

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITE ABDERRAHMANE MIRA BEJAIA
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie Appliquée

Mémoire

Présenté par : Melle MENASRIA Lydia

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie

Option : Biotechnologie microbienne

Thème

*Etude des teneurs en alcaloïdes d'une
plante médicinale «*Matricaria
pubescens*» et la détermination de leurs
activités antibactériennes*

Devant le jury :

Présidente : Mme KHEMTACHE S.

Promoteur : Mr AMIR N.

Examinatrice : Melle TAHIRI O.

Grade et lieu :

(M.A.A université de Bejaia)

(M.A.A université de Bejaia)

(M.A.A université de Bejaia)

2013-2014



Remerciement

Je remercie le bon dieu tout puissant de m'avoir donné la force, le courage et la volonté de faire et de finir ce modeste travail.

*Toute mon estime et ma respectueuse gratitude vont à mon promoteur **Mr AMIR Nadir** ainsi que ma copromotrice **M^{me} AMIR Hassiba** pour avoir accepté de m'encadrer, pour leur conseils fréquents et avisés, et leur gentillesse. Toute ma reconnaissance pour vous.*

*J'exprime ma reconnaissance à **M^{me} KHEMTACHE** qui m'a fait l'honneur de présider le jury.*

*Mes chaleureux remerciements vont également à **M^{me} TAHIRI** qui m'a fait l'honneur d'examiner ce travail.*

Toute ma gratitude à tous les enseignants de l'Université, surtout ceux qui ont contribué à ma formation.

J'exprime également toute mon amitié et ma reconnaissance aux nombreuses personnes rencontrées au cours de mes études, qui m'ont motivé, soutenu, corrigé.

Lydia

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail au premier lieu à maman et papa qui m'ont toujours soutenu dans ma vie et pour leur amour, sacrifice, soutien et patience durant toute ma vie. Trouvez dans ce travail accompli, tous le respect et l'amour que je vous porte.

A mon très cher petit frère Moumouh et mes très chères sœurs

Katia et sissa je vous adore tous.

A mon fiancé Halim, qui était toujours à mes cotés

A ma belle famille

A mes tantes, mes cousines et mes cousins surtout Khalef

Une pensée spéciale à ma chère KENZA à qui je souhaite un bon rétablissement.

A celles avec qui j'ai partagé cinq merveilleuses années d'études, de joies, des hauts et des bas mes chères copines Fahima, yasmine Dyhia et Nariman merci de m'avoir supporté toutes ces années et d'avoir toujours été présentes pour moi

A ma promotion « 2014 » A tous ceux qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans ce travail, je leur suis reconnaissante du fond du cœur, merci ! Que Dieu vous réserve de très belles surprises dans votre vie.

Lydia qui vous aime

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
01	Structure chimique de la morphine	05
02	Structure chimique de la nicotine	06
03	Structure chimique de la caféine	06
04	Taux d'extraction en alcaloïdes de <i>Matricaria pubescens</i> en fonction du pH et de la polarité du solvant utilisé ainsi que le procédé d'extraction.	14
05	Effet de la concentration en alcaloïdes de l'extrait éthanolique sur les souches testées	16
06	Effet de la concentration en alcaloïdes de l'extrait alcalin sur les souches testées	17
07	Effet de la concentration en alcaloïdes de l'extrait acide sur les souches testées	17

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
I	Classification botanique de <i>Matricaria pubescens</i>	02
II	Résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) mg/ml	21
III	Résultats de l'activité bactéricide ou bactériostatique des extraits de <i>Matricaria pubescens</i>	22
IV	Résultats des synergies extrait/antibiotiques sur <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	24

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photo	Titre	Page
01	Photographie de la plante <i>Matricaria pubescens</i>	03
02	Résultats du test phytochimique par le réactif Dragendorff	13
03	Activité antibactérienne de l'extrait éthanolique sur <i>A.baumannii</i> 897	20
04	Activité antibactérienne de l'extrait alcalin sur <i>A.baumannii</i> 897	20
05	La CMI de l'extrait éthanolique de <i>Matricaria pubescens</i>	22
06	Activité bactéricide/ bactériostatique des extraits	23
07	L'activité bactéricide de l'extrait alcalin sur <i>A.baumannii</i> 897	23

Sommaire

	page
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des photographies	
Introduction.....	01
I.1.Généralités.....	02
I.2. Présentation de l'espèce <i>Matricaria pubescens</i>	02
I.2.1. Description morphologique.....	02
I.2.2. Taxonomie.....	02
I.2.3. Noms vernaculaires.....	03
I.2.4 Habitat et répartition géographique	03
I.2.5.Utilisation traditionnelle de la plante	03
I.2.6. Composition chimique de <i>Matricaria pubescens</i>	04
I.3. Les alcaloïdes	04
I.3.1. Distribution et localisation des alcaloïdes.....	05
I.3.2. Classification des alcaloïdes	05
I.3.3. Biosynthèse des alcaloïdes.....	06
I.3.4. Activités biologiques des alcaloïdes.....	06

II. Matériel et méthodes.....	08
II.1. Milieux et réactifs utilisés	08
II.1.1. Milieux utilisés	08
II.1.2. Réactifs utilisés.....	08
II.2. Préparation du matériel végétal.....	08
II.3. Préparation des extraits	08
II.3.1. Extraction dans un milieu alcalin.....	09
II.3.2. Extraction dans un milieu acide.....	09
II.3.3. Extraction dans un milieu alcool.....	09
II.3.3.1. Extraction avec l'éthanol et le méthanol par le soxhlet.....	10
II.3.3.2. Extraction à l'éthanol par macération.....	10
II.4. Détermination du taux d'extraction	10
II.5. Test phytochimique.....	11
II.6. Détermination de l'activité antibactérienne	11
II.6.1. Les souches bactériennes utilisées	11
II.6.2. Préparation de la suspension bactérienne.....	11
II.6.3. Aromatogramme.....	11
II.6.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)..	12
II.6.5. Détermination de l'activité bactéricide ou bactériostatique	12
II.6.6. Etude de la synergie entre extrait et antibiotique	12

III. Résultats et discussion	13
III.1. Le taux d'extraction.....	13
III.2. Détermination de l'activité antibactérienne	15
III.2.1. Aromatogramme	15
III.2.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI)	20
III.2.3. Activité bactéricide ou bactériostatique.....	22
III.2.4. Synergie extrait /antibiotique.....	24
Conclusion.....	25
Références bibliographiques.....	26

Annexes

Introduction

L'antibiothérapie au cours des dernières années a fait face à des difficultés, à cause de l'augmentation alarmante de l'incidence des nouvelles et émergentes maladies infectieuses, l'apparition des effets secondaires indésirables de certains antibiotiques ainsi que le développement croissant de la résistance aux antibiotiques (Mandal et *al.*, 2011 ; Adwan et *al.*, 2010), pour cela la recherches de nouvelles substances présentant des activités antimicrobienne est devenue une nécessité (Tekwu et *al.*, 2012). Les plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle représentent non seulement une source naturelle de nouvelles molécules bioactives ; mais aussi une source de produits naturels qui pourraient être utilisés comme agents médicamenteux (Djellouli et *al.*, 2013), tels que les composés phénolique, les terpénoïdes et les alcaloïdes.

Ces derniers sont parmi les plus importants groupes de produits naturels, en raison de leurs propriétés biologiques et de leur diversité structurale. Comme ils peuvent être des poisons mortels à forte dose (Muniz, 2006).

La famille des Asteraceae, est la plus grande et la plus vaste classe des dicotylédones, c'est une source de métabolites secondaires particulièrement Variés, elle comprend environ 900 genres et 15000 espèces, distribués principalement dans les zones tempérées du globe. (Park et Kin, 1998 ; Judd et *al.*, 2002).

Matricaria pubescens objet de cette étude est très peu étudiée, ce qui rend cette étude particulièrement intéressante. En 2012, Makhloufi et ses collaborateurs ont démontré que les huiles essentielles isolées de *Matricaria pubescens* possèdent une activité contre les bactéries. Alors qu'en 2013, Djellouli et *al.* ont réalisé une étude sur cette plante par des tests de dépistage phytochimique pour démontrer l'existence des ressources naturelles et leurs propriétés thérapeutiques.

Dans ce travail qui rentre dans le cadre d'un projet de recherche Cnepru du laboratoire de Biotechnologie végétale et ethnobotanique, *Matricaria pubescens* est utilisée pour l'extraction des alcaloïdes par différentes méthodes puis l'évaluation de leurs activités antibactérienne sur diverses souches microbienne.

I.1. Généralités

Les remèdes naturels basés sur les plantes médicinales ont été pendant longtemps le principal recours des populations pour soigner diverses pathologies (Ould El Hadj et *al.*, 2003). Le Sahara Algérien qui est l'un des plus vastes et des plus chauds déserts du monde, présente une flore spécifique très diversifiée, renfermant de nombreuses espèces endémiques hautement adaptées au climat de la zone (Makhloufi, 2013). Certaines espèces possèdent des propriétés pharmacologiques qui leur confèrent un intérêt médicinal certain, le cas de *Matricaria pubescens*, qui est largement utilisée, mais qui reste néanmoins très peu étudiée.

