



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de LarbiTébessi –Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Biologie Appliquée

Mémoire Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Option : Microbiologie Appliquée



Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile
essentielle de *Rutamontana* sur des souches
bactériennes d'origine hospitalières.

Présenté par :

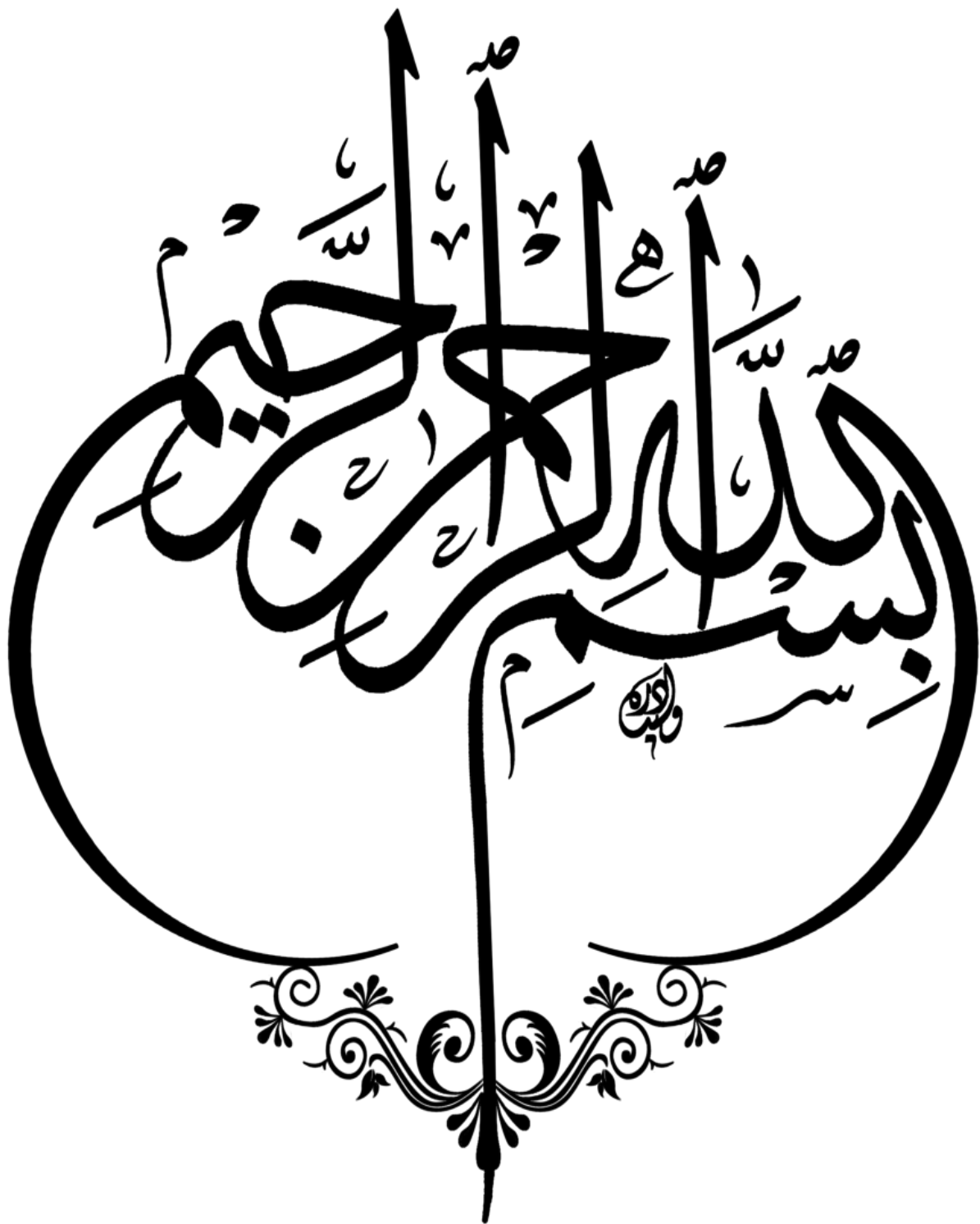
- BOUSSAHA Assala
- LABIOD Imen
- RAHEM Dina

Devant le jury:

Mme BOUABIDA Hayat	M.C.A	Université De Tébessa	Présidente
Mme FENGHOURHind	M.C.A	Université De Tébessa	Promotrice
Dr.ZOUAOUI Nassim	M.C.B	Université De Tébessa	Examinateur

Date de soutenance : Le09/06/2022 Note :/20

Année universitaire 2021 /2022



Remerciement.



Au Nom de Dieu le Très Miséricordieux, le Tout Miséricordieux.

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nos remerciements vont d'abord à notre encadreur Dr **FenghourHind** qui s'est montré plus comme une grande sœur aidant qu'un encadreur. Nous la remercions surtout pour sa disponibilité et ses conseils.

Nous adressons également nos remerciements aux membres des jurys.

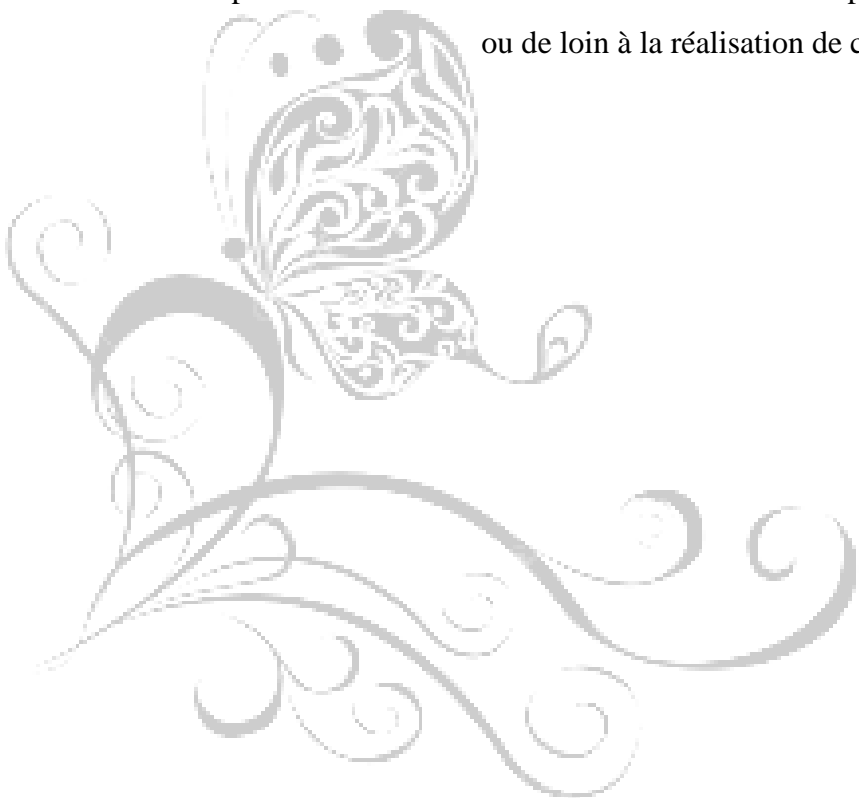
Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

Nous présentons également notre gratitude aux chefs de travaux et assistants de l'université de LaarbiTebessi, et singulièrement ceux de la faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie pour leur dévouement.

Ainsi, nous remercions **GriniImen** et **Hafsa Sarah** pour les remarques et les conseils qu'ils nous ont donnés.

Nous remercions **BourahlaNour** de nous avoir aidé lorsque nous n'avons trouvé personne.

Nous présentons aussi nos remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicaces



La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude.

Je dédie ce travail :

A mon cher parent pour m'avoir encouragé, Sans eux, je n'en serais pas là.

A mes sœurs et mes frères pour leur tendresse, leur complicité.

A ma grande mère que Dieu lui fasse miséricorde

A mon seul ami et mon fiancé **AymenMaalem** pour me motiver lorsque j'en ai besoin, et d'être là à mes côtés dans les moments difficiles et pour ses conseils et la confiance qu'il m'accorde quotidiennement.

A mes tantes **Fatima** et **el Aarem** pour leurs aide précieuse, surtout dans cette période éprouvante qu'est la dernière ligne droite.

A ma belle **Asma Hemila** pour me tolérer chaque jour mes idioties et mes petites folies, Tu ne le sais peut être pas, mais sans toi je ne serais pas la personne si ouverte et si libre que je suis aujourd'hui.

A ma jolie **DhikraMaafa** qui m'a encouragé et m'écouté quand je n'avais personne.

A ma sœur **LabiodImen**, je suis vraiment chanceux de t'avoir à mes côtés.

Mes chers amies et mes partenaires **Dina** et **Imen**.

Merci à toutes et à tous.



Assala



Dédicace

Je Dédie ce travail :

A ma chère mère **Salih**a qui était la source d'amour le motif et le grand soutien dans ma
Carrière universitaire.

A mon père **Mouhamed** pour son soutien continu pour l'achèvement de ce travail.

Pour mon cher frère et mes chères sœurs **Djawed, Darine, Douàa** et **Chahed** pour leurs
soutiens moraux et leurs aides merci d'être là pour moi.

À ma chère amie **Amal** ma jumelle de cœur.

Pour mes partenaires dans ce travail **Assala** et **Imen**.

Et a tous mes amies de la promotion de Master II Microbiologie appliquée 2022



Dina



Dédicaces

A L'aide de dieu fout puissant, Qui m'a aidé, de réaliser ce travail.

Je dédie ce travail à :

*A mes **parents**, Merci pour votre conseil, Votre patience et votre amour je vous aime.*

*A mon frère **Ayoub** le plus beau et le plus merveilleux Mon amie et la personne la plus*

Proche de moi merci pour tout.

*A toute ma **famille**, Merci de vous soutien et votre attention, vous encouragements.*

*A mes **amies**, les Ames de la vie Merci parce que tu étais toujours à coté de moi.*

*Pour mes partenaires dans ce travail **Assala** et **Dina**.*



Imen

Résumé

Rutamontana (Rutaceae), est une plante aromatique médicinale largement utilisée dans la médecine traditionnelle dans de nombreux pays, comme abortif, analgésique, anti inflammatoire, antiépileptique antispasmodique, emménagogue, et pour le traitement des pathologies cutanées. Ces innombrables vertus thérapeutiques sont principalement dues à sa richesse en métabolites secondaires comme des polyphénols, des huiles essentielles, des alcaloïdes et des coumarines. Ils sont responsables des activités antioxydant et antibactériennes.

