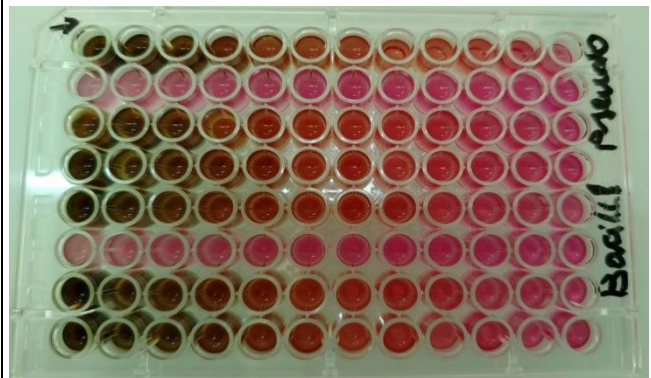
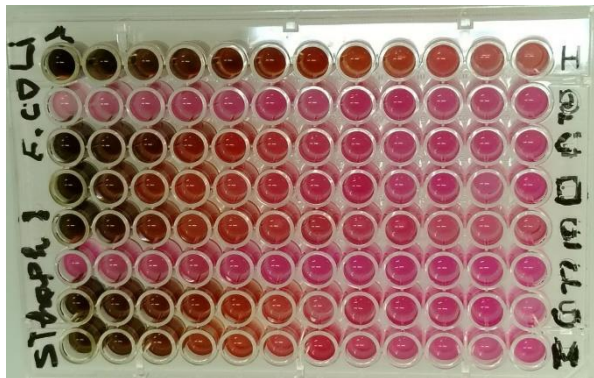
extrait brut après le grattage.

Annexe VI : Activité antibactérienne (Zones d'inhibition)

*S. aureus**B. ceureus**P. aeruginosa**E. coli*

Zones d'inhibition de l'EHM au , *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. ceureus*, *S. aureus*
(C = 1000 mg/ml).

Annexe VII : Les résultats de la CMI



Extraite hydrométhanolique

ملخص

الهدف من عملنا هو تقييم النشاط المضاد للميكروبات للمستخلص الميثانولي المائي من نبات الفيجل ، وهو نبات يستخدم تقليدياً في الجزائر. أولاً، قمنا بقياس مردود المستخلص الميثانولي المائي، وتم تقييم المحتوى الكلي متعدد الفينول و الفلافونويد في المستخلص. $(9.72 \pm 0.68\mu\text{gEQ}/\text{mg})$ والفلافونويدات $(108.60 \pm 11.34\mu\text{gEAG}/\text{mg})$ كان المستخلص الميثانولي المائي غنياً بمتعدد الفينول الكلي تم تقييم التأثير المضاد للبكتيريا للمستخلص الميثانولي المائي باستخدام طريقة الانتشار القرصي .(المستخلص $0.68\mu\text{gEQ}/\text{mg}$). (المضادات الحيوية): *E. coli* – *S. aureus* – *P. aeruginosa* حيث قام مستخلص الفيجل بتثبيت نمو ثلاث سلالات بكتيرية بشكل ملحوظ بأقطار تثبيط بلغت 11 مم و 10.67 مم و 9.67 مم على التوالي ودعمت هذه النتائج بالنتائج المتحصل *P. aeruginosa* : عليها من خلال اختبار التركيز الادنى المثبط النشاط البكتيري والتي كانت كالتالي :

E. coli= $62,5\mu\text{g}/\text{ml}$, *S. aureus* et *P. aeruginosa*= $125\mu\text{g}/\text{ml}$, et *B. cereus*= $250\mu\text{g}/\text{ml}$.

الكلمات المفتاحية : الفيجل - متعدد الفينول - فلافونويدات - مستخلص مائي كحولي - نشاط مضاد للبكتيريا

Abstract

The aim of this work is to evaluate the antimicrobial activity of the hydro-methanolic extract of *Ruta chalepensis*, a plant traditionally used in Algeria. Firstly, we measured the yield of the hydro-methanolic extract, and assessed the extract's total polyphenol and flavonoid content. The hydro-methanolic extract was rich in total polyphenols ($108.60\pm 11.34\mu\text{gEAG}/\text{mg}$) and flavonoids ($9.72\pm 0.68\mu\text{gEQ}/\text{mg}$ extract). The antibacterial effect of the hydro-methanolic extract was evaluated using the disk diffusion method (antibiogram). *Ruta chalepensis* extracts significantly inhibited the growth of three selected bacterial strains: *Escherichia coli*, *staphylococcus aureus* and *pseudomonas aeruginosa*, with inhibition zones of 11 mm, 10.67 mm and 9.67 mm respectively, while the *Bacillus cereus* strain was resistant to the extract. This result was confirmed by a MIC test on the strains tested, which gave the following values:

E. coli= $62.5\mu\text{g}/\text{ml}$, *S. aureus* and *P. aeruginosa*= $125\mu\text{g}/\text{ml}$, and *B. cereus*= $250\mu\text{g}/\text{ml}$

Key words: *Ruta chalepensis* -polyphenols- Flavonoides- Hydroalcoholic extract -Antibacterial activity

Résumé

Dans ce travail a pour l'objectif d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'extrait hydro-méthanolique de *Ruta chalepensis*, une plante a usage traditionnelle en Algérie. Dans un premier temps, nous avons mesuré le rendement de l'extrait hydro- méthanolique, la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes d'extraits a été évaluée. L'extrait hydro- méthanolique a montré une richesse en polyphénols totaux ($108.60\pm 11,34\mu\text{gEAG}/\text{mg}$), en flavonoïdes ($9,72\pm 0,68\mu\text{gEQ}/\text{mg}$ d'extrait). L'effet antibactérien de l'extrait hydro- méthanolique a été évalué par la méthode de diffusion sur les disques(antibiogramme), les extraits de *Ruta chalepensis* ont inhibé significativement la croissance de trois souches bactériennes qui sont *Escherichia coli* , *Staphylococcus aureus* et *pseudomonas aeruginosa* choisie avec des zones d'inhibition respectivement 11 mm , $10,67\text{mm}$ et $9,67$ mm par contre la souche de *Bacillus cereus* possède une résistance contre l'extrait. Cette résultats est confirmé par un teste CMI sur les souches testés qui donne les valeurs suivantes :

E. coli= $62,5\mu\text{g}/\text{ml}$, *S. aureus* et *P. aeruginosa*= $125\mu\text{g}/\text{ml}$, et *B. cereus*= $250\mu\text{g}/\text{ml}$

Mots clés : *Ruta chalepensis* -polyphenols- Flavonoides- Extraits hydroalcoolique -Activité Antibactérienne