I.2. Présentation de l'espèce *Matricaria pubescens*

I.2.1. Description morphologique

Matricaria pubescens (photo 1), est une plante aromatique spontanée et endémique. Elle appartient à la famille des Astéracées (tableau I), elle possède de nombreuses tiges couchées puis redressées sous forme de touffes. Les feuilles découpées et velues sont d'un vert sombre. Bractées et ayant une marge membraneuse large, les fleurs toutes en tubes, de coloration jaune, sont groupées en capitules dont le diamètre est de 6 à 7mm (Ozenda, 2004).

I.2.2. Taxonomie

La classification botanique de *Matricaria pubescens* est décrite comme suit (Judd et *al.*, 2002 ; Ozenda, 2004) :

Tableau I : Classification botanique de *Matricaria pubescens*

Embranchement	Spermaphytes
S / Embanchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédones
Sous-classe	Compositae
Ordre	Asterales
Famille	<i>Astéracées</i>
Genre	<i>Matricaria</i>
Espèce	<i>Pubescens</i>

I.2.3. Noms vernaculaires

Le nom scientifique de la matricaire, *Matricaria pubescens*, dérive du latin *Matricaria* désignant matrice ; *pubescens* signifiant velu.

- ✓ En arabe : Guertoufa, Ouazouza ;
- ✓ En tamashaq : Aynasnis ;
- ✓ En français : Camomille ;
- ✓ En anglais : Hairy camomille (Hammiche et Maiza, 2006).



Photo 1 : Photographie de la plante *Matricaria pubescens* (Djellouli et *al.*, 2013)

I.2.4 Habitat et répartition géographique

Selon les critères de l'UICN (l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature) cette matricaire est endémique en Afrique du nord. Au niveau local (Sahara Algérien), cette plante est commune dans tout le Sahara septentrional correspondant aux régions de : Biskra, Figuig, El oued, Touggourt, Béchar, Ghardaïa, El Golèa, Ouargla, Beni Abbés, et dans le Sahara central qui comprend les régions de : Adrar, Tamanghasset, Djanet, Fort-polignac, Fort-Flatters, Timimoune, In Salah (Ozenda, 1991).

I.2.5. Utilisation traditionnelle de la plante

Matricaria pubescens possède des propriétés anti-inflammatoires, antimicrobiennes et cytotoxiques (Maiza et *al.*, 2011), elle est utilisée pour le traitement des

affections oculaires, dysménorrhée (troubles liés à la menstruation), toux et maux de rein, (Ould El Hadj et *al.*, 2003), ulcère gastrique, ballonnements et asthme (Djellouli et *al.*, 2013)

Elle est également utilisée pour traiter les rhumatismes, les courbatures, les allergies et les morsures de scorpions (Hammiche et Maiza, 2006). En usage externe, la matricaire est utilisée couramment dans le domaine dermatologique (Makhloufi, 2013). Dans l'alimentation *Matricaria pubescens* est utilisée pour donner une bonne saveur au thé, pour la préparation des soupes et dans la conservation du beurre transformé traditionnellement. En fonction de la maladie à traiter, cette plante est utilisée sous différentes formes à savoirs macération, décoction, infusion ou inhalation (Djellouli et *al.*, 2013). Elle est récoltée et commercialisée à grande échelle dans les marchés algériens (Lhuilier, 2007).

I.2.6. Composition chimique de *Matricaria pubescens*

Un grand nombre de plantes du genre *Matricaria* ont fait à ce jour l'objet de plusieurs études, telles que des études chimiques et isolement de nombreux métabolites secondaires (Benkiki, 2006).

Les composés phytochimiques thérapeutiques trouvés dans *Matricaria pubescens* comprennent les alcaloïdes, les saponines, les terpènes et les stéroïdes, Les polyphénols, tannins et flavonoïdes (Djellouli et *al.*, 2013).

I.3. Les alcaloïdes

Les métabolites secondaires sont un groupe de molécules qui interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement, ainsi que dans la défense contre les prédateurs et les pathogènes (Judd et *al.*, 2002). Ils peuvent être utile dans la prévention contre plusieurs maladies (cancer, maladies circulatoires, les infections viral...) (Namdeo, 2007).

Parmi les premiers produits naturels isolés des plantes médicinales ; les alcaloïdes (Schauenberg et Paris, 2005), ils forment un vaste groupe de métabolites secondaires (El Tahchy, 2010), qui ont eu un impact majeur dans l'histoire médicale de l'homme (Al-Fartosy, 2013).

Un alcaloïde est un composé organique hétérocyclique d'origine naturelle, azoté, plus ou moins basique (Ameyaw et Duker-Eshun, 2009), de distribution restreinte et dotés, à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées (El Tahchy, 2010). Ils constituent une classe présentant une grande diversité structurale (Muniz, 2006). Ils se produisent normalement

dans la plante sous forme de sels ou de bases libres ou en combinaison (avec les tanins en particulier). (Breneton, 1999 ; Kashani, 2012).

En 1803, DEROSNE a isolé le premier alcaloïde semi-pur du latex sec de l'opium (*Papaver somniferum*), une drogue utilisée depuis des siècles pour des propriétés analgésiques et narcotiques. En 1805, SERTÜRNER a caractérisé cet alcaloïde et la nommée morphine, (Walton et Brown, 1999) (Figure 1).

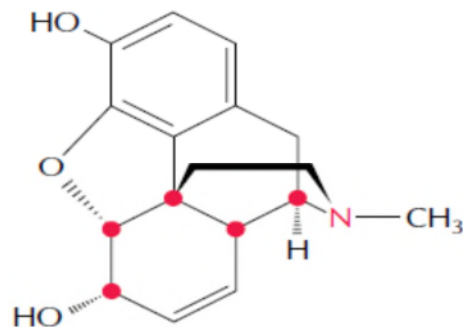


Figure 1 : Structure chimique de la morphine (Rodney et *al.*, 2000).

I.3.1. Distribution et localisation des alcaloïdes

Chez le végétaux, les alcaloïdes sont des composés essentiellement présents chez les Angiospermes, ils sont exceptionnels chez les bactéries (pyocyanine de *Pseudomonas aeruginosa*), et assez rares chez les champignons (ergolines des *Claviceps*). Ils existent également chez les animaux. (Breneton, 1999)

I.3.2. Classification des alcaloïdes

La classification des alcaloïdes est basée sur plusieurs critères, à savoirs l'origine biologique, la voie de biosynthèse, la structure et les propriétés spectroscopiques/spectrométriques (Hesse, 2002). Une autre classification a été rapportée par (Bennett et Wallsgrove, 1994) où les alcaloïdes ont été divisés en trois grandes classes en fonction des précurseurs et la structure finale :

- **Alcaloïdes vrais** : ils sont des dérivés des acide aminés, basique et contiennent l'azote dans l'hétérocycle, par exemple la nicotine (figure 2) et l'atropine.

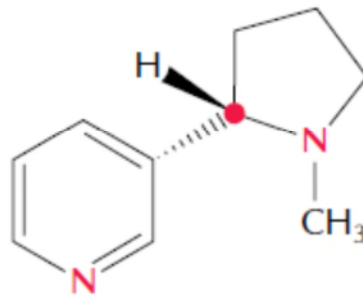


Figure 2 : Structure chimique de la nicotine (Rodney *et al.*, 2000)

- **Pseudo-alcaloïdes :** ils représentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, ils sont basique mais ne sont pas dérivés des acides aminés, par exemple caféine (figure 3) et solanidine ;

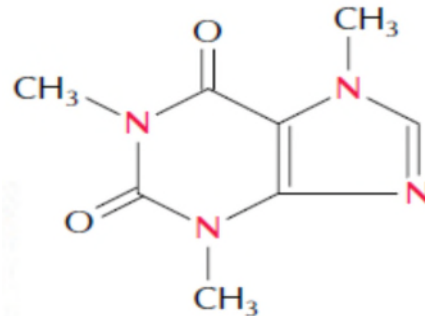


Figure 3 : Structure chimique de la caféine (Rodney *et al.*, 2000)

- **Proto-alcaloïdes :** sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique, ils ont un caractère basique et sont élaborés *in vivo* à partir d'acides aminés.

I.3.3. Biosynthèse des alcaloïdes

La biosynthèse des alcaloïdes a lieu au niveau du réticulum endoplasmique, la basicité de la plupart de ces alcaloïdes impose leur compartimentation dans les vacuoles cellulaires. Leur synthèse s'effectuent le plus souvent au niveau de sites précis, ils sont ensuite transportés dans leurs sites de stockage. (Breneton, 1999 ; Rios *et al.*, 2005)

L'ornithine et la lysine, acides aminés diamines, la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane, acides aminés aromatiques, sont le point de départ de la synthèse de nombreux alcaloïdes. La première étape consiste dans tous les cas à la décarboxylation des acides aminés par des décarboxylases spécifiques. La tyrosine et la phénylalanine, composés à

l'origine du noyau aromatique sont les précurseurs de l'important groupe des alcaloïdes isoquinoléiques. (Breneton, 1999)

I.3.4. Activités biologiques des alcaloïdes

Les propriétés biologiques des alcaloïdes sont aussi variées que leurs structures, elles sont bénéfiques dans le traitement de différentes maladies ou des dysfonctionnements de l'organisme humain (Muniz, 2006). A titre d'exemple, les alcaloïdes agissent au niveau du système nerveux central comme antidépresseurs (morphine, scopolamine) ou stimulants (strychnine, caféine). Ils peuvent être utilisés comme des antitumoraux, et des antipaludiques (Bruneton, 1999).

