



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA –Bejaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique
Spécialité : Pharmaco-Toxicologie

Mémoire de fin de Cycle en vue de l'obtention du diplôme

Master

Thème :

*Activités antibactériennes des extraits de **Populus nigra**,
de **Clematis flammula** et de **Fraxinus angustifolia***

Réalisé par :

AIT EL HADJ SARAH

HASSANE WISSAME

Soutenu le : 15/ 09/ 2022

Devant le jury :

Président :	M Boudjouan Fares	MCB
Examinatrice :	Mme Bahloul-Cheraft Nassima	MCB
Promotrice :	Mme Ayouni Karima	MCB
Invitée :	Mlle Atia Amina	Doctorante

Année Universitaire : 2021/2022

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier Allah le tout miséricordieux de nous avoir donné la patience, le courage et la volonté qui nous ont permis d'accomplir ce travail de recherche.

*Nous tenons à présenter notre profond respect et notre reconnaissance à notre promotrice **Mme Ayouni Karima**, pour son encadrement fructueux, son suivi au cours de notre travail, pour les précieuses informations, conseils et moyens qu'elle a mis à notre disposition.*

*Nos sincères considérations sont également exprimées aux membres de jury : **M Boudjouan Fares** pour nous avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail, **Mme Bahloul-Cherafet Nassima** qui a accepté de faire partie du jury et de consacrer de leur temps pour examiner ce travail.*

*Nous adressons nos vifs remerciements à tout le personnel du laboratoire de Génétique de la faculté SNV pour toute l'aide qu'ils nous ont apportée lors de la réalisation de ce travail, en particulier : les doctorantes **Radia Kadi** et **Amina Atia** ainsi que l'ingénieur du laboratoire Melle **Naima Saidène**.*

Nos remerciements les plus chaleureux vont à nos parents, familles et amis

Sarah et Wissame

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

*A mes très chers et valeureux parents **Mohamed Akli** et **Salma** à qui je dois tout, notamment leurs encouragements tout au long de mes études, les mots ne suffisent pas pour exprimer ma reconnaissance envers eux.*

*Particulièrement à ma chère sœur **Lydia** et mon petit frère **Rabah**.*

En souvenir d'une enfance dont nous avons partagé les meilleurs et les plus agréables moments. Merci d'être toujours à mes côtés.

*A mon cher **Hamza** et sa famille plus précisément **Sabrina**, **Rahima** et **Souhila**.*

*A mes petites cousines **Asma** et **Youla**.*

*A tous mes proches surtout les deux familles **AIT EL HADJ** et **BENJAHIA**.*

*A mes très chères amies **Souad**, **Rabha**, **Taous**, **Ouiza**, **Thiziri** et **Kenza**, qui ont cru en moi et qui m'ont toujours encouragée et avec qui j'ai passé des moments inoubliables.*

*A ma chère binôme **Wissame** et toute sa famille, pour tous les merveilleux moments depuis notre connaissance.*

Sarah

Dédicace

Du plus Profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers ;

*A mon très cher père **Madjid** pour son soutien et sa confiance, que DIEU te protège et t'accorde santé et longue vie.*

*A mes frères ; **Boualem, Mouloud, Noureddine** et mes sœurs ; **Souad** et **Kamília**.*

*A ma chère grand-mère **Sultana** pour l'amour, la tendresse et le soutien que tu m'as apportée tout au long de ma vie et les valeurs que tu m'as enseignée. Tes prières m'ont accompagné tout au long de mes études. Puisse Dieu le tout puissant te procurer longue vie, santé, bonheur et prospérité.*

*Aux gens dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements : mes chères tantes et oncles ; **Fatiha Naïma, Djamila, Mohand** et **Aïssa**. Que ce mémoire soit comme une marque de reconnaissance et de gratitude.*

*A mes amies **Monia, Sylia, Nawal** trouvez dans ce travail mon estime et mon amour, merci d'avoir été toujours là pour moi.*

*A celui qui faisait confiance à mon succès, mon cher **Lyes** pour son amour et son soutien, je te dédie ce travail en témoignage de mon profond Amour.*

*A ma chère binôme **Sarah** et à toute sa famille*

*A la mémoire de mes deux anges ma mère **Fatima** et ma sœur **Rachida***

Et à tous ceux à qui ma réussite tient à cœur...

Wissam

Listes des abréviations

OMS : Organisation mondiale de la santé.

CHU : Centre Hospitalo-universitaire.

ATCC : American type culture collection.

DMSO : Diméthyle Sulfoxyde.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

PCA : Gélose Plate Count Agar

Liste des tableaux

Tableau I : Principaux parties de <i>Populus nigra</i> et leurs métabolites secondaires.....	03
Tableau II : Position systématique de <i>Populus nigra</i>	04
Tableau III : Position systématique de <i>Clematis flammula</i>	06
Tableau IV : Position systématique de <i>Fraxinus angustifolia</i>	08
Tableau V : Différents types de microorganismes.....	09
Tableau VI : Répartition des polyphénols, structures et caractéristiques.....	12
Tableau VII : Appareils et produits chimiques utilisés lors des manipulations	13
Tableau VIII : Références, caractères bactériologiques, critères et pouvoir pathogène des souches microbiennes utilisées.....	14
Tableau X : Diamètre des zones d'inhibition (mm) de l'activité antibactérienne d'extraits des bourgeons de <i>Populus nigra</i> , les feuilles de <i>Clematis flammula</i> et <i>Fraxinus angustifolia</i> vis-à-vis des neuf souches bactériennes.....	22
Tableau XI : Valeurs de la CMI des quatre extraits vis-à-vis les neuf souches bactériennes	28

Liste des figures

Figure 01 : Images de différentes parties du peuplier noir :(A) arbre entier (B) Feuilles (C) bourgeons.....	04
Figure 02 : Image de <i>Clematis flammula</i> et ses différentes parties.....	06
Figure 03 : Photographie de <i>Fraxinus angustifolia</i>	07
Figure04 : Mode d'action des antibiotiques	11
Figure 05 : Principe de la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu	16
Figure 06 : Photographie d'une microplaque 96 multipuits	19
Figure 07 : Histogramme présentant la teneur en polyphénols totaux en mg EAG/g MS de chaque extrait étudié.....	21
Figure 08 : Zones d'inhibition d'extrait de <i>Clematis flammula</i> et <i>Fraxinus angustifolia</i> vis-à-vis <i>Bacillus subtilis</i>	23
Figure 09 : Zones d'inhibition d'extrait de <i>Populus nigra</i> à 80% et 70 % d'éthanol vis-à-vis <i>Enterococcus faecalis</i>	23
Figure 10 : Zones d'inhibition d'extrait de <i>Clematis flammula</i> et <i>Fraxinus angustifolia</i> vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i>	23
Figure 11 : Zones d'inhibition d'extrait de <i>Populus nigra</i> à 80% et 70 % d'éthanol vis-à-vis <i>Pseudomonas sp</i>	23
Figure 12 : Présentation graphique des zones d'inhibition (mm) d'extrait de <i>Populus nigra</i> à 80% d'éthanol sur les 09 souches bactériennes testées	24
Figure 13 : Présentation graphique des zones d'inhibition (mm) d'extrait de <i>Populus nigra</i> à 70% d'éthanol sur les 09 souches bactériennes testées	25
Figure 14 : Présentation graphique des zones d'inhibition (mm) d'extrait de <i>Clematis flammula</i> sur les 09 souches bactériennes testées.....	25
Figure 15 : Présentation graphique des zones d'inhibition (mm) d'extrait de <i>Fraxinus angustifolia</i> sur les 09 souches bactériennes testées	26
Figure 16 : Exemple explicatif de la CMI des quatre extraits contre <i>Enterococcus faecalis</i> ..	27

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale..... 1

Partie théorique

Chapitre I : Revue bibliographique

I.1. Phytothérapie et description des matières végétales	3
I.1.1. Description de <i>Populus nigra</i>	3
I.1.1.1. Description botanique et composition chimique.....	3
I.1.1.2. Répartition géographique et position systématique	4
I.1.1.3. Usage thérapeutique et activités biologiques de <i>Populus nigra</i>	5
I.1.2. Description de <i>Clematis flammula</i>	5
I.1.2.1. Description botanique et position systématique.....	5
I.1.2.2. Composition chimique et distribution	6
I.1.2.3. Utilisations traditionnelles et effets thérapeutiques	7
I.1.3. Description de <i>Fraxinus angustifolia</i>	7
I.1.3.1. Description botanique et position systématique.....	7
I.1.3.2. Composition chimique et propriétés thérapeutiques	8
I.2. Microorganismes et activité antibactérienne	9
I.2.1. Classification des microorganismes selon Bergey.....	9
I.2.2. Mécanismes de résistances des microorganismes.....	9
I.2.3. Activité antibactérienne	10
I.2.3.1. Agents antibactériens.....	10
I.2.3.2. Mode d'action des agents antibactériens	11
I.2.4. Métabolites secondaires et leurs activités antibactériennes.....	11
I.2.4.1. Polyphénols.....	12

Partie pratique

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Matériel.....	13
II.1.1. Appareils et produits chimiques	13
II.1.2. Préparation des extraits de <i>P. nigra</i> , <i>F. angustifolia</i> et <i>C. flammula</i>	13
II.1.3. Souches bactériennes utilisées.....	14
II.2. Méthodes.....	16
II.2.1. Dosage des polyphénols (Folin-Ciocalteu)	16
II.2.2. Test d'activité antibactérienne des extraits	17
II.2.2.1. Test de diffusion sur disque (Sur milieu solide).....	17
II.2.2.1.1. Stérilisation du matériel	17
II.2.2.1.2. Préparation du milieu de culture et les dilutions des extraits	17
II.2.2.1.3. Repiquage, revivification des souches bactériennes et préparation d'inoculum bactérien	18
II.2.2.1.4. Ensemencement et dépôts des disques	18
II.2.2.2. Méthode de microdilution (Sur milieu liquide).....	19

Chapitre III : Résultats et discussion

III. 1. Résultats des dosages des polyphénols totaux.....	21
III.2.1. Pouvoir antibactérien des extraits sur milieu solide.....	22
III.2.2. Pouvoir antibactérien des extraits sur milieu liquide	26
III.3. Discussion générale.....	29
Conclusion et perspectives	33
Références bibliographiques	34

Annexes

Introduction générale

Introduction générale

Anciennement, avant que l'humanité n'ait découvert l'existence des microorganismes, l'idée que certaines plantes avaient un potentiel curatif et préventif a été bien accordée en tant que nouveaux agents thérapeutiques alternatifs (**Rios et Recio, 2005**).

Selon l'OMS, la phytothérapie ou la thérapie par les plantes est considérée comme une médecine non conventionnelle et traditionnelle du fait de l'absence d'étude clinique (**Azalenko, 2005**). Ces plantes dites médicinales jouent un rôle crucial dans le soulagement et le traitement de différentes pathologies et maladies humaines (**Landoulsi et al., 2018**). Les plantes médicinales ont l'aptitude de synthétiser des milliers de composés naturels bioactifs appelés métabolites secondaires, tels que les polyphénols, les alcaloïdes et les terpènes. Plusieurs études ont mis en évidence la présence et la diversité des activités de ces métabolites secondaires (**Bruneton, 1999 ; Haddouchi et al., 2016**), ils constituent donc un immense réservoir de composés d'une grande diversité chimique, possédant un large éventail d'activités.

Les bactéries sont des organismes microscopiques, elles font partie des premières formes de vie connues sur terre. Diverses infections et maladies sont provoquées par les microorganismes dues à leur pathogénicité et leurs croissances rapides, elles peuvent avoir de graves conséquences sur la santé humaine. Le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques a conduit les chercheurs à réaliser de nombreuses études et attestent des propriétés antibactériennes de certaines plantes ou substances naturelles « antibiotiques naturels », capables de lutter efficacement contre les bactéries qui tuent ou empêchent leurs croissances (**Boudjouref, 2011**).

Au fil du temps, les plantes médicinales sont appréciées et connues dans plusieurs régions du monde due à leur efficacité (**Djeddi et al., 2015**). Parmi ces plantes nous citons *Populus nigra*, *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia* qui sont traditionnellement utilisés pour leurs divers effets thérapeutiques et propriétés biologiques. Dans le but de continuer à explorer les vertus médicinales de ces matrices végétales, nous avons réalisé ce présent travail pour estimer la teneur de ces trois espèces végétales en leurs composés actifs essentiels « les polyphénols » et évaluer leur pouvoir antibactérien.

Le phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques est du en grande partie à la prescription massive d'antibiotiques par les médecins et leur mauvaise administration. Ces dernières années, de profonds changements ont marqué les connaissances en microbiologie médicale, spécialement le nombre croissant de microorganismes impliqués dans les processus

Introduction générale

pathologiques et la résistance aux traitements appliqués. Ces différentes difficultés ont suscité notre intérêt pour la recherche d'autres substances antibactériennes pouvant constituer une solution alternative plus efficaces contre les résistances aux antibiotiques ayant moins d'effets secondaires que les antibiotiques et moins onéreux.

Pour ce faire, ce mémoire est subdivisé en deux grandes parties :

- ✓ La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique regroupant des généralités sur la phytothérapie et les plantes médicinales aussi sur la description des plantes choisies, ainsi qu'un aperçu sur l'activité antibactérienne.
- ✓ La deuxième partie est dédiée à la partie expérimentale à savoir la présentation du matériel et des protocoles expérimentaux utilisés, le processus d'extraction, l'analyse phytochimique des extraits est basée principalement sur la qualification et la quantification des composés phénoliques, ainsi que la recherche de leurs activités antibactériennes suivies des résultats des différents tests effectués ainsi qu'une discussion générale.

Chapitre I :
Revue bibliographique

I.1. Phytothérapie et description des matières végétales

"La phytothérapie est un mot d'origine grecque qui se compose étymologiquement de deux racines : phuton qui signifie « plante » et thérapie qui signifie « traitement »". Elle correspond à l'utilisation de plantes dites "médicinales" pour traiter ou prévenir les maladies et les pathologies bénignes. Cette pratique est ancestrale et répandue dans le monde entier ; nous distinguons deux types de phytothérapies traditionnelle et clinique (**Gayet, 2013**).

Selon la pharmacopée française d'après sa Xème édition : "les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses" (**Debuigne, 1974**), ses parties telles que la feuille ou l'écorce contient une ou des substances pouvant être utilisé à des fins thérapeutiques en possèdent des vertus curatives (**Abayomi, 2010**).

I.1.1. Description de *Populus nigra*

I.1.1.1. Description botanique et composition chimique

Populus nigra est une espèce dioïque, pionnière, c'est un arbre de grande taille qui peut atteindre 25 à 30 m de hauteur et capable de vivre jusqu'à 150 ans (**Marnotte et al., 2006**). Il fleurit au début du printemps (mars-avril) et affectionne les lieux humides et s'épanouit dans la lumière et aux endroit riches en végétations (**Jerkovic et al., 2003**).

Tableau I : Principaux parties de *Populus nigra* et leurs métabolites secondaires.

La partie de l'arbre	Description	Métabolite secondaire	Références
Ecorce	Brune et plutôt sombre parfois presque noire Allant jusqu'à 2 m de diamètre	Contient des phénols glycosides, la salicine et populin (salicine benzoate) qui cause l'élimination de l'acide urique. Les tanins sont également présents (5-9 %)	(Khare, 2007) (Siler et al., 2014 ; Merghache et al., 2016)
Bourgeons	Petits et collés aux rameaux, glabres et visqueux	Contiennent un glucoside : le populoside benzoylosalicoside. Ils sont très riches en salycates, en acides phénoliques et en flavonoïdes	(Goetz, 2011) (Siler et al., 2014 ; Merghache et al., 2016)
Les feuilles	Denticulées, vertes et glabres sur les deux faces de forme triangulaire à losangique	Glucoside de salicylé, Béta-caryophyllène et des composés volatiles	(Jerkovic' et al., 2003) (Siler et al., 2014 ; Merghache et al., 2016)

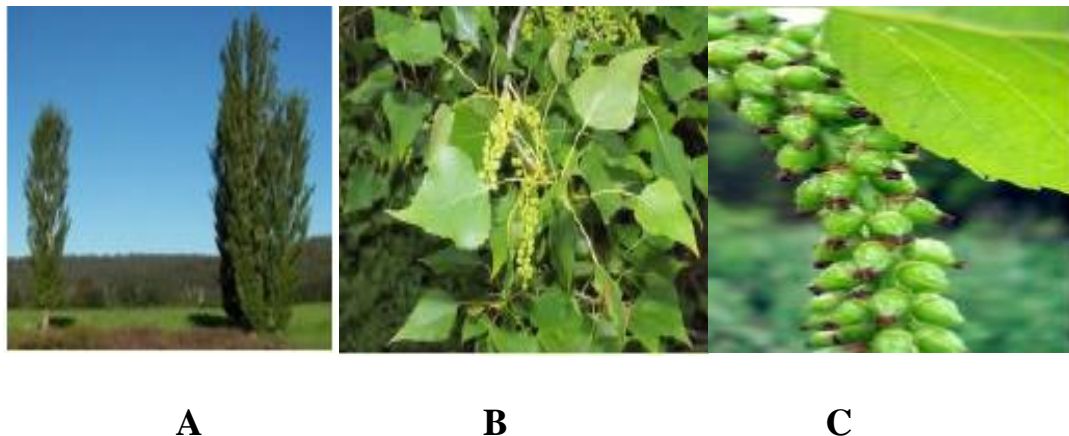


Figure 01 : Images de différentes parties du peuplier noir :(A) arbre entier (B) Feuilles (C) bourgeons (Siler et al., 2014).

I.1.1.2. Répartition géographique et position systématique

L'aire de répartition du peuplier noir est vaste, il pousse en Afrique du nord (Maroc, vallée du haut Atlas), notamment en Algérie il se répartit surtout en montagnes, commun à El Kala, la Kabylie et Tlemcen (Beloued, 1998), elle s'étend à travers le sud de l'Europe jusqu'à l'Asie centrale, en Sibérie et en Amérique du Nord (annexe 01) (Häne and Dobbertin, 2006). La position systématique de *Populus nigra* est rapportée dans le **tableau II**.