Cette étude présente les caractères aromatiques de l'huile essentielle de *Rutamontana* extraite à l'aide d'un dispositif de type Clevenger, le rendement en huile essentielle qui est de 0,5% et l'effet antibactérien de l'huile essentielle de cette plante sur certaines souches bactériennes pathogènes provenant de différentes infections.

Les résultats ont montré que l'huile essentielle de *Rutamontana* a un pouvoir inhibiteur variable d'une souche bactérienne à l'autre avec des diamètres de zones d'inhibition différents. D'ailleurs, La valeur de la zone d'inhibition la plus élevée est de 22 mm pour *S. aureus*, 15 mm pour *E.coli*, Tandis que *P.aeruginosa* a montré une résistance vis-à-vis de l'huile essentielle de *Rutamontana*.

Mots clés : Rutamontana, Huile essentielle, Activité antibactérienne.

ABSTRACT

Rutamontana (Rutaceae), is a medicinal aromatic plant widely used in traditional medicine in many countries, as an abortifacient, analgesic, anti-inflammatory, antiepileptic, antispasmodic, emmenagogue, and for the treatment of skin pathologies. These innumerable therapeutic virtues are mainly due to its richness in secondary metabolites such as polyphenols, essential oils, alkaloids and coumarins. They are responsible for antioxidant and antibacterial activities.

This study presents the aromatic characteristics of the essential oil of *Rutamontana* extracted using a Clevenger type device, the yield of essential oil which is 0.5% and the antibacterial effect of the essential oil of this plant on certain pathogenic bacterial strains from different infections. The results showed that the essential oil of *Rutamontana* has a variable inhibitory power from one bacterial strain to another with different inhibition zone diameters. Moreover, the value of the highest zone of inhibition is 21mm for *S.aureus*, 14,5mm for *E.coli*, while *P.aeruginosa* showed resistance towards the essential oil of *Rutamontana*.

Keywords: *Rutamontana*, essential oil, antibacterial activity.

ملخص:

Ruta montana (Rutaceae) هو نبات عطري يستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي في العديد من البلدان كمسبب للإجهاض، مسكن، مضاد للالتهابات، مضاد للصرع، مضاد للتشنج، مطمئ، ولعلاج أمراض الجلد. تعود هذه الفضائل العلاجية التي لا حصر لها بشكل أساسي إلى ثرائها في المستقلبات الثانوية مثل البوليفينول والزيوت الأساسية والقلويدات والكومارين. هم مسؤولون عن الأنشطة المضادة للأكسدة والبكتيريا.

تعرض هذه الدراسة الخصائص العطرية للزيت العطري لنبات *Ruta montana* المستخرج باستخدام جهاز من نوع Clevenger، وإنتاج الزيت العطري الذي يبلغ 0.5% والتأثير المضاد للبكتيريا للزيت العطري لهذا النبات على بعض السلالات البكتيرية المسببة للأمراض من عدوى مختلفة. أظهرت النتائج أن الزيت العطري من *Ruta montana* له قوة مثبتة متغيرة من سلالة بكتيرية إلى أخرى بأقطار منطقة تثبيط مختلفة. علاوة على ذلك، بلغت قيمة أعلى منطقة تثبيط 21 ملم لبكتريا *S.aureus* و 14.5 ملم ل *E.coli*, بينما أظهرت *P.aeruginosa* مقاومة تجاه الزيت العطري لنبات *Ruta montana*.

الكلمات المفتاحية: *Ruta montana*، زيت عطري، نشاط مضاد للجراثيم

TABLES DES MATIERES

Sommaire	page
Remerciement	
Dédicace	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des tableaux	
Listes des figures	
Liste des abréviations	
I. Introduction	01
Partie 1 : La synthèse bibliographique	
Chapitre 01 : Présentation de la plante <i>Rutamontana</i>	
I. La plante <i>Rutamontana</i>	04
I.1. Origine et répartition de <i>Rutamontana</i>	04
I.2. La répartition géographique de <i>Rutamontana</i> en Algérie	04
I.3. La famille des <i>Rutaceae</i>	04
I.4. Le genre <i>Ruta</i>	05
I.5. L'espèce de <i>Rutamontana</i>	05
I.5.1. Définition	05
I.5.2. Appellations	05
I.5.3. L'aspect botanique	06
I.5.4. Classification botanique de <i>Rutamontana</i>	07
I.6. Principales utilisations de <i>Rutamontana</i> en médecine traditionnelle	08
I.7. Toxicité de la plante	09
Chapitre 02 : Huile essentielle de <i>Rutamontana</i>	
I. Huile essentielle de <i>Rutamontana</i>	12
I.1. Définition de l'huile essentielle	12
I.2. Localisation et rendement des huiles essentielles	12
I.3. Caractéristiques Des Huiles Essentielles	12
I.4. Conservation	13
I.5. Techniques d'obtention des huiles essentielles	13

TABLES DES MATIERES

I.6.Hydrodistillation	14
I.7.La bioactivité	14
I.7.1 Activité antibactérienne de l'huile essentielle	15
I.8.Techniques d'étude de l'activité antibactérienne	15
I.8.1.L'aromatogramme sur milieu solide	16
Partie II : Partie expérimentale	
Matériels et méthodes	
I. Objectifs du travail	20
II. Préparation de l'huile essentielle de <i>Rutamontana</i>	20
II.1.Matériel végétal	20
II.2.Produits chimiques et Appareillage	21
II.3.Séchage du matériel végétal	21
II.4.Extraction de l'huile essentielle de <i>Rutamontana</i>	21
II.4.1.Protocol expérimental de l'extraction	21
II.5.Détermination	23
II.6.Les Caractéristiques organoleptiques	23
III. Etude de l'activité antibactérienne	23
III.1.Matériels	23
III.1.1.Les souches testées	23
III.1.2.Les milieux de culture et appareillage	24
III.2.Méthodes	24
III.2.1.vérification de la pureté des souches bactériennes testées	24
III.2.2. Méthodes d'étude de l'activité antibactérienne	24
III.2.2.1.L'aromatogramme sur milieu solide	25
Résultats et discussion	
I. Rendement en huile essentielle de <i>Rutamontana</i>	31
I.1. Résultats	31
I.2.Discussion	31

TABLES DES MATIERES

II. Les caractères organoleptiques	32
II.1. Résultats	32
II.2. Discussion	32
III. Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Rutamontana</i>	33
III.1. Vérification de la pureté des souches bactériennes testées	33
III.2. Evaluation qualitative et quantitative de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Rutamontana</i>	34
III.2.1. Résultats	34
III.2.2. Discussion	35
Conclusion	38

Références bibliographiques

Annexes

LISTE D'ABREVIATION

%	Pourcentage
AFNOR	Association Française de Normalisation (Recueil des Normes Français : Huiles essentielles).
[C]	Diamètre
D	Herbs simplex virus
Do	Densité optique.
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
ECBU	Examen cyto bactériologique des urines.
SARS-COV	Syndrome respiratoire
g	Gramme
HE	Huile essentielle.
µl	Microlitre
Mm	Millimètre
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> .
T	Température
UFC	Unité formant colonie.

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	page
1	Les fleurs, feuilles et les furies de la plante <i>Rutamontana</i> (Photo personnelle, 2022).	06
2	La plante <i>Rutamontana</i> présentant les tiges (Photo personnelle, 2022).	07
3	les méthodes d'extraction des huiles essentielles (Ouis N, 2015).	13
4	Extraction des HE par hydrodistillation (Photo personnelle, 2022).	14
5	Mécanisme d'action des huiles essentielles au niveau microbien (Boumhamdi L et al, 2018).	15
6	Principe de la méthode de diffusion par disque (Medjekane M, 2017).	17
7	La plante de <i>Rutamontana</i> au moment de la récolte (Photo personnelle, 2021).	20
8	La plante <i>Rutamontana</i> pendant le séchage (Photo personnelle, 2021).	21
9	Hydrodistillation de l'huile essentielle de <i>Rutamontana</i> par un dispositif de type Clevenger (Photo personnelle, 2021).	22
10	Broyage des feuilles de <i>Rutamontana</i> (Photo personnelle, 2021).	22
11	L'accumulation de l'huile essentielle dans l'ampoule de décantation (Photo personnelle, 2021).	22
12	Les souches testées provenant de différentes infections (Photos personnelle, 2021).	24
13	Préparation des disques (Photos personnelle, 2021).	25
14	Préparation des suspensions bactériennes (Photo personnelle, 2021).	26
15	L'ajustement de la charge bactérienne (Photo personnelle, 2021).	26
16	Préparation de la gélose MH (Photo personnelle, 2021).	27
17	Tremper l'écouvillon dans une suspension bactérienne (Photo personnelle, 2021).	27
18	Ensemencement à la surface de la boîte de pétri contenant la gélose MH (Photo personnelle, 2021).	28
19	Dépôts des disques imprégnés de l'HE de <i>Rutamontana</i> (Photo personnelle, 2021).	28
20	Incubation des boîtes de pétri ensemencées (Photo personnelle, 2021).	29
21	Résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Rutamontana</i> (Aromatogramme) testées sur <i>P.aeruginosa</i> , <i>E.coli</i> et <i>S.aureus</i> (Photos personnelle, 2022).	35

Liste des Tableau

N°	Titre	page
1	Classification Botanique de <i>Rutamotana</i> (Bennaoum Z et al, 2018).	07
2	Quelque usage traditionnel du <i>Rutamontana</i> (Lakhdar L, 2015 ; Alloun K, 2013).	08
3	Types d'usage de <i>Rutamontana</i> (Hammiche V et al, 2013)	18
4	Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés (Bourahla N et al, 2020).	16
5	Les caractéristiques des souches bactériennes testées.	23
6	Rendement en huile essentielle de <i>Rutamontana</i> .	31
7	Rendement en (HE) de la partie aérienne séchée de la plante <i>Rutamontana</i> extrait par hydrodistillation de différentes études.	31
8	Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de <i>Rutamontana</i> .	33
9	Aspect microscopique de souches bactériennes testées.	33
10	Zone d'inhibition en (mm) de l'effet antibactérien de l'HE de <i>Rutamontana</i> sur les souches bactériennes testées.	34

Introduction

INTRODUCTION

Depuis des milliers d'années, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base tel que, nourriture, abris, vêtements et aussi pour ses besoins médicaux, Les plantes possèdent d'extraordinaires vertus thérapeutiques, leurs utilisations pour le traitement de plusieurs maladies chez les êtres vivants et en particulier l'homme. Il a réussissait peu à peu à identifier les propriétés médicinales et/ou toxique des plantes. Ainsi sur chaque continent différentes traditions et rituels se sont développés à partir de plantes qui se sont transmises et enrichies au fil du temps (**Svoboda et Svoboda, 2000 ; Merad et Mahiout, 2019**).

