



Université Mohamed Khider de Biskra  
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie  
Département des sciences de la nature et de la vie

Référence ..... / .....

## MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie  
Filière : Sciences biologiques  
Spécialité : Microbiologie Fondamentale et Appliquée

---

Présenté et soutenu par :

**CHERGUI Samiha**

Le :mercredi 27 juin 2018

# Évaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits de la plante *pergularia tomentosa* L

---

### Jury:

Mme. <b>CHOUIA Amel</b>	<b>MAA</b>	Université de BISKRA	Président
Mme. <b>SAIDI Asma</b>	<b>MAA</b>	Université de BISKRA	Rapporteur
Dr. <b>REDOUANE SALAH Sara</b>	<b>MCB</b>	Université de BISKRA	Examineur

Année universitaire :2017 - 2018

## *Remerciements*

*Je remercie Allah, mon Dieu le tout puissant pour le courage qu'il m'adonné pour pouvoir accomplir ce travail.*

*Je remercie le Mdm : Saidi Asma, son précieux conseil et son aide durant toute la période du travail.*

*Nos remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail.*

*Ma gratitude va également à mon camarade le professeur Ben nadjai Hamza qui ma beaucoup aidé par ses conseils judicieux tout au long de la période de préparation de mon travail de recherche je voudrais le remercier également pour l'attention avec laquelle il a suivi mon projet et pour ces encouragements.*

*J'adresse mes remerciements à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ma formation et à mon encadrement surtout le professeur monsieur Daradji yasine et Madame l'ingénieure Mofida.*

*Enfin, nous tenons également à remercier (Hayet, hanan, Riad, Youcef).*

*Recevez mes remerciements les plus chaleureux,*

## *Dédicace*

*Je remercie Dieu qui ma donné la volonté d'étudier et qui ma aider à élaboré ce travail.*

*Je dédie ce mémoire*

*A ma chère mère "Nouara, la femme qui a sacrifiée sa vie pour la notre.*

*A lame de mon cher père "Abderahman", qui me conduit à la succès.*

*A mon chère grand père si Lakhidar , qui a sert me donne l'espoir et le courage  
nécessaire pendant monLong trajet et étude.*

*A mes très chères frères : Amar, Abdeallah, Jamai, Chafik*

*A ma très chère sœurs: Houria*

*A toutes mes amies : Asma, Basma, Aicha, Rafika, lamia, fido*

*A ceux qui aiment "SAMIRA" vraiment.*

# Table des matières

## Liste des Tableaux

## Liste des Figures

## Liste des abréviations

<b>Introduction générale</b> .....	1
<b>Chapitre 01 : Infections et activité antimicrobienne</b> .....	2
<b>1.1. Infections microbiennes</b> .....	2
1.1.1. Agents chimio thérapeutiques.....	2
1.2. Antibiotiques ATBs et agents antifongiques .....	3
1.2.1. Antibiotique ATBs.....	3
1.2.2. Substances antifongiques .....	3
1.2.3. Mécanismes de résistance des microbes .....	4
<b>Chapitre 02 : généralité sur la plante</b> .....	5
<b>2.1. Généralités sur de la plante <i>Pergularia tomentosa</i></b> .....	5
<b>2.2. Description botanique de <i>Pergularia tomentosa</i></b> .....	5
<b>2.3. Classification systématique</b> .....	6
<b>2.4. Composition chimique du <i>P.tomentosa</i></b> .....	7
<b>2.5. Usage traditionnels du <i>P. tomentosa</i></b> .....	7
<b>2.6. Activités biologiques et thérapeutiques du <i>P. tomentosa</i></b> .....	8
<b>Chapitre 03 : métabolites secondaire</b> .....	9
<b>3.1. Généralités sur les métabolites secondaires</b> .....	9
<b>3.2 Métabolites secondaires à activité antimicrobienne</b> .....	9
<b>Chapitre 04 : Matériel et méthode</b> .....	12
<b>4.1. Matériel biologique</b> .....	12
4.1.1. Matériel végétal .....	12
4.1.2. Souches microbiennes testées .....	12
4.1.3. Produits chimiques.....	13
<b>4.2. Méthodes</b> .....	13
4.2.1. Extraction Aqueuse .....	13
4.2.2. Extraction hydro-alcoolique.....	14
4.2.3. Extraction par l'acétate d'éthyle et par l'acétone .....	14
4.2.4. Screening phytochimique des extraits de <i>Pergularia tomentosa</i> .....	15
4.2.4.1. caractérisation des polyphénols.....	15

---

4.2.4.2. Caractérisation des flavonoïdes (Test de Shibata ou Shinoda test).....	15
4.2.4.3. Caractérisation des tanins (Test au FeCl <sub>3</sub> ) .....	15
4.2.4.4. Identification des quinones libres.....	16
4.2.4.5. Caractérisation des saponosides (Frothing test).....	16
4.2.4.6. Caractérisation des stérols et polyterpènes (Lieberman-Burchard's test).....	16
4.2.5. Evaluation des activités antimicrobiennes du <i>P. tomentosa</i> .....	17
4.2.5.1. Repiquage et identification des souches testées .....	17
4.2.5.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits du <i>P. tomentosa</i> .....	18
4.2.5.3. Détermination de CMI .....	19
4.2.5.4. Evaluation de l'activité antifongique des extraits du <i>P. tomentosa</i> .....	19
<b>Chapitre 05 : Résultat et discussion</b> .....	<b>21</b>
5.1. Extraction .....	21
5.2. Criblage phyto-chimique de différents extraits du <i>P. tomentosa</i> .....	21
5.3. Evaluation d'activités antimicrobiennes des extraits du <i>P. tomentosa</i> .....	24
5.3.1. Identification des souches testées .....	24
5.3.2. Activité antibactérienne et Détermination de CMI.....	25
5.3.3. Evaluation de l'activité antifongique des extraits de <i>P. tomentosa</i> .....	31
<b>Conclusion</b> .....	<b>34</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>35</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>43</b>
<b>Résumés</b> .....	<b>45</b>

---

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1:</b> infections bactériennes et leurs agents causals.....	2
<b>Tableau 2:</b> Mode d'action et les secondaires des antibiotiques.....	3
<b>Tableau 3:</b> Classification des antifongiques et leurs modes d'action selon la cible.....	4
<b>Tableau 4:</b> Caractères des organes de <i>P. tomentosa</i> .....	6
<b>Tableau 5:</b> Utilisation traditionnelles du <i>Pergularia tomentosa</i> .....	7
<b>Tableau 6:</b> les caractéristiques des souches bactériennes utilisé.....	12
<b>Tableau 7:</b> Screening des métabolites secondaires contenant dans les extraits de l'espèce de <i>P. tomentosa</i> .....	22
<b>Tableau 8:</b> Concentrations minimales inhibitrices enregistrées par les différents extraits du <i>P. tomentosa</i> contre les souches testées.....	29
<b>Tableau 9:</b> Antibiogramme vis-à-vis les germes testés (m±SD).....	29

## Liste des Figures

<b>Figure 1:</b> Photographie du <i>Pergularia tomentosa</i> .....	5
<b>Figure 2:</b> Plan d'extraction aqueuse de la partie aérienne du <i>P. tomentosa</i> .....	13
<b>Figure 3:</b> Plan d'extraction méthanolique de la partie aérienne du <i>P. tomentosa</i> .....	14
<b>Figure 4:</b> Microplaque remplie des uspension $2 \times 10^6$ spores/ml <i>Penicillium spp</i> et des différents extraits du <i>P.tomentosa</i> .....	20
<b>Figure 5:</b> Représentation photographique des Résultats du screening phytochimique qualitatif sur les différents extraits du <i>P. tomentosa</i> . Caractérisation de polyphénols (A),Flavonoïde (B), Tanin catéchique (C),Tanin galique (D).....	23
<b>Figure 6 :</b> Tests biochimiques d'identification de la souche <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	24
<b>Figure 7:</b> Teste catalase (A) et coloration de gram (B) de la souche <i>S. aureus</i> .....	24
<b>Figure 8:</b> Zone d'inhibition de la croissance bactérienne induites par l'extrait EAcE et EAQ de La plante <i>P. tomentosa</i> ( $m \pm SD$ ).....	25
<b>Figure 9:</b> Zone d'inhibition de la croissance bactérienne induites par l'extrait EAc et EMet de La plante <i>P. tomentosa</i> ( $m \pm SD$ ).....	26
<b>Figure 10:</b> Effet des ATBs de <i>P. tomentosa</i> sur <i>K. pneumonia</i> , <i>E.coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P.aeruginosa</i> .....	28
<b>Figure 11:</b> l'activité antifongique de trois extraits de <i>P. tomentosa</i> sur les souches <i>Alternaria</i> et <i>Aspergillus</i> ( $m \pm SD$ ).....	31
<b>Figure 12:</b> Activité antifongique des trois extraits de <i>P. tomentosa</i> sur la souche <i>Penicillium</i> ( $m \pm SD$ ).....	32

## Liste des abréviations

**ATBs** : Antibiotique

**EAQ** : Extrait Aqueux

**EMet** : Extrait méthanolique

**EAcE** : Extrait d'éthyle acétate

**EAc** : Extrait acétonique

**PDA** : Potato dextrose Agar

**PDB** : Potato dextrose broth

**CMI** : Concentration minimal inhibitrice

**CMF** : Concentration minimal fongicide

**ATCC** : American Type Culture Collection

**CIT** : Citrate

**VP** : voges proskaver

**GEL** : Gélatinase

**ADH** : Arginine dihydrolase

**LDC** : Lysine décarboxylase

**ODC** : Ornithine décarboxylase

**URE** : Uréase

**CN** : Gentamicine

**AML** : Amoxicilline

**SXT** : Co-trimoxazole

**C** : Chloramphénicol

**CZ** : Céfazoline

**TCC** : Ticarcilline



**ANOVA:** Analyse de la variance

# **Introduction**

## Introduction

La résistance de certaines souches bactériennes aux ATB est devenue une préoccupation majeure dans le domaine de la santé. Ce phénomène a engendré une perte d'efficacité de l'antibiothérapie. La découverte de nouveaux agents antibactériens, est devenue donc plus qu'indispensable.

Depuis des siècles, nos ancêtres avaient l'habitude d'utiliser les plantes comme remède ou médicament pour plusieurs maladies sans vraiment savoir pourquoi ou comment. Et avec le temps les pharmacologistes ont développés de multiples recherches afin de découvrir la partie active responsable de l'effet thérapeutique et pour essayer d'amplifier et contrôler cet effet.

Actuellement les plantes médicinales possèdent un atout considérable et jouissent d'une popularité grâce à la découverte progressive de leurs propriétés médicinales antibactériennes, anti\_inflammatoires, antifongiques et antioxydantes.

Les pistes de recherche de substances naturelles à activité antibactérienne sont nombreuses, parmi les quelles l'association des extraits avec les antibiotiques pourrait être très prometteuse.

Parmi les plantes les plus répandues dans le Sahara algérien l'espèce *pergularia tomentosa* (ghellaka), les chercheurs ont mis en évidence ses effets bénéfiques anti microbiens et anti fongiques.

Le présent travail s'inscrit dans le cadre d'évaluer les activités antimicrobiennes de différents extraits de la partie aérienne de la plante *P. tomentosa*.

Dans ce contexte, nous avons fixé les objectifs suivants :

- Criblage phytochimique des polyphénols et des flavonoïdes dans les quatre extraits de *Pergularia tomentosa* : aqueux, méthanolique, d'acétate d'éthyle et acétonique.
- Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique de ces extraits.

Le premier chapitre est une mise au point bibliographique basée sur l'infection et l'activité antimicrobienne. Le deuxième chapitre décrit la généralité sur la plante étudiée *pergularia tomentosa*. Le troisième chapitre parle des métabolites secondaires. Le quatrième

chapitre décrit la méthodologie adoptée. Le cinquième chapitre consiste à une analyse des résultats obtenus et leur discussion.

**Partie**  
**bibliographie**

# **Chapitre 1**

## **Infections et activité antimicrobienne**

### 1.1. Infections microbiennes

Les infections microbiennes sont des inflammations et des dommages tissulaires causées par les bactéries pathogènes, virus, parasites ou champignons (Page *et al.*, 1999). En effet, tous les micro-organismes n'ont pas les mêmes capacités à provoquer des infections microbiennes, où certains étant pratiquement toujours associés à des manifestations cliniques ou maladies (Tab.1) alors que d'autres ne provoquent qu'exceptionnellement des maladies (Petignat *et al.*, 2006).

**Tableau 5:** infections bactériennes et leurs agents causals.

Nom d'agent causal	Infection (s)	références
<i>Staphylococcus aureus</i>	Septicemia, infection de plaies	Cronberg <i>et al.</i> (1988)
	Arthrite infection osseuse; Ostéomyélite	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculose	Petingnat <i>et al.</i> (2006)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pneumonie infections nosocomiales	Delmas, (2007)
<i>Pneumocoque Haemophilus</i>	Sinusite-Otites, Pneumopathie	
<i>Escherichia coli</i>	Pneumonie , infection urinaire	Flandrois <i>et al.</i> (1997)
<i>Klebsiella,</i> <i>Enterobacter,</i> <i>Citrobacter, Proteus</i>	Méningite	Schachter <i>et al.</i> (1999)
	méningées et septicémiques	

#### 1.1.1. Agents chimio thérapeutiques

Les agents chimiothérapeutiques tuent les micro-organismes pathogènes en inhibant leur développement à des concentrations suffisamment faibles pour éviter d'occasionner des dommages chez l'hôte. La plupart de ces agents sont des antibiotiques (du grec anti, contre et bios, la vie), des produits microbiens ou leurs dérivés, capables également de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance (Prescott *et al.*, 2007).