Les alcaloïdes possèdent aussi des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et antibactériennes (Karou, 2006). En 2005, Sawyer et ses collaborateurs ont démontré que les alcaloïdes indoloquinoline, cryptolépine provoquent la lyse cellulaire et des changements morphologiques sur *Staphylococcus aureus*, mais ces effets sont peut être dues à d'autres mécanismes puisque ce composé est connu pour être un agent intercalant de l'ADN et un inhibiteur de la synthèse d'ADN par inhibition de la topoisomérase (Karou, 2006). La berberine est douée de propriétés bactériostatiques a faible dose, bactéricides a dose plus forte, elle est active sur de nombreux germes (staphylocoques, streptocoques, mais aussi salmonelles, proteus, vibrions...etc.) (Khalid et *al.*, 2004).

II. Matériel et méthodes

II.1. Milieux et réactifs utilisés :

II.1.1. Milieux utilisés :

- Muller Hinton (MH)
- Trypticase Soja Agar (TSA)
- Bouillon Nutritif (BN)

II.1.2. Réactifs utilisés :

- Methanol (BIOCHEM)
- Ethanol (SIGMA-ALDRICH)
- Chloroforme
- Dichloromethane
- Hexane
- Acide Acétique
- Acide Sulfurique
- Ammoniac
- Acide Chlorhydrique
- Dimethyl Sulfoxyde (DMSO)
- Réactif de Dragendorff

II.2. Préparation du matériel végétal

La plante « *Matricaria pubescens* » a été récoltée dans la région de Hassi Massoud willaya de Ouargla durant le mois d'avril 2013. Après la récolte, l'échantillon est séché à température ambiante à l'abri de la lumière. La matière sèche obtenue est réduite en poudre à l'aide d'un broyeur électrique, puis tamisée en utilisant deux tamiseurs de granulométries différentes (500 et 250 μ m), les fractions dont le diamètre inférieur à 250 μ m sont retenues pour l'extraction.

II.3. Préparation des extraits

Les alcaloïdes totaux de *Matricaria pubescens* sont extraits en utilisant plusieurs protocoles avec différents solvants d'extraction (extraction dans un milieu alcoolique, dans un milieu acide et dans un milieu alcalin).

Tous les protocoles d'extraction sont précédés par une délipidation, en mélangeant 20g de poudre végétale avec 100ml d'hexane. Après 48 heures de macération, le mélange est filtré, le marc obtenu est dégraissé puis séché à l'air libre, et le filtrat jeté.

II.3.1. Extraction dans un milieu alcalin

Le protocole d'extraction des alcaloïdes dans un milieu alcalin est proposé par STAS (1850) avec quelques modifications ; 10g de poudre délipidés sont repris dans 100ml de chloroforme basifiés à un pH= 9 par l'ajout de quelques gouttes d'ammoniac. Après 24 heures de macération afin de libérer les alcaloïdes de leurs combinaisons salines, le mélange est filtré (pour un bon épuisement du marc, la manipulation est répétée trois fois). Le marc épuisé est jeté et le filtrat est recueilli et concentré partiellement au rotavapeur. La phase chloroformique concentrée subit une extraction par 100 ml d'une solution d'acide sulfurique (pH= 03). La phase acide est alcalinisée par une solution d'ammoniac au pH = 9. Il est procédé à une extraction (liquide-liquide) dans une ampoule à décantation après rajout de 20 ml de chloroforme. L'ensemble est mélangé doucement en agitant de haut en bas. Après environ 30 mn, la phase organique est récupérée puis concentrée à sec, le résidu obtenu (alcaloïdes brute) est récupéré avec le DMSO et conservé à 4°C.

II.3.2. Extraction dans un milieu acide

L'extraction des alcaloïdes totaux de la matricaire dans un milieu acide a été faite selon le protocole de Makkar et *al.* (2007) sur lequel des modifications ont été apportées. 10g de poudre délipidés sont mélangés avec 100ml d'acide acétique à 15% (dans le méthanol). Après 72 heures de macération une filtration est réalisée, le filtrat récupéré est alcalinisé avec de l'ammoniac jusqu' à PH = 9. Après filtration, l'extrait est concentré au rotavapeur, puis alcalinisé par l'addition de quelques gouttes d'ammoniac. La solution obtenue est extraite par le chloroforme jusqu'à épuisement total, la phase organique est concentrée. Le résidu sec obtenu est récupéré avec le DMSO puis conservé à 4 °C.

II.3.3. Extraction dans un milieu alcool

L'extraction des alcaloïdes dans un milieu alcoolique a été réalisé en utilisant deux solvants de différente polarité (l'éthanol et le méthanol), soit par macération ou à l'aide du soxhlet.

II.3.3.1. Extraction avec l'éthanol et le méthanol par le soxhlet

Les alcaloïdes sont obtenus selon la méthode de Ross et Rain (1977) rapportée par Harborne (1998); La poudre délipidée (10g) est extraite au Soxhlet par 300ml d'alcool (éthanol et méthanol) pendant 8h. L'extrait alcoolique obtenu est évaporé à sec puis repris par 50ml de chloroforme acidifié par une solution d'acide chlorhydrique à 5 % au pH=3. Trente minutes après, la solution aqueuse acide est alcalinisée par l'ammoniac au PH=9, puis mise pour extraction des alcaloïdes avec 50ml de chloroforme dans une ampoule à décanter. La phase chloroformique récupérée et évaporée à sec, et le résidu obtenu qui représente les alcaloïdes totaux est récupérée par le DMSO puis conservée à 4 °C.

II.3.3.2. Extraction à l'éthanol par macération

10g de poudre délipidés sont repris dans 250 ml d'éthanol. Une filtration est réalisée après 24h de macération, le filtrat récupéré est évaporé à l'aide d'un rotavapeur jusqu'à 0.5ml. L'extrait éthanolique concentré est additionné de 50ml d'eau distillée acidifiée avec l'HCl jusqu'au PH=03. Après 30min de repos le mélange est basifié avec l'ammoniac jusqu'au PH=9. La solution basique obtenue est épuisée par 50ml de chloroforme dans une ampoule à décanter. La phase organique récupérée est évaporée à sec. Le résidu obtenu est récupéré avec le DMSO puis conservé à 4C°.

II.4. Détermination du taux d'extraction

Le rendement de l'extraction en alcaloïdes est déterminé par la différence entre le poids du bécher plein et le poids du bécher vide. Le pourcentage d'extraction est calculé comme suit :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = [(P_1 - P_0)/E] 100$$

P₀: poids du bécher vide (g).

P₁: poids du bécher après évaporation du solvant (g).

E : poids de l'échantillon initial (g).

II.5. Test phytochimique

La présence des alcaloïdes est confirmée par le test phytochimique spécifique. Les extraits récupérés avec le DMSO subissent une dilution de 1/10 dans un tube à essai, et quelques gouttes du réactif de Dragendorff sont ajoutées. L'apparition d'un précipité orangé indique la présence des alcaloïdes dans les extraits.

II.6. Détermination de l'activité antibactérienne

II.6.1. Les souches bactériennes utilisées

L'activité antibactérienne des trois extraits (alcoolique, alcalin et acide) de *Matricaria pubescens* est testée sur 8 souches à savoir : *Echerichia coli* ATCC25922, *Echerichia coli* 164, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *SARM*, *Acinetobacter baumannii* 610, *Acinetobacter baumannii* 897, *Pseudomonas aeuroginosa* ATCC27853, *Pseudomonas aeuroginosa* 21.

II.6.2. Préparation de la suspension bactérienne

Les souches sont préalablement réisolées sur milieux TSA (Trypticase Soja Agar). Après 18 à 24 heures d'incubation, trois à cinq colonies de la culture sont dissociées dans 3ml d'eau physiologique ce qui correspond approximativement à 10^8 UFC (unité formant colonies).

II.6.3. Aromatogramme

L'aromatogramme est basé sur la technique de diffusion sur milieux gélosés (Muller Hinton). La méthode appliquée est celle des puits décrite par Kuete et *al.*, 2004.

Des puits de 6mm de diamètre sont réalisés dans des boîtes contenant le milieu Muller Hinton. Le fond des puits est couvert par ajout de quelques gouttes du même milieu. Après ensemencement par une suspension bactérienne à l'aide d'écouvillons, les puits sont remplis avec 50µl de chaque extrait, le dernier puits (témoin) est rempli avec le DMSO. Un disque de gentamicine est également déposé au centre de chaque boîte. Les boîtes sont mises pour diffusion à 4°C pendant deux heures, avant une incubation à 37°C pendant 18 à 24h. Le diamètre des zones d'inhibition obtenues, est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse.

Tous les essais sont effectués deux fois, et le résultat est exprimé par la moyenne de ces deux mesures.

II.6.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la plus petite concentration de la substance bactérienne pour laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée (Martini et Eloff, 1998). La CMI est déterminée en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé (Muller Hinton). Pour chaque souche, seul l'extrait ayant la meilleure activité sur elle est testé. La solution mère subit une série de dilution de 25 mg/ml, 12,5 mg/ml, 6,25 mg/ml, 3,125 mg/ml, 1,562 mg/ml et 0,781 mg/ml.

Après ensemencement des boîtes à l'aide d'écouvillons, des puits de 6mm de diamètre sont remplis avec 50µl de chaque dilution des extraits précédents. Les boîtes sont par la suite incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures après une diffusion de deux heures à 4°C.

II.6.5. Détermination de l'activité bactéricide ou bactériostatique

Selon Lewus et *al.* (1992), l'activité bactéricide ou bactériostatique est déterminée en prélevant (découpant) un carré de la gélose à partir des zones d'inhibitions obtenues avec les extraits qu'on re-suspend dans 5ml de bouillon nutritif.