Les plantes médicinales sont toute plante qui contient dans un ou plusieurs de ses organes des substances pouvant être utilisées à des fins médicinales. Elles sont à la base et font partie intégrante de la médecine et de la pharmacologie modernes à la fois comme principe actif extrait exclusivement des plantes et comme matière première dans la synthèse chimique des médicaments mais aussi Comme excipient (**M Joël Labé, 2018 ; Allouni, 2018**).

Elles sont la source d'un grand nombre de molécules actives utilisées dans plusieurs domaines: l'industrie, l'alimentation, la cosmétique, la médecine et la pharmacie. Parmi ces molécules on retrouve la coumarine, les alcaloïdes, les acides Phénols, tanins, lignanes, terpènes et flavonoïdes et les huiles essentielles: Il possède des activités anti-inflammatoires, Anticancéreuses, antioxydantes et antimicrobiennes. Mais cela ne signifie pas qu'il ne peut pas devenir nocif ou toxique s'il n'est pas utilisé correctement (**Allouane et al, 2020**).

Les différentes conditions climatiques et géographiques de l'Algérie permettent la croissance de différentes espèces végétales. En particulier dans les zones côtières, montagneuses et sahariennes (**Chamek et Oullali, 2018**). Cette grande richesse botanique, comprend plusieurs espèces de plantes aromatiques d'intérêts divers et constitue un axe majeur de la recherche scientifique. Mais seules 146 étaient recensées comme Médicinales (**Zitouni et Bendiaf, 2019**).

A cet effet, et dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, on s'est intéressé à une plante aromatique qui pousse à l'Ouenza wilaya de Tébessa (Algérie), du genre *Ruta* qui appartient à la famille des Rutacées. C'est une plante aromatique médicinale largement utilisée dans la médecine traditionnelle dans de nombreux pays, comme laxatif, anti-inflammatoire, analgésique, antispasmodique, antiépileptique, emménagogue et pour

INTRODUCTION

le traitement des pathologies cutanées. Ces innombrables vertus thérapeutiques sont principalement dues à sa richesse en métabolites secondaires comme les huiles essentielles, des alcaloïdes et des coumarines, qui sont responsables des activités antioxydant et antibactériennes. Se pousse généralement dans les régions côtières, les régions montagneuses et les zones sahariennes (**Allouni, 2018 ; Najem et al, 2020**).

Les études sur cette plantes et leurs substances actives qui en sont dérivées ont accru ces dernières années notamment les huiles essentielles de *Rutamontana* , Où certains misent en évidence par de nombreuses publications internationales et d'autres font encore l'objet de recherches dans le monde entier et les recherches se poursuivent jusqu'aujourd'hui sur l'activité antimicrobienne de ces huiles et de nombreux chercheurs ont mené plusieurs études pour connaître l'effet des huiles essentielles de *Rutamontana* sur les micro-organismes pathogènes notamment (**Allouni, 2018 , Allouane et al, 2020 ; Djellabi et Sedairia, 2021**).

Cette plante a été choisie dans le cadre de nos travaux grâce à leur abondance en Algérie et également pour ses propriétés médicinales reconnues depuis l'antiquité. Dans le but de déterminer l'effet antibactérien de l'HE de *Rutamontana* sur un ensemble de bactéries pathogènes d'origine hospitaliers.

Notre travail est constitué de deux parties :

- La première partie présente une recherche bibliographique globale sur l'origine de la plante Et sa répartition mondiale, ainsi qu'en Algérie, sa description, sa classification, son Extraction, les propriétés thérapeutiques, les utilisations et sa toxicité.
- La deuxième partie présente la partie expérimentale contenant le matériel et méthodes utilisés pour la réalisation de l'extraction de l'huile essentielle de *Ruta Montana* et son activité Antibactérienne et décrit les différents résultats obtenus et leurs discussions.

Une conclusion est donnée à la fin du présent travail en tirant les principaux résultats obtenus lesquels pourraient stimuler d'autres travaux de recherche dans le sens de servir et de valoriser le patrimoine national dans le domaine des plantes médicinales.

Partie I

La synthèse bibliographique

Chapitre 1

Présentation de la plante

Rutamontana

I. La plante *Rutamontana*

I.1. Origine et répartition de *Rutamontana*

Rutamontana a une large distribution dans le monde, elle est plus distribuée dans les pays tropicaux et tempérés tels que L'Amérique tropicale, L'Afrique du sud et L'Australie (Yosra et al, 2019). Elle est aussi cultivée en Europe du sud (Italie, Malte, Turquie...etc). Et L'Afrique du nord (Algérie, Tunisie, Maroc, Libye, L'Egypte) (Allouni, 2018).

I.2. La répartition géographique de *Rutamontana* en Algérie

Rutamontana pousse spontanément sur les rochers et les zones sèches. On l'a trouvé en abondance dans les régions du nord de l'Algérie, qui se caractérisent par des sols calcaires. On la trouve également dans les pâturages rocheux et les prairies des collines et les alpages (Djellabi et Sedairia, 2020). Ainsi que dans l'intérieur montagneux jusqu'à l'Atlas saharien (Najem et al, 2018).

I.3. La famille des *Rutaceae*

Avec environ 1500 espèces dans environ 150 genres, les *Rutaceae* sont la plus grande famille de l'ordre des *Sapindales* et sont surtout connues par le genre *Ruta* (Belazizia et al, 2020).

La famille a une grande distribution mondiale principalement dans les régions tropicales et subtropicales du monde. La plupart des Rutacées sont des plantes ligneuses, mais des sous-arbustes et des herbes existent dans plusieurs genres (Appelhans et al, 2020). La plupart des plantes de cette famille sont toxiques (Najem et al, 2018). La caractéristique morphologique la plus frappante de la famille facilement observable sur le terrain : est la présence de cavités sécrétoires (schizogènes) contenant des huiles essentielles. Les cavités sont visibles sous forme de points pellucides dans les feuilles, mais aussi dans d'autres parties des plantes, comme le péricarpe, les fleurs et les jeunes axes. Ce caractère est présent chez presque toutes les Rutacées à l'exception de certains genres les cavités peuvent être discrètes et moins abondantes. Les rutacées sont assez variables dans la plupart des caractères morphologiques (Appelhans et al, 2020). Les fruits sont souvent des baccates ou des déhiscents, les graines étant soit libérées élastiquement du fruit, soit restant attachées au fruit ouvert par le funicule. Les autres types de fruits de Rutacées comprennent les drupes et les samares (Appelhans et al, 2020).

I.4. Le genre *Ruta*

Le genre *Ruta* fait partie des diverses plantes aromatiques de la famille des Rutacées (Nahar et al, 2021).

Il est cultivé dans de nombreuses régions du monde (Mohammedi et al, 2020). Cependant la plus grande distribution des espèces de *Ruta* se trouve dans la région méditerranéenne (Nahar et al, 2021).

Le genre *Ruta* est représenté en Algérie par cinq espèces : (*Rutamontana*, *Rutachalepensis*, *Rutagraveolens*, *Rutaangustifolia* et *Rutatuberculata*) (Mohammedi et al, 2020). Ces Cinq espèces sont les plus répandues et les plus étudiées du genre *Ruta*. Ces espèces sont des arbustes vivaces caractérisés par une odeur désagréable et un goût acide (Magoura et al, 2020). Les espèces diffèrent les unes des autres par la forme des feuilles, la grappe fructifère, les bractées et les sépales (Allouni, 2018 ; Belazizia et al, 2020). L'utilisation des espèces de *Ruta* dans les médecines traditionnelles remonte au 5ème siècle, comme l'ont documenté divers auteurs célèbres comme Hippocrate et Dioscoride, et la valeur médicinale traditionnelle potentielle de ces espèces est toujours appréciée dans de nombreux pays (Nahar et al, 2021).

I.5. L'espèce de *Rutamontana*

I.5.1. Définition

Rutamontana fait partie de la famille des *Rutaceae*, c'est l'une des herbes utilisées en médecine alternative. Elle possède de nombreuses propriétés et avantages médicinales, mais c'est une plante toxique et dangereuse, si elle n'est pas utilisée avec prudence (Amabye, 2015).

Elle se propage par grain pouvant atteindre 1 mètre de long (Allouni, 2018). Elle est présente dans plusieurs régions du monde en abondance dans les régions méditerranéennes (Nahar et al, 2021).

I.5.2. Appellations

Rutamontana est connue sous le nom vernaculaire fidjel (Bennaoum et al, 2017).

En Algérie appelé populairement: «Fidjel», «Fidjela el djebeli», « sadhab », « hchichet el-dwa » (Mohammedi et al, 2020).

En nom berbère : «aourmi», «Issin » et « Zent » (Mohammedi et al, 2020).

En Français : Rue des montagnes (Najem et al, 2018).

En Italie: *Rutamontana* (Daoudi et al, 2016).

En Allemand : Bergraute (Benaouam, 2018).

I.5.3.L'aspect botanique

Il s'agit d'un sous-arbrisseau vivace de 30 à 60 cm de hauteur à tige rameuse dans sa partie supérieure, semi-ligneux (**Figure 01**) (**Allouni, 2018**).

Les feuilles, glauques finement découpées en segments linéaires, lancéolées ou souvent très allongées, enroulées en dessous par leur bord, leurs faces supérieures sont couvertes de pustules sécrétant une essence extrêmement malodorante.

Les fleurs, petites de 4 à 5 mm, de couleur jaune, sont groupées par 5 à 6 en cyme composée ordinairement de 4 divisions, Les pétales concaves, denticulés sur les marges, calice persistant. Elles comportent 4 à 5 carpelles libres, multi ovulés, à style soudé.

A maturité, le fruit est une capsule globuleuse, s'ouvrant en deux valves et apparaîtra une graine globuleuse, noire et brillante, fleurit de mai à juin (**Najem et al, 2018**) (**Figure 02**).

D'après (**Najem et al, 2018**) et (**Allouni, 2018**) :

Les tiges: Droites, cylindriques, très rameuses, glabres et glauques de 2 à 5 pieds de hauteurs.

Les feuilles: Pétiolées, alternes, éparses, composées, d'un vert glauque, à folioles ovales obtuses, épaisses, légèrement dentées sur les bords ou entières.

Les fleurs: Jaunes, à cinq pétales concaves qui renferment dix étamines bien plus longues que les pétales et terminées par des anthères presque ronds, pédonculées en corymbe terminal.