## 1.2. Antibiotiques ATBs et agents antifongiques

### 1.2.1. Antibiotique ATBs

Les antibiotiques (Tab.2) sont des substances semi-synthétiques naturellement élaborées par des microorganismes ou chimiquement synthétisées en entier (Bousseboua, 2002). En effet, ces substances possèdent le pouvoir d'inhiber la croissance et la multiplication d'un microorganisme, dit effet bactériostatique ou de détruire ce dernier en exerçant un effet bactéricide (Boulahbal, 2002 ; Vanbambek et Tulkens, 2009).

**Tableau 6:** Mode d'action et les secondaires des antibiotiques (Prescott *et al.*, 2010).

<b>Antibiotique</b>	<b>Mécanisme d'action</b>	<b>Effets secondaires</b>
<b>Pénicilline</b>	Inhibe la synthèse de la paroi bactérienne Active les enzymes lytiques de la paroi.	Réactions allergiques, diarrhée, anémie, nausée, toxicité rénal.
<b>Sulfamide</b>	Inhibe la synthèse de l'acide folique compétition avec l'acide p- amino benzoïque.	Nausée, vomissement et diarrhée.
<b>Vancomycine</b>	Inhibe la transpeptidation.	Réactions allergiques.
<b>Aminoglycoside</b>	Inhibe la synthèse protéique et provoque des erreurs de lecture de l'ARNm.	Perte d'équilibre, réaction allergiques, lésion rénal.
<b>Macrolide</b>	Inhibe l'élongation de la chaîne péptide.	Dérangement intestinal, lésion hépatique, anémie
<b>Rifampine</b>	Inhibe la synthèse des ARN en agissant sur l'ARN polymérase.	Nausée, vomissement, diarrhée, fatigue, somnolence.
<b>Polymyxine B</b>	Perturbe la structure et perméabilité de la membrane cytoplasmique.	Lésion rénal grave, somnolence, vertige.
<b>Dapsone</b>	Interférerait avec la synthèse de l'acide folique.	Douleurs au dose, décoloration des ongles, fièvre.

### 1.2.2. Substances antifongiques

Les agents antifongiques sont utilisés dans différents domaines principalement en thérapeutique humaine et vétérinaire (les antifongiques systémiques ou topiques), dans l'industrie alimentaire (les conservateurs) et en alimentation animale, pour la prévention et le traitement des atteintes fongiques chez les plantes, du bois de construction ou d'autres matériaux; En effet, les antifongiques d'origine microbiologique (Tab.3) utilisés actuellement en clinique sont essentiellement de structure polyénique, notamment l'amphotéricine B et la nystatine (Bastide *et al.*, 1986).



On outre, la recherche permanente affirme qu'il ya quatre classes de molécules synthétiques, ciblant trois voies métaboliques distinctes, sont utilisées aujourd'hui en clinique : les fluoropyrimidines, les polyènes, les dérivés azolés et les échinocandines (Vandeputte, 2008).

**Tableau 7:** Classification des antifongiques et leurs modes d'action selon la cible (Geursen et al., 2008).

Structure	Mode d'action	Exemples
<b>Polyènes (macrolides cycliques)</b>	Rupture de la membrane	Polybutadiène
<b>Azolés (divisés d'imidazoles)</b>	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol	Imidazoles, ketonazole, Triazoles, fluconazoles
<b>Allylamines</b>	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol	Terbinafine, butenafine
<b>Pyradone</b>	Rupture de la membrane et de la paroi	Ciclipiroxolamine
<b>Echinocandine naturel</b>	Inhibition de la synthèse du glucane	Casposfungine, Anidulafungine
<b>Autres</b>	Anti-mitotique, rupture du fuseau cellulaire	Griséofulvine

### 1.2.3. Mécanismes de résistance des microbes

L'exemple le plus connu de résistance est l'hydrolyse du noyau  $\beta$ -lactame de nombreuses pénicillines (Prescott *et al.*, 2007), par la souche *Staphylococcus aureus* qui produit la pénicillinase, une enzyme qui détruit la molécule de pénicilline (Perry *et al.*, 2002). Cependant, L'antibiotique rentre dans la bactérie, mais avant qu'il puisse se fixer sur sa cible, il est pris en charge par des protéines membranaires et une protéine périplasmique chargée d'assurer la liaison entre les précédentes, entraînant son excrétion vers l'extérieur de la bactérie (ex : *Pseudomonas aeruginosa*) (Gaudy *et al.*, 2005).

On outre, une accumulation graduelle de mutations sur l'ADN chromosomique peut rendre les structures cellulaires inaptées à la fixation de l'antibiotique ou d'un autre composé chimique (Perry *et al.*, 2002).

**Chapitre 2**  
**Généralité sur la plante**  
***Pergularia tomentosa* L.**

### 2.1. Généralités sur de la plante *Pergularia tomentosa*

La famille de l'asclépiade (Asclépiadacée) comporte environ 200 genres et 2500 espèces, essentielles herbacées ou buissonnantes propres aux régions tempérées et subtropicales (François, 2008). Cette famille est connue par sa richesse en métabolite secondaire, notamment les genres : *Asclépias*, *Pergularia*, *Gomphocarpus* et *Calotropis* (Gohar et al., 2000). le *Pergularia tomentosa* est une plante vivace des pays secs, elle pousse sur les sols dans les déserts Généralement sableux et couvre de vastes régions allant du sud Algérien jusqu'en Afrique du Nord. Elle fleurit en printemps (Neuwinger, 1994).




### 2.2. Description botanique de *Pergularia tomentosa*

Le *Pergularia tomentosa* c'est une plante herbacée ou semi-ligneuse, arbrisseau vivace pouvant dépasser 1 m d'hauteur (Fig.1), Cet arbrisseau vivace peut dépasser 1m d'hauteur. Les jeunes rameaux volubiles de cette plante s'enroulent fréquemment autour les plus anciens lui donnant un aspect touffu (Ozenda, 2004). Les caractères botaniques de déférents organes de *P. tomentosa* sont figurés dans (Tab.4).



**Figure 1:** Photographie du *Pergularia tomentosa* (originale).

**Tableau 8:** Caractères des organes de *P. tomentosa* (Schmelzer et Gurie-Fakim, 2013).

Organe	Caractères
 <p data-bbox="347 555 453 584">Feuilles</p>	<p data-bbox="624 398 1254 539">Ovoïdes cordéin florescences corymbiformes (encœurà la base) longuement pédonculées, 5 cm de diamètre.</p>
 <p data-bbox="357 913 443 943">Fleurs</p>	<p data-bbox="624 757 1394 898">Blanche pourpres et ordoriférantes avec une corolle tubulaire vert jaunâtres ou violet brunâtre, 8 mm de longueur.</p>
 <p data-bbox="357 1216 443 1245">Fruits</p>	<p data-bbox="624 1037 1394 1178">Follicules groupés par paire, fusiformes, divergents et couverts derugosité, pubescents et crochus à leurs somme et 7 cm delong et contiennent des graines.</p>

### 2.3. Classification systématique

Systimatiqument, le *P. tomentosa* est classifiée comme une plante appartient à

**Embranchement:** Spermaphytes

**Sous Embranchement:** Angiospermes

**Classe:** Dicotylédones

**Sous classe:** Rosidae

**Ordre:** Gentianales

**Famille:** Asclepiadaceae

**Genre:** *Pergularia*

**Espèce:** *Pergularia tomentosa* L (Ozenda, 1991).

#### 2.4. Composition chimique du *P.tomentosa*

L'étude phytochimique effectuée par Hassan *et al*, (2007) sur le *P. tomentosa* a affirmé sa richesse en métabolites secondaires, essentiellement, les polyphénols en particulier les flavonoïdes, les tanins, les glycosides cardiaques et les glycosides cyanogènes et aussi des saponines. D'autre étude a indiqué que presque toutes les parties de cette la plante même ses racines sont riches en hétérosides cardénolides, avec l'uzariénine, et le ghalakinoside, la pergularine, et la calactine (Hifnawy *et al.*, 2014).

Cependant, Les extraits de tiges du *P. daemia* et du *P. tomentosa* d'autre espèces appartenants au meme genres, semblent tavoir les mêmes flavanols glycosides dans leur composition, y compris les kaempférol, et malonylhexosides de quercétine, kaempférol et Isorhamnetin (Heneidak *et al.*, 2006).

Par ailleurs, La composition minérale de la plante *P. tomentosa* montre une grande quantité de phosphore et de potassium dans la racine et la tige. Des teneurs importantes de sodium, de magnésium et de calcium sont relevées dans les extraits des feuilles (Sheded *et al.*, 2006).

#### 2.5. Usage traditionnels du *P. tomentosa*

**Tableau 5 :** Utilisation traditionnelles du *Pergularia tomentosa*.

Régions	Partie utilisée	mode d'utilisation	Usages	Références
Désert du nord de l'Algérie	Feuilles et fleurs	Décoction	Angine, teigne, dermatose	Ould el hadj <i>et al.</i> (2003)
	Partie aérienne	Décoction	Hypoglycémie	Kemssi <i>et al.</i> (2014)
Tassili	Racine	Usage interne	Bronchite Constipation	Hammiche et Maiza. (2006)
	Feuilles et fleurs	Décoction et usage interne	Helminthiases Abortive	
		Décoction usage externe	Maladies de la peau	
Côte d'Ivoire	feuille	Jus	Les maux de tête.	

## 2.6. Activités biologiques et thérapeutiques du *P. tomentosa*

Les extraits aqueux et à plusieurs solvants organiques des feuilles, des tiges et des racines de la plante *P. tomentosa* semblent avoir une activité antifongique importante contre une série des champignons pathogènes, en particulier, son activité protectrice démontrée par les études qu'ont été menées par Bekheet *et al.* (2011) sur des organes chez le crapaud *Bufo regularis* infecté par cette souche fongique. En plus, les travaux effectués par Hussein *et al.* (1999) ont montré que les deux cardénolides extraites à partir du *P. tomentosa* présentent une activité molluscicide. Cependant, les alcaloïdes extraits de la partie aérienne du *P. tomentosa* peuvent exercer un effet larvicide considérable avec un taux de mortalité dose-dépendante contre les larves de criquets (Acheuk et Doumandji, 2013).

La teneur du *P. tomentosa* en tanins, flavonoïdes, alcaloïdes et les saponines, glycosides, saponinglycosides, cardiacglycosides, anthraquinones et stéroïdes peut être responsable de l'activité anti dermatophytique que présente cette plante contre la plupart des dermatophytes testés dans l'étude de Shinkafi (2013).

Par ailleurs, l'inhibition de la croissance de souches cancéreuses par les glycosides cardénolides isolée des racines de *P. tomentosa* a été prouvée *in vitro* (Piacente *et al.*, 2009).

# **Chapitre 3**

## **Métabolites secondaires**

### 3.1. Généralités sur les métabolites secondaires

Les plantes médicinales sont utilisées traditionnellement pour leurs vertus thérapeutiques. Cela signifie qu'au moins l'une de ses parties (feuille, tige, racine) peut être employée dans le but de soigner divers maux. En effet, les organes de végétaux sont très riches en métabolites secondaires naturels contribuent aux plantes leurs activités biologiques (Macheix *et al.*, 2005). ils appartiennent aux grande catégories de composés chimiques à base de plantes qui sont les acides phénoliques, les flavonoides, les tanins, les huiles essentielles et les terpènes, les alcaloides et les saponines. Ces composés phénoliques forment alors une grande famille de polyphénolsqui sont très divers,de plus de 8000 composés connus, depuis les simples acides phénoliques jusqu'aux grands polymères complexes par exemple les tanins, lignines (Hopkins, 2003). Ils ont tous en commun un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles dans leurs structures (Pascale et Veronique, 2006).

Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs, en exerçant des effets antimicrobienne, antioxydant, anti-inflammatoire (Macheix *et al.*, 2005).

Ce métabolisme, en très faibles quantités, ne paraissent pas essentielles à la vie de la plante mais, ils participent fréquemment aux mécanismes de défense les végétaux contre les microorganismes pathogènes. Ces produits, à structure chimique souvent complexe, sont très déversés en fonction d'espèces (Raven, 2003).

### 3.2. Métabolites secondaires à activité antimicrobienne

Les composés, appartenant aux acides phénoliques, les plus représentatifs de ces effets sont les acides cinnamiques et caféïques. On les retrouve présents dans le thym et la téragone. Ces composés sont particulièrement efficaces contre de nombreuses souches de bactéries, de champignons et de virus (Cheng *et al.*, 2008). Tandis que, la capacité des tanins à créer des complexes avec les protéines par des liaisons hydrogènes, des liaisons hydrophobes ou des liaisons covalentes, leur permet alors de désactiver les adhésions microbiennes, enzymatiques et les enveloppes cellulaires transportant les protéines des microorganismes (Cowan, 1999).

Une étude réalisée par Xia *et al.* (2011) a montré que certaines plantes médicinales ont une capacité intrinsèque à synthétiser des métabolites secondaires dont certains sont des composés aromatiques de types phénols. Ces composés jouent un rôle de protection des plantes contre les invasions microbiennes, et présentent d'autres mécanismes d'action de lutte



contre les champignons, les bactéries et les virus. En effet, Il a été reporté que les raisins *Vitisvinifera* possèdent des propriétés pharmacologiques importantes, en particulier des activités antimicrobiennes grâce à la présence de nombreux polyphénols, notamment d'acide gallique, d'acide hydroxycinnamique, de flavanols, et de tanins (Nassiri et Hosseinzadeh, 2009).