La lecture des résultats est faite chaque jour, les bouillons restant claire après une semaine d'incubation, sont utilisés pour l'ensemencement sur milieu TSA (Trypticase Soja Agar). La lecture est faite après 18 à 24 heures à 37°C.

Un témoin négatif et un autre positive sont pris comme contrôle pour interpréter les résultats.

II.6.6. Etude de la synergie entre extrait et antibiotique

Pour étudier l'effet synergique des extraits de *Matricaria pubescens* avec un antibiotique, 50µl de chaque extrait avec une concentration de 50mg/ml sont ajouté au disque d'antibiotique. Dans notre cas la ceftazidime (CAZ) est choisie pour le test. La souche choisie pour cette étude est la souche de référence *E.coli* ATCC25922.

III. Résultats et discussion

III.1. Le taux d'extraction

La période de récolte de la plante, la procédure de séchage, la granulométrie des particules, le temps de macération, le volume ainsi que la nature du solvant, constituent les paramètres susceptibles d'influencer le taux d'extraction et d'affecter ainsi l'activité antibactérienne des extraits (Mallika et Dhar, 1980; Eloff, 1998 ; Pinelo *et al.*, 2005 ; Eloff et McGaw, 2006 ; Sipgno *et al.*, 2007; Hayouni *et al.*, 2007).

Dans le présent travail, il est procédé à l'extraction par macération et par soxhlet, des alcaloïdes totaux à partir d'une plante médicinale *Matricaria pubescens*, ainsi qu'à la détermination de l'activité antibactérienne des extraits obtenus. Pour avoir le taux d'extraction en alcaloïdes le plus élevé, plusieurs protocoles ont été testés en utilisant différents solvants à différentes polarités et pH (le chloroforme, le méthanol et l'éthanol).

Pour confirmer la nature des composés extraits, un test phytochimique spécifique est testé. Après l'ajout de quelques gouttes du réactif de Dragendorff, un précipité orangé est constaté pour l'ensemble des extraits, ce qui témoigne de la présence des alcaloïdes.

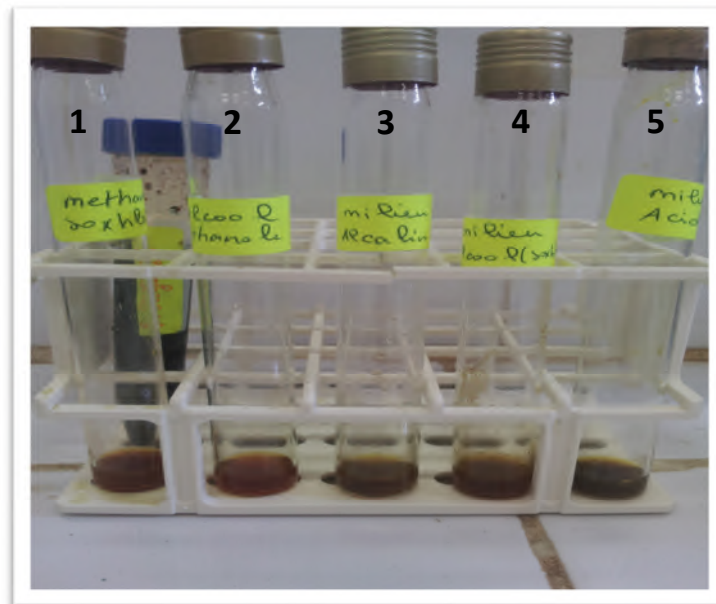


Photo 1 : Résultats du test phytochimique par le réactif Dragendorff.

1 : extrait au méthanol par soxhlet, 2 : extrait à l'éthanol par macération, 3 : extrait alcalin par macération, 4 : extrait à l'éthanol par soxhlet, 5 : extrait acide par macération.

Les résultats montrent que les taux d'extraction obtenus présentent des différences selon le protocole d'extraction, le pH et la nature du solvant utilisé (figure 04) ; Les taux d'extraction les plus importants sont obtenus avec le 3^{ème} protocole utilisant l'éthanol comme solvant et le soxhlet pour l'extraction et le 2^{ème} protocole utilisant le méthanol acide pour l'extraction, ils sont de 4.03% et 4.02% respectivement. Ils sont suivis par l'extraction au méthanol par soxhlet et l'éthanol par macération avec des taux d'extraction de 3.52 % et 3.32% respectivement. Cependant en appliquant le premier protocole; le chloroforme basifié a donné le rendement en alcaloïde le plus faible 2,69%.

Les différences constatées entre les teneurs en alcaloïdes obtenues en appliquant plusieurs méthodes d'extraction pourraient être expliquées par la nature et ainsi la solubilité des alcaloïdes de la matricaire dans les solvants.

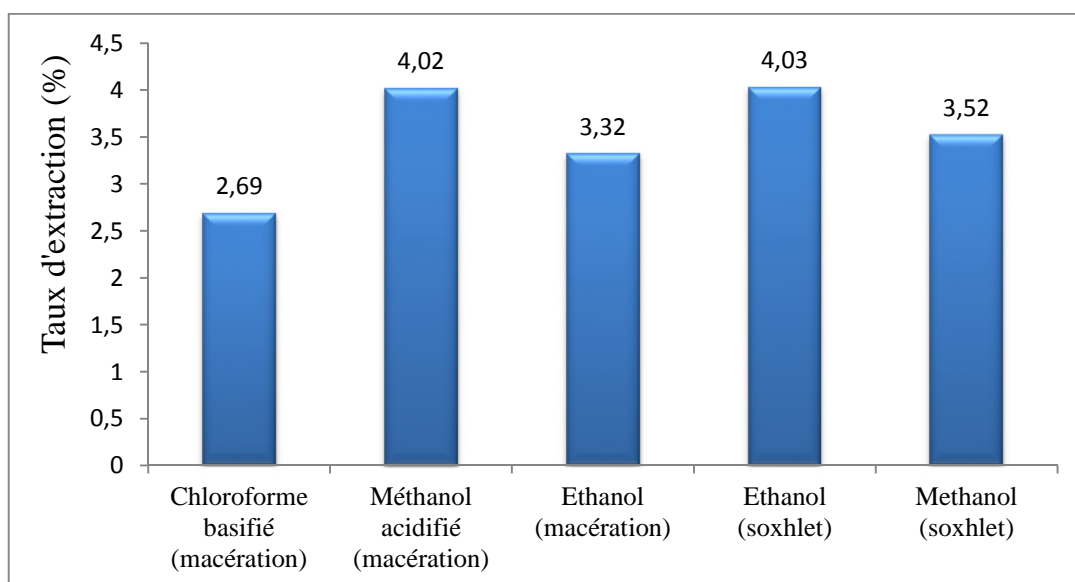


Figure 4 : Taux d'extraction en alcaloïdes de *Matricaria pubescens* en fonction du pH et de la polarité du solvant utilisé ainsi que le procédé d'extraction.

Benhammou et ses collaborateurs en 2013, ont révélé dans leurs travaux sur *Anabasis articulata* un taux en alcaloïdes de 5.95% pour l'extrait éthanolique et 5.47% pour l'extrait méthanolique, ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus avec nos extraits. Alors que Maatalah et al. (2012), ont obtenu un rendement de 1.25 pour la même plante.

L'étude menée par Bouzidi et al. (2011), sur *Datura stramonium* qui est une plante très répandue en Algérie, a donné un taux de 0.07% pour l'extrait alcalin, ce taux s'avère beaucoup plus faible que celui obtenu avec notre extrait qui est de 2.69%.

Un taux d'extraction de 1.94% par méthanol à partir *Anethum graveolens* a été obtenu par El fartosy et son collaborateur (2013), alors que Gomah, (2010) a obtenu un taux de 2.60% pour l'extrait alcalin dans son étude sur *Peganum harmala*, le même résultat est obtenu avec notre extrait.

Ces différences des taux d'extractions obtenus, sont dues au fait, que la teneur en métabolites secondaire dépend de plusieurs facteurs tels que l'espèce, l'origine, le stade de croissance, les influences environnementales et le patrimoine génétique (Bruneton, 1999).

Les alcaloïdes ont une basicité plus ou moins marquée, ils peuvent former des sels avec des acides minéraux (chlorhydrates, sulfates, nitrates) ou organiques (tartrates, sulfamates, maléates). Les sels d'alcaloïdes sont généralement solubles dans l'eau et les alcools dilués, ils sont insolubles dans les solvants organiques apolaires, sauf rares exceptions (Bruneton, 1999). La basicité des alcaloïdes est très variable, étroitement fonction de la disponibilité du doublet libre de l'azote. Des groupements électro-attracteurs adjacents à l'atome d'azote diminuent la basicité tandis que des groupements électro-donneurs la renforcent. La basicité est également influencée par des contraintes stériques, elle est un facteur d'instabilité pour ces molécules qui, à l'état de base et en solution, sont sensibles à la chaleur, à la lumière ainsi qu'à l'oxygène (Bruneton, 1999).

III.2. Détermination de l'activité antibactérienne

III.2.1. Aromatogramme

Cette partie vise à déterminer l'activité antibactérienne des extraits de *Matricaria pubescens* sur huit souches, à savoir : *Echerichia coli* ATCC25922, *Echerichia coli* 164, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *SARM*, *Acinetobacter baumannii* 610, *Acinetobacter baumannii* 897, *Pseudomonas aeuroginosa* ATCC27853, *Pseudomonas aeuroginosa* 21.