Les fruits: Des capsules globuleuses à lobes arrondies et pédoncule court (4 mm) et se terminent par 4 ou 5 lobes arrondis, apparents; libérant à maturité de petites graines noirâtres
Les racines: Blanches, fibreuses et à nombreuses radicules.



Figure 01 : Les fleurs, feuilles et les fruits de la plante *Rutamontana* (**Photo personnelle, 2022**).



Figure 02 : La plante *Rutamontana* présentant les tiges (Photo personnelle, 2022).

I.5.4. Classification botanique de *Rutamontana*

Le **tableau 01** résume la classification botanique de *Rutamontana* selon (Bennaoum, 2018) :

Tableau 01: Classification Botanique de *Rutamontana* (Bennaoum, 2018).

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Embranchement	<i>Angiospermae</i>
Sous-embranchement	<i>Eu Angiospermae</i>
Classe	<i>Eudicots</i>
Sous-classe	<i>Coreeudicots</i>
Série	<i>Rosids</i>
Supe-ordre	<i>Malvids</i>
Ordre	<i>Sapindales</i>
Famille	<i>Rutaceae</i>
Sous-famille	<i>Rutoideae</i>
Genre	<i>Ruta</i>
Espèce	<i>Ruta montana</i>

Chapitre 1 : Présentation de la plante *Rutamontana*

I.6.Principales utilisations de *Rutamontana* en médecine traditionnelle

Rutamontana est une plante à usage thérapeutique par excellence, les parties les plus utilisées sont les feuilles et les racines. Cette plante est utilisée sous différentes préparations à savoir la décoction, l'infusion et la macération de plus, ses huiles essentielles ont aussi des vertus médicinales. Une pincée pendant une semaine est la posologie la plus recommandée, pour éviter d'éventuelles intoxications (**Tableau 02**) (**Daoudi et al, 2016**).

Rutamontana est utilisée prescrite pour soigner une variété d'affections : dermiques, pulmonaires, dentaires, urogénitales, buccodentaire traumatologiques, Gastro-intestinal, neurologiques (**Najem et al, 2018**). Leurs Utilisations étaient principalement comme Un abortif et emménagogue et comme hypoglycémiant, antirhumatismal, Vermifuge, antiépileptique, antispasmodique, diurétique et Antipyrétique (**Tableau 03**) (**Mohammedi et al, 2020**). Elle a le potentiel d'être utilisées comme bloqueurs des canaux potassiques dans le traitement des maladies neuromusculaires, de l'anxiété et de la dysménorrhée (**Nahar et al, 2021**). Elle possède des activités antiparasitaires antibactérienne et molluscicides (**Djarri et al, 2013**). Aussi elle est consignée comme remède contre le venin du serpent (**Mohammedi et al, 2020**). Les graines et les feuilles sont utilisées comme un antidote contre les toxines. Les infections internes et les inflammations, et les ulcères Externes et l'eczéma sont traités par les extraits de la plante. Ces dernières activités peuvent s'expliquer par les activités cytotoxiques Et antimicrobiennes des alcaloïdes acridones (**Allouni , 2018**).

Tableau 02 : Quelque usage traditionnels du *Rutamontana*(**Lakhdar , 2015 ; Alloun , 2013**).

Espèces	Pays	Partie utilisée	Voie	Usage	Références
<i>Ruta montana</i>	Espagne	Partie entière	Orale	-fièvre- emménagogue- abortive- antispasmodique- contre les vers intestinaux	(Alloun, 2013).
	Algérie	Plante aérienne		Emménagogue - antispasmodique -Rubéfiant, poudre - Echarrodique	(Alloun, 2013).

Chapitre 1 : Présentation de la plante *Rutamontana*

	Maroc	Plante aérienne		Contre les maux d'estomac, les affections de l'appareil respiratoire et les maladies du foie	(Lakhdar, 2015).
--	-------	-----------------	--	--	------------------

Tableau 03 : Types d'usage de *Rutamontana* (Hammiche et al, 2013).

Usage interne	Usage externe
comme emménagogue puissant, pour les règles douloureuses, les accouchements difficiles et, à doses fortes, comme abortif et comme aphrodisiaque.	La décoction dans l'huile, en friction, soulage les rhumatismes, les courbatures et, appliquée sur la peau, a la réputation d'améliorer le vitiligo et le psoriasis.
Pour les affections respiratoires sévères, les gastralgies, les troubles intestinaux, les spasmes, la goutte, épilepsie, les troubles nerveux, la paralysie et comme vermifuge.	-l'infusion en collyre est employée contre les ulcérations de la cornée, en gouttes auriculaires pour les otites et les bourdonnements d'oreille; par voie nasale, les gouttes traitent l'ozène.
En injections vaginales comme abortif, en lavements comme anthelminthique.	ainsi que les fièvres et les vomissements du nourrisson et du jeune enfant.

I.7.Toxicité de la plante

Rutamontana peut se révéler toxique en cas d'utilisation abusive (Najem et al, 2019). Elle ne doit pas être consommée par les femmes enceintes, les fortes doses entraînent l'avortement (Parray et al, 2012).

La prise d'une injection (3 à 4 minutes) des feuilles et des tiges de *Rutamontana* pendant une semaine à fortes doses (3 infusions de 200 ml par jour) a provoqué une intoxication aiguë d'une femme en Tunisie, Donc Les doses aléatoires peuvent entraîner des effets néfastes sur la santé (Masri et al, 2015).

Chapitre 1 : Présentation de la plante *Rutamontana*

Le contact cutané avec les Feuilles de la plante provoque des érythèmes, des dermatites bulleuses parfois sévères, stimulant des brûlures, qui diffèrent des réactions de photoallergie due à la présence des furanocoumarines photosensibilisantes (**Alouni, 2018**). Les irritations cutanées sont provoquées due à la présence de la méthylnonylcétone l'un des propriétés de l'HE (**Belazizia et Askri, 2020**).

Chapitre 02
Huile essentielle de
Rutamontana

I. Huile essentielle de *Rutamontana*

I.1. Définition de l'huile essentielle

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils (**Tour, 2015**).

Les huiles essentielles sont des liquides huileux aromatiques qui sont extraits de différentes parties des plantes, par exemple les feuilles, l'écorce, les graines, les fleurs et l'écorce. Ils peuvent être obtenus par plusieurs techniques d'extraction différentes mais parmi toutes les méthodes la technique d'hydrodistillation est largement utilisée (**Herman et al, 2019**).

I.2. Localisation et rendement des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont produits dans le cytoplasme des cellules sécrétoires et s'accumulent généralement dans des cellules glandulaires spécialisées, situées à la surface des cellules et recouvertes par la cuticule (**Boukhatem et al, 2019**).

Selon (**Alloun, 2013**) on retrouve par exemple:

- Cellule sécrétoires : poils glandulaires épidermiques (lamiacées, verbénacées ...etc).
- Schizigène: des glandes de type poche (Rosacées, Rutacées).
- Les canaux glandulaires : retrouvés chez les conifères, ombellifères.

Toutes les parties des plantes aromatiques peuvent contenir de l'huile essentielle (**Teixeira et al, 2013**).

Le rendement de l'huile essentielle est calculé selon la formule suivante :

$$\text{RHE}\% = \text{MHE} / \text{MV} \times 100$$

RHE : Rendement en huile essentielle (%).

MHE: Masse de l'huile essentielle (g).

MVs: Masse de la matière végétale sèche (g) (**Bourahla et al, 2020**).

I.3. Caractéristiques Des Huiles Essentielles

D'après (**Echchaoui, 2018**) les principales caractéristiques sont :

- Les huiles essentielles sont constituées de molécules aromatiques de très faible masse.
- Liquides à température ambiante, Très inflammables.
- Renferment des principes volatile et rarement coloré.
- Densité inférieur à celle de l'eau.

I.4. Conservation

D'après (Echchaoui, 2018) pour conserver les huiles essentielles, il existe des règles obligatoires à respecter et à suivre par exemple :

- Il est recommandé de les stocker dans des flacons en verre ambre ou foncé, de manière à les protéger de la lumière,
- Il faut éviter les forts écarts de température et le contact avec l'air.
- Après chaque usage il faut renfermer les flacons car les arômes s'évaporent dans l'atmosphère.
- Éviter de Tenir les flacons à portée des enfants.
- Stocker les bouteilles verticalement en position horizontale, il y a un risque que l'huile attaque le bouchon (les huiles ont une action corrosive sur Le plastique).
- Doit être conservé à 4°c de température.

I.5. Techniques d'obtention des huiles essentielles

Il y a des différentes méthodes utilisées pour extraire les huiles essentielles (Figure 03) (Herman et al, 2019).

Le choix de procédé d'obtention des huiles essentielles dépend de la quantité, la composition et la localisation des l'huiles dans la plante (Boukhatem et al, 2019).

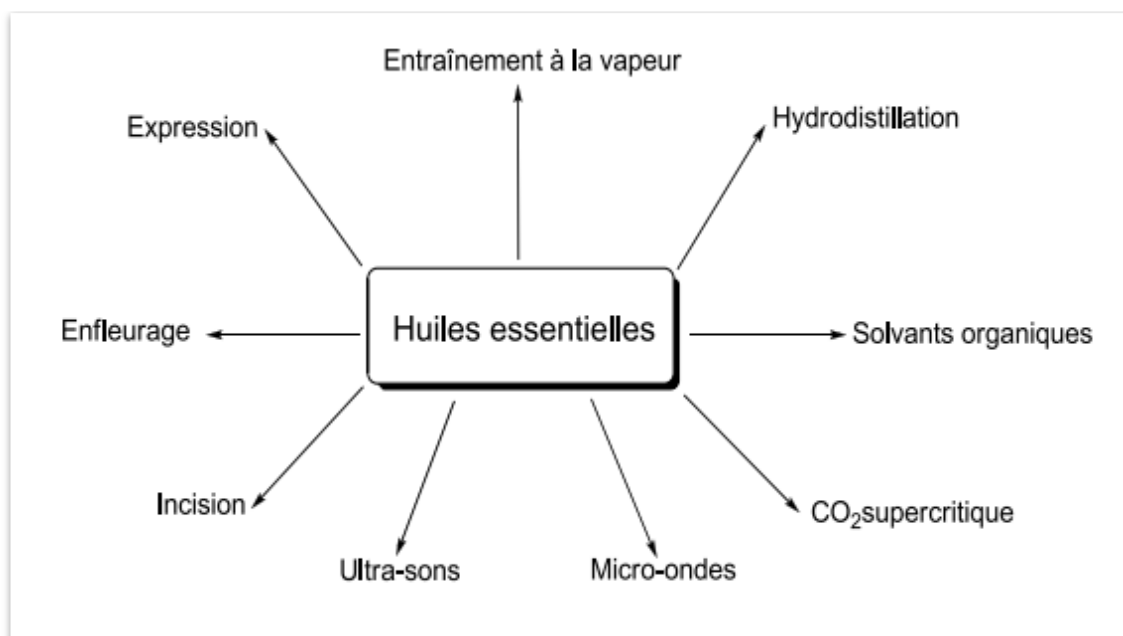


Figure 03 : les méthodes d'extraction des huiles essentielles (Ouis, 2015).