Les composés phénoliques possèdent un large spectre d'activités biologiques parmi ces composés les flavonoïdes. En effet, une flavone et une flavanone, isolés des fruits de *Terminalia Bellerica* et de l'arbuste *Esyenhardtia texana* respectivement semblent avoir une activité contre le microbe pathogène opportuniste *Candida albicans* (Wächter *et al.*, 1999). Les flavonoïdes, au sens strict sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Gu, 1996). Martini (2011) a reporté que certains flavonoïdes peuvent inhiber la synthèse des prostaglandines. Cette action leur confère une activité anti-inflammatoire, ils seront donc particulièrement appréciés pour une action préventive contre le vieillissement de la peau. Cependant, les tanins provoquent une réaction générale avec toutes les protéines (Miller et Ricklefs, 2005).

On outre, les alcaloïdes sont des substances basiques azotées, et douées à faible dose de propriétés physiologiques marquées (Zenk et Juenger, 2007). De nombreuses recherches ont d'ailleurs affirmées l'intérêt des alcaloïdes dans l'activité antiplasmodique, antispasmodique, anticancérale, antimycobactériale. Leurs effets laxatif et anti- rhumatismal, antalgique et analgésique ont aussi été révélés (Santhosh et suriyannarayanan, 2014).

Les huiles essentielles sont des mélanges de composés aromatiques des plantes, qui sont extraites par distillation par la vapeur ou des solvants (Smallfield, 2001). Un grand nombre d'entre eux possède des propriétés antiseptiques (klaas *et al.*, 2002).

L'activité antimicrobiens d'une l'HE est liée à sa composition chimique aux groupes fonctionnels des composés majoritaires. Les composés possédant la plus grand efficacité antimicrobiens et le plus large spectre sont des phénylpropanes (le thymol, le carvacrol et l'eugénol) et des mono terpéniques (Zhiri, 2006 ; Dadasoglu *et al.*, 2011).

Généralement les composés phénoliques, utilisés contre les bactéries et les fongiques, sont appelés les composés antibactériens et antifongiques comme les acides phénols tels que les cinnamiques et les benzoïques (Hopkins, 2003). Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tanins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis de certains microorganismes.

En effet, leurs mécanismes de toxicité peuvent être liés à l'inhibition des enzymes hydrolytiques comme les protéases et les carbohydrases ou à l'inactivation des adhésions microbiennes, des protéines du transport et celles de l'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

# **Partie Expérimentale**

# **Chapitre 4**

## **Matériel et méthodes**

## 4.1. Matériel biologique

### 4.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal comprend la partie aérienne (tige, feuilles, et fleurs) de la plante *Pergularia tomentosa*, récoltées de la région de Lichana (la wilaya de Biskra), en Novembre 2018 au stade pleine floraison.

Après nettoyage des impuretés, la matière végétale est séchée à température ambiante et à l'abri de la lumière du soleil dans un endroit sec et aéré, pendant une semaine. La partie aérienne a été broyée avec un mixeur manuelle et conservée dans des sacs foliacés jusqu'à son utilisation.

### 4.1.2. Souches microbiennes testées

Les souches testées au cours de cette étude sont des souches à l'origine de plusieurs infection (urinaire, nosocomial...etc.). Elles proviennent du laboratoire de microbiologie Elhakim saadan, et sont conservées à 4°C dans des boites de Pétri contenant le milieu solide nutritive jusqu'à l'utilisation. Cependant, les souches fongiques utilisées sont: *Cladosporium spp*, *Alternaria spp*, et *Penicillium spp* (isolées à partir des aliments de vaches), *Aspergillus spp* (isolées à partir du sol) isolée par les étudiants encadrés par docture REDOUANE SALAH Sara (Promotion 2017/2018).

**Tableau 6:** les caractéristiques des souches bactériennes utilisé.

Espèce microbienne	Caractéristiques	Références
<i>Escherichia coli</i>	Bacille a Gram positif	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacille à Gram négatif	ATCC 27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocci à Gram positif	ATCC 25923
<i>Klabsiella pneumonie</i>	Capsulés à Gram négatif	Souche inconnu

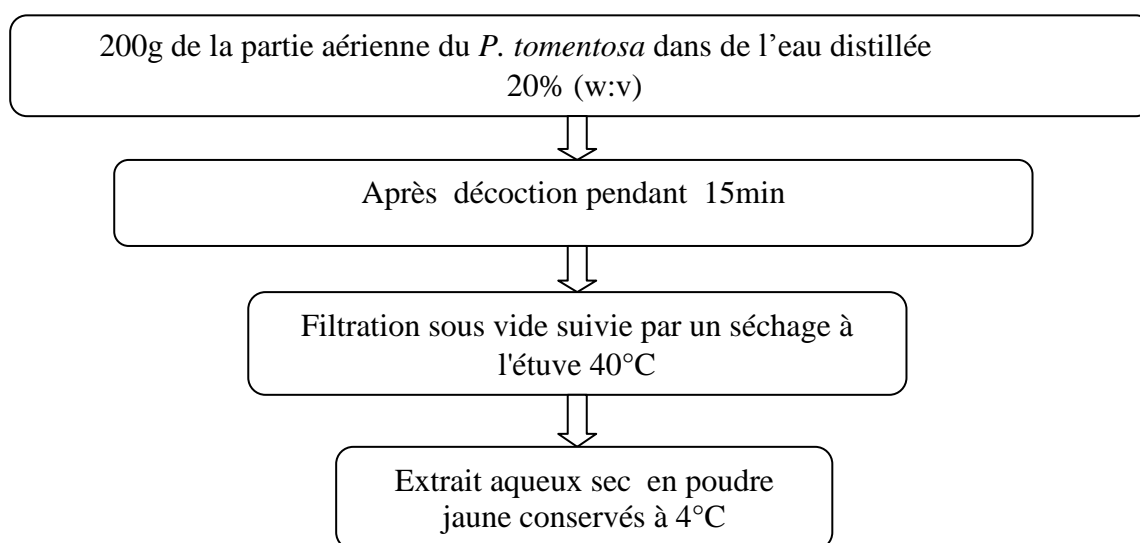
### 4.1.3. Produits chimiques

Les réactifs et les solvants utilisés dans le présent travail sont : Ethyle Acétate, Acétone, Méthanol, Diméthylesulfoxyde (DMSO), Éther de pétrol, Galerie Api20 E, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Hcl, FeCl<sub>3</sub>, Formaldéhyde, Bouillan nutritife, les milieux culture utilisés sont: gélose Mac conkey, chapman, Muller Hinton (MH), PDA, PDB. Cependant le teste d'antibiogramme implique les antibiotiques: Gentamicine (CN), l'amoxicilline (AML), co-trimoxazole (SXT), chloramphénicol (C) , Céfazoline (CZ), Ticarcilline (TCC).

## 4.2. Méthodes

### 4.2.1. Extraction Aqueuse

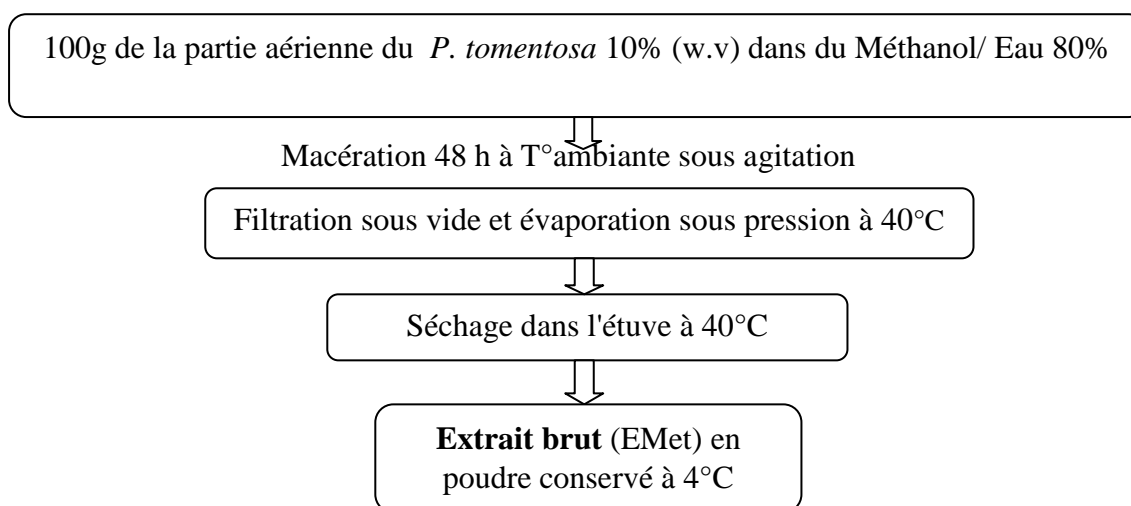
L'extrait aqueux de *P.tomentosa* (EAQ) a été obtenu par une décoction pendant 15 min de 200g du broyat de la partie aérienne de la plante (tiges et feuilles et fleures) dans d'eau distillée, la procédure a été effectuée selon la méthode décrite par Thenmozhi (2011), comme elle montre la figure 2.



**Figure 2:** Plan d'extraction aqueuse de la partie aérienne du *P. tomentosa* (Thenmozhi, 2011).

### 4.2.2. Extraction hydro-alcoolique

L'extrait *P.tomentosa* (EMet) a été préparé à partir de broyat des tiges, des feuilles et fleurs qui ont été mis en macération dans du système méthanol 80 % selon la méthode de Bekheet *et al.* (2011) à la température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 48h, avec un maximum d'agitation (Figure 3 ). Après filtration, le filtrat a subi une évaporation à l'aide d'un évaporateur rotatif (Heidolph, Germany).



**Figure 3:** Plan d'extraction méthanolique de la partie aérienne du *P. tomentosa* (Bekheet *et al.*, 2011).

### 4.2.3. Extraction par l'acétate d'éthyle et par l'acétone

La même méthode d'extraction de celle de l'extrait méthanolique est appliquée sur la partie aérienne du *P. tomentosa* (EAcE), en remplaçant à chaque fois le système hydro-alcoolique par l'acétate d'éthyle ou l'acétone. La macérat est ensuite filtré, et le filtrat a subi l'évaporation suivie par la décantation, en ajoutant l'éther de pétrole afin d'éliminer des la matière lipidiques indésirables (Senthilkumar *et al.*, 2005). Lorsque la matière grasse est éliminée, l'extrait a soumis l'évaporation sous pression à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (Heidolph, Germany) et il a été ensuite séché dans l'étuve à 40°C pour récupérer en fin un extrait en pâte verdâtre. L'extrait est ensuite conservé à 4°C.

Le rendement d'extraction après chaque procédure est calculé selon la formule suivant:

$$\text{RDT}\% = \left[ \frac{\text{masse de résidu extrait obtenu (Mf)}}{\text{masse de la matière végétale (Mi)}} \right] \times 100$$

**RDT:** rendement (%)

**Mf :** la masse en g d'extrait obtenue après le séchage

**Mi :** la masse en g de matière végétale à extraire

#### 4.2.4. Screening phytochimique des extraits de *Pergularia tomentosa*

La caractérisation des groupes chimiques bioactifs dans les différents extraits de la partie aérienne de la plante *P. tomentosa* a été effectuée par une série des réactions en tubes.

##### 4.2.4.1. caractérisation des polyphénols

Qualitativement, la présence des composés phénoliques dans les différents extraits de *P. tomentosa* a été révélée selon la méthode au trichlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) décrite par N'Guessan *et al.* (2009). Une goutte de solution méthanolique de  $\text{FeCl}_3$  à 2% a été ajoutée à 2 ml de chaque extrait (EAQ, EMet, EAcE et EAc). L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée est le signe de la présence de polyphénols.

##### 4.2.4.2. Caractérisation des flavonoïdes (Test de Shibata ou Shinoda test)

la présence des flavonoïdes dans la partie aérienne étudiée de *P. tomentosa* a été caractérisée par (Aliyu *et al.*, 2011). 0,5g de chaque extrait a été dissoute dans 1.5ml du méthanol (50%) et chauffée dans bain d'eau bouillante. Une volume de 5ml d'HCl et quelques fragments de magnésium ont été ensuite ajoutés. Après dégagement d'hydrogène par réduction des flavonoïdes aglycones en anthocyanes, une coloration rouge est observée.

##### 4.2.4.3. Caractérisation des tanins (Test au $\text{FeCl}_3$ )

Selon Dohou *et al.*, (2003), une quantité de 2 à 3 gouttes de  $\text{FeCl}_3$  (1%) a été ajoutée à 1ml de chaque extrait. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques.



Le réactif de Stiansy a été utilisé afin de différencier convenablement entre les tanins galliques et catéchiques. Pour cela, un volume de 15ml du réactif de Stiasny (10ml de formaldéhyde + 5 ml d'HCl concentré) a été additionné à chaque extrait. Le mélange est ensuite incubé au bain marie à 80°C pendant 30min. L'observation d'un précipité en gros flocons reflète la présence des tanins catéchique. Pour les tanins galliques, la solution précédente a été filtrée, le filtrat est recueilli et saturé d'acétate de sodium. L'addition de 3 gouttes de FeCl<sub>3</sub> provoque l'apparition d'une coloration bleu-noir intense, qui constitue un signe de la présence de tanins galliques (N'Guessan *et al.*, 2009).

#### **4.2.4.4. Identification des quinones libers**

Une quantité de 0.5g de chaque extrait a été additionnée à 10 ml de chloroforme. Après un agitation manuelle d'une minute et un repos de 24h, les extraits sont filtrés. Une quantité de KOH (10% ; M/v) a été ensuite ajouté à chaque extrait. Après agitation, la présence des anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse au rouge (Dohou *et al.*, 2003).

#### **4.2.4.5. Caractérisation des saponosides (Frothing test)**

La présence des saponosides a été déterminée qualitativement par l'apparition, après agitation de mousse persistante pour plus de 15 à 30 min. une quantité de 1g de chaque extrait a été solubilisée dans 10 ml l'eau distillée et la solution a été agitée vigoureusement dans le sens vertical pendant 15 à 30 sec (Dohou *et al.*, 2003 ; Aliyu *et al.*, 2011). Après 15 min, l'hauteur de mousse est mesurée. Hauteur de la mousse >1cm signifie la présence la saponoside (N'Guessan *et al.*, 2009).