Tableau II : Position systématique de *Populus nigra* (Siler et al., 2014)

Règne	Végétal
Sous-règne	Eucaryotes
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Salicales
Famille	Salicacées
Genre	<i>Populus</i>
Espèce	<i>Populus nigra</i>

Populus nigra est connu sous divers noms vernaculaires à savoir : Peuplier noir, Peuplier noir européen, Peuplier franc, Liard, Liardier, Bioule (en français), *Black Poplar* (en anglais), Sefsaf (en arabe) et *Asgarsif* (en berbère).

I.1.1.3. Usage thérapeutique et activités biologiques de *Populus nigra*

Puisque la composition du peuplier noir est riche en divers composés et connu pour ses vertus médicinales, ceci lui confère plusieurs activités biologiques (**Dudonné et al., 2011**). La partie la plus utilisée en phytothérapie est les bourgeons suite à leur abondance en métabolites secondaires (**Siler et al., 2014**). Les bourgeons sont impliqués contre diverses affections douloureuses, maladies chroniques des poumons et des voies urinaires, la toux et les rhumatismes chroniques (**Häne et Debbertin, 2006**).

➤ **Activité anti inflammatoire**

Une étude réalisée par **Zhang et ses collaborateurs en 2006** a montré que les extraits de plusieurs espèces de *Populus* ont une activité anti inflammatoire due à la richesse en flavonoïdes et en salicylates.

➤ **Activité anti oxydante**

Les effets antioxydants de *Populus* sont essentiellement attribués aux polyphénols majeurs et aux flavonoïdes (**Neacsu et al., 2007**), comme l'ont montré les travaux de **Dudonné et al., (2011)** que l'extrait aqueux des bourgeons de *Populus nigra* est doté d'une activité antioxydante.

➤ **Activité antalgique et antiseptique**

La décoction de l'écorce du genre de *Populus* est adoptée comme un remède auprès des douleurs (**Zhang et al., 2006**), les extraits à base des bourgeons de nombreuses espèces du *Populus* est employée pour le traitement des plaies et des ulcères due au phénol et flavonoïdes (**Isidorov et al., 2008**).

I.1.2. Description de *Clematis flammula*

I.1.2.1. Description botanique et position systématique

Clematis flammula est une plante indigène, volubile à feuilles caduques composées de 3 à 7 folioles étroites, portées par de longs pétioles, ses tiges grêles, grimpantes ou rampantes

s'allongent parfois jusqu'à 5 m, tandis que la vigne ligneuse porte des fleurs blanches parfumées de juillet à septembre (Kumar et al., 2008 ; Guesmi et al., 2019)



Figure 02 : Image de *Clematis flammula* et ses différentes parties [1]

La position systématique de *Clematis flammula* est présentée dans le **tableau III**.

Tableau III : Position systématique de *Clematis flammula* (Keener et al., 1982)

Règne	Plantae
Sous- règne	Trachéophytes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Ranunculales
Famille	Ranunculaceae
Genre	Clematis
Espèce	<i>Clematis flammula</i>

Clematis flammula est connue sous divers noms à savoir : Clematite flammette, Clematite brulante (en français), *Sweet scented virgin's bower* (en anglais), *Nard barda* et *Yasmine bari* (en arabe), *Azenzou* (en berbère).

I.1.2.2. Composition chimique et distribution

Clematis flammula est l'un des genres les plus étendus des Ranunculaceae et comprend environ 350 espèces, elles sont répandues dans le sud de l'Europe et du nord de l'Afrique et cultivées localement dans la région médiane des deux hémisphères, avec certaines espèces diffusées dans les zones tropicales (Tamura, 1995). Le genre de clématite est connu comme

une riche source des saponines triterpénoïdes, la ranunculine et ses dérivés, les flavonoïdes, les polyphénols et les acides organiques... (Chawla *et al.*, 2012).

I.1.2.3. Utilisations traditionnelles et effets thérapeutiques

Cette plante est considérée comme un agent anti-inflammatoire utilisé en médecine traditionnelle. Sa saveur lui permet d'être comme ingrédient dans de nombreux types de plats traditionnels et ses qualités antalgiques recommandées pour les femmes qui viennent d'accoucher. Les parties fraîches des clématites sont largement utilisées en dermatologie, la sciatique et les rhumatismes (Bellakhdar, 1997 ; Rivera Núñez *et al.*, 2008). Ainsi utilisées pour traiter de nombreux maux, en particulier l'arthrite, les brûlures superficielles et même le cancer (Atmani *et al.*, 2011). Le criblage phytochimique des espèces de *Clematis* a montré des activités antioxydantes (Mushtaq *et al.*, 2013 ; Hemlata *et al.*, 2016). Les extraits éthanoliques de *Clematis flammula* montre une activité antifongique et anti-biofilm prometteuse contre *Condidat albicans*. Ces extraits ont pu empêcher à la fois la formation et le développement du biofilm en empêchant l'adhésion et la croissance du tube germinatif et allongement des hyphes (Ourabah *et al.*, 2019).

I.1.3. Description de *Fraxinus angustifolia*

I.1.3.1. Description botanique et position systématique

Fraxinus angustifolia dont le nom commun est le *Frêne oxyphylle*, est un arbre majestueux de hauteur moyenne de 15 à 25 m. Ses feuilles sont caduques, opposées parfois alternées souvent à fleurs odorantes (Moulaoui *et al.*, 2015) sans pétales ni septales. La période de floraison est en mois de mars et mai (Beloued, 2009). Il appartient à la famille des Oléacées et pousse dans la région méditerranéenne, l'ouest de l'Asie jusqu'à l'ouest de l'Iran (Caudullo et Durrant, 2016). La position systématique est illustrée dans le **tableau IV**.



Figure 03 : Photographie de *Fraxinus angustifolia* et ses différentes parties [2]

Tableau IV : Position systématique de *Fraxinus angustifolia* (Wallander, 2001).

Règne	Végétal
Groupe	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Astérides
Ordre	Oléales
Famille	Oléacées
Genre	Fraxinus
Espèce	<i>Fraxinus angustifolia</i>
Sous-espèce	<i>Angustifolia</i>

I.1.3.2. Composition chimique et propriétés thérapeutiques

Cet arbre est une source importante de composés chimiques, il est riche principalement en tanins, sécoiridoïdes et en phénylétanoïde. Nous notons aussi la présence de coumarine, lignane et flavonoïdes (Kostova et Iossofova, 2007), Ce qui explique ses multiples propriétés biologiques, utilisée dans le traitement de plusieurs maladies depuis très longtemps.

- **Effet diurétique** : l'extrait de feuilles de *Fraxinus* facilite l'excrétion rénale due à la présence des flavonoïdes (Casadebaig et al., 1989).
- **Activité antioxydante** : les études effectuées par Meyer et ses collaborateurs ont prouvé que cet effet est dû à la présence des antioxydants et des constituants coumariniques (Marinova et al., 1994).
- **Activité anti inflammatoire** : due à la présence des polyphénols principalement les flavonoïdes qui sont des puissants inhibiteurs de la cyclooxygénase et la lipoloxogénase : enzymes responsables de phénomène inflammatoire (Strehl et al., 1995).
- **Activité antivirale** : contre le virus de la grippe, le virus de la maladie de Newcastle (NDV) et les pseudovirus (Galabov et al., 1996).
- **Activité antimicrobienne** : une étude sur la composition des isolats volatiles des feuilles et des graines de *Fraxinus* contient on particulier le docosane méthyl, le n-pentacosane et le T-mnurolol responsable de potentiel antimicrobien (Zouaghi et al., 2021).

I.2. Microorganismes et activité antibactérienne

Les microorganismes sont des cellules vivantes microscopiques de type procaryote, invisibles à l’œil nu, qui se trouve partout dans l’environnement. Ces microorganismes capables de franchir l’organisme humain et de s’y multiplier ce qui provoque plusieurs pathologies (Yahiaoui, 2015).

I.2.1. Classification des microorganismes selon Bergey

Selon Bergey, les bactéries sont classées selon la présence de la paroi et sa nature, que l’on peut déterminer grâce à la coloration de Gram (Annexe 03) (Yahiaoui, 2015).

Tableau V : Différentes classes des microorganismes (Yahiaoui, 2015).

		Bactéries				Champignons	
		Gram négatif	Gram positif	Mycoplasme	Archaeobactéries	Levure	Moisissures
Caractéristiques		Paroi simple formée de peptidoglycane entre la membrane externe et la membrane cytoplasmique	Paroi simple formée de peptidoglycane	Eubactéries sans paroi	Pas de paroi Dans des conditions de vie extrêmes	unicellulaires, de forme arrondie, ovale ou même triangulaire	Champignons filamenteux de forme mycélienne pluricellulaires et parfois coénocytiques
	Exemples	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Halobacterium</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Dictyostellium discoïdum</i>

I.2.2. Mécanismes de résistances des microorganismes

La résistance aux antibiotiques peut être naturelle et due à un changement ou une mutation des gènes de la bactérie (Hooper, 2000) ou acquise qui se manifeste par l’acquisition des gènes de résistance présents dans d’autres bactéries (Liebet et al., 2000). Plusieurs mécanismes d’action ont été cités qui sont : Imperméabilité de la membrane ; altération des précurseurs cibles de la paroi, des enzymes cibles et des ribosomes cibles ; les pompes d’efflux ; l’inhibition enzymatique (Allen et al., 2006).

I.2.3. Activité antibactérienne

Depuis l'antiquité, les plantes médicinales ont été des sources précieuses pour la médecine traditionnelle dans le traitement d'un large éventail de maladies notamment des maladies infectieuses. Cependant, c'est jusqu'au début du 20ème siècle que les scientifiques commencent à s'y intéresser (**Haddouche, 2008**). De plus en plus les microorganismes, notamment les bactéries, développent une résistance contre les antibiotiques, ce qui a conduit les scientifiques à chercher de nouvelles substances biologiquement actives en suivant différentes approches, particulièrement l'approche systématique des microorganismes ou des plantes médicinales (**Sagdic et al., 2002**).

Par définition, l'activité antibactérienne correspond à l'effet d'une molécule ou composé qui à une certaine concentration inhibe la croissance d'une bactérie ou la détruit. La sensibilité de la bactérie vis à vis de l'agent antibactérien varie selon la nature de ce dernier et la souche bactérienne (**Nicolase et Daniel, 1998**).

I.2.3.1. Agents antibactériens

Un agent antibactérien se définit par sa capacité de causer la mort cellulaire des microorganismes pathogènes ou inhiber leur croissance et prolifération. Les agents antibactériens sont classés selon leurs effets : on trouve des agents dits bactéricides, qui détruisent les bactéries, et des agents dits bactériostatiques qui inhibent leur croissance (**Fleurette et Freney, 1995 ; Pibiri, 2006**). On distingue différents agents antibactériens :

- **Les antibiotiques** : Ce sont des substances distinguées à agir sur les microorganismes, la plupart sont de nature synthétique ou semi synthétique (**Gogny et al., 2001**). Ils exercent leurs activités en fonction de la cible désirée, ils se fixent sur cette dernière et perturbent la physiologie bactérienne (**Ogawara, 1981**).
- **Les substances naturelles** : De nombreux chercheurs ont démontré le pouvoir antibactérien de certaines substances tels que les polyphénols, surtout les flavonoïdes et les tannins, ils possèdent une toxicité contre les microorganismes liée à l'inhibition des enzymes hydrolytiques ou d'autres interactions pour empêcher le développement cellulaire (**Cowan, 1999**).

I.2.3.2. Mode d'action des agents antibactériens

Les molécules à activité antibactérienne comme les antibiotiques, agissent spécifiquement sur des cibles moléculaires perturbant une étape essentielle du métabolisme des bactéries.

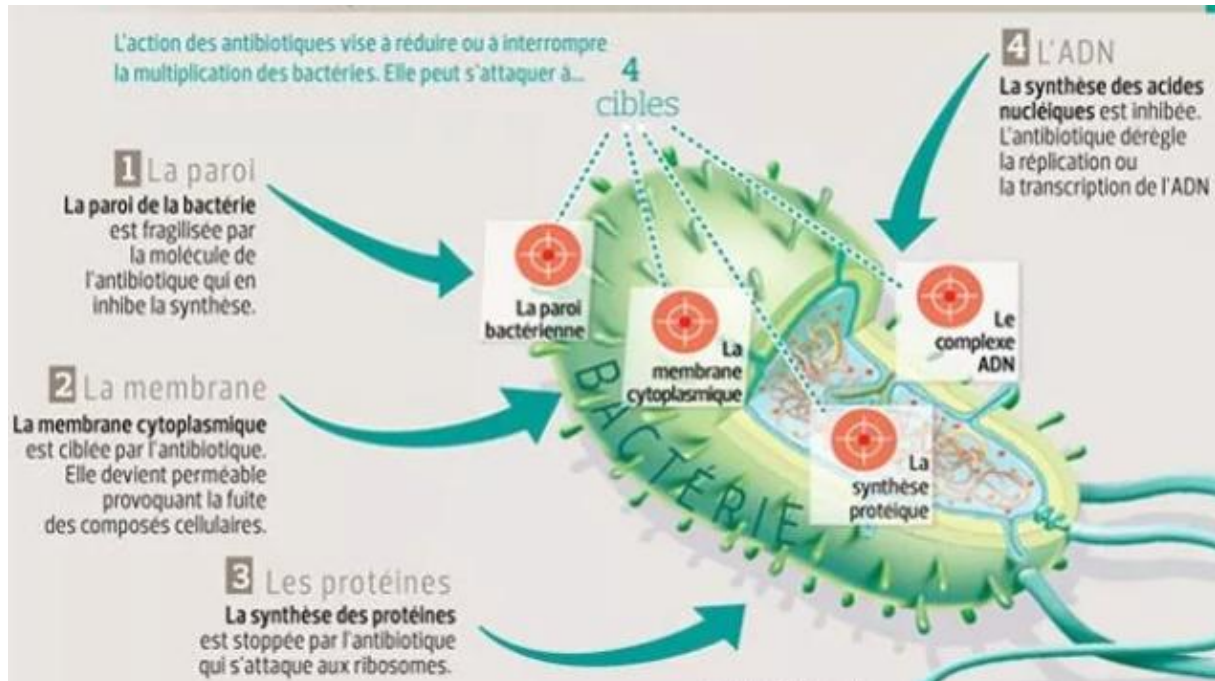


Figure 04 : Schéma récapitulatif des mécanismes d'action des antibiotiques (Pibiri, 2006).

I.2.4. Métabolites secondaires et leurs activités antibactériennes

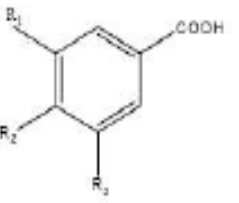
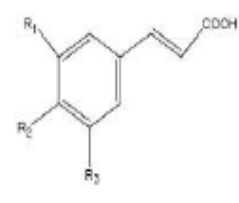
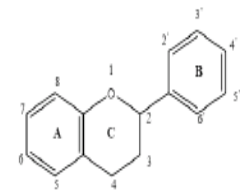
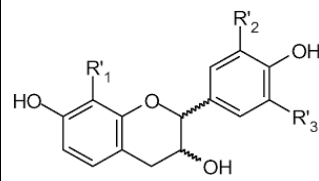
Ce sont des composés phytochimiques et des molécules organiques synthétisés par les plantes autotrophes (Lutge et al., 2002 ; Abderrazak et Joël, 2007). Pharmacologiquement, les métabolites secondaires constituent la partie la plus importante, environ 1/3 des médicaments utilisés contiennent au moins une de ces matières végétales (Newman et Cragg, 2012). Les métabolites secondaires appartiennent à trois grandes familles chacune renferme une très grande diversité de composés qui possèdent des activités biologiques (Krief, 2003).

- Les alcaloïdes
- Les terpénoïdes et leurs dérivés.
- Les composés aromatiques ou polyphénols (acides phénoliques, flavonoïdes, b-anthocyanidines, tanins) et les quinones (Merghem, 2009).

I.2.4.1. Polyphénols

Ce sont des métabolites secondaires, d'un poids moléculaire élevé compris entre 500 et 3000 Da (Chira *et al.*, 2008), leur structure est caractérisée par la présence d'un ou plusieurs noyaux aromatiques liés un ou plusieurs groupement hydroxyle (OH) (Harborne, 1994). Les polyphénols sont répartis selon leur structure en trois catégories principales : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins (Balasundramet *al.*, 2006 ; Edeas, 2007).

Tableau VI : Répartition des polyphénols, structures et caractéristiques.

	Acides phénoliques		Flavonoïdes	Tanins
	Acide hydroxybenzoïque	Acide hydroxycinnamique		
Structure				
Caractéristiques	Ils possèdent au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique, dérivés des acides benzoïques (C6-C1) ou des acides cinnamiques (C6-C3), ils sont incolores et plutôt rares dans la nature.		Ils ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C).	Leur structure est complexe formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques et leur degré d'oxydation, sont biosynthétiques divisés en deux catégories : les tanins hydrolysables et les tanins condensés.
Références	(Haslam 1994). (Cai <i>et al.</i> 2006) (Chira <i>et al.</i> , 2008)		(Macheix <i>et al.</i> , 2005) (Emerenciano <i>et al.</i> , 2007).	(Hemingway, 1992). (Paolini <i>et al.</i> , 2003). (Naczka et Shahidi, 2004)

➤ L'objectif de ce travail

Ce présent travail a pour objectif, la valorisation des bourgeons de l'espèce *Populus nigra* et les feuilles des deux plantes *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia*. Il a été réalisé au Laboratoire de Biochimie Appliquée de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université de Bejaïa.

Chapitre II :

Matériel et méthodes

Dans cette partie expérimentale, nous nous sommes intéressés aux extraits hydro-alcooliques de ces trois plantes, le dosage de leurs teneurs en polyphénols dans un premier temps ensuite évaluer leur pouvoir antibactérien vis-à-vis de neuf différentes souches bactériennes en un deuxième temps.

II.1. Matériel

II.1.1. Appareils et produits chimiques

Tableau VII : Appareils et produits chimiques utilisés.

Appareillage et matériel	Solvants et réactifs Chimiques
Bec bunsen, Autoclave, Etuve, Tubes, Flacon pour milieu de culture, Boîtes de Pétri, Pipettes Pasteur, Anse de platine, Ecouvillons de prélèvement, Balance de précision, Dessicateur, Vortex, Sonicateur, Centrifugeuse, Broyeur électrique, spectrophotomètre UV-visible 1800 (longueur d'onde [190nm -1100 nm]), Tamiseuse, Rotavapeur, Lecteur micro plaque.	Alcool, Eau distillée, NaCl, chlorure de baryum, Acide sulfurique, Diméthylsulfoxyde (DMSO), Folin Ciocalteu, carbonate de sodium. Bouillon nutritif, gélose nutritive, bouillons Muller Hinton, Gélose Muller Hinton.