I.6. Hydrodistillation

L'extraction par Hydrodistillation est la méthode la plus utilisée et la plus courante pour extraire les huiles essentielles car elle convient à la plupart des plantes (**figure 04**) (**Bourahla et al, 2020**).

La matière végétale à extraire va être mélangé avec l'eau, l'ensemble est soumis à une température élevée jusqu'à l'ébullition (**Boukhatem et al, 2019**).

L'explosion des cellules qui contient les molécules aromatiques due à la chaleur, entraîne leur libération. Les molécules aromatiques libérées forment un mélange avec la vapeur d'eau. Ainsi, dans une pièce pour s'y refroidir, ils se séparent l'un de l'autre sous l'effet de la différence de densité. Puis l'huile est récupérée par décantation (**Bourahla et al, 2020**).

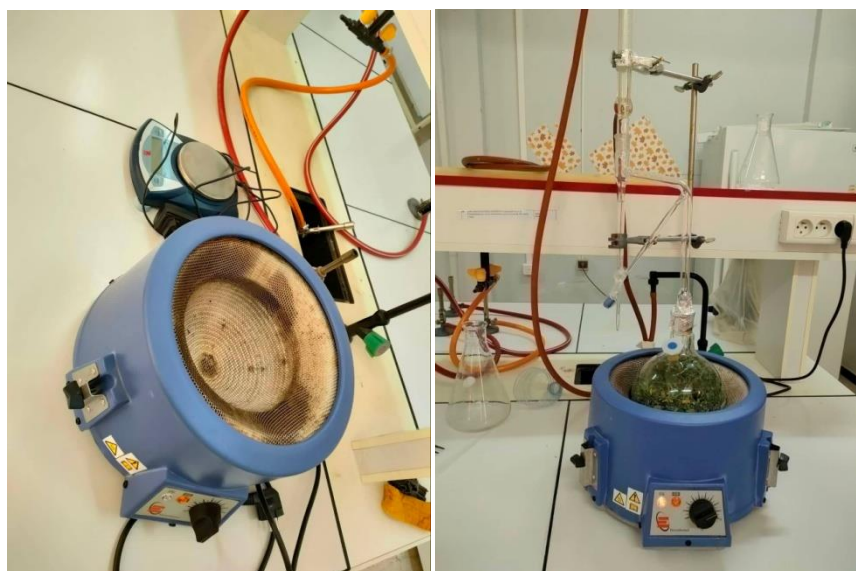


Figure04 : Extraction des HE par hydrodistillation (**Photo personnelle, 2022**).

I.7. La bioactivité

Les huiles essentielles de *Rutamontana* sont bien connues par ses bioactivités. Ils sont utilisés depuis longtemps dans la médecine traditionnelle ainsi que dans les médicaments, les produits cosmétiques et pharmaceutiques (**Nahar et al, 2021 ; Parray et al, 2012**).

Selon (**Nahar et al, 2021**) les Principales bioactivités de l'huile essentielle de *Rutamontana* incluent : activités anti-inflammatoire, antimicrobiennes, antioxydantes, antiprotozoaires, cytotoxiques, herbicides, insecticides, insectifuges, larvicides, nématocides/anthelminthiques et phytotoxiques.

I.7.1 Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Rutamontana*

Les résultats des chercheurs indiquent que l'activité antibactérienne est liée à la composition chimique de l'huile essentielle et le micro-organisme testé. D'autres ont montré que les huiles essentielles de l'espèce de *Rutamontana* plus puissantes en ce qui concerne les activités antibactériennes (Nahar et al, 2021).

Les phénols, les terpènes ou terpénoïdes sont les plus importantes molécules caractérisées par leur activité antibactérienne et leur large spectre. Cependant le mécanisme de l'action de ces terpènes n'est pas clairement défini (Lakhdar, 2015).

La membrane externe des bactéries Gram- étant rigide, riche en LPS et plus complexe, les molécules aromatiques des (HE) trouvent plus de difficulté à la traverser, par contre les composés aromatiques peuvent atteindre plus facilement la membrane plasmique des bactéries Gram+ (Boumhamdi et al, 2018).

Les huiles essentielles peuvent être cytotoxique pour les bactéries, en agissant sur plusieurs structures (figure 05) (Boumhamdi et al, 2018).

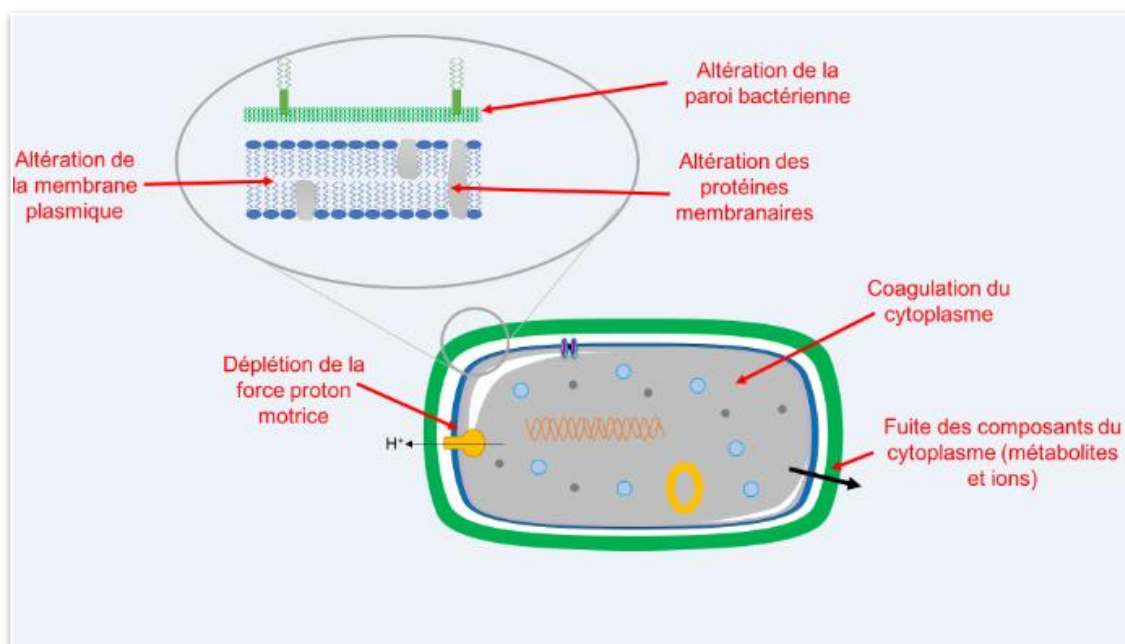


Figure 05 : Mécanisme d'action des huiles essentielles au niveau microbien (Boumhamdi et al, 2018).

I.8. Techniques d'étude de l'activité antibactérienne

Il ya des techniques d'études de l'activité antibactérienne qui sont actuellement utilisées pour effectuer l'évaluation des propriétés antibactériennes des huiles essentielles, comme la méthode de diffusion en milieu solide (gélosé) (Fontanay et al, 2015).

I.8.1.L'aromatogramme sur milieu solide

Cette méthode est la technique la plus abondante et la plus utilisée pour déterminer l'activité antimicrobienne des (HEs) (Allouni, 2018).

La méthode des disque consiste à ensemencer une suspension bactérienne (à la surface) dans des boîtes de pétri contenant un milieu gélosé (Stéphane et al, 2015 ; Allouni, 2018).

Les huiles essentielles sont déposés sur les disques absorbants et stériles, ces derniers sont placés sur les boîtes de Pétri (Stéphane et al, 2015 ; Allouni, 2018).

Durant l'incubation la substance est alors diffuser dans la gélose à la surface et ce qui créé un gradient de concentration dépendant de la substance, ce que permet de suivre l'inhibition et la croissance des germes présentées par une zone clair autour de disque (Zone d'inhibition) (Stéphane et al, 2015 ; Allouni, 2018).

La sensibilité des bactéries à l'huile essentielle, permet de les classés en 4 groupes selon le diamètre de la zone d'inhibition, ils sont résumés dans le **Tableau 04**.

Tableau 04 : Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés (Bourahla et al, 2020).

Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Transcription	Sensibilité des germes
<8	-	Résistante
9-14	+	Sensible
15-19	++	Très sensible
>20	+++	Extrêmement sensible

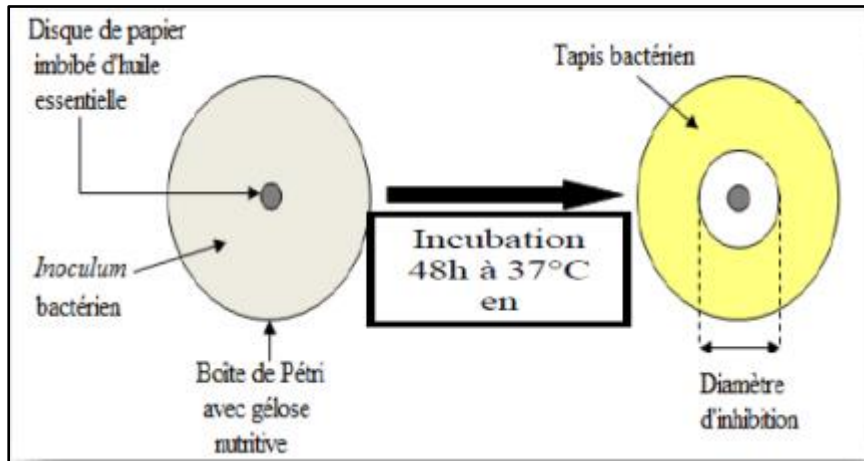


Figure06 : Principe de la méthode de diffusion par disque (Medjekane, 2017).

Partie II

La partie expérimentale

Matériels et Méthodes

I. Objectifs du travail

Le travail a été effectué au sein du laboratoire de microbiologie du département de Biologie appliquée de la faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie, de l'Université LaarbiTébessi de Tébessa, pendant une durée de deux mois (Novembre jusqu'à la fin de Décembre) de l'année universitaire 2021.