Les extraits utilisés pour déterminer cette activité sont : l'extrait obtenu par l'éthanol au soxhlet et les extraits obtenus par macération avec le méthanol acidifié et le chloroforme basifié à des concentrations allant de 20 à 60mg/ml.

La présente étude révèle l'existence d'une différence entre les diamètres des zones d'inhibitions en fonction du solvant d'extraction, de la concentration en alcaloïdes et de la souche testé.

L'analyse des résultats montre que les diamètres des zones d'inhibitions augmentent pour toutes les souches testées sensibles dans ce travail en augmentant les concentrations des extraits en alcaloïdes.

Pour l'extrait éthanolique, le diamètre de la zone d'inhibition varie de 12.69mm à 15.73mm pour *Acinetobacter baumannii* 897, de 16.11mm à 24.26mm pour SARM et de 9.97mm à 14.65mm pour *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (figure 5), alors qu'ils n'ont aucune action sur les souches *Echerichia coli* ATCC25922, *Echerichia coli* 164, *Acinetobacter baumannii* 610, *Pseudomonas aeuroginosa* ATCC27853, *Pseudomonas aeuroginosa* 21.

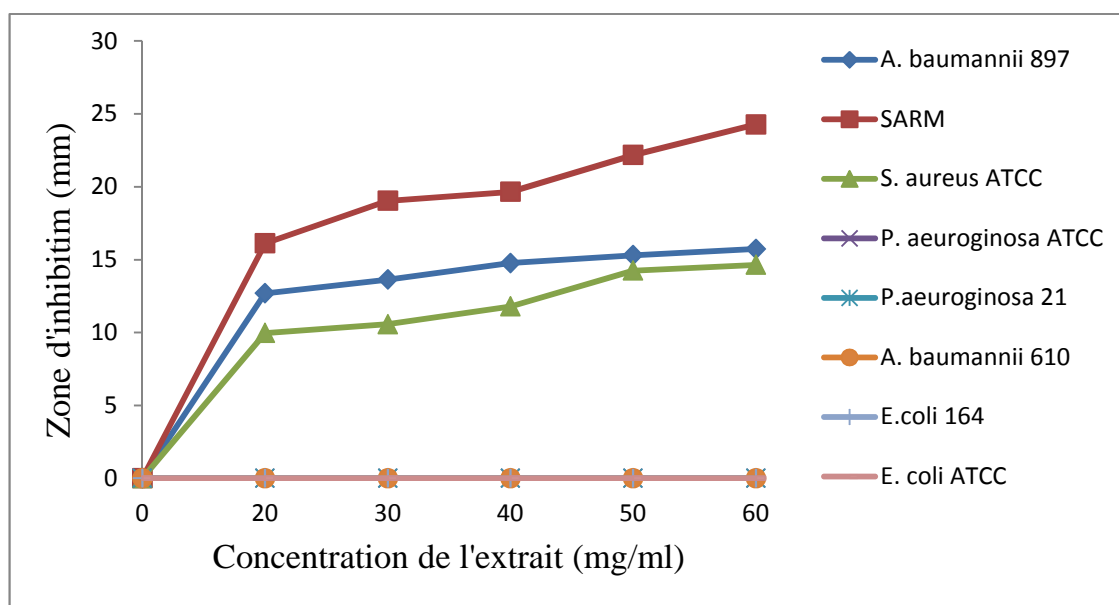


Figure 5 : Effet de la concentration en alcaloïdes de l'extrait éthanolique sur les souches testées.

Pour l'extrait alcalin, le diamètre des zones d'inhibition varie de 13.05mm à 19.24mm pour *Acinetobacter baumannii* 897, de 11mm à 15.55 mm pour *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (figure 06). Aucune action sur les souches *Echerichia coli* ATCC25922, *Echerichia coli* 164, SARM, *Acinetobacter baumannii* 610, *Pseudomonas aeuroginosa* ATCC27853, *Pseudomonas aeuroginosa* 21 n'a été constaté

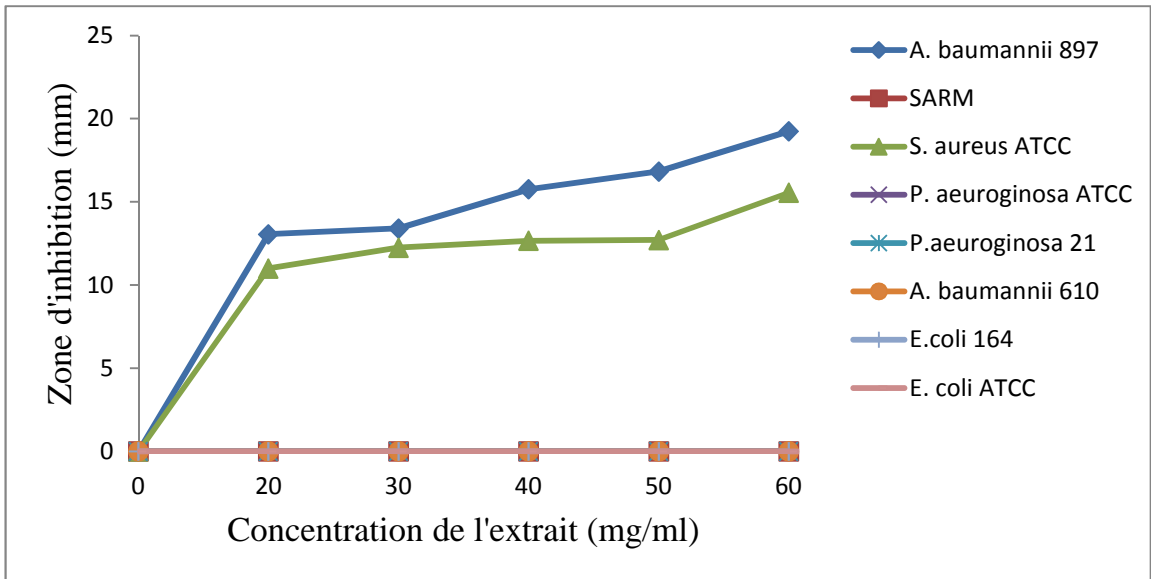


Figure 6 : Effet de la concentration en alcaloïdes de l'extrait alcalin sur les souches testées.

Alors que pour l'extrait acide, ce diamètre varie de 8.76mm à 11.21mm pour *Staphylococcus aureus ATCC25923* et de 11.46mm à 15.14mm pour *Acinetobacter baumannii 897*, pour cette dernière aucune zone n'est constatée pour les deux concentrations de 20 mg/ml et 30 mg/ml (figure 07). Aucune zone d'inhibition n'est constatée autour des souches : *Echerichia coli ATCC25922*, *Echerichia coli 164*, *SARM*, *Acinetobacter baumannii 610*, *Pseudomonas aeuroginosa ATCC27853*, *Pseudomonas aeuroginosa 21*.

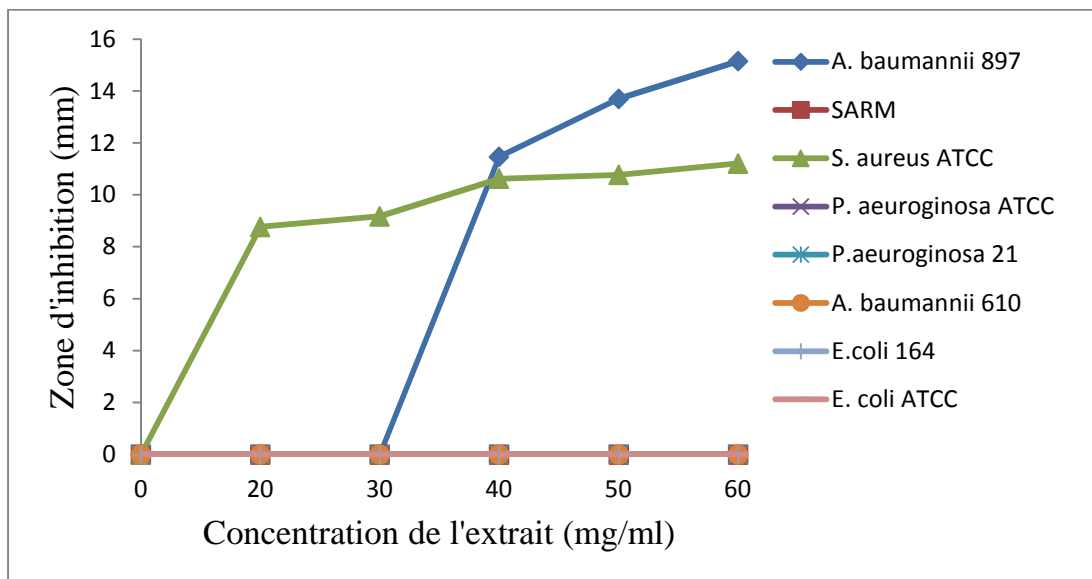


Figure 7: Effet de la concentration en alcaloïdes de l'extrait acide sur les souches testées.

La plus grande zone d'inhibition (24.26mm) est obtenue par l'extrait alcoolique sur *SARM*, alors que la plus faible (9.97mm) est obtenue avec le même extrait sur *Staphylococcus aureus ATCC25923*.