II.1.2. Préparation des extraits de *P. nigra*, *F. angustifolia* et *C. flammula*

Les bourgeons de *Populus nigra*, les feuilles *Clematis flammula* ont été récolté (en juillet 2020) dans la forêt de province de Tizi Neftah à Amizour, Béjaia. Les feuilles de *Fraxinus angustifolia* ont été récoltées (en juillet 2020) dans la forêt d'Akfadou, Chemini, Bejaia. Ces matrices végétales ont été séchés à l'étuve (37°C), afin d'éliminer toute trace d'humidité puis broyés à l'aide d'un broyeur électrique, ensuite tamisé par une tamiseuse électrique pour obtenir une poudre très fine (63µm) dans le but d'optimiser l'extraction. La poudre a été stockée à l'abri de la lumière et l'humidité dans des flacons en verre fermés. Le protocole d'extraction adopté est celui d'une extraction solide-liquide.

Les extraits des bourgeons de *Populus nigra* et ceux des feuilles de *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia* étudiés dans le présent travail ont été préalablement préparés au niveau du laboratoire de Biochimie Appliquée, comme suit : A partir des poudres fines sèches délipidés à l'éther, l'extraction par épuisement a été menée par le procédé Soxhlet (**Annexe 03**) avec l'éthanol (80%), dans l'objectif d'optimiser l'extraction des métabolites bioactifs, particulièrement les composés phénoliques.




L'extrait récupéré a été séché par rotavapeur pour éliminer l'éthanol, ensuite congelé à -80°C, pour continuer le séchage de la fraction aqueuse par lyophilisation.




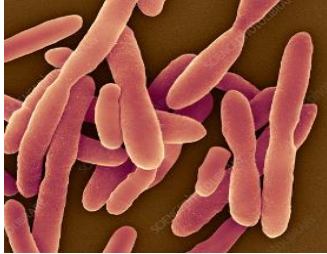


Par ailleurs, les bourgeons de *Populus nigra* ont subi un deuxième type d'extraction qui est une macération dans l'éthanol (70%) sous sonicateur (ultrasons pendant 15 min à 40°C), avec un rapport de matière sèche solvant de 1/6 : m/v (**annexe 04**). Une filtration a suivi pour sécher les filtrats au rotavapeur.

II.1.3. Souches bactériennes utilisées

Les tests antibactériens ont été testés sur neuf souches bactériennes responsables de différentes maladies et pathologies, délivrées par le CHU de Bejaïa. Les bactéries étudiées, leurs références selon l'American type culture collection (ATCC) et quelques critères sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau VIII : Références, caractères bactériologiques, critères et pouvoir pathogène des souches bactériennes utilisées :

Souches bactériennes	Caractères bactériologiques	Critères et pouvoir pathogène
<p><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p> 	Gram négatif	<p>-Un bacille appartenant à la famille des entérobactériaseae, il est de 2 à 4µm de long et un diamètre d'environ 0,6µm (Anonyme, 2003)</p> <p>-Infections intestinales (entérites, diarrhées) et extra intestinales (infections urinaires, septicémies, méningites) (Hacker, 1992)</p>
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</p> 	Gram négatif	<p>-Un bacille non sporulant présent dans les sols, les plantes, les habitats aqueux et les environnements humides (Faure et al., 2008). est une mésophile qui a de 1 à 5 µm de long et 0,5 à 1µm de large (Vasil, 1986).</p> <p>-Responsable d'infections nosocomiales graves et d'infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose (Woods et al., 1997).</p>
<p><i>Klebsiella pneumoniae</i></p> 	Gram négatif	<p>-Un pathogène à fort potentiel, le plus souvent est isolée en milieu hospitalier (Michel-Briand et al., 2002).</p> <p>-Infections pulmonaires, septicémies et nosocomiales (urinaires, intra-abdominaux) (Cypierre et al., 2020).</p>

<p><i>Salmonella sp</i> ATCC 700603</p> 	<p>Gram négatif</p>	<p>-<i>Salmonella</i> fait partie de la famille des enterobacteriaceae, très pathogène (Rodier et al., 2009).</p> <p>-Fièvre typhoïde et des gastro-entérites (Berends et al., 1996)</p>
<p><i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212</p> 	<p>Gram positif</p>	<p>-Les entérocoques sont des bactéries non sporulées qui se présentent sous forme de coques isolés ou arrangés en paires ou en chaînettes, aussi sont des bactéries ubiquistes, (Beargie et al., 1975 ; Schloissnig et al. 2013)</p> <p>-Peuvent entraîner des infections des voies urinaires, des plaies et des tissus mous (Zhang et al., 2005)</p>
<p><i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606</p> 	<p>Gram négatif</p>	<p>-Ce sont des coccobacilles, immobiles, souvent regroupées en diplocobacilles, Ce sont des aérobies stricts souvent en capsulées (Avriljl et al., 2000).</p> <p>-Il est responsable de différents types d'infections, majoritairement pulmonaires ou bactériémiques (Joly-Guillon et al., 1993)</p>
<p><i>Pseudomonas sp</i></p> 	<p>Gram négatif</p>	<p>-Il appartient à la famille des Pseudomonaceae. bactéries sous forme de bâtonnets, non sporulant, elles sont aérobies obligatoires, mésophile et chimioorganotrophe (Cook et al., 1996) .</p> <p>- Envahissent souvent le tissu de leurs hôtes et causent une infection et une bactériémie chez les hôtes immunodéprimés (Tanner et al., 1983).</p>
<p><i>Bacillus subtilis</i></p> 	<p>Gram positif</p>	<p>-Une bactérie ubiquitaire du sol (Zhu, 2018). Ils provoquent une intoxication alimentaire et servent à repeupler la flore intestinale (Harwood, 1992).</p>
<p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p> 	<p>Gram positif</p>	<p>- Il se regroupe en amas ayant la forme de grappes de raisin, de 0,8 à 1µm de diamètre, immobiles, non sporulés, (Konrad, 2009). Responsable d'infection cutanées : furoncles, panaris et abcès, infections nosocomiales et infections ORL (Oto-rhino-laryngologie) : otites et sinusites (Vincenot et al., 2008).</p>

II.2. Méthodes

II.2.1. Dosage des polyphénols (Folin-Ciocalteu)

Plusieurs méthodes analytiques ont été rapportées pour la quantification des polyphénols, la plus utilisée est l'analyse par le réactif de Folin-Ciocalteu, adoptée par **Kähkönen et al., (1999)**. Le réactif de Folin-Ciocalteu est composé de l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et l'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_2O_{40}$), en présence de polyphénols, il se réduit en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}). La couleur bleue formée reflète la présence des polyphénols, dont l'intensité de cette couleur est proportionnelle au taux de ces composés phénoliques présents dans l'échantillon (**Ribéreau-Gayon, 1968**). La quantité de polyphénols est exprimée en μg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (μg GAE/mg).

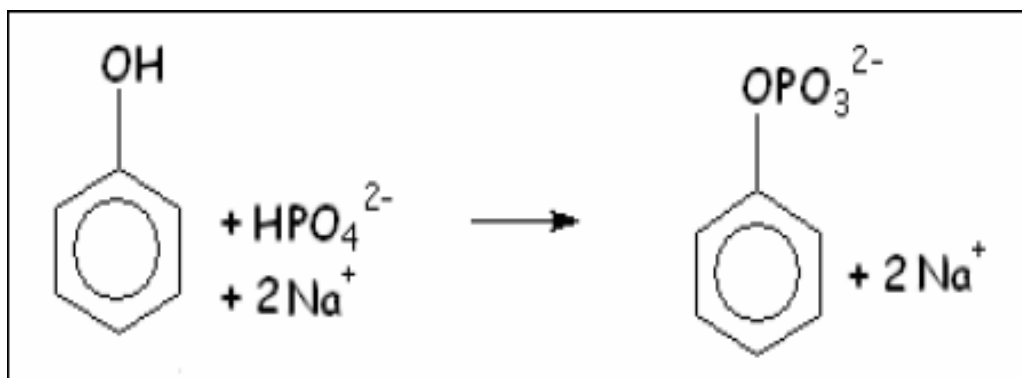


Figure 05 : Principe de la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu (**Bouba, 2009**)

Le protocole de cette méthode est le suivant : tout d'abord on mélange 200 μL d'extrait avec 1 ml du réactif de Folin Ciocalteu (1N), après 5 min on ajoute 0,8 ml de carbonate de sodium ($Na_2 CO_3$) à concentration de 75g/l (7,5%), (on fait 3 essais pour chaque extrait). Les mélanges préparés seront incubés à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 min, enfin la lecture se fait par mesure de l'absorbance au spectrophotomètre à 760 nm. Une courbe d'étalonnage (à 760nm) est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations initiales.

II.2.2. Test d'activité antibactérienne des extraits

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits des bourgeons de *Populus* et les feuilles de *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia* a été effectuée par deux méthodes :

- **Méthode de diffusion sur disque (milieu solide).**
- **Méthode de microdilution sur milieu liquide.**

II.2.2.1. Test de diffusion sur disque (sur milieu solide)

Le principe de cette technique repose sur la diffusion en milieu solide (gélifié), dans une boîte Pétri décrite par (Lesueur et *al.*, 2007 ; Kaloustian et *al.*, 2008 ; Vinod et *al.*, 2010 ; Meddour et *al.*, 2013)

II.2.2.1.1. Stérilisation du matériel

Tout le matériel utilisé durant la manipulation, l'eau distillée, les milieux de culture, l'eau physiologique, les tubes à essai et les disques en papier Wattman ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

II.2.2.1.2. Préparation du milieu de culture et les dilutions des extraits

➤ Milieu de culture

Nous avons préparé plusieurs milieux de culture : la gélose Nutritive, gélose Mueller Hinton et le bouillon nutritif, qui seront ensuite coulé en fusion dans les boîtes de Pétri de façon à obtenir une épaisseur de 3mm, puis les laisser refroidir et solidifier (**annexe 05**)

➤ Dilutions des extraits

Pour chaque extrait brut de *Populus nigra*, *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia*, 50 mg ont été dissous dans 0,5 ml de DMSO et 2 ml d'eau distillée stérile, puis ont été mis dans un sonicateur pour la dissolution d'extrait par l'effet mécanique d'onde ultrasonore (0.45MHz). Finalement, le mélange a été filtré par des filtres à seringue pour éliminer les impuretés particulières de probable contamination bactérienne.

II.2.2.1.3. Repiquage, revivification des souches bactériennes et préparation de l'inoculum bactérien**➤ Repiquage des bactéries**

Dans des conditions stériles, on a prélevé une colonie isolée à l'aide d'une anse en platine, puis décharger dans tube stérile contenant un bouillon nutritif et ensuite les incuber dans l'étuve à 37°C pendant 18h.

➤ Revivification et réactivation des bactéries

Après 18h d'incubation, en utilisant une pipette pasteur stérile on a prélevé dans le bouillon nutritif contenant les bactéries, puis des gouttelettes de suspension bactérienne sont ensemencées en stries dans des boîtes de Pétri, préalablement coulées de gélose nutritive, et ensuite cultivé dans l'étuve à 37°C pendant 24h (**annexe 06**), pour optimiser leur croissance. Si les nouvelles cultures obtenues sont représentatives de celle reçues initialement (culture pure), on procède à la préparation de l'inoculum.

➤ Inoculum bactérien standard

Après 24 h d'incubation, on racle à l'aide d'une anse de platine des colonies bien isolées. Décharger l'anse dans l'eau physiologique, puis agiter au vortex. Les concentrations microbiennes sont évaluées par turbidité et doit eut être diluées de telle façon que la densité optique mesurée sur un spectrophotomètre à 630 nm soit comprise entre (0,08-0,1) nm, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ($1,5 \cdot 10^7$ UFC/ml) (**annexe 07**). Si la suspension bactérienne est trop turbide, elle peut être diluée avec plus d'eau physiologique. Si la suspension n'est pas suffisamment trouble, plus de bactéries peuvent être ajoutées (**Daouda, 2015**).

II.2.2.1.4. Ensemencement et dépôts des disques

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage selon la méthode de Kibry-Bauer, un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne, puis frotté sur la boîte contenant le milieu Muller- Hinton, le choix de ce milieu, souvent rencontré dans la littérature, a été dicté par sa spécificité et sa richesse permettant une bonne croissance aux bactéries-tests et offrant des résultats clairs en raison de sa transparence ; de haut en bas en stries serrées afin d'obtenir une culture de colonies confluentes. On dépose les disques de (9 mm de diamètre) papier wattman N°1, délicatement sur la surface de gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile (**annexe 08**). Ces disques sont imprégnés d'extraits à deux différentes concentrations 0,5 mg/disque (25µl) et 1mg/disque (50µl), un disque déposé au milieu contenant un témoin

négatif (0,5 DMSO et 2ml d'eau distillée). Finalement, l'ensemble des boîtes ont été laissées pendant 15 min à température ambiante pour permettre la diffusion des extraits puis ils sont incubés pendant 24h à 37°C. L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition, des différents extraits autour du disque.

II.2.2.2. Méthode de microdilution (sur milieu liquide)

La méthode de dilution en milieu liquide ou technique de microdilution, nous permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits suffisante pour inhiber ou détruire la croissance des souches bactériennes. Elle a été effectuée selon la méthode de bouillon Mueller-Hinton en microdilution dans une microplaque à 96 puits, les puits sont alignés en 8 lignes et 12 colonnes. La CMI des extraits testés a été déterminée comme la concentration la plus faible à laquelle aucune croissance visible des bactéries ne s'est produite (Chouitah et al., 2011). La représentation explicative de la méthode utilisée est comme suite :

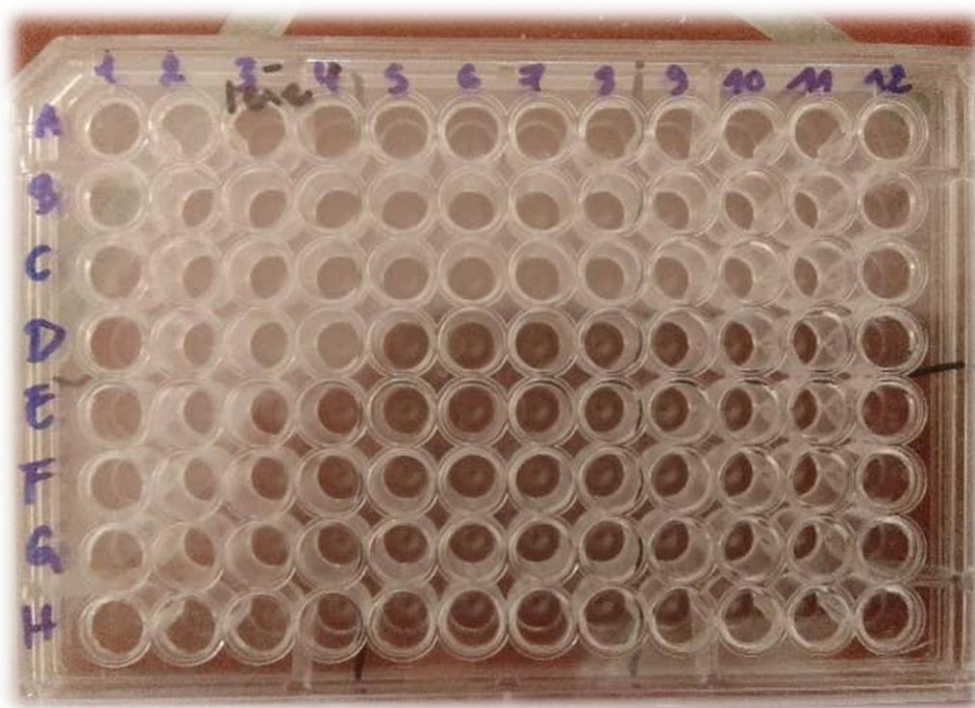


Figure 06 : Photographie d'une microplaque 96 puits (Originale).

Chaque test a été réalisé deux fois (deux essais) avec un témoin (160µl de bouillon Mueller-Hinton, 40µl d'extrait et 100µl d'eau physiologique). La ligne 1(A,F) : on a ajouté dans tous les puits 160µl de bouillon Mueller-Hinton, sachant que dans le premier puits (A,1) on a mis 40µl d'extrait des bourgeons de *Populus*, en retirant 100µl de ce puits pour les mettre dans

chaque puits en alternatif, afin de diluer l'extrait (dilution en série), on arrivant au dernier puits (F,1) on a jetés 100µl. En dernier lieu, chaque puits a été inoculé avec 100µl de suspension bactérienne.

On a ajouté 100µl de bouillon Muller-Hinton dans le puits (G, 1). Le contrôle positif (culture bactérienne) :100µl de bouillon Muller-Hinton. Contrôle négatif (Bouillon) : 100µl d'inoculum (suspension bactérienne) dans le puits (H, 1).

Les résultats sont lus après une incubation de la microplaque à 37 °C pendant 24 h. La CMI a été donc déterminé comme la concentration du premier puit à partir duquel aucun trouble visible à l'œil nu n'a été observé. Selon **Choukchou-Braham et al (2010)**.