#### **4.2.4.6. Caractérisation des stérols et polyterpènes (Lieberman-Burchard's test)**

Un quantité de 0.5g de extrait sont additionnes de 1ml d'anhydride acétique puis de 0.5 ml de chloroforme, après dissolution, les solution sont transférés dans des tubes à essai auxquels sont ajoutés 0.5ml d'acide sulfurique concentré. l'apparition à l'interphase d'un anneau pourpre ou violet qui indique la présence des stérols, cette couleur vive au bleu puis au vert indique la présence des tèrpenes (N'Guessan *et al.*, 2009).

#### **4.2.5. Evaluation des activités antimicrobiennes du *P. tomentosa***

##### **4.2.5.1. Repiquage et identification des souches testées**

Les souches, qui sur les quelles, la capacité antibactérienne de différents extraits du *P. tomentosa* sera évaluée, ont été identifiées à l'aide d'une série des tests biochimiques se commence par l'étapes d'isolement.

Pour obtenir des colonies pures isolées, une masse bactérienne est suspendue dans l'eau physiologie, puis l'inoculum est déposé à l'aide d'une anse de platine pour être ensemencé, en stries serrées, sur une boîte de pétri contenant un milieu de culture solidifiée et sélectif pour chaque souche bactérienne par exemple: le milieu Mac Conkey est spécifiquement utilisé pour les bactéries Gram- (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et) et Chapman pour (*Staphylococcus aureus*). Les boîtes inoculées sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h.

La transplantation d'une culture pure sur un milieu de culture neuf c'est l'indispensable de répéter la procédure d'isolement par stries au moins 2 à 3 fois sur les boîtes fraîchement préparées et la même incubation pour donner une culture pure.

Avant d'être testées, les souches bactériennes purement isolées ont été finalement identifiées à l'aide d'une série de tests biochimiques pour déterminer l'espèce bactérienne exacte, en s'appuyant sur leurs caractères biochimiques.

##### **a. Test de catalase**

Prendre une lame porte objet propre, déposer sur celle-ci une goutte d'eau oxygénée et émulsionner un peu de la colonie suspecte ou de la culture obtenue sur gélose. La lecture de résultat est immédiate.

##### **b. Coloration de Gram**

La suspension bactérienne a été préparée par l'ajout d'une colonie isolée à l'aide d'une anse de platine dans de 10ml d'eau distillée stérile, dans un tube à essais, puis une simple agitation est faite pour assurer son homogénéisation. Une goutte de chaque suspension bactérienne préparée est ensuite déposée, sur une lame bien dégraissée à la chaleur ou à l'alcool, étalée puis fixée. Sur un bac de coloration, la lame a été recouverte avec le violet de gentiane, lugol, alcool, fushine puis l'eau, où chaque colorant ou solvant est laissé réagir avec l'échantillon pendant 1min avant d'être rejeté Denis *et al.* (2004). Après séchage, l'examen microscopique est effectuée sur l'immersion (10 x 100).

### c. Galerie API

les tubes et les cupules des tests : CIT, VP et GEL ont été inoculés de suspension bactérienne. En outre, une anaérobiose a été créée dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE et H<sub>2</sub>S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine. Finalement, la boîte est refermée et mise en incubation à 37°C pendant 24h (Dellaras, 2007).

#### 4.2.5.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits du *P. tomentosa*

L'effet antibactérien de différents extraits de la partie aérienne du *P. tomentosa* a été évalué par la méthode en disques Rahal (2005), autrement dit la méthode de diffusion. Les extraits EAQ et EMeT sont préalablement solubilisés dans de l'eau distillée stérile. Par contre, l'EAc et l'EAcE sont dissous dans de DMSO, à différentes concentrations de 100, 200 et de 300mg/ml pour les extraits EAc et EAcE, (100, 300 et 450 mg/ml) pour EAQ et 100, 300, 500mg/ml pour EMeT.

Une suspension bactérienne en solution stérile d'eau physiologie équivalente au 0.5 de Mc Ferland (UFC/ml) a été préparée à partir d'une culture jeune de 24h dont la densité optique est fixée à 625nm entre 0.08 et 0.1 (Chabbert *et al.*, 2002).

Sur des boîtes de pétri contenant la gélose Mueller Hinton écouvillon né par une suspension microbienne, les disques, imprégnés de 10µl de chacun d'extraits EAQ, EMeT, EAc et EAcE aux différentes concentrations, sont ensuite déposés à la surface. Deux autres disques imprégnés avec de l'eau distillée et du DMSO sont utilisés comme témoins négatifs. Par contre, les disques d'antibiotiques de référence, prêts à l'emploi, sont utilisés comme témoins positifs. Après une incubation de 24h à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition produites par les extraits étudiés sont mesurés. Toutes les expériences sont faites en triplicata (n=3). L'activité antibactérienne est exprimée par le diamètre des halos d'inhibitions au tour des disques imprégnés d'extraits. Plus la zone d'inhibition est grande, plus l'activité antibactérienne d'extrait est importante en comparaison aux antibiotiques (Rahal, 2005).

#### 4.2.5.3. Détermination de CMI

Une gamme de concentrations décroissantes de chaque extrait de *P. tomentosa* a été effectuée par dilutions successives de raison 1/2 (31.25, 62.5, 125, 250 mg/ml) à partir d'une solution mère de 450 et/ou 500mg/ml. Dans des tubes à hémolyse, l'ensemble d'inoculum bactériens, correspondent à une concentration bactérienne de  $10^8$  à  $10^9$  bactéries/ml, ont été préparées à partir d'une culture jaune de 24h dans un bouillon nutritif Mueller-Hinton. Chaque inoculum a subi une dilution en milieu liquide (v:v), en présence de l'extrait dissout dans de DMSO, et la croissance bactérienne se visualise par un trouble ou un culot bactérien. Après 24h d'incubation à 37 °C, la CMI est estimée comme la faible concentration, parmi les cinq concentrations examinées de chaque extrait, correspond à celle en premier tube ne présentant ni trouble ni culot bactérien (Ericsson et Sherris, 1971).

#### 4.2.5.4. Evaluation de l'activité antifongique des extraits du *P. tomentosa*

Sur la croissance mycélienne des souches fongiques testées, le pouvoir antifongique exercée par les extraits EAQ, EMet et EAc du *P. tomentosa* a été évalué par une méthode quantitative microspectrophotométrique décrite par Broekaert et ses collaborateurs (1990) et optimisée par Dellavalle et *al.* (2011). Brièvement, Différentes concentrations (31.25, 62.5, 125, 250mg/ml) de chaque extrait de cette plante, sont appliquées sur des plaques de microtitration à 96 puits inoculées par la suspension en spores.

##### a. Préparation de la suspension des spores

La suspension en spores a été préparée par addition de 10 ml d'eau physiologie à la souche cultivée, 7 jours sur le milieu PDA. Ensuite, les spores sont récupérés superficiellement en utilisant une pipette pasteur sous des conditions aseptiques (Sandhya et *al.*, 2005). À 1ml de suspension de spores préalablement agitée, 6ml de PDB sont ajouté et le nombre de spores est en premier temps déterminée sur la cellule de Mallassiez, l'examen s'effectue au microscope au grossissement x 40 sur une serie de dilution. La suspension est diluée d'une manière à obtenir un nombre des pores de  $2 \times 10^6$  spores/ml. De plus, lame sure de l'absorbance de chaque dilution à 650 nm au spectrophotomètre a été prise afin de confirmer que la suspension a été correctement dilué dans de PDB jusqu'à une concentration de  $2 \times 10^6$  spores/ml (Sumantha et *al.*, 2008).

### a. Détermination de l'effet antifongique

Dans chaque puits d'une microplaque de 96puits, 100µl de chaque concentration des extraits sont mélangés avec 100µl de suspension de spores fongiques ( $2 \times 10^6$  spores.ml<sup>-1</sup> dans du frais PDB). Cependant, les puits témoin négatif reçoivent 100µl de DMSO et le même volume de la suspension de spores dans du PDB. Après une délicate agitation, les plaques ont été incubées dans les premiers 30min à 27°C. Après 48h d'incubation à 27°C, la croissance a été enregistré par la mesure de l'absorbance de culture à 630nm. Toutes les expériences sont faites en répété 3 fois (Fig.4). La lecture microspectrophotométrie est effectuée à l'aide un lecteur de microplaques d'ELISA à 630nm (BIOTEK, Vermont). Les pourcentages d'activité antifongique (ou d'inhibition de croissance) ont été calculés, en basant sur la formule suivante :

$$I \% : \Delta C - \Delta T / \Delta C \times 100$$

$\Delta C$  : variation correcte dans l'absorbance de microculture des puits Control négatif à 630nm.

$\Delta T$  : variation correcte dans l'absorbance de microculture des puits Test à 630nm.



**Figure 4:** Microplaque remplie des uspension  $2 \times 10^6$  spores/ml *Penicillium spp* et des différents extraits du *P. tomentosa*.

### **4.3. Etude statistique**

A l'aide d'un logiciel de Excel Stat, la signification statistique entre les quatre extraits est déterminée par « le test t student » (teste permet à la comparaison entre deux échantillons seul), et les différences sont considérées significatives au seuil de 5 % ( $p < 0.05$ ).

# **Chapitre 5**

## **Résultats et discussion**

### 5.1. Extraction

Les différentes extractions ont été faites sur la partie aérienne de *P. tomentosa*, en utilisant des solvants à polarités décroissante, il s'agit de l'eau distillée, méthanol 80%, l'éthyle acétate et de l'acétone, ce qui nous permet d'obtenir l'extrait aqueux EAQ (Thenmozhi, 2011), l'extrait méthanolique EMe (Bekheet et al., 2011), et l'EAcE et l'EAc (Senthilkumar et al., 2005), respectivement.

La méthode d'extraction choisie doit permettre d'extraire le maximum des composants bioactifs et les prévenir contre la dénaturation ou les modifications probables. En outre, l'utilisation des solvants à polarité différentes permet de séparer des composés selon leur degré de solubilité dans le système solvant d'extraction.

Dans le présent travail, nous avons obtenu quatre extraits avec des rendements et des aspects différents. Le rendement de l'extrait brut EMe, qui est caractérisé par un aspect cristallin, semble être le plus élevé égal à 9.97%, suivi par celui enregistré par l'EAQ en poudre (8.6%), et en fin ceux-ci d'extraits EAc et EAcE, en aspect pâteux verdâtre, qui sont les plus faibles de l'ordre de 2.98% et de 1.23%, respectivement.

Le rendement obtenu d'EMe (9.97%) dans la présente étude est supérieur à celui apporté (5.6%) par les études de Bekheet et al. (2011) sur la même espèce de *P. tomentosa*. En effet, le rendement d'extractions des plantes dépend essentiellement de leurs propriétés génétiques (Ebrahimzadeh et al., 2008), la variété, la saison de récolte, la localisation géographique, les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante (Park et Cha, 2003), la manière et la durée de la conservation (Özgüven et Tansi, 1998).

### 5.2. Criblage phyto-chimique de différents extraits du *P. tomentosa*

L'apparition d'une coloration ou d'une précipitation par l'intermédiaire de certains réactifs spécifiques va affirmer la présence ou l'absence des différentes classes de métabolites secondaires existantes dans les extraits étudiés. Les résultats des tests de screening phytochimiques des quatre extraits de la partie aérienne de l'espèce *P. tomentosa* sont présentés dans le tableau 7 ci-dessous.



**Tableau 7:** Screening des métabolites secondaires contenant dans les extraits de l'espèce de *P. tomentosa*

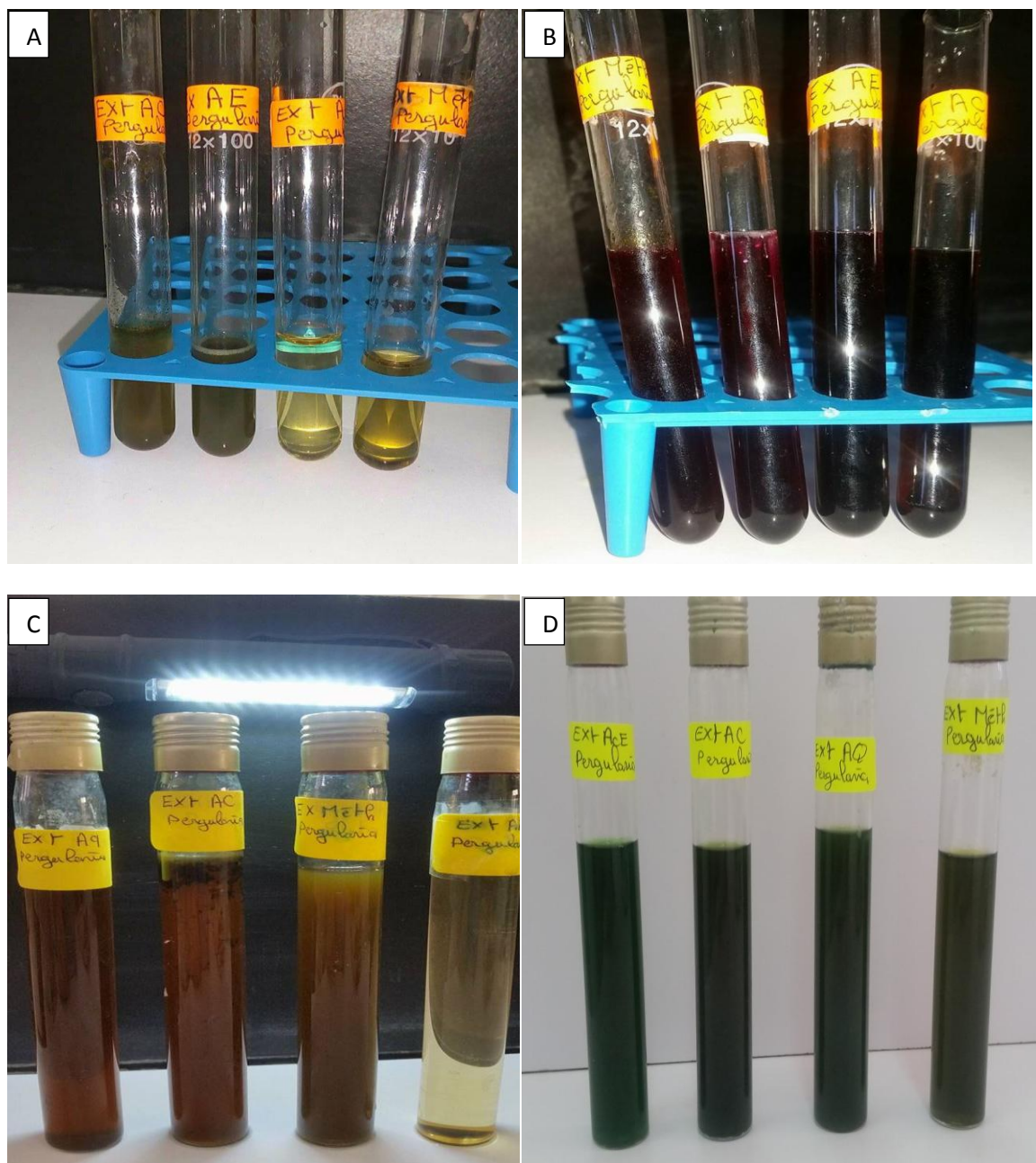
	Polyphénols	Flavonoïdes	Tanins		Intra quinon	quinon libre	Saponines	Terpènes
			Cat	Gal				
<b>EMet</b>	+	+	-	+	-	-	-	+
<b>EAQ</b>	+	+	+	+	-	-	-	+
<b>EAc</b>	+	+	+	+	-	-	-	+
<b>EAcE</b>	+	+	-	+	-	-	-	+