L'aromatogramme ne montre aucune activité sur les souches : *Echerichia coli ATCC25922*, *Echerichia coli 164*, *Acinetobacter baumannii 610*, *Pseudomonas aeuroginosa ATCC27853*, *Pseudomonas aeuroginosa 21*, pour l'extrait alcoolique. *Echerichia coli ATCC25922*, *Echerichia coli 164*, *Acinetobacter baumannii 610*, *Pseudomonas aeuroginosa ATCC27853*, *Pseudomonas aeuroginosa 21* et *SARM*, pour les deux extraits alcalin et acide.

Nos résultats montrent qu'à la même concentration et sur la même souche, les trois extraits donnent des zones d'inhibition différentes, ce qui pourrait être dû à la nature des alcaloïdes extraits dans chaque solvant.

Les protocoles appliqués ont permis de donner des taux d'extraction différents et des alcaloïdes ayant des potentiels antibactériens différents à la même concentration, ce qui indique la diversité des alcaloïdes extraits de *Matricaria pubescens*.

Maatalah et al. (2012), ont démontré que les alcaloïdes d'*Anabasis articulata*, une plante médicinale localement appelée 'ajrem' présente des activités antimicrobiennes sur les souches *Escherichia coli ATCC 25922*, *Staphylococcus aureus ATCC 6538* et *Pseudomonas aeruginosa ATCC 14028*, ce qui pourrait s'expliquer par la nature des alcaloïdes extraits et contenus dans chaque plante.

Karou et al. (2006), ont démontré que l'extrait alcalin de *Sida acuta* possède une activité antibactérienne vis-à-vis *Staphylococcus aureus ATCC 25923*, le même résultat est trouvé avec l'extrait alcalin de *Matricaria pubescens*.

Les résultats de Gomah (2010), révèlent que l'extrait alcalin de *Peganum harmala* est actif sur *E.coli*, alors qu'elle est résistante dans la présente étude.

Torres et ses collaborateurs (2002) ont révélé qu'*E.coli ATCC 25922* est insensible aux quatre alcaloïdes toxiques isolés à partir d'*Arenosclera brasiliensis*, ce qui concorde avec les résultats de la présente étude.

Les alcaloïdes isolés à partir de *Mitragyna speciosa*, ne possèdent aucune activité sur *E.coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Parthasarathy et al. 2009), ce qui est en accord avec nos résultats. Bonjar, (2004) de sa part a démontré la résistance de cette dernière aux extraits de 43 espèces de 29 familles de plantes médicinales Iraniennes.

Wang et al. (2013), ont démontré que les alcaloïdes de l'extrait éthanolique de *Evodia rutaecarpa* sont actifs contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, le même résultat est obtenu avec notre extrait.

Les alcaloïdes isolés à partir de quelques espèces de *Corydalis* et *Fumaria*, possèdent une activité sur *Acinetobacter baumannii* (Orhana et al, 2007), le même résultat est obtenu avec les extraits de *Matricaria pubescens*.

Makhloufi et al. (2012), dans leurs travaux sur la même plante (*Matricaria pubescens*), ont rapporté que la souche *S.aureus* ATCC 25923 est sensible au composés phénoliques de l'extrait éthanolique, mais résistante à ses huiles essentielles.

La souche *E.coli* ATCC 25922 testée sensible par les extraits de *matricaria pubescens* de Makhloufi et al. (2012) est résistante dans la présente étude, alors que la souche *P.aeruginosa* ATCC 27853 rapporté par ces auteurs résistante est résistante aussi dans le présent travail.

En plus de la probable implication de la méthodologie dans l'évaluation de l'activité antibactérienne, la structure de la membrane cellulaire des bactéries pourrait aussi y jouer un grand rôle. En effet la membrane externe des bactéries gram (-), constitue une barrière de perméabilité efficace, qui empêche la diffusion des molécules hydrophobes et ce par la présence de charges négatives de surface (Nikaido, 2003). Contrairement aux gram (-), le peptidoglycane des bactéries gram (+) n'entravent que la diffusion des molécules de poids moléculaires supérieurs à 50000 Dalton (Hogan et Kolter, 2002). Ceci pourrait expliquer la sensibilité des souches gram (+) (*S. aureus* ATCC 25923 et SARM), ainsi que la résistance des gram (-) (*E. coli* ATCC 25922 et *E.coli* 164) aux extraits de *Matricaria pubescens*.

Cependant, certaines études ne révèlent aucune activité antibactérienne sélective vis-à-vis des bactéries gram(+) ou gram (-) (Athamena et al., 2010). La sensibilité des souches d'*A. baumannii* 610, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *P. aeruginosa* 21 observée avec les extraits étudiés confirme cette hypothèse.

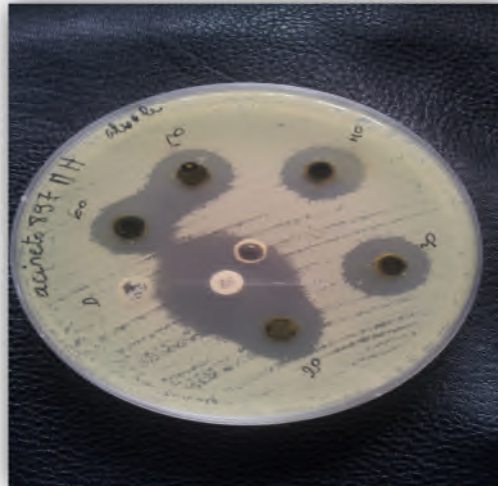


Photo 3 : Activité antibactérienne de l'extrait éthanolique sur *A.baumannii* 897.

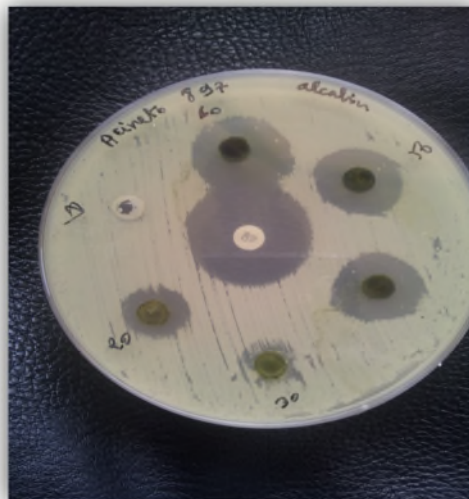


Photo 4 : Activité antibactérienne de l'extrait alcalin sur *A.baumannii* 897

III.2.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée par la méthode de dilution sur milieu solide pour les extraits ayant montré la meilleure activité antibactérienne (l'extrait éthanolique) vis-à-vis des souches testées à l'exception de *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 164, *A. baumannii* 610, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *P.aeruginosa* 21 qui se sont révélées résistantes à tous nos extraits. Les résultats sont illustrés dans le tableau 2.

Tableau II : Résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) mg/ml

Souches	CMI
<i>Acinetobacter baumannii</i> 897	< 0.781
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	3.125
SARM	< 0.781

La CMI de l'extrait éthanolique est déterminée pour les souches *Acinetobacter baumannii* 897, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 et SARM et ce suite aux résultats de l'aromatogramme.

L'extrait éthanolique est plus actif sur *Acinetobacter baumannii* 897 et SARM avec une CMI < 0.781 mg/ml. La CMI des alcaloïdes de l'extrait éthanolique pour *Staphylococcus aureus* ATCC25923 est de 3.3125 mg/ml, alors que celle des alcaloïdes de *Sida acuta* est de 0.40mg/ml pour la même souche et de 0.08mg/ml pour *Echerichia coli* CIP 105182 (Karou *et al.*, 2006).

Tanaka *et al.* (2006), dans leur étude sur les alcaloïdes de *Aspidosperma ramiflorum* ont trouvé une CMI de 0.50mg/ml sur la souche *Staphylococcus aureus*, cet extrait s'est avéré plus actif que celui obtenu avec *Matricaria pubescens*, et une CMI de 1mg/ml sur *Echerichia coli* qui est résistante dans la présente étude.

Chakraborty et Brantner, (1999) ont rapporté une CMI de 0.42mg/ml pour *Pseudomonas aeruginosa* des alcaloïdes de *Holarrhena pubescens*, alors que cette souche est résistante aux extraits de *Matricaria pubescens*.

Dans l'étude réalisée par Makhloufi *et al.* (2012) sur la même plante, la CMI de des composés phénoliques de l'extrait éthanolique est de 8 mg/ml sur *Staphylococcus aureus* ATCC25923. Cependant lors de notre étude la CMI obtenue avec les alcaloïdes de *Matricaria pubescens* sur la même souche est de 3.125 mg/ml. La plus petite concentration des huiles essentielles de cette plante inhibant *Echerichia coli* ATCC 25922 est de 13 mg/ml (Makhloufi *et al.*, 2012), alors que cette souche c'est avérée résistante à tous nos extraits.

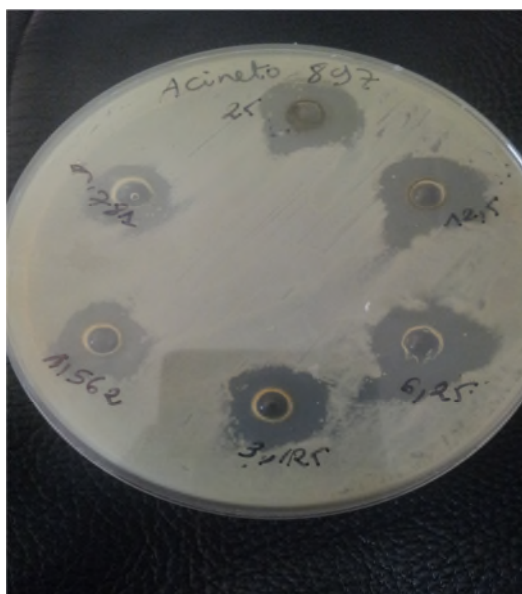


Photo 5 : La CMI de l'extrait éthanolique sur *A.baumannii* 897

III.2.3. Activité bactéricide ou bactériostatique

Un seuil de 12,5 mm de la zone d'inhibition est fixé pour tester l'activité bactéricide ou bactériostatique des extraits de *Matricaria pubescens* sur les souches testées.