Chapitre III :

Résultats et discussion

III. 1. Résultats des dosages des polyphénols totaux

La détermination de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. La courbe (**annexe 09**) montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations. Les quantités des polyphénols correspondantes de chaque extrait ont été rapportées en équivalent gramme d'acide gallique et déterminé par l'équation de type : $y = 0,0194 x - 0,0097$ sachant que $R^2 = 0,9994$. Les résultats sont illustrés dans la figure suivante :

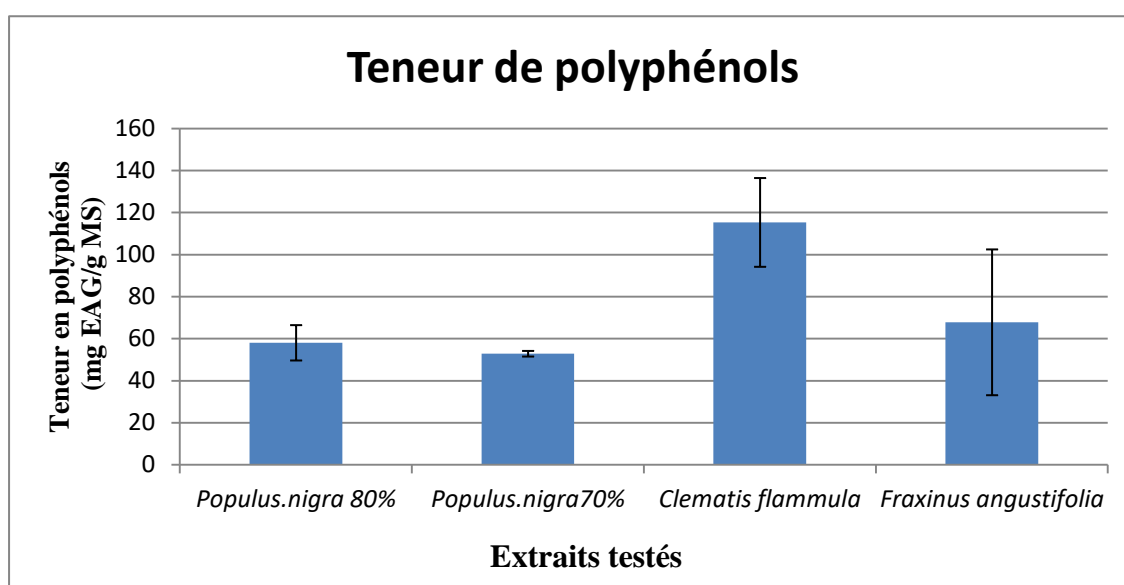


Figure 07 : Histogramme présentant la teneur en polyphénols totaux en mg EAG/g MS de chaque extrait étudié.

Au vu des résultats rapportés dans la **figure 10**, l'extrait de *Clematis flammula* présente la teneur la plus élevée, elle est de $115,312 \pm 21,11$ (mg EAG/g MS), suivi par l'extrait de *Fraxinus angustifolia* et l'extrait éthanolique de *Populus nigra* (80%), enregistrant respectivement par ordre décroissant les teneurs suivantes : $67,788 \pm 34,67$ (mg EAG/g MS) et $58,044 \pm 8,4$ (mg EAG/g MS), tandis que la valeur la plus faible revient à l'extrait éthanolique de *Populus nigra* (70%) avec une teneur de $52,836 \pm 1,33$ (mg EAG/g MS). Selon les teneurs des polyphénols, on constate que l'extrait le plus riche en polyphénols est celui de *Clematis flammula*.

III.2.1. Pouvoir antibactérien des extraits sur milieu solide

L'évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des extraits des bourgeons de *Populus nigra*, les feuilles de *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia* en utilisant la méthode de diffusion sur disque dans le milieu gélosé solide Mueller-Hinton est répartie par la présence ou l'absence d'une zone d'inhibition et le diamètre de cette zone.

Les résultats sont exprimés selon trois niveaux de sensibilités, ils sont classés suivant le diamètre des zones d'inhibition (D) (Moreira et al., 2005) :

- ✓ Non sensible (-) ou résistante : $D \geq 8$ mm
- ✓ Sensible (+) : $9 \geq D \geq 14$ mm
- ✓ Très sensible (++) : $15 \geq D \geq 19$ mm
- ✓ Extrêmement sensible (+++) : $D \geq 20$ mm

Les résultats sont rapportés dans le **tableau X** et leurs aspects sont illustrés dans les figures **11, 12, 13** et **14**.

Tableau X : Diamètre des zones d'inhibition (mm) de l'activité antibactérienne d'extraits des bourgeons de *Populus nigra*, les feuilles de *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia* vis-à-vis les neuf souches bactériennes. Les résultats notés sont les moyennes des ensembles des diamètres du même essai.

Extraits Souches	<i>Populus nigra</i> Bourgeons (80%) (A)		<i>Populus nigra</i> Bourgeons (70%) (a)		<i>Clematis flammula</i> Feuilles (E)		<i>Fraxinus</i> <i>angustifolia</i> feuilles (F)	
	Concentration de l'extrait en mg/disque							
	0,5	1	0,5	1	0,5	1	0,5	1
<i>Acénetobacter baumannii</i>	-	-	-	-	11 (S)	18 (T)	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	10 (S)	10 (S)	10 (S)	11 (S)	11 (S)	15 (T)	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	10 (S)	12 (S)	-	-	11 (S)	16 (T)	10 (S)	12 (S)
<i>E. Coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumonie</i>	-	-	10 (S)	11 (S)	10 (S)	17 (T)	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	13 (S)	17 (T)	-	-
<i>Pseudomonas sp</i>	-	14 (S)	10 (S)	12 (S)	10 (S)	10 (S)	-	12 (S)
<i>Salmonella sp</i>	-	11 (S)	-	-	-	-	-	11 (S)
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	12 (S)	15 (T)	-	-

S : sensible, T : très sensible, (-) : résistante, Le diamètre des disques est de 9mm.



Figure 08 : Zones d'inhibition obtenus par l'extrait de *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia* vis-à-vis *Bacillus subtilis*.

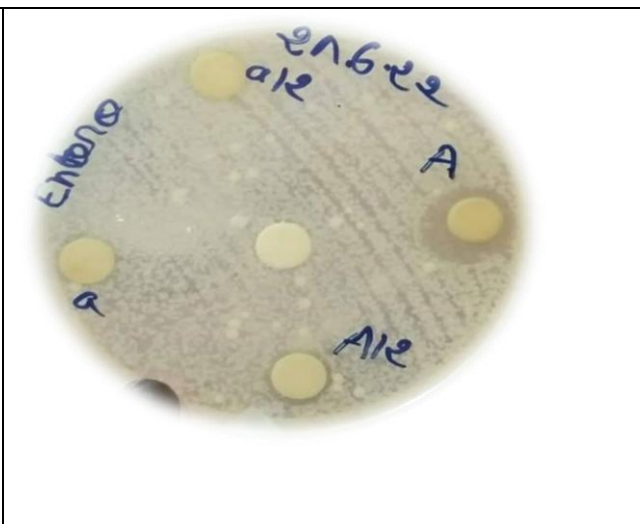


Figure 09 : Zones d'inhibition obtenus par l'extrait d'extrait de *Populus nigra* à (80%) et (70 %) vis-à-vis *Enterococcus faecalis*.

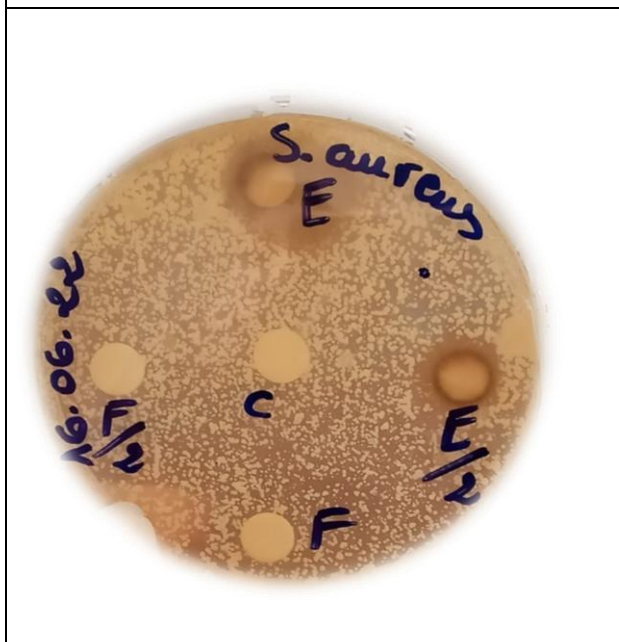


Figure 10 : Zones d'inhibition obtenus par l'extrait d'extrait de *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia* vis-à-vis *Staphylococcus aureus*.

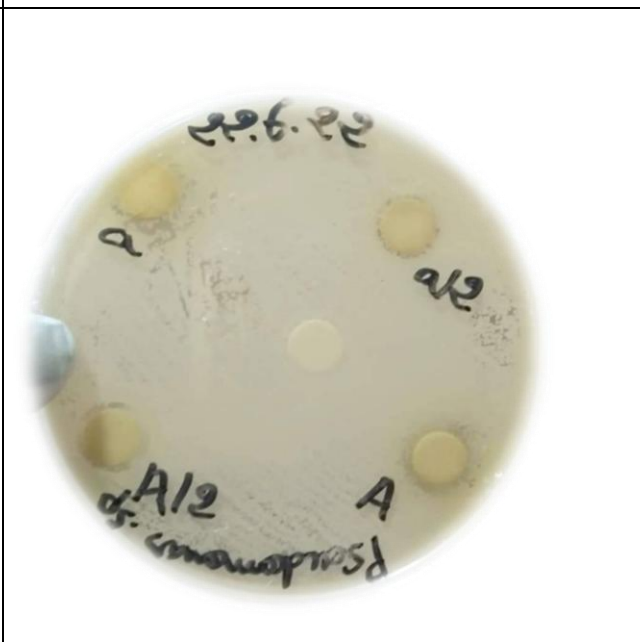


Figure 11 : Zones d'inhibition obtenus par l'extrait d'extrait de *Populus nigra* à (80%) et (70 %) vis-à-vis *Pseudomonas sp.*

A : extrait des bourgeons de *Populus nigra* à 80% d'éthanol (**1mg/disque**).

A /2 : extrait des bourgeons de *Populus nigra* à 80% d'éthanol (**0,5mg/ disque**).

a : extrait des bourgeons de *Populus nigra* à 70% d'éthanol (**1mg/disque**).

a/2 : extrait des bourgeons de *Populus nigra* à 70% d'éthanol (**0,5mg/ disque**).

E : extrait des feuilles de *Clematis flammula* (**1mg/disque**).

E/2 : extrait des feuilles de *Clematis flammula* (**0,5mg/ disque**).

F : extrait des feuilles de *Fraxinus angustifolia* (**1mg/disque**).

F/2 : extrait des feuilles de *Fraxinus angustifolia* (**0,5mg/ disque**).

➤ Les autres résultats des tests antibactériens sont représentés dans (**annexe 10**).

➤ **Pouvoir bactériostatique ou bactéricide :**

On note que toutes les activités enregistrées ont été reprise pour caractériser le type de l'effet antibactérien, il s'est avéré bactériostatique sur toutes les souches bactériennes testées.

Les histogrammes des figures (15, 16, 17 et 18) illustre les comparaisons des effets antibactériens exercés par les extraits de *Populus nigra* (80%) (**Figure 15**), *Populus nigra* (70%) (**Figure 16**), *Clematis flammula* (**Figure 17**) et *Fraxinus angustifolia* (**Figure 18**), sur les souches bactériennes.

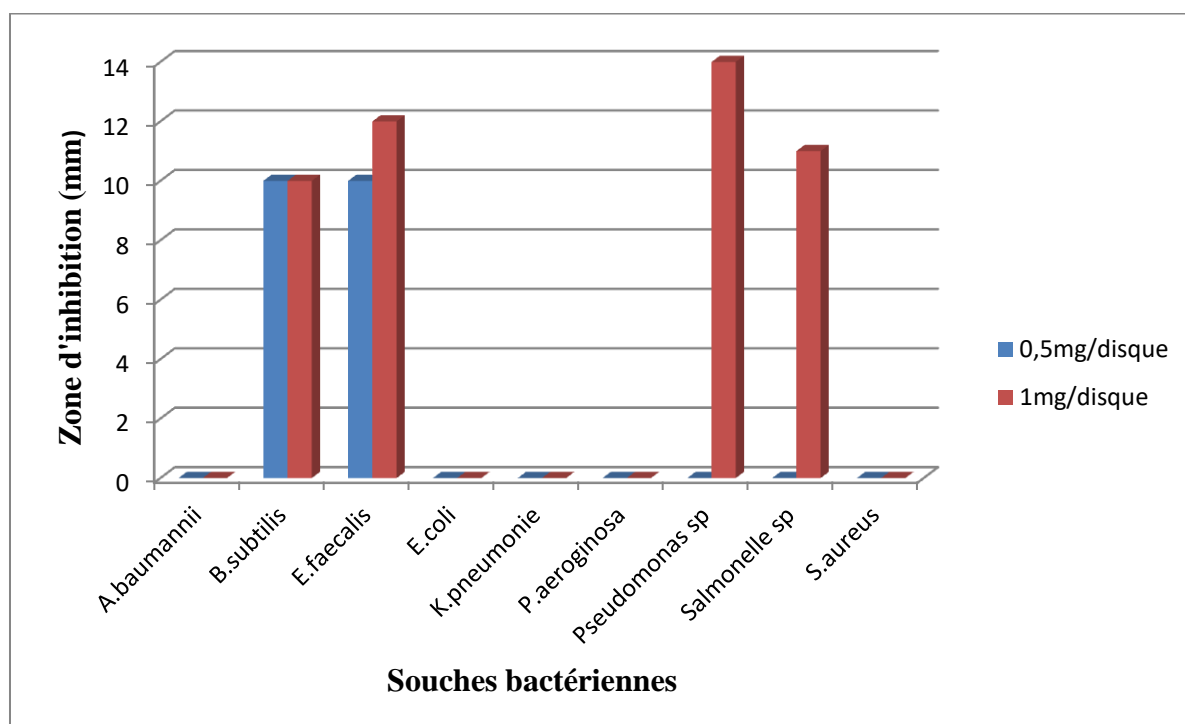


Figure 12 : Présentation graphique des zones d'inhibition (mm) de l'extrait de *Populus nigra* à (80%) sur les neuf souches bactériennes testées.

D'après les résultats obtenus, on constate que les souches réagissent différemment contre les extraits étudiés. Selon **la figure 15**, on déduit que l'extrait des bourgeons de *Populus nigra* à (80%) exerce un effet inhibiteur modéré (12 mm) contre *Enterococcus faecalis* et *Bacillus subtilis* pour les deux concentrations (0,5 et 1 mg /disque), aussi contre *Pseudomonas sp* et *Salmonelle sp* uniquement pour la dose de (1 mg/disque) avec un diamètre de 14 mm et 11 mm, respectivement, tandis que le reste des souches bactériennes sont résistantes a notre extrait.

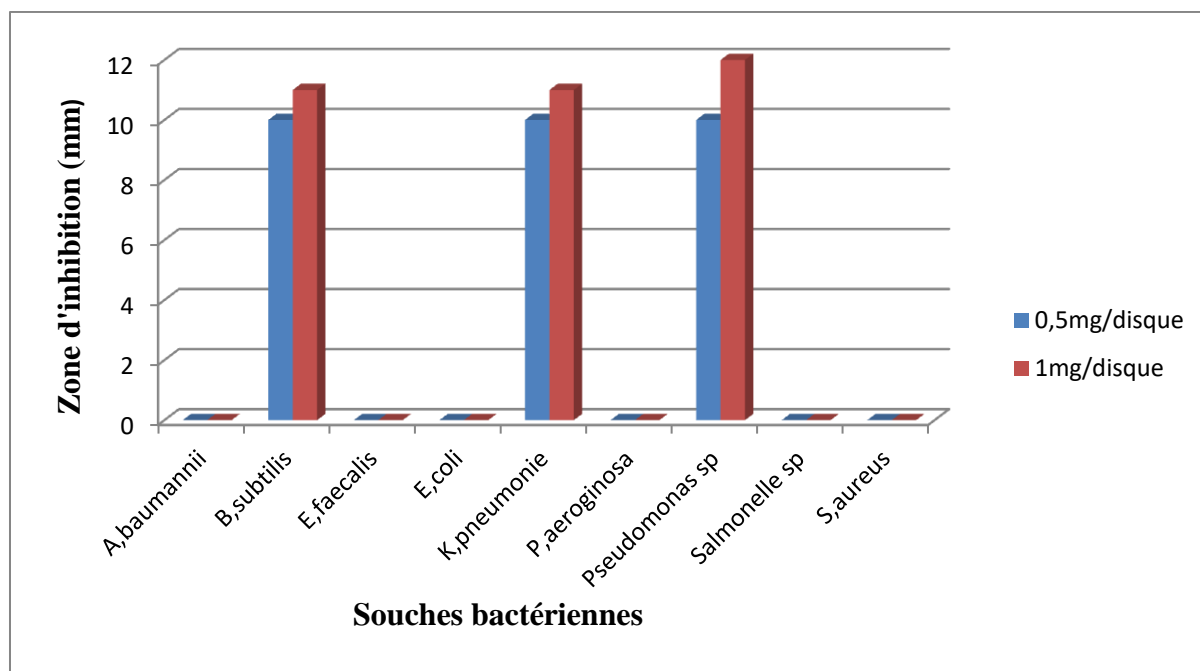


Figure 13 : Présentation graphique des zones d'inhibition (mm) de l'extrait de *Populus nigra* à (70%) sur les neuf souches bactériennes testées.

Concernant l'extrait des bourgeons de *Populus nigra* à (70%), **la figure 16** montre qu'il a inhibé la croissance de *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas sp* pour les deux doses, dont la plus grande zone d'inhibition est observé contre *Pseudomonas sp* d'un diamètre de 12 mm. Pour le reste des souches bactériennes l'extrait de *Populus nigra* à (70%) ne présente aucune activité bioactive contre eux.

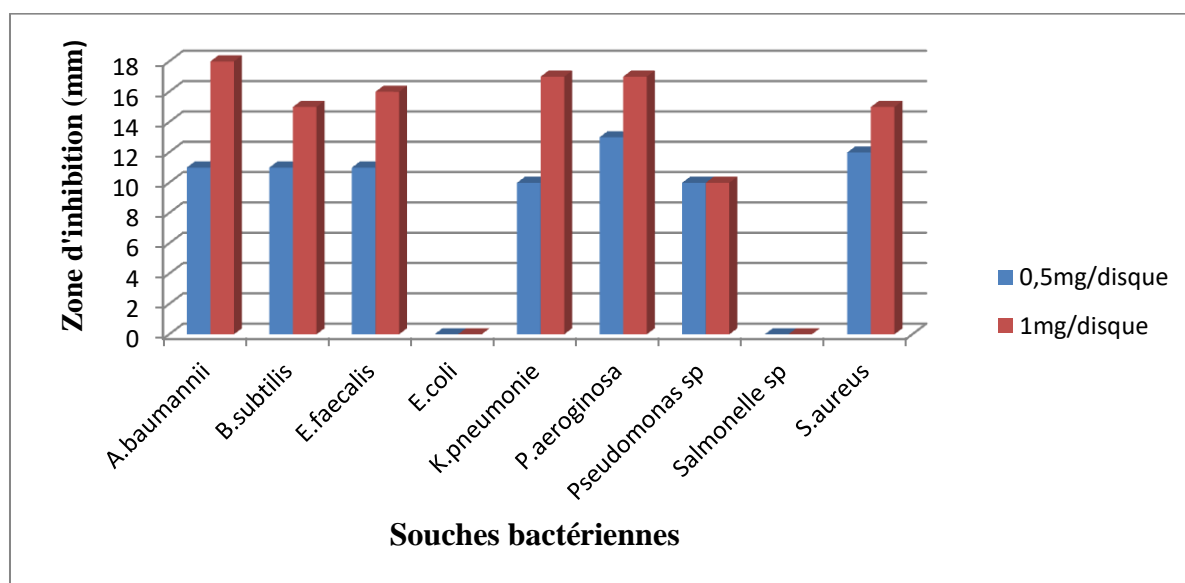


Figure 14 : Présentation graphique des zones d'inhibition (mm) de l'extrait de *Clematis flammula* sur les neuf souches bactériennes testées.