Les résultats obtenus (fig.5) montrent que les différentes fractions préparées de la plante *P. tomentosa* sont riches en polyphénols, en flavonoïdes, en tanins et notamment en terpènes. Par contre, l'absence de certains composés tels que les anthraquinones, les quinones libres, les saponines a été constatée. La richesse des extraits EAc et EAcE en composés phénoliques a été confirmée par l'apparition d'une couleur verte foncée après l'addition de  $\text{FeCl}_3$  (N'Guesson et al., 2009) en comparaison des extraits EMet et EAQ qui semblent être moins riches avec une couleur moins foncée où elle est plus claire pour l'EAQ (Fig. A). Les recherches de James et al. (2011) ont indiqué que l'extrait EAc de *P. tomentosa* semble avoir une teneur très élevée en polyphénols et en flavonoïdes. Ces résultats ont été également démontrés par les travaux effectués par Lahmer et al. (2012).

Heneidak et ses collaborateurs (2006) ont révélé, dans leur étude menée sur la plante *P. tomentosa*, la présence des flavonoïdes sous formes d'aglycones flavoniques combinés avec des glycosides, où les molécules déterminées, par cette équipe de recherche, sont essentiellement des flavonols. De plus, une étude antérieure de Karthishwaran et Murunalini (2012) sur la même plante *P. tomentosa* a prouvé la présence des flavonoïdes dans l'extrait méthanolique, aussi dans l'extrait Met de l'espèce *P. daemia* est riche de flavonoïdes.

D'après nos résultats, les quatre extraits obtenus de la partie aérienne de l'espèce *P. tomentosa* s'avèrent contenant des espèces terpéniques. Hassan et al., (2007) ont eu des résultats similaires sur la même espèce récoltée de la région de Sokoto (Nigeria).

On a également noté la présence des deux types de tanins catéchiques et galliques dans les extraits EAQ et EAc, tandis que les extraits EMet et EAcE ne contiennent qu'un seul type de tanins, les tanins galliques. Ce qui peut se lier à la nature chimique et à la solubilité de ces composés phénoliques dans chacun des systèmes solvants utilisés.



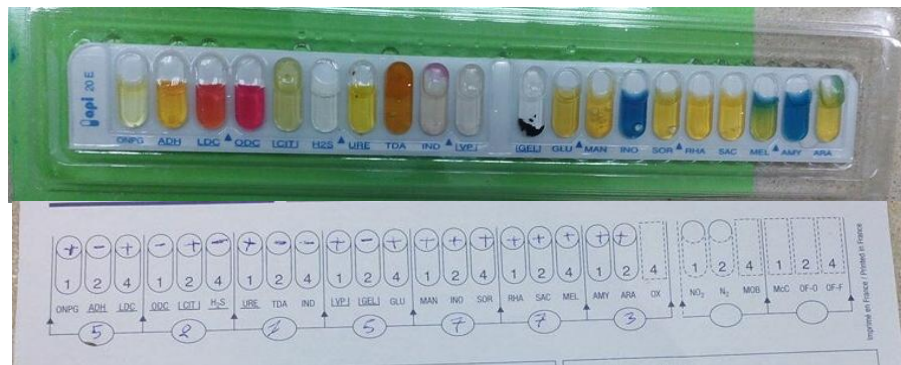
**Figure 5:** Représentation photographique des Résultats du screening phytochimique qualitatif sur les différents extraits du *P. tomentosa*. Caractérisation de polyphénols (A),Flavonoïde (B), Tanin catéchique (C), Tanin galique (D).

### 5.3. Évaluation d'activités antimicrobiennes des extraits du *P. tomentosa*

#### 5.3.1. Identification des souches testées

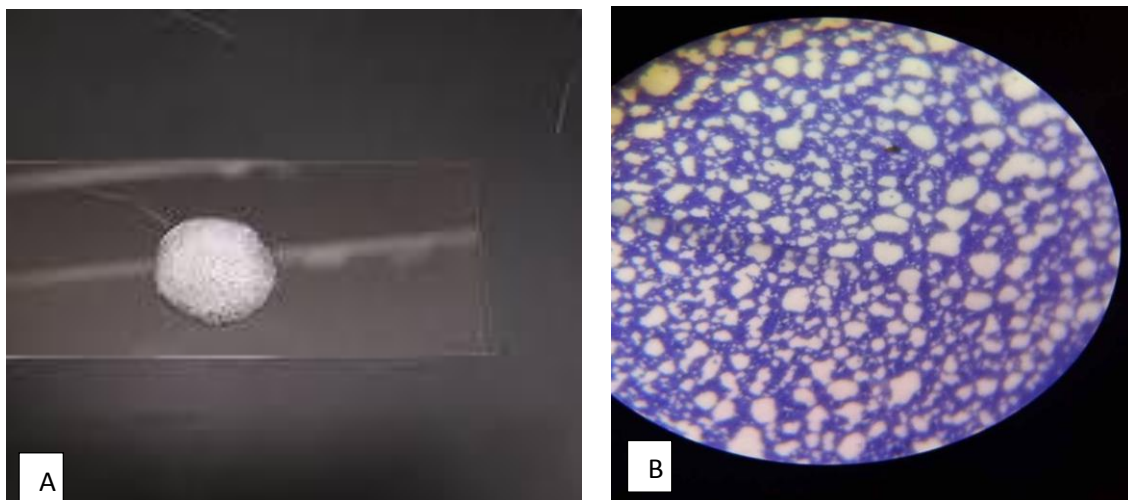
l'identification des souches de *k. pneumoniae* et *E. coli* a été confirmée au laboratoire à l'aide d'une série de tests biochimiques, comme elle présente la (fig.6)

- ✓ la galerie biochimique API20E. (Leyral et *al.*, 1998).



**Figure 6 :** Tests biochimiques d'identification de la souche *Klebsiella pneumoniae*.  
Le profil numérique est : 5215773.

- ✓ Production de catalase (Fig.A) (Joffin et Leyral, 2006).
- ✓ Coloration de Gram, comme (Fig. B) (Dellaaras, 2007).

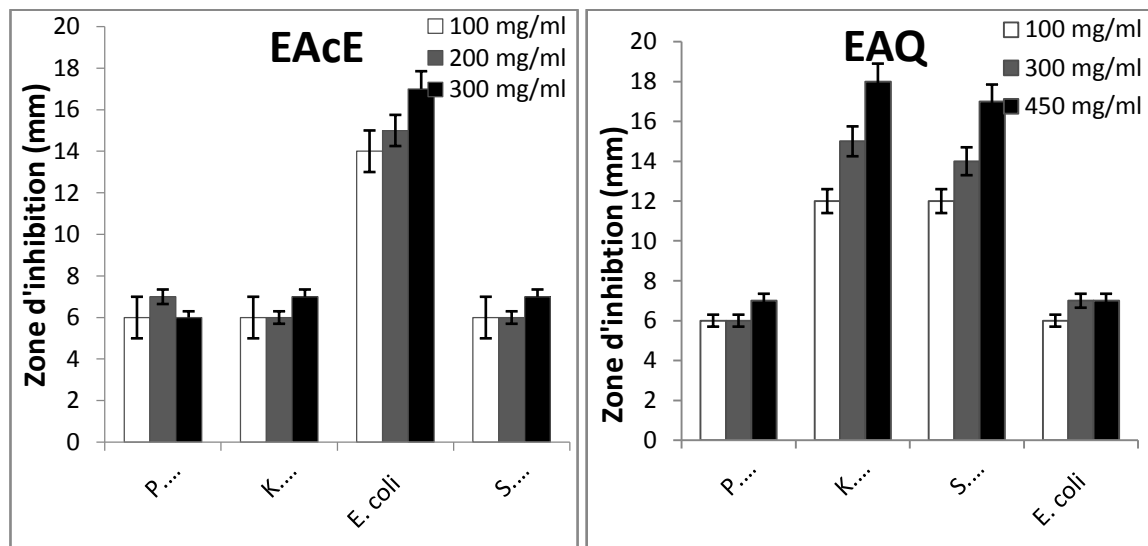


**Figure 7:** Teste catalase (A) et coloration de gram (B) de la souche *S. aureus*.

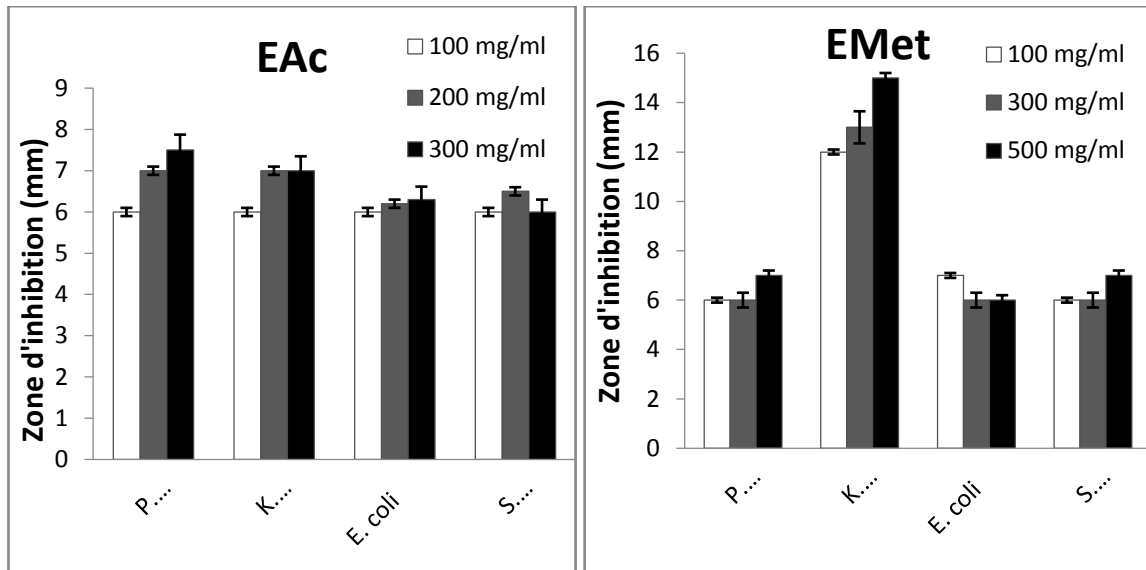
### 5.3.2. Activité antibactérienne et Détermination de CMI

le pouvoir antibactérien d'EAQ, EMEt, EAce et d'EAC de *P. tomentosa* a été examiné in vitro vis-à-vis quatre souches pathogènes (*E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*). L'évaluation a été effectuée par la méthode de diffusion sur un milieu gélosé solide, Mueller-Hinton (Rahal, 2005), en utilisant des disques imprégnés de différents extraits à trois doses différentes. L'activité antibactérienne des extraits a été estimée en termes de diamètre (en mm) de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits testés ou l'antibiotique. Le test a été réalisé en triplicata. Les extraits sont complètement dissolvent dans du DMSO, en conséquence, son activité a été également testé.

Les résultats obtenus ont révélé que le DMSO, comme un solvant approprié, ne présente aucun effet inhibiteur sur la croissance normale des souches microbiennes testées, de ce fait, il est employé comme un témoin négatif T<sup>(-)</sup>. Par ailleurs, les souches testées ont montré de différentes sensibilités aux antibiotiques standards, utilisés comme des témoins positifs T<sup>(+)</sup>, tels l'Amoxicilline, Gentamicine, co-trimoxazole, Ticarcilline, la Cefazoline et le Chloramphénicol. En effet, on dit que l'extrait a une action bactériostatique, si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 12mm (Sagdac, 2003), si le diamètre d'inhibition dépasse le 12 mm, l'extrait est considéré comme bactéricide.