Les résultats sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau III : Résultats de l'activité bactéricide ou bactériostatique des extraits de *Matricaria pubescens*

	Extrait alcool	Extrait acide	Extrait alcalin
<i>A.baumannii</i> 897	(-)	Non testé	(+)
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	Non testé	(-)	Non testé
SARM	(-)	Non testé	Non testé

(-) Bactériostatique

(+) Bactéricide

D'après ces résultats l'activité bactéricide ou bactériostatique des extraits varie selon la souche testée et le solvant d'extraction.

Résultats et discussion

Les extraits alcoolique et acide présentent, après 24, un effet bactériostatique sur les souches *A.baumannii* 897 et *SARM*, pour le premier et *S.aureus* ATCC25923 pour le second.

Pour la souche *A.baumannii* 897, l'extrait alcalin resté claire après une semaine d'incubation, est confirmé bactéricide par l'absence de croissance microbienne sur milieu TSA après repiquage.

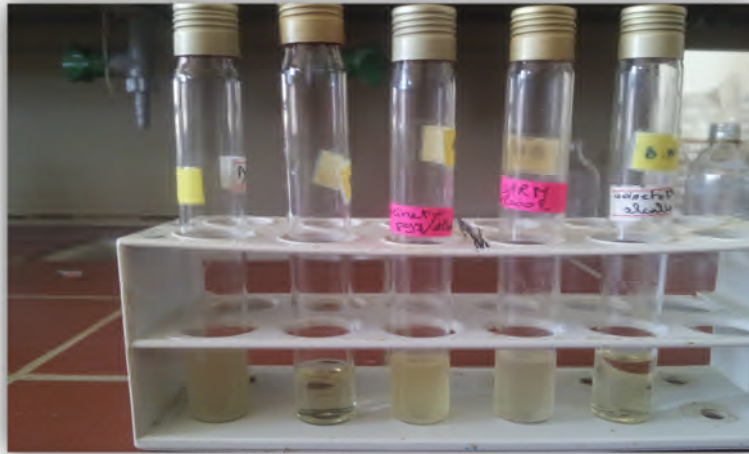


Photo 6 : Activité bactéricide/ bactériostatique des extraits

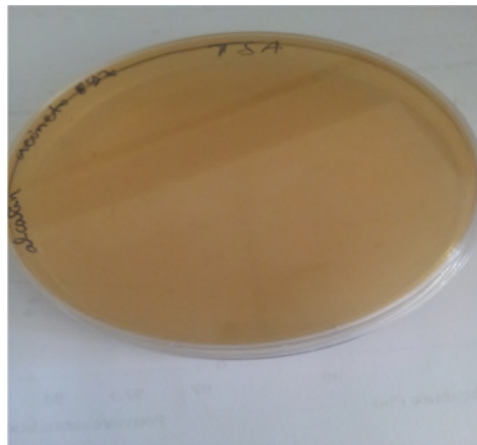


Photo 7 : L'activité bactéricide de l'extrait alcalin sur *A.baumannii* 897

III.2.4. Synergie extrait / antibiotique

Pour l'étude de la synergie, la ceftazidime (CAZ) est utilisé comme antibiotique dont les zones d'inhibitions sont de 21.3mm sur *E. coli* ATCC 25922. Cependant la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 est avérée résistante vis-à-vis tous les extraits de la présente étude. Les résultats sont illustrés dans le tableau 4 :

Tableau IV : Résultats des synergies extrait/antibiotiques sur *Escherichia coli* ATCC 25922

<i>E.coli</i> ATCC 25922			
	Extrait	Extrait+CAZ	Difference
Acool	0	24,71	3,41
alcalin	0	24,07	2,77
acide	0	24,98	3,68

Les résultats des synergies réalisés entre nos extraits et la ceftazidime sur la souche *E. coli* ATCC 25922 révèlent une légère amélioration de l'activité antibactérienne dont la plus grande est de 3.68mm de diamètre, obtenue avec l'extrait acide.

Conclusion

La présente étude est consacrée à l'extraction des alcaloïdes de *Matricaria pubescens* par macération ou par soxhlet en utilisant différents solvants à différentes polarités et pH, ainsi qu'à la détermination de l'activité antibactérienne des extraits obtenus.

Les résultats de cette étude montrent que le meilleur taux d'extraction (4.03%) est obtenu en utilisant l'éthanol et le soxhlet pour l'extraction des alcaloïdes.

Parmi les souches testées, les extraits alcaloïdiques de *Matricaria pubescens* obtenus, possèdent un effet antibactérien uniquement sur *Acinetobacter baumannii* 897, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* résistante à la méthiciline. Alors qu'aucune zone d'inhibition n'est constatée autour des souches restantes. La plus grande zone d'inhibition (24.26 mm) est obtenue avec l'extrait éthanolique sur *Staphylococcus aureus* résistante à la méthiciline. L'extrait éthanolique est plus actif sur *Acinetobacter baumannii* 897 et *SARM* avec une CMI < 0.781 mg/ml.

L'activité bactéricide ou bactériostatique des extraits de la matricaire diffère selon le solvant d'extraction et la souche testée. L'extrait alcalin présente un effet bactéricide sur *Acinetobacter baumannii* 897.

L'étude de la synergie entre les différents extraits et la ceftazidime sur la souche *E. coli* ATCC 25922, met en évidence une amélioration de l'activité antibactérienne. L'extrait acide a donné la meilleure récupération (3.68mm).

A fin de compléter cette étude, il serait intéressant :

- ✓ D'étudier d'autres paramètres d'extraction à savoir la granulométrie de la poudre, la durée d'extraction et bien d'autres aspects (différentes parties de la plante, période de récolte...)
- ✓ D'identifier le principe actif responsable de l'activité antibactérienne, en utilisant plusieurs techniques dont HPLC, CCM....
- ✓ Déterminer les mécanismes d'action des alcaloïdes sur les cellules bactériennes
- ✓ D'évaluer l'activité antifongique et anti-enzymatique de ces alcaloïdes.
- ✓ Déduire la toxicité de ces alcaloïdes ainsi que la dose efficace en réalisant des tests *in vivo*.

A

Ameyaw Y , Duker-Eshun G. (2009). The alkaloid contents of the ethno-plant organs of three antimalarial medicinal plant species in the eastern region of Ghana. *Int J Chem Sci.* 7, 48-58.

Adwan G, Abu-Shanab B et Adwan. K. (2010). Antibacterial activities of some plant extract alone and in combination with different antimicrobials against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* p266.

Al-Fartosy A. J.M, Zearah S.A, Alwan N.A. (2013). Total antioxidant capacity and antihyperlipidemic activity of alkaloid extract from aerial part of *Anethum graveolens* L. plant. *European Scientific Journal*, edition vol.9, No.33, 413-423.

B

Bennett RN, Wallsgrove RM. (1994). Secondary metabolites in plant defense mechanisms. *Tansley Review No. 72 .new Phytol.*127, 622-623

Bruneton J. (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.*3^{ème} Edition Technique et documentation Lavoisier. P : 784-873.

Bonjar S. (2004). Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used in Iran. *Journal of Ethnopharmacology.* 94, 301-305.

Bouzidi A, Mahdeb N, Kara N et Benouadah Z. (2011). Analyse qualitative et quantitative des alcaloïdes totaux des graines de *Datura stramonium* L. *Agriculture* N° 2, 79-86.

Benhammou N, Ghambaza N, Benabdelkader S, Atik-Bekkara F et Kadifkova Panovska T. (2013). Phytochemicals and antioxidant properties of extracts from the root and stems of *Anabasis articulata*. *International Food Research Journal.* 20, 2057-206

C

Chakraborty A, Brantner AH. (1999), Antibacterial steroid alkaloids from the stem bark of *Holarrhena pubescens*. *Journal of Ethnopharmacology*. 68,339–344.

D

Djellouli M, Moussaoui A, Benmehdi H, Ziane L , Belabbes A , Badraoui M, Slimani N et Hamidi N. (2013). Ethnopharmacological study and phytochemical screening of three plants (asteraceae family) from the region of south west Algeria. *Asian journal of naturel & applied sciences*. 2: pp 59-64.

E

Eloff, JN. (1998). Wich extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 60, 1-8.

Eloff, JN, McGaw LJ. (2006). *Modern phytomedicine. Turning medicinal plants into drugs.* Edited by I. Ahmad, F. Aqil, and M. Owais.97-121.

El Tahchy A. (2010). Étude de la voie de biosynthèse de la galanthamine chez *Leucojum aestivum* L. et criblage phytochimique de quelques Amaryllidaceae. Thèse de doctorat en chimie. Université Henri Poincaré, Nancy-Université, Faculté des sciences. 20p.

G

Gomah N. (2010). Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of *Peganum harmala* (L) seeds and their combination effects. *Fitoterapia* 81. 779–782

H

Harborne JB. (1998). *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis.* (3rd Ed.) London: Chapman & Hall. ISBN: 0-412-57270-2, 302 p.