Pour l'extrait des feuilles de *Clematis flammula*, la figure 17 monte un large spectre d'activité antibactérienne contre toutes les souches bactériennes, à l'exception d'*Escherichia Coli* et *Salmonella sp* aux deux doses utilisées. Les plus grandes zones d'inhibition ont été produites par *Acénitobacter baumannii* d'un diamètre de 18 mm (très sensible) pour la concentration de 1 mg/disque.

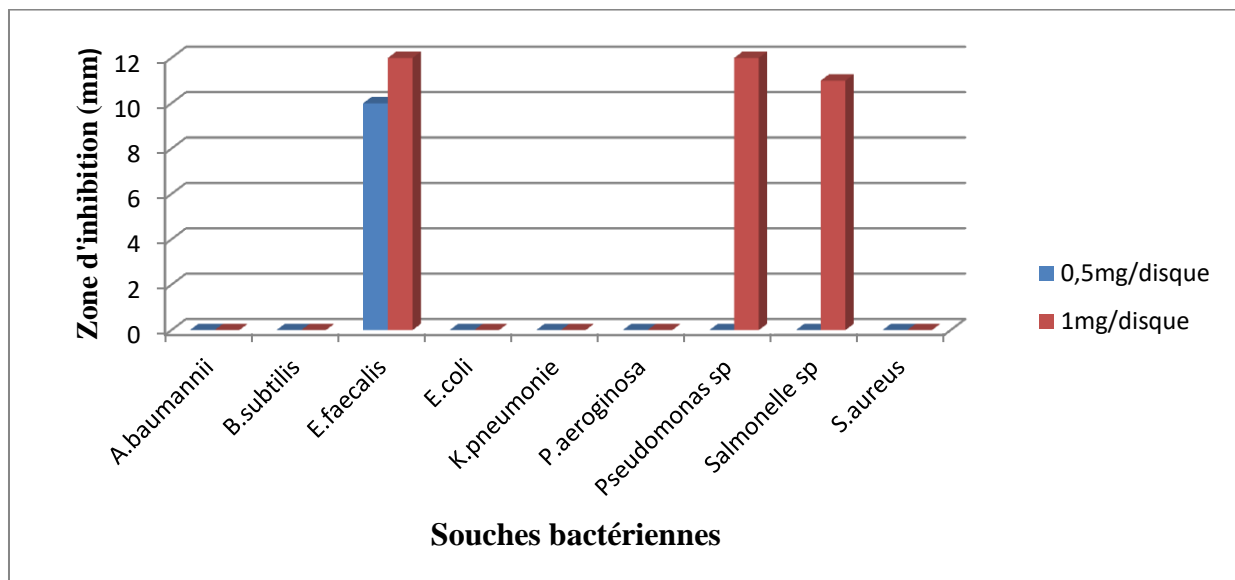


Figure 15 : Présentation graphique des zones d'inhibition (mm) de l'extrait de *Fraxinus angustifolia* sur les neuf souches bactériennes testées.

D'autres parts, l'extrait des feuilles de *Fraxinus angustifolia* toutes les souches bactériennes semblent résistantes sauf *Enterococcus faecalis* dont la zone d'inhibition est de 10 mm à 0.5 mg/disque et 12 mm à 1 mg/disque. L'extrait présente une faible activité inhibitrice vis-à-vis *Pseudomonas sp* et *Salmonella sp* à 1 mg/disque avec un diamètre de 12 mm et 11 mm, respectivement.

➤ Analyse statistique :

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne de trois répétitions avec l'écart type (Moy±SD).

III.2.2. Pouvoir antimicrobien des extraits sur milieu liquide

Afin de mieux évaluer cette activité une étude plus poussée a été menée par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits contre les différentes souches bactériennes, selon la méthode de micro-dilution sur milieu liquide, elle est définie comme la plus faible concentration de l'extrait à laquelle une bactérie ne montre pas une croissance visible. Les résultats sont représentés dans le **tableau XI**.

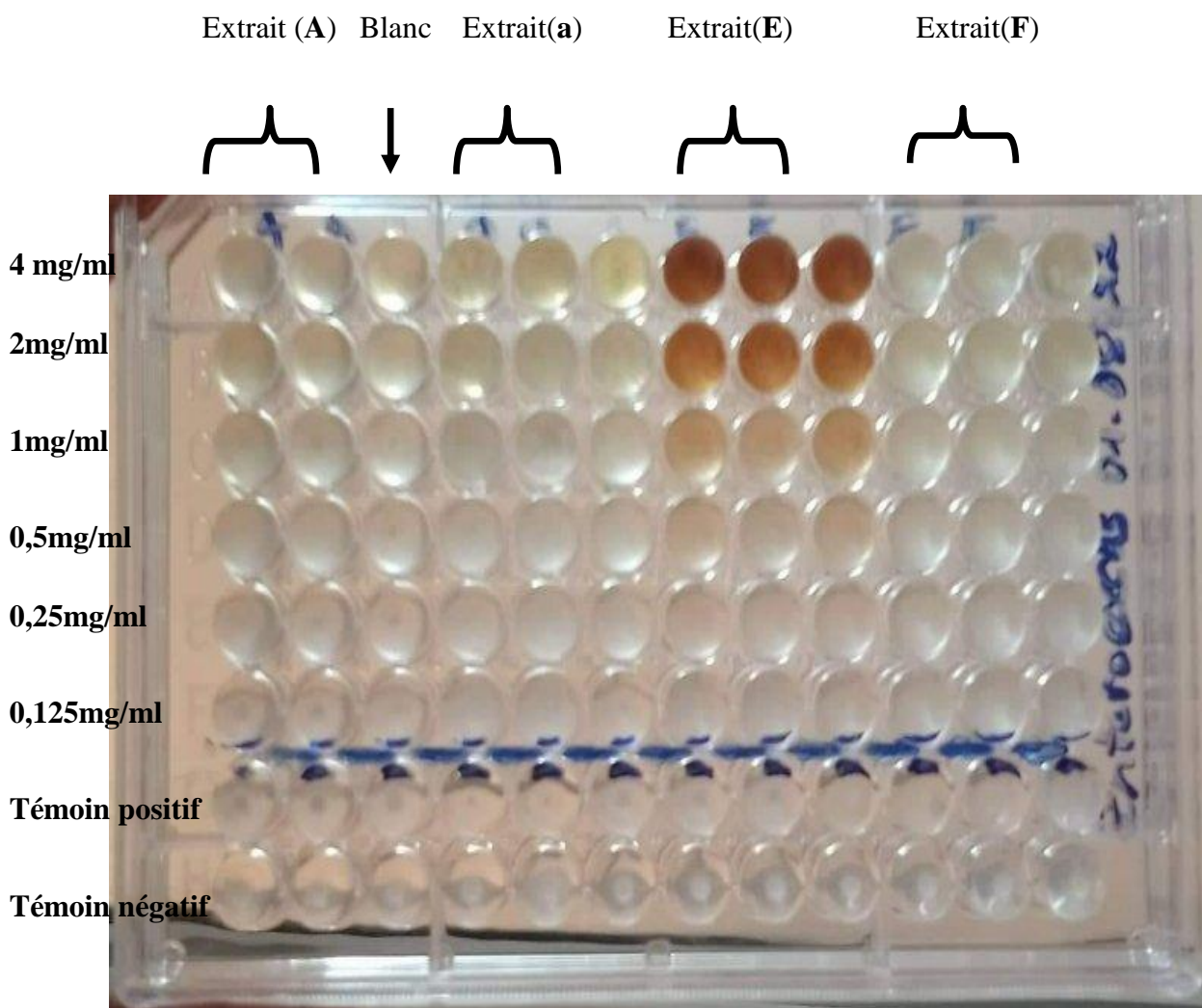


Figure 16 : exemple explicatif de la CMI des quatre extraits contre *Enterococcus faecalis*.

A : extrait des bourgeons de *Populus nigra* à 80% d'éthanol.

a : extrait des bourgeons de *Populus nigra* à 70% d'éthanol.

E : extrait des feuilles de *Clematis flammula*.

F : extrait des feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

Tableau XI : Valeurs de la CMI des quatre extraits vis-à-vis les 09 souches bactériennes :

Extractions Souches	<i>Populus nigra</i> (80%)	<i>Populus nigra</i> (70%)	<i>Clematis flammula</i>	<i>Fraxinus angustifolia</i>
Concentration minimale inhibitrice en (mg/ml)				
<i>Acénetobacter baumannii</i>	0,5	0,25	0,25	2
<i>Bacillus subtilis</i>	0,125	1	1	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,5	0,25	0,5	0,25
<i>Escherichia Coli</i>	1	0,25	0,25	4
<i>Klebsiella pneumonie</i>	0,125	0,5	0,5	0,125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,5	4	0,125	0,5
<i>Pseudomonas sp</i>	0,5	0,5	0,25	1
<i>Salmonella sp</i>	1	0,25	0,5	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	2	0,25	4

La concentration minimale inhibitrice (CMI), est une étude quantitative qui permet de déterminer l'intervalle de la plus faible concentration d'antibactérien, à l'œil nu elle correspond donc à la plus petite concentration pour laquelle il y a absence de turbidité. D'ailleurs, on note que les concentrations croissantes des extraits (4, 2, 1, 0,5, 0,25 et 0,125 mg/ml) provoquent une diminution progressive et dose de manière dépendante la turbidité induite par la croissance des souches.

A travers le **Tableau XI**, il apparaît que l'extrait le plus actif avec les concentrations les plus faibles (0,125-0,5 mg/ml) est celui des feuilles de *Clematis flammula*. Par contre on remarque des CMI plus élevées (4-2 mg/ml) avec les deux extraits de *Populus nigra* et *Fraxinus angustifolia*.

En comparant les résultats obtenus par la méthode de diffusion sur milieu gélosé et celle de la microdilution, on constate une corrélation on ce qui concerne les concentrations utilisées. Néanmoins, les différentes valeurs de CMI obtenues nous permettent de conclure que l'effet antibactérien est en fonction du genre de la bactérie et la concentration des extraits testés.

III.3. Discussion générale

Plusieurs recherches ont été faites sur les plantes médicinales surtout sur leurs compositions chimiques et leurs composés bioactifs, ces recherches ont rapporté que les polyphénols notamment les acides phénoliques et les tanins servent de mécanismes de défense de la plante, contre les microorganismes, ce qui leur confèrent le pouvoir antibactérien (**Felleh et al., 2008**).

L'activité antimicrobienne contre les bactéries analysées dans la présente étude a été évaluée qualitativement et quantitativement en fonction de la présence ou l'absence de zones d'inhibition, le diamètre de la zone (mm) et la CMI. Nous constatons, d'après les résultats qu'une grande différence est notée entre l'activité antibactérienne des extraits éthanoliques vis-à-vis les bactéries utilisées, y compris des bactéries Gram positifs et Gram négatifs.

Les bourgeons de *Populus nigra* ont été décrits comme contenant principalement des composés phénoliques (phénols, acides phénoliques, phénylpropanoïdes et différents sous-groupes de flavonoïdes) et terpénoïdes. Il a été suggéré que la présence de forte teneur en flavonoïdes et de composés phénoliques serait responsable de la plupart des activités biologiques et pharmacologiques des bourgeons de *Populus nigra*, ce que lui attribue un pouvoir antibactérien contre les bactéries testées dans ce présent travail, tels que *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas sp*, et *Salmonella sp*.

Une étude menée par Gulhan Vardar-Unlu et al., (**2008**) sur l'extrait méthanolique des bourgeons de peuplier noir a montré un large spectre d'activité antibactérienne, les plus sensibles étant les bactéries Gram-positif, tels que *Staphylococcus aureus* (CMI de 0,50 mg/ml) et les bactéries Gram négatif comme *Enterococcus faecalis* (CMI de 1 mg/ml). Bénédec et ses collaborateurs (2014) ont montré qu'en utilisant la méthode de diffusion sur milieu gélosé a démontré que l'extrait éthanolique des bourgeons de peuplier noir présente une activité antibactérienne *in vitro* contre les bactéries Gram-positif, telles que *Staphylococcus aureus* ($\phi = 13$ mm). De plus, d'autres recherches ont démontré que les extraits éthanoliques de résines de propolis et de bourgeons de peuplier d'Italie présentent un potentiel antibactérien important contre *Pseudomonas aeruginosa* (CMI de 125 μ g/mL). La propolis a été signalée comme étant active contre les bactéries Gram positif (**Grange et Davey, 1990**). Il a été rapporté par Debbache et al., (**2014**) dans une étude sur le criblage phytochimique des bourgeons de *Populus nigra* que l'extrait éthanolique a montré un

potentiel antibactérien avec les plus grandes zones d'inhibition (entre 12 et 17 mm) sur *B. subtilis*, cependant, *K. pneumoniae* a montré une résistance complète à cet extrait. Alternativement, le caractère lipophile des exsudats des bourgeons de peuplier qui favorise la pénétration de l'extrait dans la membrane bactérienne, a également été signalé (**Bankova, 2005**).

On comparant l'activité de l'extrait éthanolique (80%) des bourgeons de *Populus nigra* et l'extrait éthanolique (70%) de la même plante, on remarquera que l'extrait à (80%) a une activité modérée sur *Enterococcus faecalis*, tandis que l'extrait à (70%) n'a marqué aucun effet sur la même souche. Cela indique que la nature du solvant et la méthode d'extraction (soxhlet et sonication) influencent l'efficacité de l'activité antibactérienne.

Les activités biologiques des extraits de *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia* ont fait l'objet d'études approfondies ces dernières années par l'équipe de recherche du laboratoire de Biochimie Appliquée (**Atmani et al., 2009 ; Berboucha et al., 2010 ; Atmani et al., 2011 ; Moulaoui et al., 2015 ; Medjahed et al., 2016 ; Ayouni et al., 2016 ; Yous et al., 2018 ; Ahmane et al., 2019**).

D'après nos résultats le dosage des polyphénols totaux de l'extrait éthanolique de feuilles de *Clematis flammula*, il apparaît que ce dernier est le meilleur extrait en termes de sa quantité et sa qualité en polyphénols 115,312 mg EAC/g d'extrait.

Une étude effectuée par (**Ourabah et al., 2019**), la quantification des principaux composés polyphénoliques dans l'extrait éthanolique à (96%) des feuilles de *Clematis flammula* a montré une teneur très élevée en phénols totaux ($745,27 \pm 9,94$ mg EAG /g), ces résultats sont significativement supérieurs à celle retrouvées dans le présent travail, qui serait lié à la différence d'échantillon (Année de récolte).

Chawla et al (**2012**) ont trouvé dans leurs recherches que d'autres constituants de l'espèce de *Clematis*, telles que l'huile essentielle et la clématine (alcaloïde) isolée de *Clematis flammula* ont été signalés pour des effets toxiques. En effet, une étude approfondie de la littérature a révélé que la protoanémonine et l'acide aristolochique sont les composés majeurs qui causent la toxicité de cette plante. La toxicité de *Clematis flammula* ne peut pas être exclue, donc on peut déduire que le potentiel antibactérien élevé de cette plante peut être due à sa toxicité non pas à ses polyphénols.

D'après les résultats de Kumar et al (2020), l'extrait obtenu de *Fraxinus micrantha* a eu un effet inhibiteur remarquable contre la croissance de la plupart des micro-organismes testés à l'exception des bactéries Gram négatif : *X. phaseoli* à une concentration de 1000 mg/ml. Les résultats ont indiqué que les bactéries Gram positif : *B. subtilis* sont les plus sensibles pour l'extrait du méthanol (1000 mg/ml) avec la plus grande zone d'inhibition 22 mm.

D'autres études menées par Lambrev et ses collaborateurs (1961) ont révélé une activité antibactérienne claire de l'extrait éthanolique et de *Fraxinus ornus* L, et sa décoction d'écorce contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*,

Selon Gomez et Fillat (1984), la composition chimique des feuilles de *Fraxinus* dépendent de la période de leur récolte et leur digestibilité diminue si elles sont collectées en septembre et octobre par rapport au mois d'août.

L'étude de la composition chimique de *Fraxinus* révèle la présence d'un flavonoïde le rutoside possédant un effet anti-inflammatoire, du mannitol et des sels de potassium aux activités diurétiques qui permettent de stimuler les fonctions d'élimination de l'organisme. On sait aussi que le mannitol est un capteur de radicaux libres et que les polyphénols sont antioxydants. Ces propriétés permettent d'utiliser ces substances comme protecteurs tissulaires des articulations, freinant ainsi leur vieillissement. Ces effets plutôt protecteurs peuvent expliquer sa faible toxicité sur les cultures bactériennes.

On déduit que ce n'est pas uniquement la quantité des polyphénols contenue dans un extrait qui indique son activité antibactérienne, mais aussi la qualité de ces composants. Ce qui justifie les résultats trouvés dans le présent travail.

Justifiant les rapports précédents, la différence entre les résultats obtenus et ceux des autres travaux menés par plusieurs chercheurs peut être due à différents paramètres. En effet, il a été constaté par Hayouni et al (2007) que la méthode d'extraction, la nature du solvant et sa concentration peuvent influencer l'activité antimicrobienne des différents extraits. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antimicrobienne des extraits explique les variations de leurs compositions chimiques.