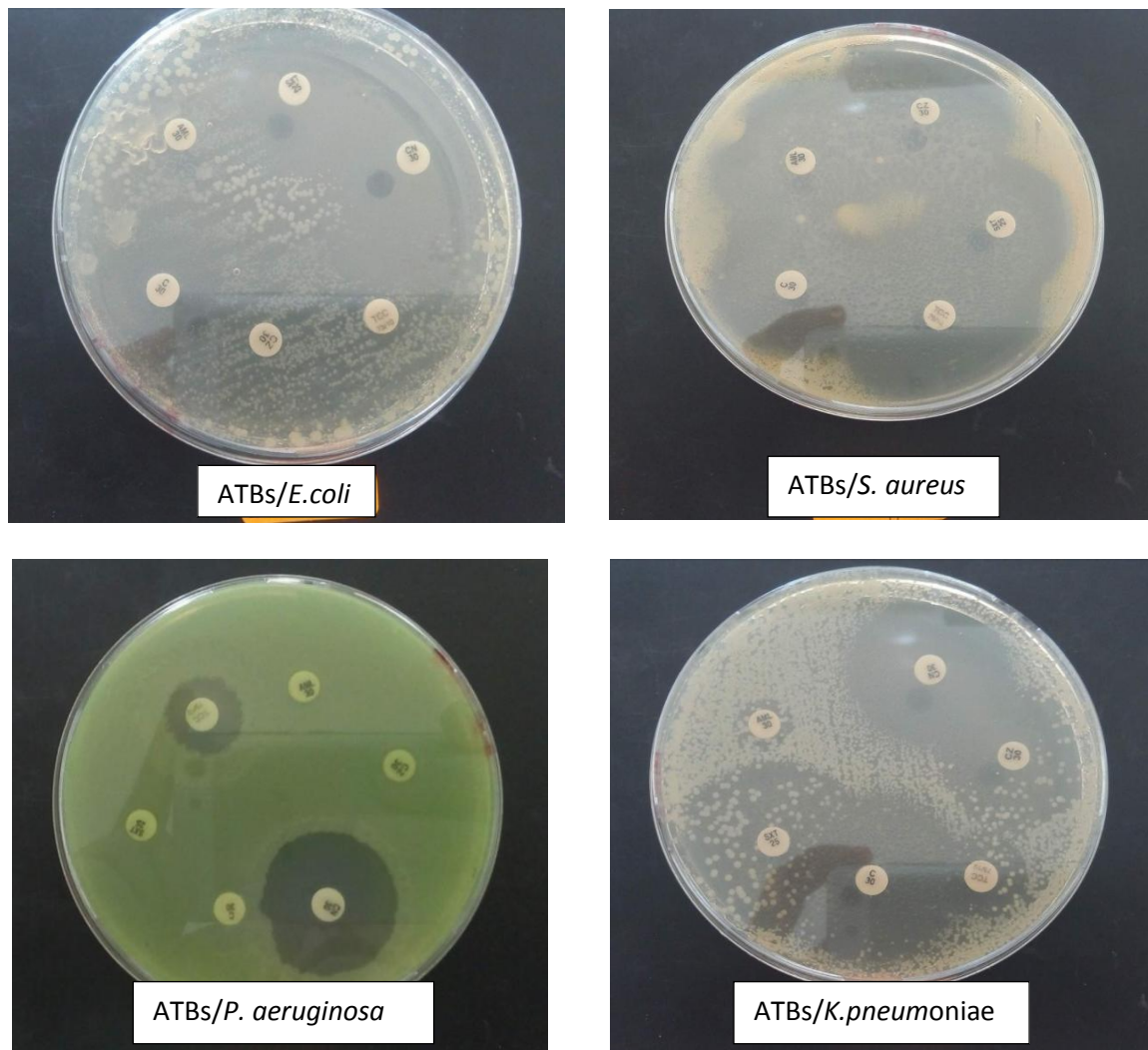
**Figure 8:** Zone d'inhibition de la croissance bactérienne induites par l'extrait EAcE et EAQ de La plante *P. tomentosa* (m ±SD).



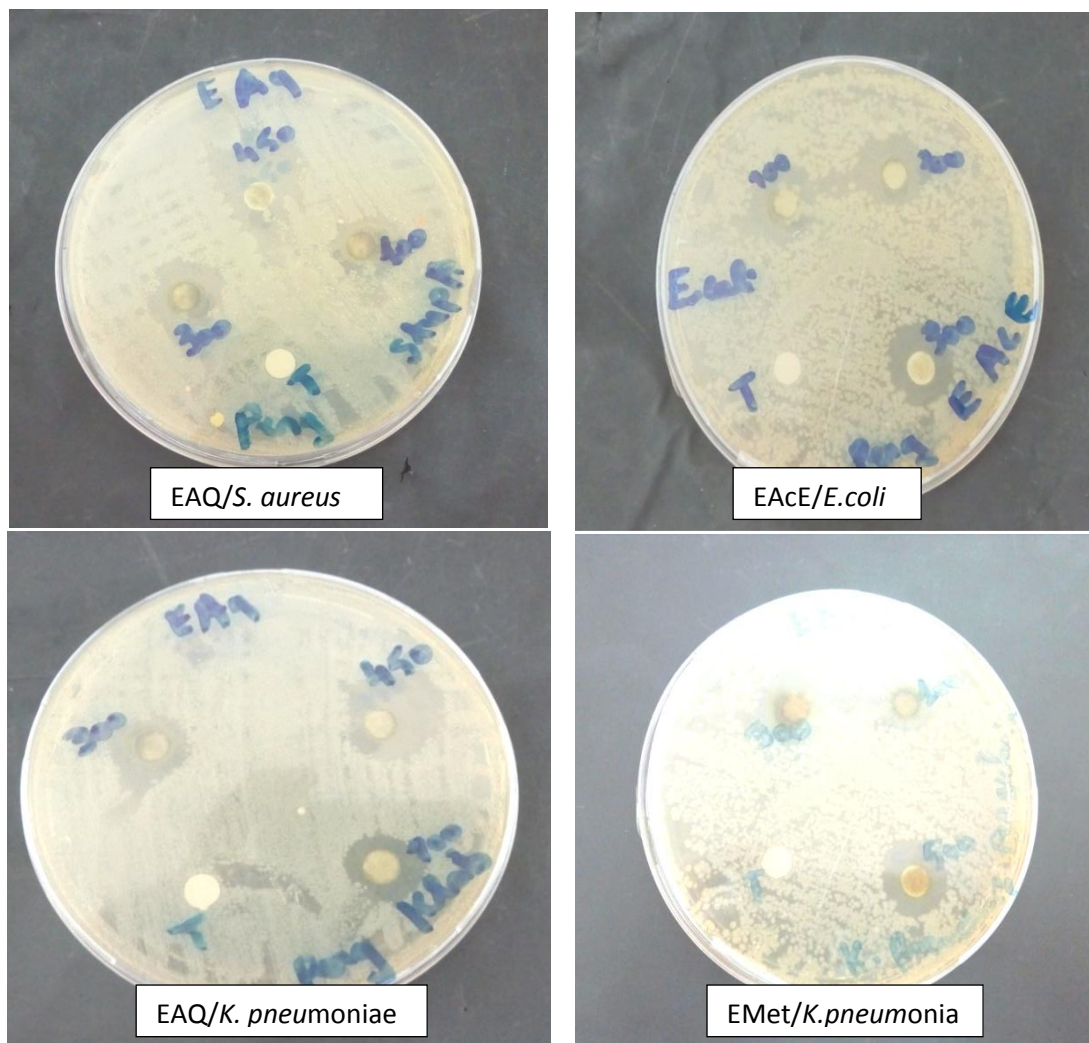
**Figure 9:** Zone d'inhibition de la croissance bactérienne induites par l'extrait EAc et EMet de La plante *P. tomentosa* (m ±SD).

Les résultats expérimentaux obtenus dans la présente étude ont montré que l'EMet, EAQ et l'EAcE exercent significativement ( $P \leq 0.05$ ), à concentration de 500 mg/ml, 450 mg/ml et 300 mg/ml respectivement, une inhibition sur la croissance bactérienne très importante pour l'ensemble des souches commence à s'apparaître à 100 mg/ml pour l'EAQ et l'EAcE et l'EMet à l'exception de *P. aeruginosa* qui ne présente aucune sensibilité. Les diamètres de zones, correspondants à l'inhibition induite par les différentes doses de chacun d'extraits, sont représentés dans les histogrammes comparatifs (fig.8 et fig.9). Cependant, les quatre souches testées n'ont révélé aucune sensibilité à l'extrait EAc de *P. tomentosa*. La différence statistique entre le dernier résultat et le  $T^{(-)}$  est non significative ( $P > 0.05$ ).

Néanmoins, la souche *K. pneumoniae* semble être statistiquement significative ( $p \leq 0.05$ ) plus sensible envers l'EAQ à 450 mg/ml que vis-à-vis l'EMet à 500 mg/ml, avec une inhibition correspond au 18mm et 15mm de diamètre, respectivement (Fig.11). Ce qui peut indiquer que l'efficacité antibactérienne de l'EAQ est significativement très importante que celle engendrée par l'EMet contre cette souche bactérienne.



**Figure 10:** Effet des ATBs de *P. tomentosa* sur *K. pneumoniae*, *E.coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*.



**Figure 11:** Effet des ATBs et EAQ, EAcE et EMet de *P. tomentosa* sur *K. pneumoniae*, *E..coli* et *S. aureus*.

Afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice, qui par laquelle chacun d'extraits de *P. tomentosa* a inhibé la croissance bactérienne d'une souche donnée, l'activité antibactérienne de toute une gamme de concentrations décroissantes (31.25, 62.5, 125, 250mg/ml) de ceux-ci a été évaluée selon la méthode standardisée par Ericsson et Sherris (1971). la CMI est alors exprimée comme la faible concentration, parmi les quatre concentrations examinées de chaque extrait, correspond au premier tube dans la série qui ne présente ni trouble ni culot bactérien. De ce fait, les résultats obtenus lors de la détermination de CMI des différents extraits de *P. tomentosa* sont envisagés dans le ( Tab. 8).

**Tableau 8:** Concentrations minimales inhibitrices enregistrées par les différents extraits du *P. tomentosa* contre les souches testées.

<b>CMI (mg/ml)</b> <b>Souches</b>	<b>EAQ</b>	<b>EMet</b>	<b>EAc</b>	<b>EAcE</b>
<i>K. pneumoniae</i>	62.56 mg/ml	62.56 mg/ml	250 mg/ml	62.5 mg/ml
<i>E. coli</i>	125 mg/ml	Culot	culot	62.56 mg/ml
<i>P. aeruginosa</i>	Culot	Culot	Culot	Culot
<i>S. aureus</i>	125 mg/ml	Culot	Culot	Culot

Par ailleurs, les souches testées ont montré de différentes sensibilités aux antibiotiques standards (tab.9), utilisés comme des témoins positifs T(+), tel l'Amoxisilline (AML), Gentamicine(CN), co-trimoxazole(SXT), Ticarcilline(TCC), la Cefazoline(CZ) et le Choramphénicol (C), (fig.8).

D'après les résultats obtenus (Tab.9), la souche *Escherichia coli* est très sensible à la SXT, CN, CZ et C, avec des diamètres de zones d'inhibition de 25 et 18, 15, 14mm, respectivement, alors qu'elle est résistante à TCC et AML. En outre, CN, C, SXT et CZ ont exercé un effet bactéricide, avec des diamètres de zones d'inhibition de l'ordre de 25, 25, 24 et 20mm, respectivement, sur la souche *Staphylococcus aureus* qui semble être alors moins sensible à TCC et résistante à AML. Pour la souche *K. pneumoniae*, Sa sensible enregistrée est aussi bien différentielle contre CN, C, SXT, CZ et TCC avec des diamètres allant jusqu'à 25mm. Cependant, la *P. aeruginosa*, parmi les souches testées, se révèle la souche la plus sensible à tous les ATBs examinés comme T<sup>(+)</sup>, à l'exception de AML.

**Tableau 9:** Antibiogramme vis-à-vis les germes testés (m±SD). les résultats sont exprimés en (mm).

<b>ATBs</b> <b>Souches</b>	<b>AML</b>	<b>SXT</b>	<b>TCC</b>	<b>C</b>	<b>CZ</b>	<b>CN</b>
<i>K. pneumoniae</i>	10 ± 0.01	25± 0.12	14 ± 0.00	25± 0.00	20 ± 0.00	25±0.15
<i>E. coli</i>	7 ± 0.58	25 ± 0.00	6 ± 0.15	14 ± 0.57	15 ± 0.00	18±1.73
<i>P. aeruginosa</i>	6 ± 0.00	6± 0.12	12 ± 0.00	6 ± 1.15	6 ± 0.15	25±0.58
<i>S. aureus</i>	6 ± 1.15	24 ± 0.57	14 ± 0.15	25 ±0.54	20± 0.00	25±0.75



En comparaisons des ATBs, l'effet bactériostatique significatif quel montrent l'EAQ et l'EMet de *P. tomentosa* sur la *K. pneumoniae* est supérieur ( $P \leq 0.05$ ) que celui engendré par la AML (fig.11). Comme il semble être inférieur ( $P \leq 0.05$ ) à celui de SXT, C et CN. Cependant, l'activité antibactérienne de ces extraits EAQ et EMet, à CMI de l'ordre de 62.5 mg/ml et 125 mg/ml, s'avère similaire ( $p \leq 0.05$ ) à celle produite par CZ et TCC contre *K. pneumoniae* respectivement.

Concernant l'EAQ, il présente un pouvoir inhibiteur considérable, avec une CMI est égale à 125 mg/ml contre la souche *S. aureus*, supérieure à l'AML, et inférieur que celui de SXT et TCC et CN, Cependant, son activité apparaît équivalente à celle exercée par CZ. La différence entre l'effet de l'EAQ et ces ATBs est statistiquement significative ( $P \leq 0.05$ ).