Le but de ce travail consiste à l'étude «In vitro» de l'effet antibactérienne de l'huile essentielle de *Rutamontana* sur des souches pathogènes provenant de différentes infections.

Les souches bactériennes testés sont des souches pathogènes proviennent de laboratoire d'analyses médicale privé « **Hannibaal** » de la wilaya de Tébessa.

II. Préparation de l'huile essentielle de *Rutamontana*

II.1. Matériel végétal

La plante de *Rutamontana* est cultivée à l'Ouenza, la wilaya de Tébessa. Elle est disponible en abondance.

L'échantillon a été récolté le jeudi 11 /11/2021, à 14h00.

200 grammes ont été ramassé de la partie aérienne de la plante.



Figure 07 : La plante de *Rutamontana* au moment de la récolte (Photo personnelle, 2021).

II.2. Produits chimiques et Appareillage

Tous les produits chimiques utilisés ainsi que l'appareillage sont mentionnés dans l'annexe 01.

II.3. Séchage du matériel végétal

La partie aérienne de la plante *Rutamontana* (feuilles seulement) a été séchée dans une température ambiante évitant la lumière et l'humidité pendant 10 jours (**Figure 08**).

Après le séchage on l'a transporté au laboratoire de Microbiologie de la faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie de Tébessa, pour commencer l'extraction de l'huile essentielle.



Figure 08 : La plante *Rutamontana* pendant le séchage (**Photo personnelle, 2021**).

II.4. Extraction de l'huile essentielle de *Rutamontana*

II.4.1. Protocole expérimental de l'extraction

Premièrement l'appareil a été rincé avec de l'acétone et l'eau distillée avant de commencer le procédé d'extraction pour éviter toute contamination de l'huile essentielle.

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée grâce à l'hydrodistillateur de type Clevenger (**Figure 09**).

Nous avons pesé 100 grammes de la matière végétale séchée et broyée et puis nous l'avons mis dans un ballon de 2 litres ajoutant 1 litre de l'eau distillée (**Figure 10**).

Lorsque l'huile a commencé à s'accumuler dans l'ampoule de décantation, nous l'avons recouvert de papier aluminium (**Figure 11**). Le processus a pris environ 2h30min à 3 heures de temps. Finalement l'huile essentielle a été récupérée par une seringue, puis mesuré et conservé dans des flacons en verre stérile recouverts d'un papier aluminium dans un réfrigérateur à 4°C de température.

Matériels et Méthodes



Figure 09 : Hydrodistillation de l'huile essentielle de *Rutamontana* par un dispositif de type Clevenger (**Photo personnelle, 2021**).



Figure 10 : Broyage des feuilles de *Rutamontana*(**Photo personnelle, 2021**).



Figure 11 : L'accumulation de l'huile essentielle dans l'ampoule de décantation (**Photo personnelle, 2021**).

Matériels et Méthodes

II.5. Détermination de rendement en huile essentielle

Le rendement de l'huile essentielle est calculé selon la formule suivante :

$$\text{RHE\%} = \text{MHE} / \text{Ms} \cdot 100$$

RdtHE : Rendement en huile essentielle (%).

MHE: Masse de l'huile essentielle (g).

MVS : Masse de la matière végétale sèche (g)

II.6. Les Caractéristiques organoleptiques

Les caractères organoleptiques de l'huile essentielle de *Rutamontana* consiste à vérifier (l'aspect, couleur, odeur et la saveur).

Les caractères organoleptiques ont été étudiés et comparé aux normes d'AFNOR, 2006 et d'autres études de chercheurs.

III. Etude de l'activité antibactérienne

III.1. Matériels

III.1.1. Les souches testées

Les souches utilisées pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne d'HE de *Rutamontana* sont motionnées dans le **tableau 05**.

Tableau 05: Les caractéristiques des souches bactériennes testées (retenus du laboratoire d'analyse médicale privé Hannibal).

la souche	La famille	La forme	Gram	Provenance
<i>Pseudomonas.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	Bacille	Négatif	Analyse bactériologique des urines,
<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Coque	Négatif	ECBU, Laboratoire Hannibal
<i>Staphylococcus.aureus</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	Coque	Positif	Analyse bactériologique de pus,

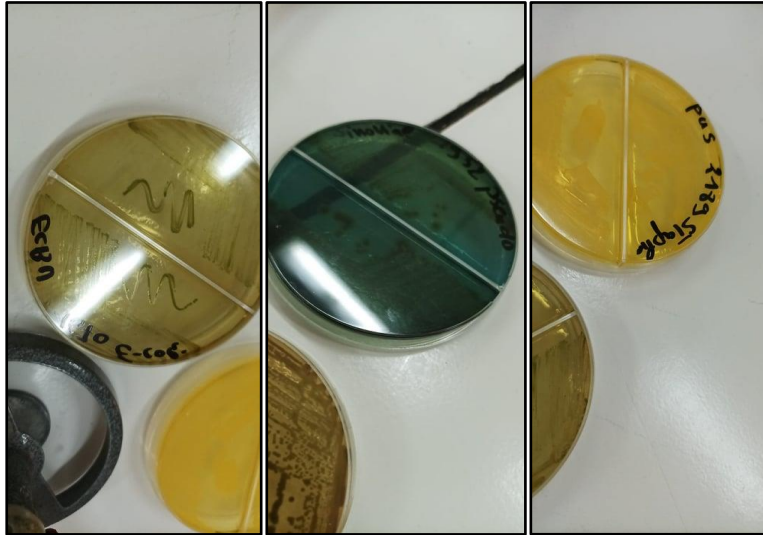


Figure 12 : Les souches testées provenant de différentes infections (**Photos personnelle, 2021**).

III.1.2. Les milieux de culture et appareillage

Les milieux de culture et l'appareillage utilisés dans cette partie sont mentionnés dans l'**annexe numéro 02**.

III.2. Méthodes

III.2.1. vérification de la pureté des souches bactériennes testées

Les bactéries utilisées sont des souches pathogènes provenant de différentes infections, et pour vérifier la pureté de ces souches nous avons appliqué :

- Inoculation sur GN 24h à 37°C.
- Inoculation sur chromagar d'orientation.
- Examen microscopique après coloration de Gram (**annexe 03**).

On a réalisé des séries de repiquage à chaque test de l'activité antibactérienne, pour que les bactéries restent jeunes (**annexe 04**).

III.2.2. Méthodes d'étude de l'activité antibactérienne

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'effet antibactérien de l'huile essentielle de *Rutamontana* est la méthode de diffusion à partir d'un disque de papier Whatman n°1 de 6 mm (l'aromatogramme), qui permet la mise en évidence de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle.

Tous les tests ont été réalisés au niveau de laboratoire de la microbiologie de la faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie de la wilaya Tébessa.

III.2.2.1.L'aromatogramme sur milieu solide

a) Principe

Le principe de la méthode consiste à introduire des disques absorbants stériles (6 mm de diamètre) imprégnés de l'HE à tester à la surface des boîtes de pétri contenant un milieu gélosé préalablement coulé et ensemencé avec la souche bactérienne testée.

Après l'incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition apparues, si l'HE présente un effet sur la souche testée, si non la souche testée est résistante. (Stéphane *et al*, 2015 ; Allouni, 2018).

La sensibilité des bactéries à l'huile essentielle, permet de les classer en 4 groupes selon le diamètre de la zone d'inhibition, ils sont résumés dans le **Tableau 04**.

Tableau 04 : Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés (Bourahla *et al*, 2020).

Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Transcription	Sensibilité des germes
<8	-	Résistante
9-14	+	Sensible
15-19	++	Très sensible
>20	+++	Extrêmement sensible

b) La préparation des disques

Des disques d'un diamètre de 6 millimètres sont préparés avec du papier filtre choisi (Whatman n°1). Puis ils sont placés dans un autoclave pour la stérilisation.

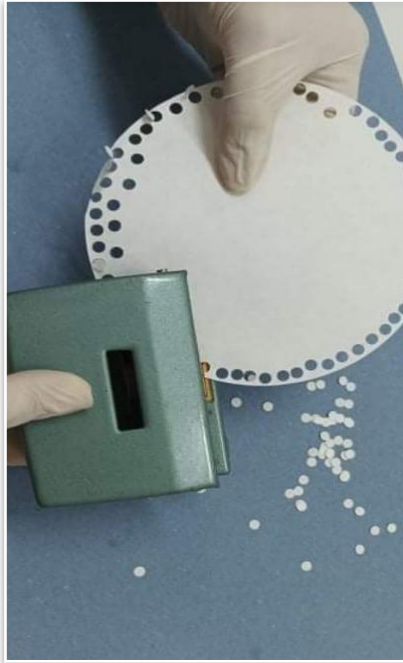


Figure 13 : Préparation des disques (Photos personnelle, 2021).

c) Préparation de l'inoculum et ajustement de la charge bactérienne

L'inoculum a été préparé en suivant les étapes suivantes :

- Le prélèvement se fait à l'aide d'une pipette Pasteur, on gratte les colonies clairement isolées et on les place dans des tubes à essai contenant dix millilitres d'eau physiologique (**figure 14**).
- le mélange doit être bien homogénéisé (l'ajustement du mélange se faire par la comparaison du mélange à la solution de Mc Ferland) (**annexe05**).
- La turbidité des suspensions doit être équivalente à celle de Mc Ferland 0.5 ce qui correspond à $1,5 \times 10^8$ UFC/ml pour les bactéries ($D.O = 0.08 \text{ à } 0.1 / \lambda = 600\text{nm}$).



Figure 14 : Préparation des suspensions bactériennes (Photo personnelle, 2021).



Figure 15 : L'ajustement de la charge bactérienne (Photo personnelle, 2021).

d) Protocol expérimental

Après la préparation de la gélose Mueller Hinton (MH), elle sera versée dans des boîtes de pétri pour se solidifier (**Figure 16**). Pour effectuer l'ensemencement on fait tremper un écouvillon stérile dans une suspension bactérienne (**Figure 17**). L'ensemencement se fait sur toute la surface de la gélose MH en stries serrés en faisant pivoter la boîte de 60 degrés à chaque fois (**Figure 18**).

Laisser sécher 15 à 20 minutes à une température ambiante avant de déposer les disques imprégnés d'HE pure de *Rutamontana*.

Ensuite, à l'aide d'un pince stérile, on place les disques sur la surface des boîtes de pétri on dépose de différentes quantités d'huile essentielle pure par une micropipette (de 5, 10 et 20 μ l), pour voir l'effet de l'huile essentielle de *Rutamontana* sur la souche testée (**Figure 19**).