Par ailleurs Boudhrioua et al (2009) ont rapporté que les variations en teneur de polyphénols ainsi l'efficacité de l'activité antibactérienne des extraits est dépendante des conditions climatiques, la répartition géographique et la période de la récolte de la plante.

En effet, la présence de plusieurs types d'enzymes dans les cellules végétales en particulier les polyphénols oxydases et les glycosidases est susceptible de modifier les composés phénoliques, ce qui rend l'extraction difficile. De plus, la méthode de séchage de la plante peut être un facteur de détérioration de la structure des polyphénols (**Ribéreau-Gayon 1968**). Enfin, selon Regnault-Roger et *al* (**2008**) le dosage des polyphénols par le réactif de Folin-Ciocalteu donne un taux phénolique apparent élevé, beaucoup de composés peuvent réagir avec ce réactif, donc n'est pas spécifique aux polyphénols.

L'interprétation des résultats négatifs obtenus par et *E. coli* peuvent être interprétés suivant ce qui a été rapporté dans la littérature. Cette souche est très connue pour sa résistance à certains antibiotiques ainsi qu'à une grande variété d'agents chimiques. Les bactéries à Gram positif, quant à elles sont généralement les plus sensibles aux effets de ces extraits polyphénoliques, cela est dû principalement aux peptidoglycanes constituant la paroi. En effet, les bactéries perdent leur rigidité et se lysent sous leur pression osmotique interne qui rompt leur membrane cytoplasmique (**Athamena et al., 2010**).

Cependant, la résistance des bactéries Gram négatif, peut s'expliquer par la configuration spatiale des molécules qui empêchent de traverser les protéines de transport (porine) de la membrane externe, et ne peuvent pas donc atteindre le peptidoglycane de la paroi bactérienne (**Bousseboua, 2001 ; Pages et al ; 2003**).

Debbache et *al* (**2014**) a conclu dans ses recherches sur *Populus nigra* que la fraction aqueuse de l'extrait chloroformique peut être utilisée comme une source accessible d'antioxydants naturels. Il peut également être exploité comme médicament anti-inflammatoire ou antigoutteux. En revanche, le potentiel antibactérien de l'extrait éthanolique apparaît prometteur, ce qui en fait un substitut plausible aux médicaments antimicrobiens inefficaces. Cette conclusion confirme les résultats obtenus dans notre travail.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

De nos jours, l'emploi des plantes médicinales en phytothérapie comme remèdes des maladies humaines est vigoureusement recommandé. Elles restent toujours la source fiable des métabolites actifs connus par leurs valeurs. C'est en cela que l'objectif visé par ce travail est l'évaluation qualitative et quantitative du pouvoir antibactérien vis-à-vis des souches bactériennes des extraits des bourgeons de *Populus nigra*, les feuilles de *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia*.

Les résultats du dosage des composés phénoliques par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu dans les différents extraits montrent que l'extrait des feuilles de *Clematis flammula* possède relativement la teneur la plus importante ($115,31 \pm 0,14 \text{mgEAG/g}$), tandis que la teneur la plus faible a été obtenue avec l'extrait des bourgeons de *Populus nigra* (70%) ($52,83 \pm 0,07 \text{ mg EAG /g}$).

L'évaluation du potentiel antibactérien des quatre extraits contre les souches bactériennes, par la méthode de diffusion sur disque a révélé que l'extrait des feuilles de *Clematis flammula* possède un effet inhibiteur très intéressant, surtout pour la concentration (1mg/disque) dont les zones d'inhibitions varient entre 15 et 18 mm, par rapport aux deux extraits de *Populus nigra* et *Fraxinus angustifolia* dont le diamètre de leurs zones d'inhibition est compris entre 10 et 12 mm. Ceci pourrait refléter soit le large spectre d'activité d'un ou des composés phénoliques de ces extraits ou bien la variabilité des métabolites secondaires qui les constituent, tandis que la nature de la souche et le mode de préparation des extraits ont une influence sur les résultats de mesure de l'activité antibactérienne.

D'après nos résultats, la concentration minimale inhibitrice (CMI) est située autour de 0,125mg/ml et 4mg/ml pour les deux extraits de *Populus nigra* et pour l'extrait de *Fraxinus angustifolia*, par contre celle des feuilles de *Clematis flammula* est de 0,125-0,5 mg/ml.

Il serait intéressant pour compléter cette étude :

- D'optimiser des différentes extractions ;
- D'approfondir l'étude phytochimique afin de déterminer qualitativement et quantitativement les molécules bioactives présentes dans ces extraits ;
- Une approche du mécanisme d'action de la (ou les) molécules responsables de l'activité antibactérienne ;
- D'élargir l'étude de l'activité antimicrobienne sur d'autres souches bactériennes pathogènes et d'autres microorganismes notamment les champignons et les parasites.

Références bibliographiques

- Abayomi S.** Plante médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Paris : Karthala 2010.
- Abderrazak M.** et Joël R. La botanique de A à Z. Edition Dunod. Paris. 2007 ; 177p.
- Ahmane N,** Atmani-Kilani D, Chaher N, Ayouni K, Rahmani Berboucha, M, Da Costa G, Debbache-Benaida N, Richard T, Atmani D. Identification of bioactive compounds from *Fraxinus angustifolia* extracts with anti-NADH oxidase activity of bovine milk xanthine oxidoreductase. *Turk J Biol* ; 2019, 43 : 133-147.
- Allen U,** Dobson R. S, Embree J, Langley J, Moore D, Pekeles G, Samson L. E, Harsany R MacDonald N , Halperin S, Naus M, Pickering L. Les produits antimicrobiens à domiciles : Le problème de l'antibiorésistance. *Paediatr Child Health* ; 2006, 11 (3):177-182.
- Anonyme.** Bactériologie. Université de Pierre et Marie Curie. 2003 ; 122p.
- Athamena S,** Chalghem I, Kassah-Laouar A, Khebri S, Laroui S. Activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L .L S J ; 2010 : 11-13.
- Atmani D,** Chaher N, Berboucha M, Ayouni K, Lounis H, Boudaoud H, Debbache N, Atmani D. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chem*; 2009, 112: 303-309.
- Atmani D,** Ruiz-Larrea M.B, Ruiz-Sanz J.I, Lizcano L.J, Bakkali F, Atmani D. Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts. *J Med Plant Res* ; 2011, 5 (4) : 589-598.
- Avril J.L,** Dabernat H, Denis F, Monteil H. Bactériologie clinique. Paris : Ellipses, 2000 ; 602p.
- Ayouni K,** Berboucha-Rahmani m, Kim K.K, Atmani D, Verpoorte R, Choi H. Outil métabolomique pour identifier les composés antioxydants des extraits de feuilles et d'écorce de tige de *Fraxinus angustifolia*. *Ind crops* ; 2016.
- Azalenko K.** Contribution à la détermination des chemotypes d'une plante à huile essentielle du Togo *Lippia mutiflora*. Mémoire d'ingénieur de travaux, ESTBA, Univ. Lomé ; 2005.
- Balasundram N,** Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*;2006, 99: 191-203.
- Beargie R,** Lynd P, Tucker E, Duhring J. Perinatal infection and vaginal flora. *Am J Obstet Gynecol* ;1975. 122: 31–33.
- Beloued A.** Plantes médicinales d'algérie. Dépt de botanique a l'institut national agronomique d'el-harrach-alger. Office des publication universitaires ; 2009, 2(01).
- Beloued A.** Plantes médicinales. Edition 2, Office des publications universitaire, 1998 ; 162.
- Berboucha M,** Ayouni K, Atmani D, Benboubetra M. Kinetic Study on the Inhibition of Xanthine Oxidase by Extracts from Two Selected Algerian Plants Traditionally Used for the Treatment of Inflammatory Diseases. *J Med Food*; 2010 ,13 (4): 1-9.
- Benedec D,** Oniga I, Muresan B, Mot AC, Damian G, Nistor A, Silaghi-Dumitrescu R, Hanganu D, Duma, M, Vlase L. Contrast between Water- and Ethanol-Based Antioxidant

Références bibliographiques

Assays: Aspen (*Populus tremula*) and Black Poplar (*Populus nigra*) Extracts as a Case Study. *J. Food Qual.* **2014**, 37, 259–267.

Berends B. R., Urlings H. A. P, Snijders J. M. A, Van Knapen F. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella spp.* In pigs. *Int J Food Microbiol* ; 1996, 30(1-2): 37-53.

Berville A. Histoire de l'olivier l'arbre des temps Editions Quae : 2012 ; 48.

Betts J., Finlay B. B. Identification of *Salmonella typhimurium* invasiveness Loci. *Can. J. Microbiol*; 1992, 38(8): 852-857.

Bodurhoiau N., Bahloul N, Ben Slimen I, Kceahuo N. Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Ind. Crops and Prod.* ; 2009, 29: 412–419.

Bouba A. A. Contribution à l'étude du développement d'un aliment fonctionnel à base d'épices du Cameroun : Caractérisation physico-chimique et fonctionnelle. Thèse de doctorat. Institut national polytechnique de lorraine et l'université de N'gaoundéré ; 2009, 191 p.

Boudjouref M. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Thèse de magister. Université Ferhat Abbas-Sétif. 2011 ; p99.

Bousseboua H. Elément de microbiologie général. Breton C ; 2001 :160-167.

Brunneton J. Flavonoïdes. In : Pharmacognosie, Phytochimie : Plantes médicinales, 3ème édition, Technique et Documentation (Paris) ; 1999 :310-353.

Cai Y.Z., Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H. Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life sciences*; 2006, 78 (25): 2872-2888.

Casadebaig J., Jacob M, Cassanas G, Gandy D, Baylac G. Puech A. *J Ethnopharmacol*; 1989, 26:211.

Caudullo G., Durrant HT. *Fraxinus angustifolia* in Europe: distribution, habitat, Usage and threats. *European Atlas of Forest Tree Species* 2016.

Chawla R., Kumar S, Sharma A. The genus Clematis (Ranunculaceae): Chemical and pharmacological perspectives. *J.Ethnopharmacol* ; 2012, 143(1) : 116-150.

Chira K., Suh J.-H, Saucier C, Teissèdre P.-L. Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*; 2008, 6: 75-82.

Chouitah O., Meddah B, Aoues A, Sonnet P. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from *Glycyrrhiza glabra* leaves. *J. Essent. Oil Bear. Plants*; 2011, 14(3): 284-288.

Choukchou-Braham N., Rahmoun M.N, Benabdallah M, Villemin D, Boucherit K, Mostefa-Kara, B, Ziani-Cherif C. Antimicrobial screening of the Algerian *Lawsonia inermis* (henna). *Der Pharma Chemica*; 2010, 2(6): 320-332.

Cook R., Bruckart W, Coulson J, Goettel M, Lumsden R, Maddox J, McManus M, Moore L, Meyer S, Quimby P, Stack J, Vaughn J. Sécurité des micro-organismes destinés à la lutte

Références bibliographiques

antiparasitaire et de lutte contre les maladies des plantes : un cadre pour l'évaluation scientifique. *Biol. Contrôle* ; 1996:14-24p.

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

Cypierre A, Gutierrez B, Pestourie N, Pinet P, Durox H, Ducroix-Roubertou S, Faucher J. Bactériémies à *Klebsiella pneumoniae* productrice de carbapénémase NDM au cours d'une épidémie : données épidémiologiques, traitements et évolutions. *Médecine et Maladies Infectieuses* ; 2020, 50(6) : S37.

D'halewyn M, Leclerc j, Norman K, Bélanger M , Legris M. les risques de la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur, Yves Frenette ©Institut national de santé publique du Québec ; 2002.

Daouda T. Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire. Thèse de doctorat. Université Felix Houphouët-boigny ; 2015.

Debbache N, Atmani D. Chemical analysis and biological activities of *Populus nigra*, flower buds extracts as source of propolis in Algeria. *Ind. Crop. Prod*; 2014,53: 85-92

Debbache-Benaida N, Atmani-Kilani D, Schini-Keirth V.B, Djebbli N,Atmani D. Pharmacological potential of *Populus nigra* extract as antioxidant, anti-inflammatory, cardiovascular and hepatoprotective agent. *Asian Pac. J. Trop. Biomed* ; 2013, 3(9): 697-704.

Debuigne, G. Larousse des plantes qui guérissent. Edition Larousse 1974.

Djeddi S, Djahoudi A.G, Benchalia, Himour H. Antibacterial activity of *Calycotum villosa* (Poiret) Link extracts; 2015, 3(1): 13-18.

Edeas M. Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*, 2007 : 5: 264-270.

Emerenciano V.P, Barbosa K.O, Scotti M. T, Ferrero M.J.P. Self organising maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae: a classification of tribes using flavonoid data. *J. Bra. Chem.Soc*; 2007, 18(5): 891-899.

Erdman J. W, Balentine D, Arab L, Beecher G, Dwyer J. T, Folts J, BurrowesJ. Flavonoids and Heart Health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005. Washington DC. *J.Nutr*; 2007, 137(3): 718S-737S.

Faure K, Kipnis E, Guery B. Prise en charge des pneumonies liées a *pseudomonas aeruginosa*. *Rev Tun Infectiol* ; 2008 , 2(1) : 1-8.

Fleurette, Freney J. Antiseptie et désinfection 1995.

Galabov A, Iosifova T, Vassileva E, Kostova I. Antiviral activity of some hydroxycoumarin derivatives. *Zeitschrift für Naturforschung* ; 1996, 51(7-8) : 558-562.

Gayet C. Guide de poche de phytothérapie. Paris: Quotidien malin 2013.

Goetz M.E, Lunch A. Reactive species: A cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. *Cancer Letters* ; 2008, 266 : 73–83.

Gomez García D and Fillat F. Utilisation du Frêne comme arbre fourrager dans les Pyrénées de Huesca. *Ecologie des milieux montagnards et de haute altitude : documents d'écologie pyrénéenne*, 1984 III-IV : 481-489.

Gongy M. Puyt, J.D. Pellerin, J.L Classification des principes actifs. L'arsenal thérapeutique vétérinaire, Editions le point vétérinaire ; 2001, P 165-168.

Guesmi F, Ben hmed M, Prasad S, Tyagi A. K, Landoulsi A. *In vivo* pathogenesis of colon carcinoma and its suppression by hydrophilic fractions of *Clematis flammula* via activation of TRAIL death machinery (DRs) expression. *Biomedicine and Pharmacotherapy*; 2019, 109: 2182-2191.

Hacker J. Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. *Canad. J. Microbiol*; 1992, 38(7): 720-727.

Haddouche F, Benmansour A. Article de synthèse: Huiles essentielles et activités biologiques, Application à deux plantes aromatiques. *Journal. Techno. labo* N°8 2008.

Hadouchi F, Chaouche T.M, Halla N. Screening phytochimique, activité antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. *Ethnopharmacologie* ; 2016 : 1-9.

Hane K, Kaennel, Dobbertin, M. Le peuplier noir: un géant au pied d'argile. *La forêt*; 2006: 7-8.

Harborne J.B. Phenolics. In: Natural products: their chemistry and biological significance. Eds. Mann J, Davidson R. S, Hobbs J.B, Harborne J.B. Longman (London); 1994, Chap. 6: 361-388.

Harwood C. R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends in Biotechnology*; 1992, 10: 247-256.

Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. *Nat. Prod*; 1994, 11: 41-66.

Hayoun I E.A, Ebardabba M, Boiux M and Hadmi M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L and *Jniperus phonicea* L Fruit extracts. *Food Chem*; 2007; 105: 1126-1134.

Hemingway R.W. Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: Lpant polyphenols: synthesis, proprieties, significande. Laks P.E, Hemingway R.W New York 1992.

Hemlata B, Sara S, Kumud, U. Preliminary phytochemical, physicochemical, anti-oxidant and antimicrobial studies of *Clematis montana* leaves. *Int. J. Curr Pharm. Res*; 2016, 8: 33–36.

Hooper D.C. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones Clinical Infections Disease. 2000 ; 31 (Supp 12). S24 S28.

Isidorov V. A, Vinogorova, V. T. GC-MS Analysis of compounds Extracted from Buds of *Populus balsamifera* and *Populus nigra*. *Z. Natureforsch* ; 2003, 58 : 355-360.

J. Bellakhdar, La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle, Ed Ibis Press, Paris, 1997.

Références bibliographiques

- Jerkovic I**, Mastelic J. Volatile compounds from leaf-buds of *Populus nigra* L. (Salicaceae). *Phytochemistry*; 2003, 63(1): 109-113.
- Jerković I**, Mastelić J. Volatile compounds from leaf-buds of *Populus nigra* L. (Salicaceae). *Phytochemistry*; 2003, 63: 109–113.
- Joly-Guillou M. L**, Sollet J. P, Varache C, Bergogene-Berezin E. Infections dues à *Acinetobacter baumannii*. *Médecine et Maladies Infectieuses* ; 1993, 23 : 67-72.
- Kähkönen M.P**, Hopia A.I, Vuorela H.J, Rauha J.P, Pihlaja K, Kujala T.S, Heinonen M. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric.Food Chem*; 1999, 47: 3954-3962.
- Kaloustian J**, Chevalier J, Mikail C, Martin M, Abou L, Vergnes M.F. Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie*; 2008, 6: 160–164.
- Keener C. S**, Dennis W. M. The Subgeneric Classification of *Clematis* (Ranunculaceae) in Temperate North America North of Mexico. *Taxon*; 1982, 31(1): 37.
- Konrad P**, Adriana E, Rosato, Grzegorz W. Staphylococcus aureus as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta biochimica polinica*; 2009, 56(4): 597-612.
- Krief S**. Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, thèse doctorat, muséum national d’histoire naturelle. 2003 ; 32p.
- Kumar P**, Kumar Singhal V, Kaur. Cytomixis Induced Meiotic Abnormalities in Pollen Mother Cells of *Clematis flammula* L. (Ranunculaceae). *Cytologia*; 2008, 73(4): 381-385.
- Kumar P**, Sati S. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of Himalayan *Fraxinus micrantha* Lingelsh Leaf extract. *Natural Product Research*; 2020: 1-5
- Lambrev J**, Yankov N, Bachvarova T. Adjarova E. Nauchni Trudove Visch Selskostopanski Institute ‘V Kolarov’; 1961, 9:311.
- Landoulsi A**, Roumy V, Rivière C, Sahpaz S, Benhamida J, Hennebelle T. Composition chimique et activités pharmacologiques des espèces tunisiennes du genre *Eryngium* L.(Apiaceae) ; 2018: 1-17.
- Lesueur D**, Serra D.de Rocca, Bighelli A, Hoi T.M, Ban N.K, Thai T.H, Casanova J. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Michelia faveolata* Meryll ex Dandy from Vietnam. *Flavour. Frag J*; 2007, 22: 317-321.
- Liebert C.A**, Hall R.M, Summers A.O. Transposon Tn21, flagship of the floating genome, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; 2000, 63: 507- 522.
- Lutge U**, Kluge M, Bauer G. Botanique (3^e éd). Technique et documentation. Lavoisier. Paris. 2002 ; 211p.
- Macheix JJ**, Fleuriet A, Jay-Allemand C. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d’importance économique. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 2005, p. 4-5.
- Marinova EM**, Yanishlieva N.V, Kostova I.N. *Food Chem*; 1994, 51-125.