D'après les résultats obtenus, *E. coli* est sensible à SXT et C et CZ et CN, alors qu'elle est résistante à AML et TCC. L'extrait EAQ représente une activité inhibitrice contre l'*E. coli* (à CMI de 62.5 mg/ml) équivalente à celle exercée par CN. Concernant la souche *P. aeruginosa*, les quatre extraits et tous les ATB examinés, à l'exception de la Gentamicine et la Ticarcilline, ne présentent aucun effet bactériostatique sur sa croissance bactérienne.

Nos travaux confirment l'ensemble des résultats de Dangoggo *et al.*, (2002) et Jabri *et al.*, (2013), qui ont démontré que les extraits des feuilles du *Pergularia tomentosa* possèdent une activité antibactérienne intéressante contre nombreuses souches. De plus, Les études effectuées par Ignacimuthu et ses collaborateurs (2009) sur l'espèce *P. deamia* ont montré que cette espèce semble également un agent inhibiteur de la croissance bactérienne, vis à vis les souches *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*.

L'effet antimicrobien que possèdent les feuilles de *Pergularia tomentosa* sur les différentes souches examinés, avec cette efficacité, peut s'attribuer probablement à leur richesse en polyphénols, flavonoïdes et en tanins qui sont des métabolites secondaires réputés pour leurs effets antimicrobiens (Xia *et al.*, 2011). Cowan (1999) a rapporté également que différentes classes de polyphénol, essentiellement les tanins, les flavonoïdes et les terpènes, peuvent augmenter la toxicité en vers les microorganismes.

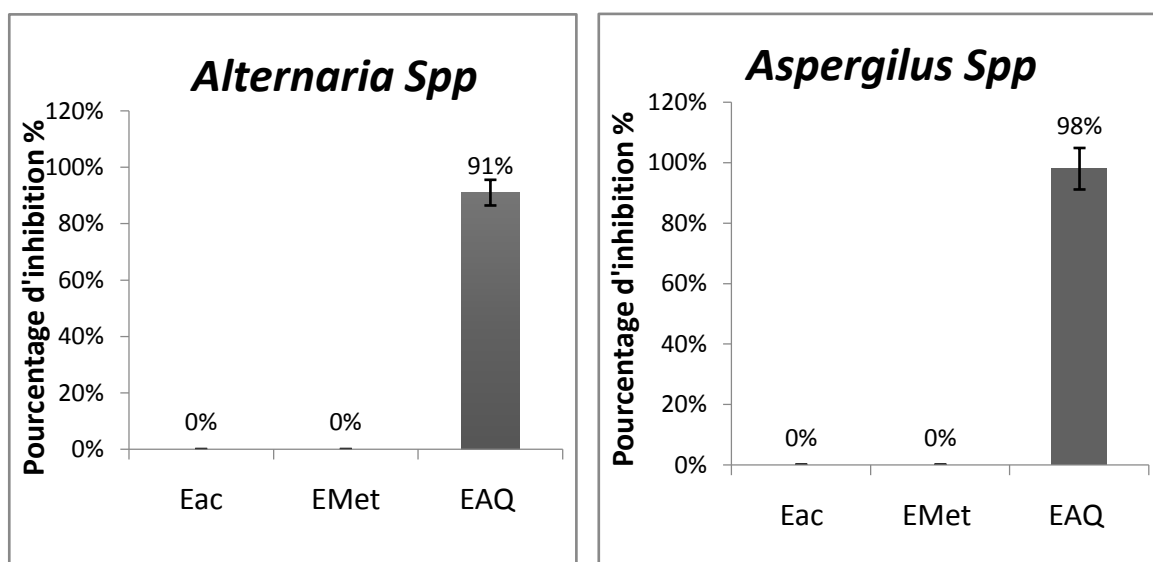
Selon de Thenmozhi (2011) les extraits aqueux et méthanolique de la partie aérienne de l'espèce *Pergularia daemia*, appartenant du genre *Pergularia*, présentent également une activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klasiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*. La même équipe de recherche a expliqué cette activité par les capacités de composés de polyphénols, essentiellement les tanins et les

flavonoïdes de favoriser la rupture de la membrane bactérienne. D'après Hadi (2004), les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont puissants inhibiteurs *in vitro* de l'ADN gyrase.

### 5.3.3. Evaluation de l'activité antifongique des extraits de *P. tomentosa*

Le pouvoir antifongique des extraits EAQ, EMet et EAc du *P. tomentosa* a été évalué par une méthode microspectrophotométrique décrite par Broekaert et ses collaborateurs (1990) et optimisée par Dellavalle *et al.* (2011). Différentes concentrations de chacun d'extraits allant à une dose de 250mg/ml, sont examinées sur les plaques de microtitration à 96 puits inoculées par les suspensions en spores d'*Aspergillus spp*, *Alternaria spp*, *Penicillium spp* et de *Cladosporium*. La croissance a été enregistrée par la mesure de l'absorbance de culture à 630nm et les pourcentages d'activité antifongique (ou d'inhibition de croissance) ont été calculés, par rapport à la différence entre la variation correcte dans l'absorbance de microculture de puits control négatif et celle de puits test à 630nm.

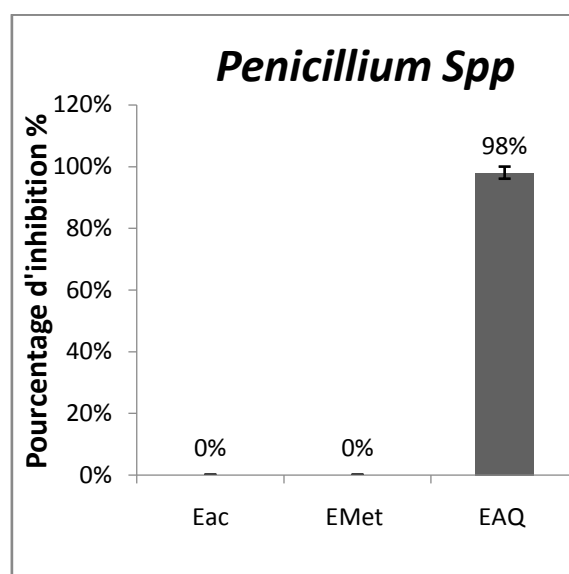
Jusqu'à dose de 250mg/ml, aucun effet fongistatique d'extrait EAc et EMet n'a été observé sur la croissance de *Alternaria spp* et *Aspergillus spp* (Fig.11), les quelles sont inhibés par l'extrait EAQ aux concentrations minimales CMF de l'ordre de 125 mg/ml et de 62.5 mg/ml avec une inhibition maximale égale à 91% et 98%, respectivement. Ce qui indique que la fraction aqueuse semble être un agent fongicide excellent contre ces deux champignons.



**Figure 11** : l'activité antifongique de trois extraits de *P. tomentosa* sur les souches *Alternaria* et *Aspergillus* (m ± SD).

Une inhibition fongicide excellente est engendrée par l'extrait EAQ sur la croissance de la souche *Penicillium* et avec un pourcentage d'inhibition de 98% correspond à la CMF de 250 mg/ml. Devant l'extrait EMet et EAc de *P. tomentosum* à concentration de 250mg/ml la souche précédemment discutée semble être très résistante (fig.12). De même, la souche fongique *Cladosporium*, présente une forte résistance envers l'ensemble d'extraits EAQ, EMet et EAc à la dose maximale testée 250mg/ml qui ne révèle aucune efficacité d'inhiber la croissance de cette souche où la différence statistique entre les absorbances depuis test et celles de puits contrôle s'avère non significative ( $P > 0.05$ ).

Nos résultats sont en accord avec ceux-ci reportés par les travaux de Hassan et al. (2007) dans l'étude de l'activité antifongique de l'extrait EAQ de *P. tomentosum* à partir d'une concentration de 8 mg/ml, cet extrait constitue un agent fongicide excellent (96%) sur les souche fongique tell que *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*. Selon Hassan et Umar (2007), le pouvoir antifongique d'extrait de *Pergularia* contre *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* et *Trichophyton rubrum*, peut être dû à leur efficacité dans la dégradation de la paroi cellule fongique.



**Figure 12:** Activité antifongique des trois extraits de *P. tomentosum* sur la souche *Penicillium* ( $m \pm SD$ ).

Le mécanisme d'action de l'extrait aqueux de *P. tomentosa* contre les souches fongique pathogènes peut être due a leur contenu en flavonoïde, tanin, saponin, terpenoïdes, alcaloïdes (Hassan et *al.*, 2007 ; shinkafi, 2013). que semble avoir une capacité de lyser la paroi cellulaire fongique par la formation des pores dans la cellules et la fuite des constituants cytoplasmique et faire une repture dans la chaîne de transport d'électrons (Shelton, 1991; Dominguez et Martin, 1998).

---

## Conclusion

Le présent travail s'est porté sur *P. tomentosa*: espèce végétale très connue pour ses vertus thérapeutiques variées. Il a permis de mettre en évidence à travers une analyse phytochimique, la richesse de ces plantes en composés phénoliques.

La détermination du rendement en extraits brut a montré que les rendements d'extractions varient considérablement entre les espèces végétales et pour la même espèce végétale en fonction du solvant utilisé pour l'extraction. Les meilleurs résultats sont enregistrés chez Emét 9.97% et EAQ 8.6% et un faible rendement pour EAc 2.98% et EAce 1.23%.

La qualification en polyphénols totaux et en flavonoïdes des différents extraits nous a permis de déduire que les plantes testées source prometteuse des composés phénoliques, riche en polyphénols, flavonoïdes, tanins et terpènes et l'absence des intra cinons, cinons libres et saponines.

L'étude de pouvoir antibactérien des extraits bruts issus de *P. tomentosa* a permis de conclure que nos extraits sont relativement actifs sur les souches bactériennes testés ; *K.pneumonie*, *S.aureus* et *E. coli* sont sensibles envers ces extraits, par contre la souche *Pseudomonase aeroginosa* est résistante.

Concernant le pouvoir antifongique, l'effet des extraits de *P. tomentosa* se traduit en pourcentage important d'inhibition de la croissance des champignon testé (*Penincillium*, *Alternaria*, *Aspergillus*), notant que ces souches sont inhibées uniquement par l'extrait EAQ. En outre, il faut noter que la souche *Cladosporium* est résistante envers tout les extraits.

Enfin, l'ensemble de nos résultats obtenus nous permettent de conclure que la plante *P. tomentosa* est riche en molécules bioactives qui ont le pouvoir d'inhiber la croissance de plusieurs microorganismes pathogènes. Ces molécules sont considérés comme des agents antimicrobiens naturels qui peuvent être utiles pour des applications thérapeutiques.

## Bibliographie

Aliyu A. B., Musa A. M., Abdullahi M. S., Ibrahim H., et Oyewale A O. 2011. Phtochemical screenning and antibacterial activities of Vernornia ambigua, Vernonia blumeoides and vernonia oocephala (ASTERACEAE). Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research. 68 :67-73.

Bastide A., Méo M., Andriantsoa M., Laget M., Duménil G. 1986. Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrice de substances antifangique de structure non polyenique. Microbiolodie 2:453-466.

Bekheet S. H. M., Abdel-Motaal F. F., Mahalel U.A. 2011. Antifungal effects of Ficus sycomorus and *Pergularia tomentosa* aqueous extrqcts on some organs in Bufo regularis treated with Aspergillus niger. Tissue and Cell 34:398-404.

Boulahbal F. 2002. Microbiologie : s1 clinique. 1édition, offices des publication universitairse, Alger, p. 174.

Bousseboua H. 2002. Microbiologie général. 1er édition, l'université mentouri, consantine, p. 265.

Broekaert W. F., Terras F. R. G., Cammue B. P. A., Venderleyden J. 1990. On automated quantitative assay for fungal growth inhibition. FEMS Microbiologie letters.69: 55-60.

Chabert J., Dacheuxd., Stare N., Attree I. 2002. Role and activation of type 3 secretion system genes in *pseudomonas aeruginosa* induced. Drosphililia killing. Microb patho 32: 287.295.

Cheng S. S., Liu J. Y., Chang E. H et Chang S. T. 2008. Antifongal Activaty of cinnan aldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. Bioresourse technology. 99 (11): 5145-5149.

Cowan M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology reviews*. 12(4): 564-570.

Dadasoglu F., Aydin T., Kotan R., Cakir A., Ozer H., Kordali S., Cakmaka R., Dikbas N., Mte E. 2011. Antibacterial activities of extracts and essential oils of three origanum species against plant pathogenic bacteria and their potential use as disinfectants. *Journal of plant pathology*. EDIZIONI ETS pisa. 93(2) : 271-282.

Dangogo S. M., Faruq U. Z., Hassan L.G. 2002. Preliminary phytochemical analysis and antibacterial activity of *P. tomentosa*. *SOKOTO Journal of veterinary sciences*. 4(2): 8-11.

Dellars C. 2007. *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de control sanitaire*. Technique et Documentation. Edition. LAVOISIER, Paris, 476p.

Delmas C. 2007. Fiche technique bactériologie (*Shigella flexneri*), Centre Toulousain pour le contrôle de qualité en Biologie Clinique. P1.

Ebrahimzadeh M. A., Pourmmorad F. et Hafezi S., 2008-Antioxidant activities of Iranian Corn Silk. *Turkish journal of biology*. 32 : 43-49.

Ericsson H. M., Sherris, J.C. 1971. Antibiotic sensitivity testing . Report of international collaborative study, *Acta pathol microbiol scand. Sect B* 217 (suppl): 1-6.

Flandrois J. P., Courcol R., Lemeland J. F., Ramuz M., Sirot J., Soussy C.J. 1997. *Bactériologie médicale*. Press universitaires lyon. P176, 177, 178, 180.