Matériels et Méthodes

Enfin on incube les boîtes testées dans l'étuve à 37° C, sans les inverser (**Figure20**).



Figure 16 : Préparation de la gélose MH (Photo personnelle, 2021).



Figure 17 : Tremper l'écouvillon dans une suspension bactérienne (Photo personnelle, 2021).

Matériels et Méthodes



Figure 18:Ensemencement à la surface de la boîte de pétri contenant la gélose MH (Photo Personnelle, 2021).



Figure19 : Dépôts des disques imprégnés de l'HE de *Rutamontana*(Photo Personnelle, 2021).



Figure 20: Incubation des boîtes de pétri ensemencées (Photo personnelle, 2021).

e) Expression des résultats

La mesure des diamètres des zones d'inhibitions s'effectue à l'aide d'un pied de coulisse.

N.B : On n'a pas pu continuer notre travail due à l'éclatement du dispositif utilisé pour refaire l'extraction d'HE de la plante étudiée et au manque des moyens et des produits.

Résultat et discussion

Résultat et discussion

I. Rendement en huile essentielle de *Rutamontana* :

I.1. Résultats :

L'hydrodistillation de la partie aérienne séchée de la plante *Rutamontana* récoltée de l'Ouenza (Tébessa) par le dispositif de cleverger nous a donné un rendement moyen en (HE) égale à (0,5%). Les résultats d'extraction sont mentionnés dans le **tableau 06**.

Tableau 06 : Rendement en huile essentielle de *Rutamontana*.

Extraction	Rendement (%)
Moyenne	0,50 ± 0,12

I.2. Discussion :

Les résultats du rendement en (HE) de *Rutamontana* ont été comparés avec d'autres études, ils sont mentionnés dans le **tableau 07**.

Tableau 07 : Rendement en (HE) de la partie aérienne séchée de la plante

Rutamontana extrait par hydrodistillation de différentes études.

La plante	La région	période de récolte	Etat	R(%)	Références
<i>Ruta montana</i>	Maroc	Avril et Mai 2015	P.A.S	1,21	(Daoudi et al, 2016)
	Tizi ousou	Avril et Mai 2019	P.A.S	0,38	(Mohammedi et al, 2020)
	Msila	Avril et Mai 2019	P.A.S	0,89	(Mohammedi et al, 2020)
	Djelfa	Avril et Mai 2019	P.A.S	1,45	(Mohammedi et al, 2020)
	Tébessa	Février 2020	P.A.S	0,82	(Djellabi et Zaineb, 2020)

P.A.S : Partie aérienne séchées, R : Rendement.

Résultat et discussion

Le rendement en (HE) de la partie aérienne séchée de la plante *Rutamontana* qu'on a trouvé est égal à (0,5%).

Il apparait que la teneur en (HE) de notre échantillon récolté de l'Ouenza wilaya de Tébessa, est inférieur à celui enregistré par **(Daoudi et al, 2016)** qui ont trouvé un rendement égale à (1,21%) en (HE) extrait à partir des partie aériennes séchées et récolté dans la période de floraison (Avril et Mai) de la région de Maroc par la technique d'hydrodistillation.

Le rendement est différent aussi à celui trouvé par **(Mohammedi et al, 2020)** qui ont estimé une valeur égale à (1,45%), utilisant la partie aérienne séchée de la plante *Rutamontanar* récoltée de la région de Djelfa pour extraire l'HE par la méthode d'hydrodistillation.

Par ailleurs, la comparaison de nos résultats avec **(Mohameddi et al, 2020)** et **(Djellabi et Sedairi, 2020)**, qui ont trouvé respectivement une valeur de (0,89%) en huile essentielle extrait à partir de la partie aérienne séchée récoltée de la région de Msila en Avril et Mai 2019 par la technique d'hydrodistillation, et (0,82%) en (HE) extrait à partir des feuilles séchés récoltés en Février 2020. Nous a permet de conclure que nos résultats sont très proche de leurs valeurs.

Un rendement en huile essentielle inférieur à celui qu'on a trouvé a été signalé par **(Mohammedi et al, 2020)** de la région de Tizi-Ouzou est estimé à (0,38%). Ils ont utilisé la partie aérienne séchée seulement récoltée en Avril et Mai 2019.

Bien qu'il est très toxique l'HE peut être affecté par plusieurs facteurs tels que : les conditions climatique, géographique et saisonnière, période de récolte, l'état d'utilisation de la plante et la technique d'extraction appliquée. Ce qui permet d'expliquer la variation entre ces résultats **(Allouni, 2018 ; Yosra et al, 2019 ; Bourahla et al, 2020)**.

II. Les caractères organoleptiques de l'HE

II.1.Résultat

L'huile essentielle obtenue par hydrodistillation du matériel végétal de *Rutamontana* est un liquide de couleur jaune pale, il présente une odeur très forte et caractéristique.

II.2 Discussion

Résultat et discussion

Les paramètres organoleptiques de l'HE sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes (AFNOR, 2006) et similaire à celui trouvé par (Alloun, 2013) sont résumés dans le **tableau 08**.

Tableau 08 : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Rutamontana*.

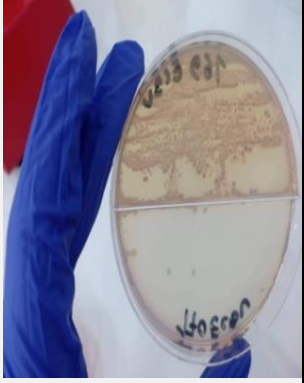
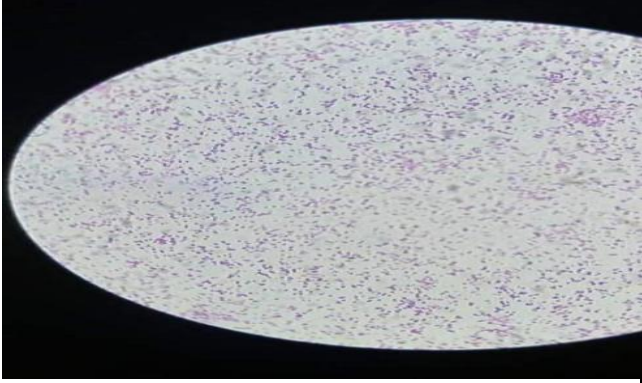
Caractéristiques organoleptiques	Aspect	Couleur	Odeur
Alloun, 2013	Liquide Mobile	Jaune pale	Forte, prononcé et caractéristique
AFNOR, 2006	Liquide Mobile	Jaune pale	Forte et Caractéristique
Huile essentielle étudié	Liquide	Jaune pale	Forte caractéristique

III. Etude de l'activité antibactérienne de l'HE de *Rutamontana*

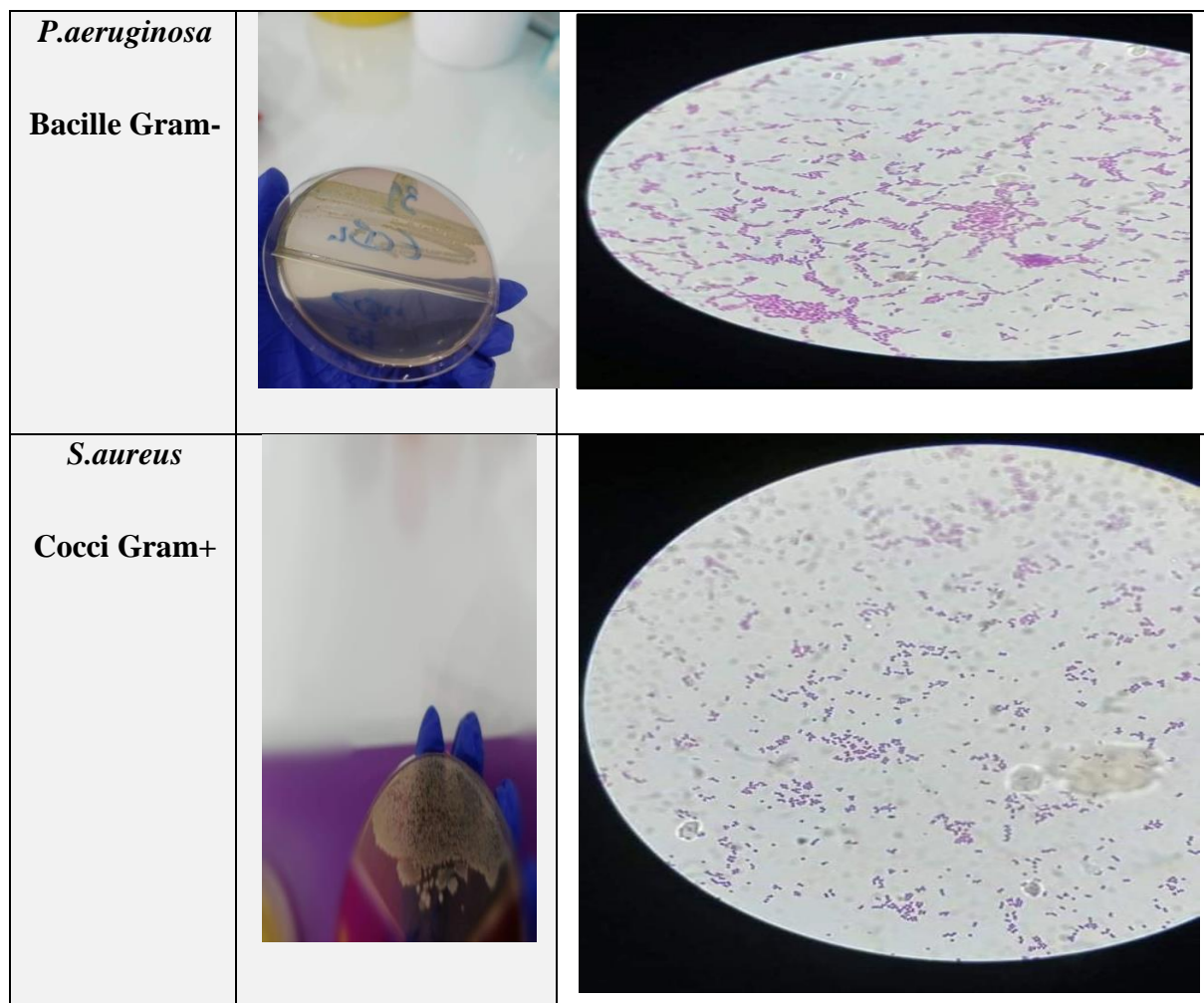
III.1. Vérification de la pureté des souches bactériennes testées

Les résultats de la vérification de la pureté des souches bactériennes sont présentés dans le **tableau 09**.