Références bibliographiques

Marnotte P, Carrara A, Dominati E, Girardot F. Plantes des rizières de camargue. France. ISBN Cirad, 2006; 2-876714-621-5.

Martin D.W, Schurr M.J, Mudd M.H, Holloway B W, Deretic V. Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infectiog cystic fibrosispatients. *Proc. Natl. Acad Sci. U. S. A.* 1993 ; 90: 83778381.

Meddour A, Yahia M, Benkiki N, Ayachi A. Etude de l'activité antioxydant et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *capparis spinosa* l. *Leban. Sci .J* ; 2013, 14(1): 49-60.

Medjahed Z, Atmani-kilani D, Atmani D, fauconnier M.L . hepatoprotective and ant diabetic activities of *fraxinus angustifolia* vahl extracts in animal models: characterization by high performance liquid chromatography analysis Meyer B, Schneider W, Elstner EF. (1995). *Drug Res*; 2015, 45:174.

Medjahed Z, Atmani-Kilani D, Fauconnier M.L, Richard G, Atmani D. Hepatoprotective and antidiabetic activities of *Fraxinus angustifolia* Vahl extracts in animal models: characterization by high performance liquid chromatography analysis. *Turk J Med Sci*; 2016, 46: 1-11.

Merghache D, Boucherit-Otmani Z, El Hacı I, Merghache S, Chikhi I, Boucherit K. Antioxydants and antimicrobial activities of Algerian *Populus nigra* buds extracts. *Biosci. Engin JI*; 2016, 3(1/2): 3201- 3209.

Michel-Briand Y, Baysse C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*; 2002, 84(5-6): 499-510.

Moreira M.R, Ponce A.G, Del Valle C.E, Roura S.I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Leaving Water Temperature*; 2005, 38: 565-570.

Moulaoui, K, Caddeo C, Manca M.L, Castangia I, Valenti D, Escribano E, Atmani D, Fadda A.M, Manconi M. Identification and nanoentrapment of polyphenolic phytocomplex from *Fraxinus angustifolia*: *In vitro* and *in vivo* wound healing potential. *Eur J Med Chem*; 2015, 89: 179-188.

Mushtaq A, Rasoul, N, Riaz, M, Tareen R.B, Zubair M, Rachid U, Akmal Khan,M, Taufiq-Yap Y.H. Antioxydant, antimicrobial studies and characterization of essential oil, fixed oil of *Clematis graveolens* by GC-MS. *Oxidation Communications*; 2013, 36: 1067–1078.

Naczk M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*; 2004, 1054: 95–111.

Newman D.J, Cragg G.M. Naturel products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 of 2010. *J.Nat. Prod*; 2012, 75 : 311-335.

Nicolas M, Daniel C. Activités technologiques en microbiologie-Techniques de base et méthodologie. Editeurs CRDP D'Aquitaine-Bordeaux. Cité par Allane, T. 2009.

Ogawara H .Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria with special reference to betalactam antibiotics. *Microbial. Rev*; 1981, 45 (4): 591-619.

Références bibliographiques

Ouibrahim F. Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis* L., *Ocimum basilicum* L. et *Rosmarinus officinalis* L.) de l'est algérien. Thèse de doctorat. université badji mokhtar – Annaba (2015).

Ourabah A, Atmani-Kilani D, Debbache-Benaida N, Kolesova O, Azib L, Yous F, Simonetti G. Anti-candida albicans biofilm activity of extracts from two selected indigenous Algerian plants : *Clematis flammula* and *Fraxinus angustifolia*. *J. Herb. Med*; 2019, 100319.

Paolini V, Dorchies Ph, Hoste .. Effet des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre. *Alter. Agri* ; 2003, 17-19.

Pibiri M. .C. Assainissement Microbiologie de l'Air et des Systèmes de Ventilation au Moyen d'Huiles Essentielles, Thèse pour l'obtention du grade de docteur ès sciences. Lausanne, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL) 2006.

Regnault-Roger C, Philogène B.J.R, Vincent C. Biopesticides d'origine végétale. Edition Tec et Doc, Paris, 2008 ; 546p.

Ribéreau-Gayon P. Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod, Paris, 1968 ; 254p.

Ribéreau-Gayon, P. Notions générales sur les composés phénoliques, méthodes générales d'étude des composés phénoliques. In : Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod, 1968 ; p: 1-27.

Rios J. L, Recio M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharma* ; 2005, 100: 80-84.

Rivera Núñez D, Alcaraz Ariza F, Verde López A, Fajardo Rodríguez J, Obón de Castro C. Las Plantas en la Cultura Popular. *Sociedad Mediterranea de Historia Natural, Jumilla*; 2008.

Rodier J, Legube B, Merlet M, Brunet R. L'analyse de l'eau. Edition: Dunod, Paris. 2009; p : 1600.

Sagdic O, Kuscu A ,Özcan M, Özcelik S. Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*; 2002, 19: 473-480.

Schloissnig S, Arumugam M, Sunagawa S, Mitreva M, Tap J, Zhu A, Waller A, *et al.* Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature*; 2013, 493: 45–50.

Siler B, Skoric M, Misic D, Kovacevic B, Jelic M, Patenkovic A, Novicic Z.K. Variability of European Black Poplar (*Populus nigra* L.) in the Danube Basin .*Novi Sad* ; 2014: 9-28.

Strehl E, Schneider W, Elstner EF, *Drug R*; 1995, 45:172.

Tamura M. *Archiclematis* and *Clematis*. In: Hiepko, P. (Ed.), Die Naturlichen Pflanzen familien. Zwei. Aufl. 17a. Duncker and Humblot, Berlin, pp ; 1995 : 366–387 (4).

Tanner F, Chappuis C. *Pseudomonas* et infections hospitalières. *Médecine et Maladies Infectieuses* ; 1983 , 13(6) : 309-392.

Vandar-Unlu G, Silici S, Unlu M. Composition and *in vitro* antimicrobial activity of *Populus* buds and poplar-type propolis, *World J.Microbiol. Biotechnol*; 2008, 24: 43-48.

Vasil M.L. *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J Pediatr* ; 1986, 108 : 800-805.

Vincenot F , Saleh M, Prévost G. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone Des Laboratoires* ; 2008 , (407): 61-69.

Vinod K.G, Amit R, Vikas KN, Kalishankar M. Antimicrobial activity of Spondias pinnata resin. *J. Med Plants Res*; 2010, 4(16): 1656-1661.

Wallander E. Evolution of wind-pollination in *Fraxinus* (Oleaceae) – an ecophylogenetic approach. PhD thesis. Göteborg University, Sweden; 2001.

Woods D. E, Lam J. S, Paranchych W, Speert D. P, Campbell M, Godfrey A. J. Correlation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors from clinical and environmental isolates with pathogenicity in the neutropenic mouse. *Canad. J. Microbio* ; 1997, 43(6) : 541-551.

Yahiaoui B. Cours de Microbiologie générale (2015).

Yous F, Atmani-Kilani D, Debbache-Benaida N, Cheraft N, Sebaihi, S, Saidene N, Benloukil M, Atmani D. Anti-ulcerogenic and proton pump (H⁺, K⁺ ATPase) inhibitory activity of *Clematis flammula* L. extract. *S Afr J Bot*; 2018, 119: 390-399.

Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. *J. Endod*; 2015, 41(8): 1207-1213.

Zhang X-F, Hung T.M, phuong P. T, Min B.S, Song K-S, Seong Y. H, Bae K-H. Anti-inflammatory Activity of Flavonoids from *Populus davitina*. *Archives of pharmacal research*; 2006, 29(12): 1102-1108.

Zhu B Stülke J, SubtiWiki in. From genes and proteins to functional network annotation of the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research*; 2018, 46: 743- 748.

Zouaghi N, Houda Bensiradji N. E, Cavaleiro C. Phytochemical Study and Antibacterial Effects of *Fraxinus angustifolia* Vahl (Algeria): Experimental and Computational Investigations. *Waste Biomass Valor*; 2012: 3605-3616.

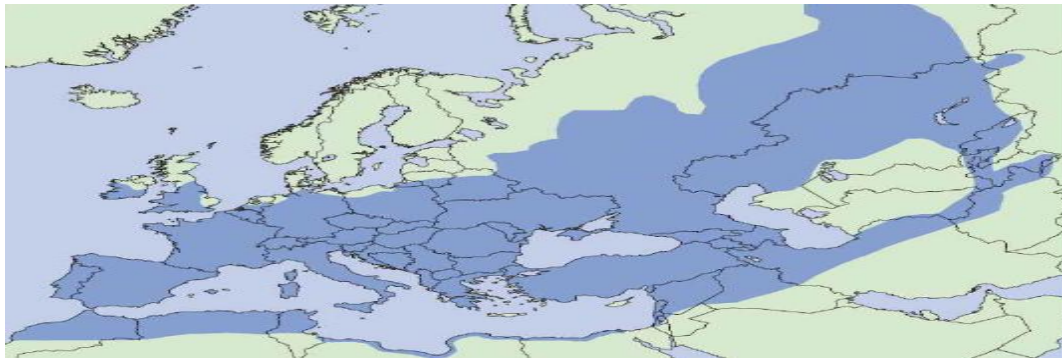
➤ Références numériques

[1] http://www.florabeilles.org/serie/clematis-flammula_apis-mellifera-2.

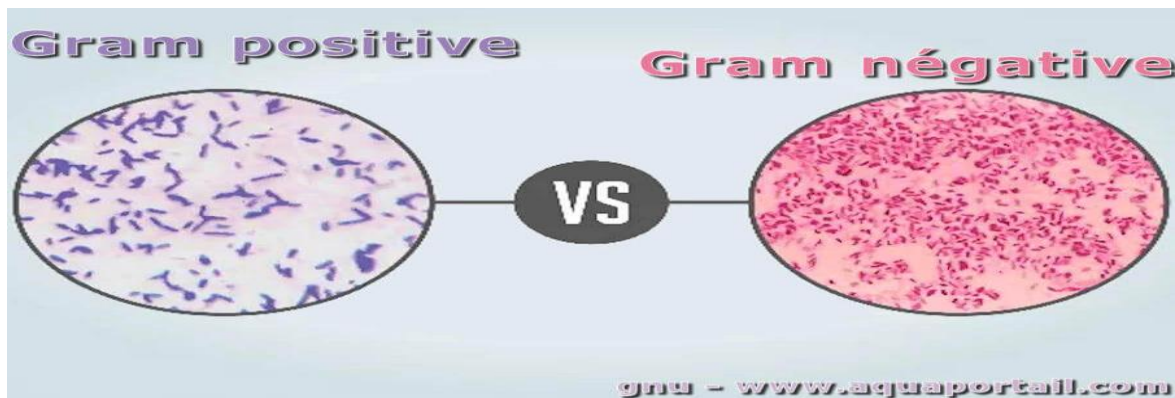
[2] http://www.florealpes.com/comparaison.php?compar_code_1=fraxinusangusti&compar_code_2=frene&zoomph1=4&zoomph2=5&PHPSESSID=.

Annexes

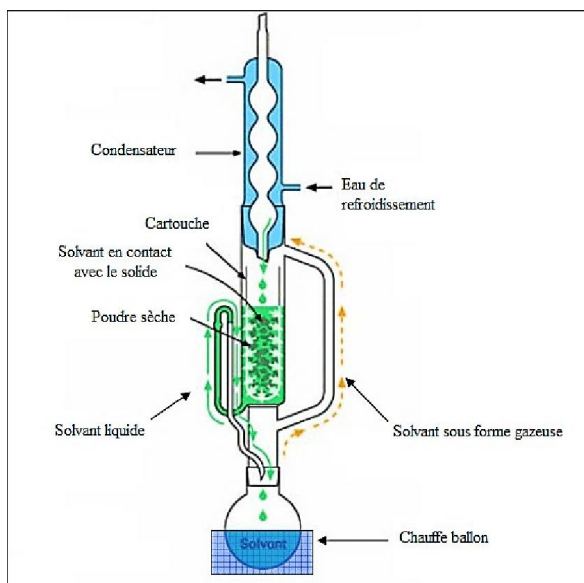
Annexe 01 : Répartition géographique de *Populus nigra*.



Annexe 02 : Coloration de Gram et différence entre les bactéries à Gram positif et négatif.



Annexe 03 et 04 : Schéma représente l'appareil de Soxhlet et photographie de Sonicateur.



Annexe 05 : Préparation des Gélose Nutritive, Gélose Mueller Hinton et Bouillon nutritif :

Un milieu de culture ou une gélose nutritive est support qui permet la culture de bactéries afin de permettre leur étude. En principe les bactéries trouvent dans ce milieu les composants indispensables pour leur multiplication en grand nombre. Ainsi selon le but de la culture, il est possible de placer les micro-organismes dans des conditions optimales, ou tout à fait défavorables. Il se compose d'une base (agar-agar, eau, minéraux...)

Il existe aussi des bouillons de culture qui possèdent la même fonction, mais ces milieux ne contiennent pas d'agar-agar, ils sont donc totalement liquides.

✓ Préparation d'une gélose nutritive :

Tryptone : 5g, extrait de levure : 2.5 g, glucose : 1g, agar : 15 g/let eau distillée : 250 ml

On chauffe jusqu'à ébullition, ensuite on met les milieux de culture dans l'autoclave pour stériliser. On laisse les milieux dans l'autoclave 20 min avec une température de 121°C.

✓ Préparation de la Gélose Mueller Hinton :

Suspendre les composants, poudre déshydratée, dans l'eau (38 grammes dans 1000 ml d'eau purifiée/distillée). Le milieu est bouilli pendant jusqu'à dissolution complète des ingrédients. Stériliser par autoclavage (121°C) pendant 15 minutes

Composition gélose Mueller Hinton	
Ingrédients	gramme/litre
Peptone	17.5g
Extrait de viande	2g
Amidon	1.5g
Agar	17g



Photographie de la gélose Mueller Hinton

✓ **Composition de la Gélose Hektoen :**

Composition gélose Hektoen			
Ingrédients	gramme/litre	Ingrédients	gramme/litre
Protéose peptone	12g	Extrait de levure	3g
Chlorure de sodium	5g	Sels biliaries	9g
Citrate de fer ammoniacal	1,5g	Salicine	2g
Lactose	12g	Saccharose	12g
Fuchsine acide	0,1g	Bleu de bromothymol	0,065g

✓ **Composition de la Gélose Chapman :**

Pour 1 litre de milieu :

Composition gélose Chapman	
Ingrédients	gramme/litre
Peptone	10 g
Extrait de viande de boeuf	1 g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol	10g
Rouge de phénol	0,025g
Gélose	15g

✓ **Composition de la Gélose Plate Count Agar :**

Composition gélose PCA	
Ingrédients	gramme/litre
Tryptone	5g
Extrait de levure	2.5g
Glucose	1g
Agar agar bactériologique	12g

✓ **Préparation de l'eau physiologique:**

Dans un flacon de capacité de 1L, on dissout 9g de NaCl dans un litre d'eau distillée et on mélange quelques minutes. Ensuite on met dans chaque tube à essai 9ml de l'eau physiologique.



Annexe 06 : Technique d'ensemencement par stries sur les boîtes de Pétri :

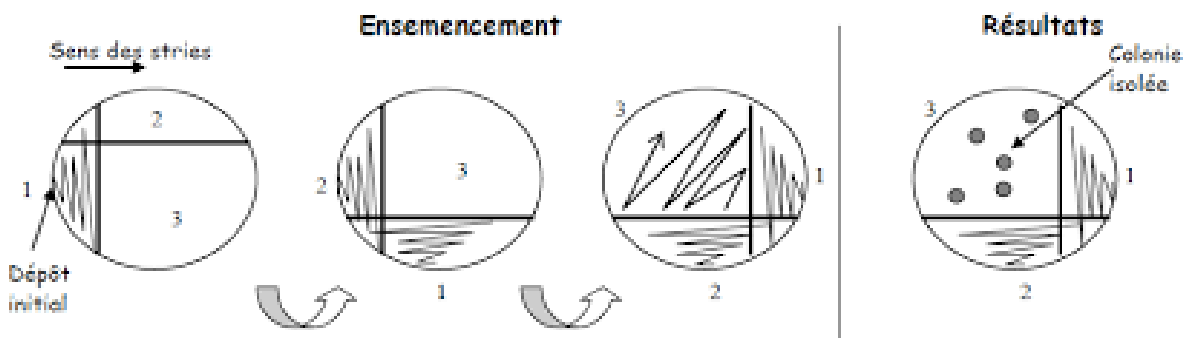


Schéma explicatif sur la méthode d'ensemencement

Annexe 07 : Préparation de Mc Farland Standard :

Le standard McFarland 0.5 est utilisé lors de préparation d'inoculum bactérien pour tests de sensibilité aux agents antimicrobiens donc utilisés comme une référence afin d'ajuster la turbidité de la suspension bactérienne.