Hogan D, Kolter R. (2002). Why are bacteria refractory to antimicrobials. *Current Opinion in Microbiology*. 5,472-477.

Hesse M. (2002). *Alkaloids: Nature's Curse of Blessing?* . Ed: WILEY-VCH. 1-12pp.

Hayouni E, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi H. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera L.* and *Juniperus phoenicea L.* fruit extracts. *Food Chemistry*. 105(3): 1126-1134.

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

J

Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens P. (2002). Botanique Systématique, une perspective phylogénétique. Edition De Boeck Université .84-87 ,396-399.

K

Khalid A, Choudhay MI, Haq Z, Ghayur MN, Feroz RA et Gilani AH. (2004). Cholinesterase inhibitory and spasmolytic potential of steroidal alkaloids. *Journal of steroidal Biochemistry and Molecular Biology*. 26, 477-484.

Kuete V, Beng P, Etoa FX, Modjo SL, Bogne P, Assob JC et Lontsi DB. (2004). Activités antimicrobiennes de l'extrait total et des fractions de jus de fruits de *Citrus Medicalin* (Rutaceae). *Pharm. Méd. Trad. Afr.* 13,91-94.

Karou D, Savadogo A, Canini A, Yameogo S, Montesano C, Simpore J, Colizzi V et Traore AS. (2006). Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *African Journal of Biotechnology*. 5,198-199.

Kashani HH, Hoseini ES, Nikzad H et Aarabi MH. (2012). Pharmacological properties of medicinal herbs by focus on secondary metabolites. *Life Science Journal*. 9,509-520.

L

Lewus CB, Sun.S et Montville TJ. (1992). Production of an Amylase-Sensitive Bacteriocin by an Atypical *Leuconostoc paramesenteroides* Strain. New Jersey. *Applied and Environmental Microbiology* . 143-149.

Lhuillier A. (2007). Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia hook Fexoliver*, *Agauria polyphlia baker* (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla baker* (Monimlaceae) et *Embelia concinna baker* (Myrsinaceae). Thèse de doctorat. Université de Toulouse. p 20-28-152-153.

M

Mallika M, Dhar SC. (1980). Studies on the oxidation of tannins by *Aspergillus flavus*. Journal of Bioscience. 1,43-48.

Maiza K, Brac de la Perrière EA et Hammiche V. (1993). Pharmacopée traditionnelle saharienne : Sahara septentrional. Médicaments et Aliments : L'Approche Ethnopharmacologique. 169-171.

Martini N, Eloff JN. (1998). The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). Journal of Ethnopharmacology. 62, 255-256.

Muniz MN. (2006). Synthèse d'alkaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine, Thèse de doctorat en chimie. Université Joseph Fourier – Grenoble I. 17p.

Makkar H, Siddhuraju P et Becker K. (2007) Plant secondary metabolites. New Jersey : Humana Press .

Mandal S, DebMandal M, Saha K et Kumar Pal N. (2011). In Vitro Antibacterial activity of three Indian spices against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Oman Medical Journal. 26,319.

Maiza K, Hammiche V et Maiza-Benabdesselam F. (2011). Traditional medicine in North Sahara "the Deffi". Life Sciences Leaf lets. 16,551-560.

Maatalah BM, Bouzidi NK, Bellahouel S, Merah B, Fortas Z, Soulimani R, Saidi S et Dourdour A. (2012). Antimicrobial activity of the alkaloids and saponin extracts of *Anabasis articulate*. Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research. 3, 54-57.

Makhloufi A. (2013). Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Thèse de doctorat en biologie. L'université Aboubaker Belkaid. Faculté des sciences. 14-17.

N

Nikaido H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular Biologie Reviews*. 64, 593-656.

Namdeo A. G. (2007). Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites. *Pharmacognosy Reviews*. Vol 1, 69-70.

O

Ozenda P. (1991). *Flore du Sahara*, Ed. CNRS, Paris France. 201-280

Ould El Hadj MD, Hadj-Mahammed M et Zabeirou H. (2003). Place of the spontaneous plants samples in the traditional pharmacopoeia of the area of Ouargla (Septentrional east Sahara); *Courrier du Savoir* – N°03; pp. 47-51.

Ozenda P, 2004. *Flore et végétation du Sahara*. Troisième édition. CNRS édition.750005 Paris. 92,438,662.

Orhana I, Özc elikb B, Karaog luc B et Bilge S . (2007). Antiviral and Antimicrobial Profiles of Selected Isoquinoline Alkaloids from *Fumaria* and *Corydalis* Species. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, Tübingen.19-25.

P

Park E J, Kin J. (1998). cytotoxic sesquiterpene lactones from inula Britannica. *Planta Med*. 64, 752p.

Pinelo M, Del Fabbro P, Manzocco L, Jose Nunez M, Nicoli M.C. (2005). Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry*, 92 :109–117.

Parthasarathy S, Bin Azizi J, Ramanathan S, Ismail S, Sasidharan S, Mohd Said S et Mahsufi Mansor S.(2009). Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activities of Aqueous, Methanolic and Alkaloid Extracts from *Mitragyna Speciosa* (Rubiaceae Family) Leaves. *Molecules*.14, 3964-3974.

R

Rodney C, Kutchan TM et Lewis NG. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, (Eds.), American Society of Plant Physiologists, pp.1268-1277.

S

Schauenberg P, Paris F. (2005). *Guide des plantes médicinales. Analyse, description et utilisation de 400 plantes*. 2e ed. Ed Delachaux et Niestlé. 106-119.

Sawer IK, Berry MI et Ford JL. (2005). the killing effect on *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 40: 24-29.

Rios MJ, Recio MK. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 100, 80-84.

Spigno G, Tarmelli L et De Faveri D.M. (2007). Effect of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1): 200-208.

T

Torres YR, Berlinck RGS, Nascimento GGF, Fortier SC, Pessoa C et De Moraes M.O.(2002). Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. *Toxicon*. 40, 885-891.

Tanaka JC, Da Silva CC, De Oliveira AB, Nakamura CV et Dias Filho B.P. (2006). Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 39, 387-391

Tekwu EM, Pieme AC et PenlapBeng V. (2012). Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. Journal of Ethnopharmacology. 142, 265p.

W

Walton NJ, Brown DE. (1999). Chemical from Plants: Perspectives on plant secondary products. Ed: World Scientific. p: 1-14.

Wang XX, Zan K, Shi SP, Zeng KW, Jiang Y, Guan Y, Xiao CL, Gao HY, Wu LG et Tu PF. (2013). Quinolone alkaloids with antibacterial and cytotoxic activities from the fruits of *Evodia rutaecarpa*. Fitoterapia 89,1-7.

Composition des milieux :

1. Muller Hintone (MH) (g/l)

- Ifusion de viande de boeuf (300)
- Hydrolysate de caséine (17,5)
- Amidon (1,5)
- Agar (17)
- PH 7,3

2. Trypticase Soja Agar (TSA) (g/l)

- Peptone de caséine (15)
- Peptone de soja (5)
- Chlorure de sodium (5)
- Gélose (15)
- PH 7,2

3. Bouillon nutritif (g/l)

- Macération de viande (15)
- Peptone tryptique (5)
- NaCl (5)
- PH 7,3

Résumé

Le but de ce travail est d'extraire les alcaloïdes, à partir d'une plante médicinale appelée *Matricaria pubescens*, en utilisant différents protocoles, solvants et PH (méthanol, éthanol, chloroforme basifié et méthanol acidifié). Ainsi que l'évaluation des activités antibactériennes des extraits obtenus. Les résultats obtenus indiquent que l'extrait éthanolique présente le taux d'extraction le plus élevé (4.03%), en utilisant le soxhlet pour l'extraction. D'après les aromagrammes réalisés, tous les extraits de la matricaire présentent un pouvoir inhibiteur sur les souches : *Acinetobacter baumannii* 897, *SARM* et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Les autres souches testées sont restées sensibles. Sur toutes les souches étudiées, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline est la plus sensible à l'extrait éthanolique avec des zones d'inhibitions atteignant les 24.26mm. Ce dernier est plus actif sur *Acinetobacter baumannii* 897 et *SARM* avec une CMI < 0.781 mg/ml. L'extrait alcalin possède un effet bactéricide sur la souche *Acinetobacter baumannii* 897, Une amélioration de l'activité antibactérienne est constatée après la réalisation des synergies entre les différents extraits et la CAZ sur la souche *E. coli* ATCC 25922.

Mots clés: *Matricaria pubescens*, alcaloïdes, activité antibactérienne.

Summary:

The aim of this work, is the extraction of alkaloids from a medicinal plant called *Matricaria pubescens*, using different protocols, solvents and pH (methanol, ethanol, chloroform basified and methanol acidified). And evaluation of their antibacterial activity. The results indicate that the ethanolic extract has the highest extraction rate (4.03%), using soxhlet for the extraction. All extracts of *matricaria* have inhibitory effects on : *Acinetobacter baumannii* 897, MRSA and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Other tested strains have remained sensitive. All tested strains, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is the most sensitive to the ethanol extract with 24.26mm. It is more active on *Acinetobacter baumannii* 897 and MRSA with a MIC <0.781 mg / ml. The alkaline extract has a bactericidal effect on *Acinetobacter baumannii* 897, an improvement of antibacterial activity is observed after the realization of synergies between the different extracts and CAZ on the *E. coli* ATCC 25922.

Key words: *Matricaria pubescens*, alkaloids, antibacterial activity.