Francois R. 2008. *Dictionnaire encyclopédique des sciences de la nature et de la biodiversité*. Edition Dunod. Paris. 726 P.

Gaudy C., Buxeraud D. 2005. Antibiotiques: pharmacologie et thérapeutique. ELSEVIER, Paris. P14,23,24.

Geursen R., Heer P., Kirkness B., Loewenstein P., Mees S., Mees S., Muschart M., Pickaert M. 2008. Mycoses. Des médicaments au service de l'humanité: 1-3.

Gohar A. A., El-olemy M. M., Essam A. S., El-said M., Niwa M. 2000. Cardenolids and B-Sitosterol glucoside from *P. tomentosa* L. Journal Natural Product Sciences. 63 : 142-146.

Hammiche V. et Maiza K., 2006-Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. Journal of Ethnopharmacology. 105 : 358–367.

Hassan S.W., Umar R.A., Ladan M.J., Nyemik P., Wasagu R.S.U., Lawal M and Ebbo A.A. 2007. Nutritive value, phytochemical and antifungal properties of *p. tomentosa* (Asclepiadaceae). International journal of pharmacologie 3(4) :334-340.

Hifnawy M.S., El-shanawany M.A., Khalifa M.M., Youssef A.K., et Desoukey S.Y. 2014. Cardiotoxic activity of *Pergularia tomentosa* different extracts, fractions and isolated compounds, *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, Volume 9, Issue 1 : 54-60.

Hopkins W. G. 2003. Physiologie végétale. Traduction de la 2<sup>ème</sup> édition, par serge Rombour Révision scientifique de Charles-Marie Evrard, Américain. P 267-283.

Hussein H.I., Al-rajhi D.H., El-Shahawi F.I. et Hashem S.M. 1999. Molluscicidal Activity of *Pergularia tomentosa* (L.), Methomyl and Methiocarb, Against Land Snails, *International Journal of Pest Management*. 45 : 211–213.

Ignacimuthu S., Pavunaj M., Duraipandiyar V., Nagappan R., Muthu C. 2009. Antibacterial activity of a novel quinone from the leaves of *Pergularia daemia* (Forsk.), a traditional medicinal plant. *Asian pacific journal of tropical disease* 4(1).



James O., Unekwojo E. G., Ojochenemi A. A. 2011. Assessment of Biological Activity : A comparison of *Pergularia deamia* and *Jatropha curcas* Leaf Extracts. *British biotechnology Journal*. 1(3) : 85-100.

Karthishwaran K et Mirunalini S. 2012. Assessment of the antioxidant potential of *pergularia daemia* (forsk) extract in vitro and vivo experiments on hamster buccal pouch carcinogenesis. *Asian pacific journal of tropical disease* 509-516.

Kemassi A., Darem S., Cherif R., Boual Z., Sadine S. E., Aggoune M. S., OULD EL Hadj-Khelil A. et Ould Elhadj M. D. 2014. Recherche et identification de quelques plantes médicinales à caractère hypoglycémiant de la pharmacopée traditionnelle des communautés de la vallée du M'Zab (Sahara septentrional Est Algérien), *Journal of Advanced Research in Science and Technology*. 1(1) : 1-5.

Klaas C. A., Wagner G., Laufer S.m Sosa S.m Loggia R. D., Bomme U., Pahl H. L., Merfort L. 2002. Studies on the anti-inflammatory of phytopharmaceuticals prepared from *Qnica flozers*. *Planta Med*. 68:385-391.

Lahmer I., Belghith K., Ben abdallah F. 2012. Exploration de quelques activités antioxydantes d'une espèce spontanée : *Pergularia tomentosa*. *Bio-surveillance de l'environnement, Biomolécules et santé. Le premier congrès International de l'ATP-BE*, 75 : pp. 130-131.

Macheix J. J., Fleuriet A., Christan J. A. 2005. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Italie*, p. 185.

Martini M. C. 2011. Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie. 3<sup>ème</sup> édition. Lavoisier. Paris. P316.

Miller L., Ricklefs R. 2005. Ecologie de boeck et larcier. Bruxelles. Pris .P807.

Nassiri-ASL M., Hosseinzadeh H. 2009. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (grape) and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research*. 23(9) : 1197-1204.

Neuwinger H. D. 1994. African ethnobotany poison and drugs :chemistry, pharmacologie, 1<sup>er</sup> édition, CHAPMAN & HALL, Germany, p. 242.

N'Guessan K., Kadja B., Zirihi G. N., Traoré D., Aké-Assi L. 2009. Screening phytochimique de quelque plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobo (Agboville, Cote-d'Ivoire). *Sciences & Nature* 6: 1-15.

Ould el hadj M. D., Hadj-Mahammed M., Zabeirou H. 2003. Place Des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région d'Ouargla (Sahara septentrional est). *Courrier du Savoir*. 3 :47-51.

Ozenda P. 1991. Flore et végétation du Sahara. 3<sup>ème</sup> édition, augmentée. Edition: CNRS, Paris, p. 662.

Ozenda P. 2004. Flore et végétation du Sahara. 3<sup>ème</sup> édition, CNRS, paris, 661 p.

Page C., Curtis M., Walker M., Sutter M., Hoffman B. 1999. pharmacologie intégrée. 1 édition, De Boeck université, paris, p. 419.

Park H.J. et Cha H.C. 2003. Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. *Korean journal of biological society*. 7 : 327-330.

Piacente S., Masullo M., De Neve N., Dewelle J., Hemed A., Kiss R., Mijatovic T. 2009. Cardenolides from *pergularia tomentosa* display cytotoxic Activity resulting from their potent inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- ATPase .Nat Prod.72:1087-1091.

Petignat C., Blanc D., Bally F. 2006. Microbiologie pathogénèse de l'infection. Cours assistant stérilisation. P 8-14.

Perry J.J., Staley J.T., Lory S. 2002. Microbiologie. Edition par Sinauer Associates. Etats-Unis. P160-165.

Prescott M., Klein. 2007. Microbiologie 2<sup>ème</sup> édition française. P806-819.

Perscott M. L., Harley., Klein., Willey., Sherwood., Wodverton. 2010. Microbiologie. 3<sup>ème</sup> édition, Boeck université, paris, 1086 p.

Rahal K. 2005. Standardisation de l'antibiogramme en Médecine Humaine à l'échelle Nationale selon les recommandations de l'OMS. 4<sup>ème</sup> édition, Ministère de la santé, de la population et de la Réforme Hospitalière.

Sagdic O. 2003. Sensitivity of four pathogenic bacteria to turkish Thyme and oregano hydrosols. Lebensm-wiss. u-techno.36 : 467-473.

Santhosh R. S., Suriyanarayanan B. 2014. Plants: A source for new antimycobacterial drugs. Georg thieme verlag KG. India.80:9-21.

Schaechter M., Medoff G., Eisenstein B.1999. Microbiologie et pathologie infectieuse. Département de Boeck Université. De Boeck et Larcier. Paris. Bruxelles. P182,183.

Schmelzer G. H et Gurib- fakim A. 2013. Ressources végétales de l'Afrique tropicale 11 (2) Plante Médicinales. 2<sup>ème</sup> édition, Fondation PROTA, Wageningen, pays- Bas, pp. 224-226.

Senthilkumar M., Gurumoarth P., Janardhanan K. 2005. Antibacterial potential of some plants used by tribals in maruthamalai hills. Tamil Nadu. Journal Natural Product Radiance. 4(1) : 27-34.

Sheded M. G., Pulfordb I. D. et Hamed A. I. 2006. Presence of major and Trace elements in seven medicinal plants growing in the South-Eastern Desert, Egypt. Journal of Arid Environments. 66 : 210–217.

Shelton R. M. 1991. Aloe vera its chemical and therapeutic properties. Int. J. Dermatol. 30 :679-683.

Shinkafi S.A. 2013. Antidermatophytic activity-phytochemical screening and chromatographic studies of *Pergularia tomentosa* L. and *Mitracarpus scaber* zucc (Leaves) used in the treatment of dermatophytoses. International Research Journal of Microbiology (IRJM). 4 (1) : 29-37.

Smallfield B. 2001. Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. Crop et Food Reseqrch. 45:4.

Sumantha A., Fontanille P., Larroche C., Pandey A. 2008. Exploration of fungal spores as a possible storehouse of proteolytic biocatalysts. World J. Microbiol Biotechnol 24 :2897-2901.

Thenmozhi C. D., Premalakshmi V. 2011. preliminary phytochemical screening and antibacterial activity of *pergularia daemia* forsk. International Journal of Pharma and Bio Sciences 2(1) :975-6299.

Vanbambek F., Tulkens P. 2009. Pharmacologie et pharmacothérapie anti-infectieuse. Université catholique lourain, p 206.

Vandeputte V.2008. Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata*. Thèse de Doctorat. Université d'Angers. France. P168.

Wachter G. A., Hofmann J. J., Furbacher T., Blake M. E., Timmermann B.N. 1999. Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochem* 52 :1469-1471.

Zhiri A. 2006. Aromathérapie, nutra news : science, nutrition, prévention et santé, 1<sup>er</sup> édition, Fondation libre choix, p 2-16.

Xia E.Q., Deng G.F., Guo Y. J. et Li H.B. 2011. Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*.11(2) : 622-646.

## Annexes

### Annexe 1: Composition de milieu de culture

#### Mac conkey:

Péptone caséine .....	17g
Péptonede viande.....	3g
Lactose.....	10g
Mélange de sels bilaires.....	1.5g
Chlorure de sodium.....	5g
Rouge de neutre.....	0.03g
Les cristales violet.....	0.001g
Agar.....	13.5g
Ph.....	7.1

#### Muler-Hinton:

Extrait de viande de bœuf .....	2g
Peptone de casine.....	17.5g
Amidon de mais.....	1.5g
Agar.....	17g

#### PDA (Potato dextrose agar):

Pomme de terre.....	200g
Saccharose.....	10g
Agar.....	15g

## Annexes 2: Lecteur de la galerie API 20 E

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
ONPG	ortho-nitro-phenyl-galactoside	beta-galactosidase	incolore	jaune (1)
ADH	arginine	arginine dihydrolase	jaune	rouge/ orangé (2)
LDC	lysine	lysine décarboxylase	jaune	orangé
ODC	ornithine	ornithine décarboxylase	jaune	rouge/ orangé (2)
ICIT	citrate de sodium	utilisation du citrate	vert pâle/ jaune	bleu-vert / bleu (3)
H <sub>2</sub> S	thiosulfate de sodium	production d'H <sub>2</sub> S	incolore/ grisâtre	dépôt noir/ fin liséré
URE	urée	uréase	jaune	rouge/ orangé
TDA	tryptophane	tryptophane desaminase	TDR / immédiat	
			jaune	marron foncé
IND	tryptophane	production d'indole	JRMES/ immédiat ou IND/ 2 mn	
			JRMES incolore Vert pâle-jaune	JRMES rose
			IND jaune	IND Anneau Rouge
[VP]	pyruvate de sodium	production d'acétone	VP 1 + VP 2 / 10 mn	
			incolore	rosé-rouge
[GEL]	gélatine de Kohn	gelatinase	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	glucose	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
MAN	mannitol	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
INO	inositol	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
SOR	sorbitol	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
RHA	rhamnose	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
SAC	saccharose	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
MEL	melibiose	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
AMY	amygdaline	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
ARA	arabinose	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
OX	sur papier filtre	cytochrome-oxydase	OX / 1-2 mn	
			incolore	violet
NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	tube GLU	production de NO <sub>2</sub>	NIT 1 + NIT 2 / 2-3 mn	
			jaune	rouge
		réduction au stade N <sub>2</sub>	Zn	
			rouge	jaune
MOB	(RPI M) (microscope)	mobilité	immobile	mobile
MAC	milieu de MacConkey	culture sur	absence	présence
OF	glucose (RPI OF)	fermentation : sous huile oxydation : à l'air	vert	jaune jaune

## ملخص

إن عملنا هذا يندرج ضمن البحث عن عوامل جديدة مضادة للميكروبات في المستخلصات المائية و الميثانولية و الأستيونية في الجزء الهوائي لنبته البرجولاريا تومنتوزة و التي تنمو في منطقة ليشانة. إن التحليل الكيميونباتي للمستخلصات أثبت غناها بالفينولات المتعددة و الفلافونويدات و الدباغ و التاربانات. دراسة النشاط المضاد للميكروبات لمستخلصات البرجولاريا تومنتوزا أثبت أن لهذه المستخلصات نشاطا كبيرا مضادا للميكروبات و خاصة ضد الفصائل البكتيرية المدروسة.

كلمات مفتاحية: البرجولاريا تومنتوزا، نشاط مضاد للميكروبات، فينولات متعددة .

---

## Résumé

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouveaux agents antimicrobiens naturels dans l'extrait: aqueux, méthanolique, éthyle acétate et acétonique de la partie aérienne de la plante *Pergularia tomentosa* qui pousse dans la région de Lichana, le criblage phytochimique des extraits a été effectué et a montré une richesse en polyphénols, flavonoïdes, tanins et terpènes. L'étude de l'activité antimicrobienne d'extraits de *Pergularia tomentosa* a montré que ses extraits ont une activité antimicrobienne très importante plus particulièrement sur les différentes souches testées.

Mot clés : *pergularia tomentosa*, activité antimicrobienne, polyphénols

---

## Abstract

Our Work lies the scope of the search for new natural antimicrobial agent in the extract: aqueous, methanolic, ethyl acetate et l'acetone of the air part of the plant *Pergularia tomentosa* which pushes in the area of Lichana, the phytochimic sifting of the extracts was carried out and showed a high content in polyphenol flavonoids, tanins and terpenes. The study of the antimicrobial activity of extracts of *pergularia tomentosa* showed that its extracts more particularly have a very important antimicrobial activity on the various stocks tested.

Key words : *Pergularia tomentosa*, antimicrobial activity, polyphenol.