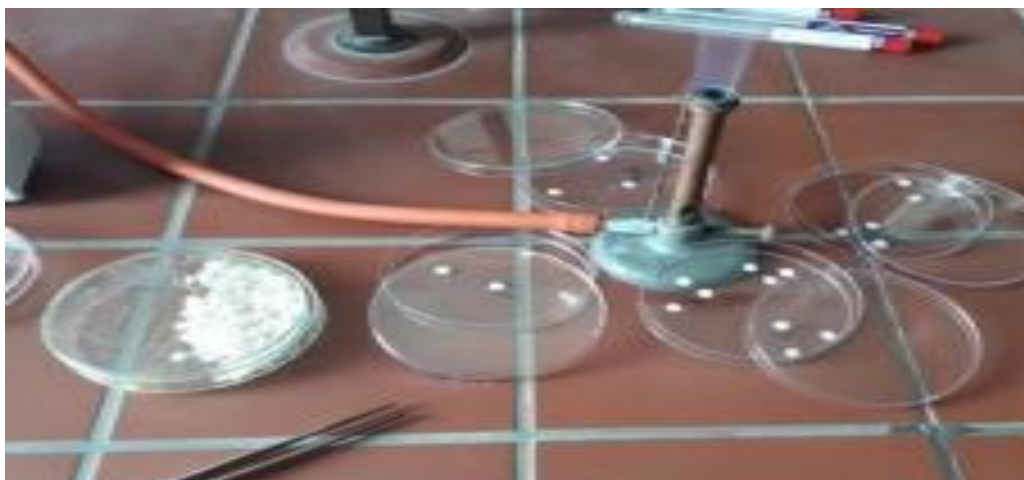
✓ **Préparation de Mc Farland :**

Préparé en mélangeant 0,05 ml de chlorure de baryum à 1,175%



dihydraté ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), avec 9,95 ml d'acide sulfurique à 1% (H_2SO_4).

Annexe 08 : Dépôt des disques de Wattman sur la gélose :



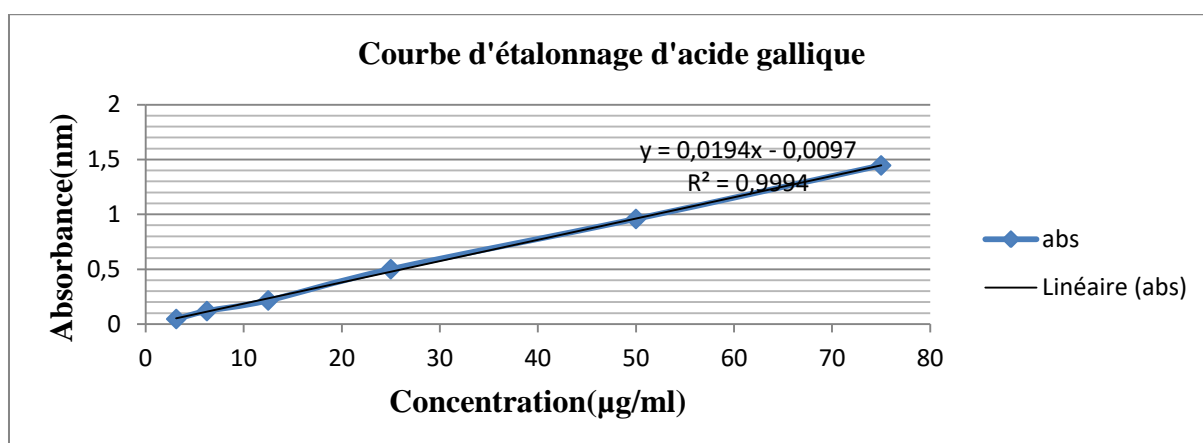
Annexe 09 : Les absorbances correspondantes aux étalons de l'acide gallique et la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

C (µg/ml)	100	75	50	25	12,5	6,25	3,125
A (nm)	1,579	1,446	0,958	0,5	0,215	0,118	0,046

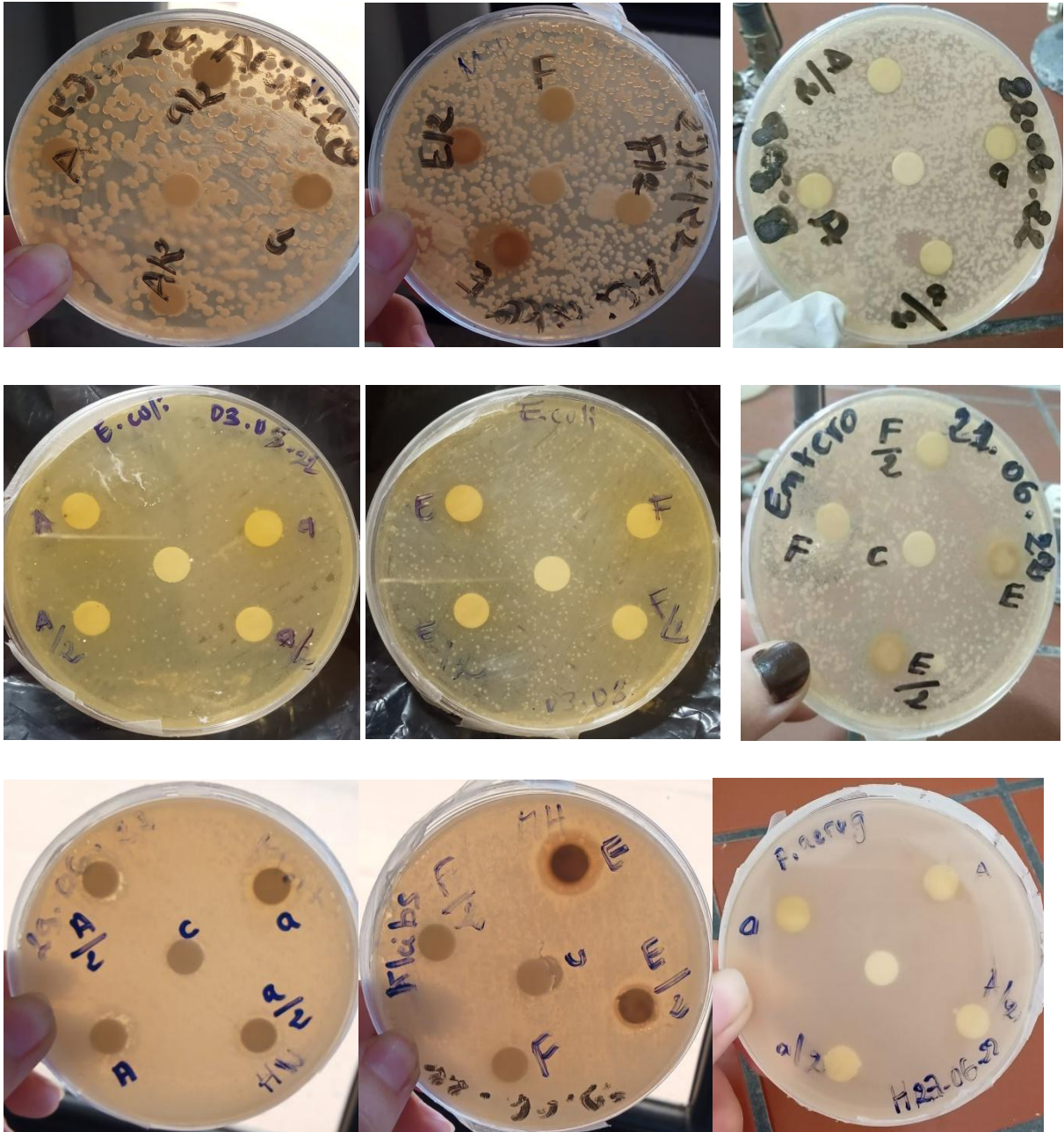
C : concentration (µg/ml)

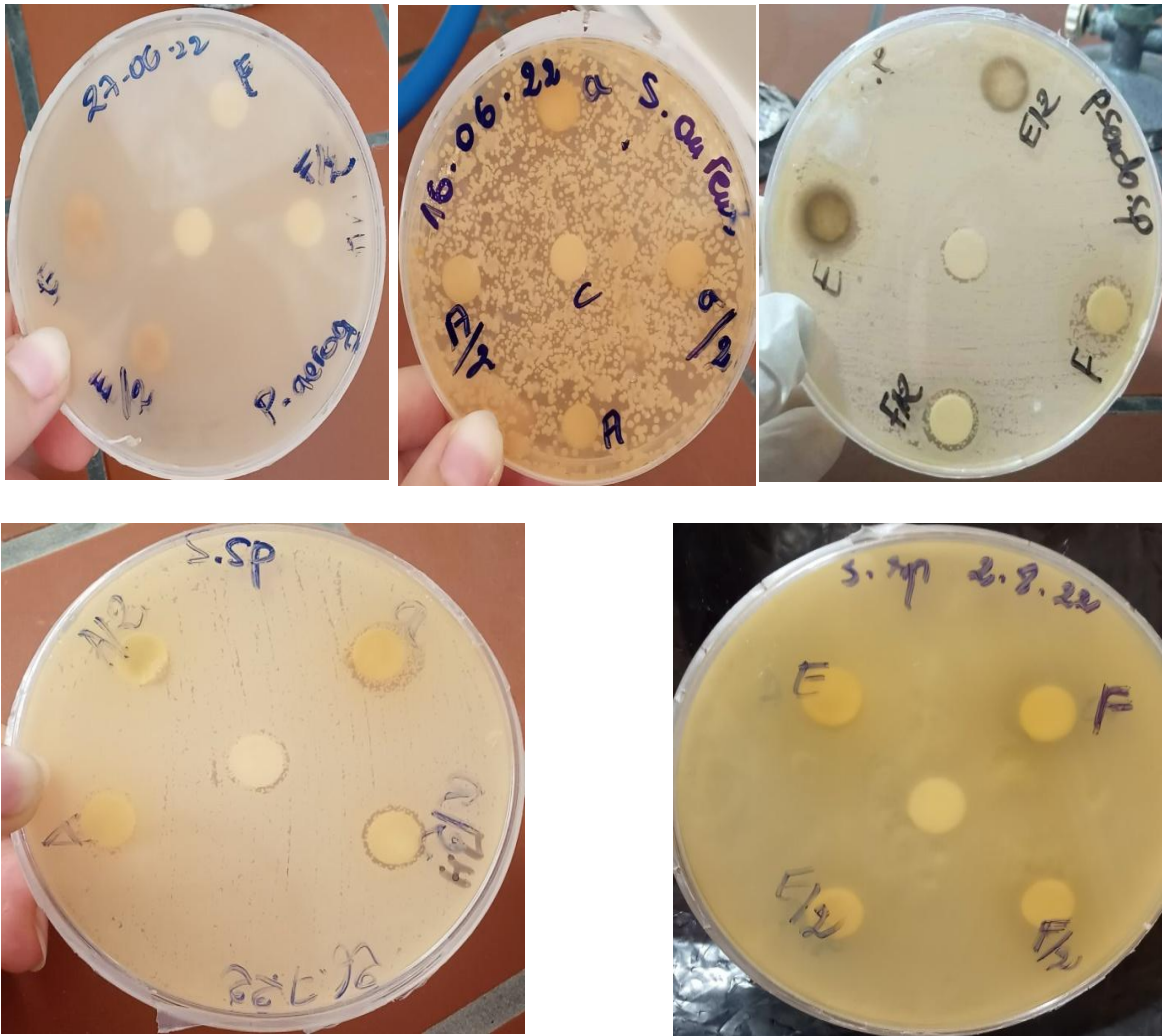
A : absorbance (nm)

Le blanc est d'une absorbance : $A = 0,105$ nm

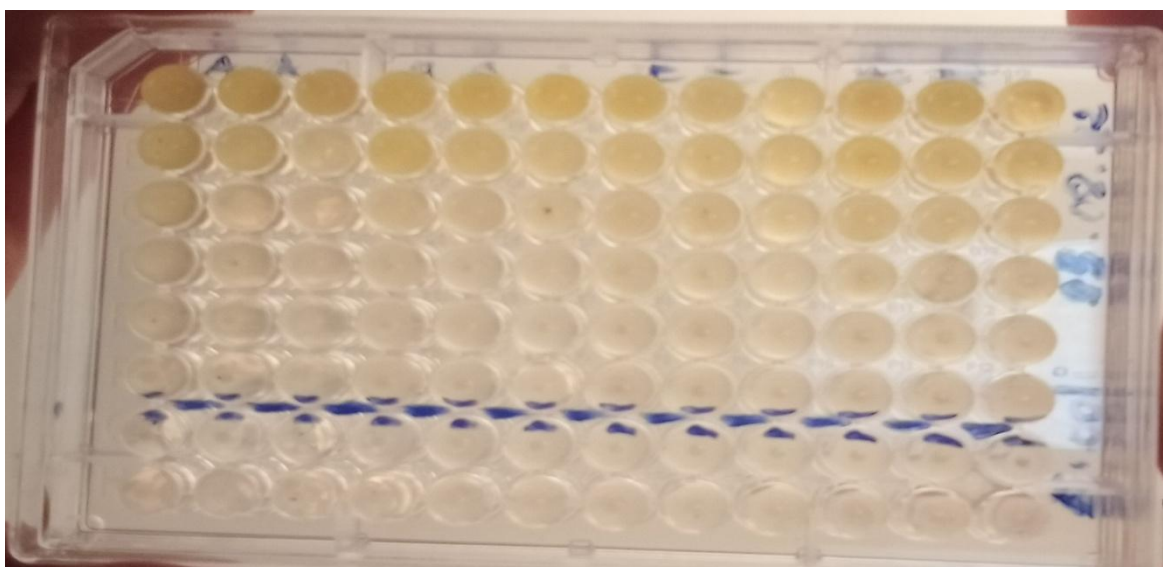


Annexe 10 : Résultats des tests antibactériens sur milieu solide :

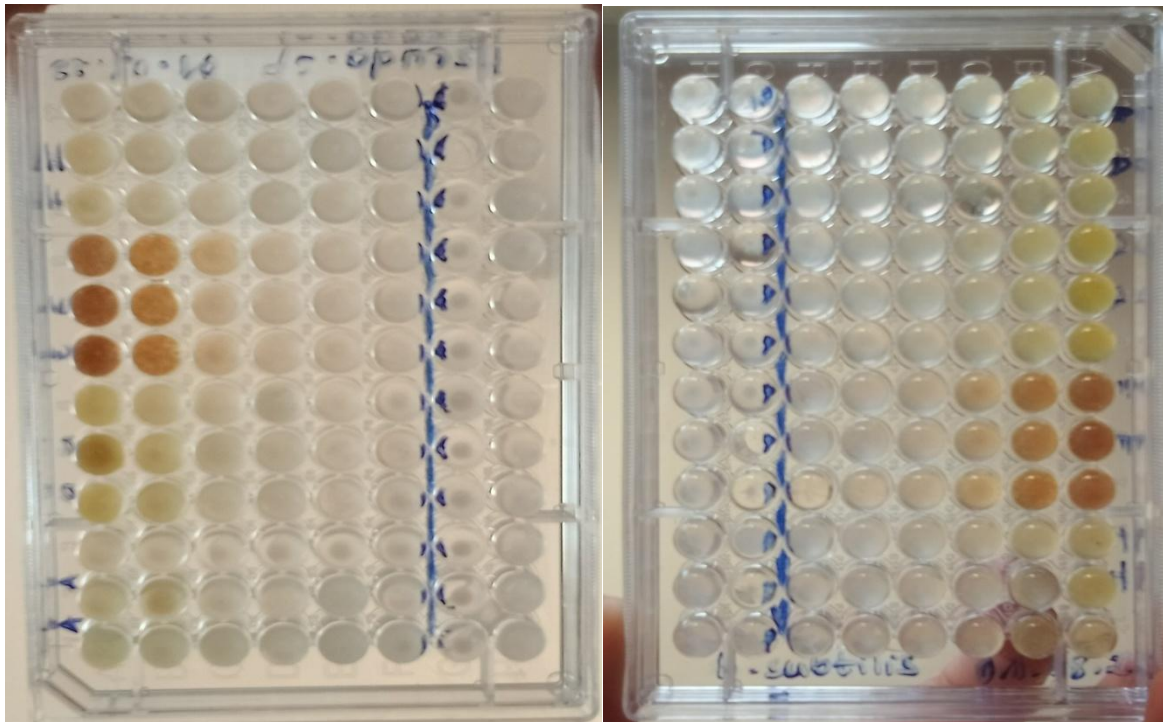




Annexe 11 : Résultats des tests antibactériens par la microdilution (sur milieu liquide)



Résultats de la CMI des quatre extraits contre *Escherichia coli*



Résultats de la CMI des quatre extraits contre *Pseudomonas sp* et *Bacillus subtilis*



Résultat de la CMI des quatre extraits contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*

Résumé

La présente étude est consacrée pour l'évaluation *in vitro* des propriétés antibactériennes des extraits éthanoliques, issus des bourgeons de *Populus nigra* et des feuilles de *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia*, sur des différentes souches bactériennes (*Acenitobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia Coli*, *Klebsiella pneumonie*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp*, *Salmonelle sp*, *Staphylococcus aureus*). Le potentiel antibactérien est évalué en utilisant deux techniques : la diffusion sur disques en milieu gélosé et la microdilution. L'étude de l'activité antibactérienne des différents extraits a montré qu'il existe des variations de sensibilité des bactéries testées selon les extraits bruts. En ce qui concerne le dosage quantitatif des polyphénols, il a révélé que *Clematis flammula* est très riche et présente la teneur la plus élevée qui est de 115,31 (mg EAG/g MS). En plus du dosage, les résultats des tests antibactériens, montrent que *Clematis flammula* a significativement inhibé la croissance de toutes les souches à l'exception d'*Escherichia Coli* et *Salmonella sp*, en provoquant des zones d'inhibitions de 10 à 18 mm de diamètre et une CMI est comprises entre 0,25 mg/ml et 1mg/ml.

Mots clés : Antibactériens, *P. nigra*, *C. flammula*, *F. angustifolia*, polyphénols, CMI.

Abstract

The present study is devoted to the *in vitro* evaluation of the antibacterial properties of ethanolic extracts, derived from *Populus nigra* buds, *Clematis flammula* and *Fraxinus angustifolia* leaves, on different bacterial strains (*Acenitobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia Coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp*, *Salmonella sp* and *Staphylococcus aureus*). The antibacterial potential is evaluated using two techniques: diffusion of the discs on agar medium and microdilution. The study of the antibacterial activity of the different extracts has shown that there are variations in the sensitivity of the bacteria tested according to the raw extracts. Regarding the quantitative determination of polyphenols, it turned out that *Clematis flammula* is very rich and has the highest content which is 115, 31 (mg EAG/g DM). In addition to the assay, the results of the antibacterial tests show that *Clematis flammula* significantly inhibited the growth of all strains except *Escherichia Coli* and *Salmonella sp* by causing inhibition zones of 10 to 18 mm diameter, and a MIC is between 0, 25 mg/ml and 1mg/ml.

Key words: Antibacterials, *P. nigra*, *C. flammula*, *F. angustifolia*, polyphenols, CMI.