Tableau09 : Aspect microscopique et macroscopique des souches bactériennes testées (Photo personnelle, 2022).

La Souche Bactérienne	Aspect macroscopique sur chromagar	Aspect microscopique après coloration du Gram
<i>E.coli</i> Coccobacille Gram-		

Résultat et discussion



III.2.Evaluation qualitative et quantitative de l'activité antibactérienne de l'HE de *Rutamontana*

III.2.1.Résultats

Les résultats issus de l'activité antibactérienne de l'HE de *Rutamontana* par la méthode de diffusion sur milieu solide (aromatogramme) sont indiqués dans le **tableau 10**.

Tableau 10 : Zone d'inhibition en (mm) de l'effet antibactérien de l'HE de *Rutamontana* sur les souches bactériennes testées.

[C] en HE pure (Microlitre)	Diamètre des zones d'inhibitions en (mm)					
	<i>E.coli</i>	<i>S</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S</i>
5	5,5 ± 0,71	-	6,25 ± 1,06	-	0	-
10	7,75 ± 0,35	-	14,5 ± 0,71	++	0	-
20	9,5 ± 0,71	+	21 ± 1,41	++ +	0	-

Résultat et discussion

[C] :Concentration en HE de *Ruta montana*, mm :milimètre, *E.coli* :*Eshirichia coli*,
S.aureus : *Staphylococcus aureus*, *P.aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa*,
S:Sensibilité, (+) : sensible, (++) : Très sensible, (+++) : extrêmement sensible, (-):
Résistante.

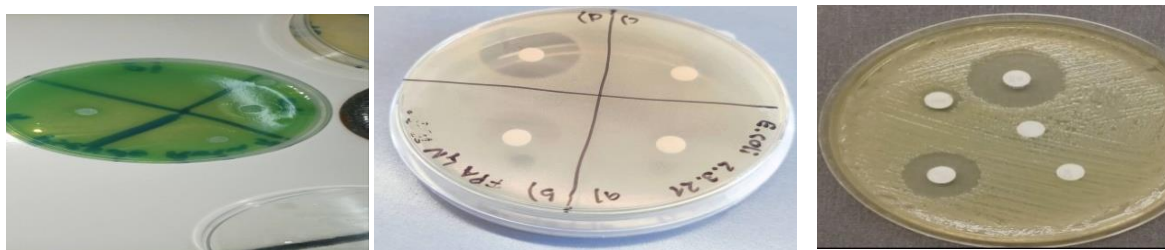


Figure 21 : Résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de *Ruta montana* (Aromatogramme) testées sur *P.aeruginosa*, *E.coli* et *S.aureus* (Photos personnelle, 2022).

III.2.2. Discussion

L'HE de *Rutamontana* pure a une forte activité sur les deux souches bactériennes *S.aureus* et *E.coli* ($5,5 \text{ mm} < D < 21 \text{ mm}$), alors qu'il n'y a aucun effet antibactérien sur la souche de *P.aeruginosa*.

Selon le **tableau 10**, on a observé que :

- La première dose appliquée $5 \mu\text{l}$: Toutes les souches bactériennes testées (*S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa*) ont présenté une résistance contre l'HE de *Rutamontana*.
- La deuxième dose appliquée $10 \mu\text{l}$: on a observé que la souche *S.aureus* est très sensible par contre les deux souches (*E.coli*, *P.aeruginosa*) ont montré une résistance vis avis l'HE de *Rutamontana*.
- La 3ème dose appliquée $20 \mu\text{l}$: la souche *S.aureus* est extrêmement sensible que *E.coli* (sensible). Tandis que la souche *pseudomonasaeruginosa* reste résistante.

La comparaison de nos résultats avec ceux rapporté par (Alloun, 2013) qui ont montré que l'HE de la plante étudié a un effet antibactérien sur *S.aureus* avec une valeur de (13mm) de diamètre et *E.coli* avec une valeur de (10,25mm) par contre la souche de *P.aeruginosa* présente une résistance contre l'HE de *Rutamontana*. Egalement (Toufiq et al, 2020) qui ont montré que l'huile essentielle extrait de la plante *Rutamontanacollecté* au stade de Floraison de la région de Taza (Maroc) a une forte activité sur *S.aureus* et *E.coli* avec un diamètre de (12 mm) et (6mm) respectivement. Alors que la souche

Résultat et discussion

P.aeruginosa est résistante à l'effet de l'huile essentielle. Ceci nous permis de conclure que nos résultats concordent avec ceux rapportés par ses auteurs.

Des résultats similaires ont été rapporté par (Mohammedi et al, 2020) qui ont collecté la plante de *Rutamontana* de sept endroit différents en Algérie (Boumerdes, Tizi-ouzou, Blida, Bouira, Tipaza, Msila et Djelfa) en mois de (Avril-Mai). Leur étude montre que l'HE extrait de la partie aérienne de matériel végétal séché récolté de la région de Tizi Ouzou a une forte activité antimicrobienne sur *S.aureus* et *E.coli* avec des diamètres d'inhibition de (16mm) et (14.3mm) respectivement. Concernant *P.aeruginosa* elle a présenté une résistance vis-à-vis de l'HE de *Rutamontana* extrait de deux régions Boumerdes et Blida. Par ailleurs (Yosra et al, 2019) ont montré que le mode d'action d'HE extrait de *Rutamontana* le plus élevé a été observé contre *S.aureus(ATCC76110)*, *S.aureus* et *E.coli* avec des zones d'inhibition les plus fortes (21 mm, 17 mm et 7 mm de diamètre respectivement). Pour les 2 souches de *P.aeruginosa* et *P.aeruginosa(ATCC7624)* ils ont trouvé des différentes valeurs (zone d'inhibition de 6mm et 21mm de diamètre respectivement). Ce qui ne concorde pas avec nos résultats.

Les résultats de notre étude ont montré que l'effet antibactérien de l'HE de *Rutamontana* dépend de la souche bactérienne testée et de la concentration de l'HE en effet quand la concentration en HE augmente les zones d'inhibition augmente (Alloun, 2013; Yosra et al, 2019 ; Belazizia et Askri, 2020).

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Récemment, les plantes médicinales ont reçu l'attention de plusieurs chercheurs de différentes régions du monde grâce à leurs propriétés médicinales. Elles contiennent de nombreuses molécules bioactive peuvent être utilisés dans la fabrication de divers produits pour le bienfait des populations (produit pharmaceutique et cosmétique).

Notre étude s'est appuyée sur l'étude de la fraction aérienne de l'HE ainsi que l'étude de l'effet antibactérien de l'huile essentielle de *Rutamontana* sur quelques souches bactériennes provenant de différentes infections.

L'extraction de l'huile essentielle de *Rutamontana* extrait par la technique d'hydrodistillation nous a donné un liquide de couleur jaune pale d'une odeur caractéristique et forte, et un rendement égale à 0,5%.

L'étude de l'activité antibactérienne in vitro de l'huile essentielle de *Rutamontana* sur les souches bactériennes *S.aureusetE.coli* a montré qu'elles sont sensibles tandis que *P.aeruginosa* a montré une résistance vis-à-vis d'HE. Ces résultats préliminaires nous a permis de conclure que l'activité antibactérienne dépend de la souche bactérienne testée et la concentration de l'HE appliquée.

En perspective, il serait intéressant de compléter l'étude par l'application de l'HE de *Rutamontana* sur d'autres souches bactériennes à Gram+ et à Gram-. Egalement faire une étude par la méthode de dilution pour calculer la **CMI** et la **CMB** et déterminer ainsi le pouvoir bactériostatique ou bactéricide de la plante et extraire l'huile essentielle avec d'autre technique d'extraction.

Références bibliographique

Références bibliographiques

Références :

-A-

1. Alloun Kahina. Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethumgraveolens L.*) de la sauge (*Salviaofficinalis L.*) et de la rue des montagnes (*Rutamontana L.*).2013. Thèse de doctorat.
2. Allouni Rima. Etude des aspects morphologique, phytochimiques et pharmacotoxicologiques de la plante *Rutamontana*. 2018. Thèse de doctorat.
3. AmabyeTeklitGebregiorgis. «Phytochemical screening and evaluation of antibacterial activity of *Rutagraveolens L.*-a medicinal plant grown around Mekelle, Tigray, Ethiopia." *Natural Products Chemistry & Research* (2015).
4. Amar Z., Abdelwahab B., Abdelhakim B., Nouredine G. 2012. Environmental impact on the chemical composition and yield of essential oils of Algerian *Rutamontana* (Clus) and their antioxidant and antibacterial activities. *Advances in Environmental Biology*, 6(10), 2684-2688.
5. Appelhans M. S., Bayly M J., Heslewood M. M., Gropp M., Verboom G A., Forster P I., Duretto M. F. 2021. A new subfamily classification of the Citrus family (Rutaceae) based on six nuclear and plastid markers. *Taxon*, 70(5), 1035-1061.

-B-

6. Belazizia N., Askri M., Malki, S. Etude des activités antioxydante et antibactérienne de la plante *Rutamontana L.* 2020.
7. Benali T., Habbadi, K., Khabbach, A., Marmouzi I., Zengin G., Bouyahya A., Hammani, K. 2020. GC–MS analysis antioxidant and antimicrobial activities of *Achilleaodorata subsp. pectinata*and *Rutamontana* essential oils and their potential use as food preservatives. *Foods*, 9(5), 668.
8. BennaoumZiane. Enveloppe écologique. caractères microphytodermiques et effets allélopathiques des composés phytochimiques des espèces du genre *Ruta* dans la région nord occidentale oranaise. 2018. Thèse de doctorat.

Références bibliographiques

9. Bennaoum, Z., Benhassaini H., Falconieri D. Chemical variability in essential oils from *Ruta* species among seasons and its taxonomic and ecological significance. *Natural Product Research*. 2017. Vol 31, no 19, p. 2329-2334.
10. Boukhatem M N., Ferhat A., Kameli A. Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles: revue de littérature. *Une*, 2019, vol. 3, no 4, p. 1653-1659.
11. Boumhamdi L., Znini A., Paolini M., Julien C., Jean., Lhou. 2018. Chemical Composition And Biocontrol Of The Essential Oil Of Celeri Seeds (*Apium Graveolens* L.) Against *Botrytis Cinerea* After Apples Harvest.
12. Bourahla, N., Halfaya A., Khelif O. Étude de l'effet antibactérien de l'huile essentielle d'une plante médicinale (*Eucalyptus camaldulensis*). 2020.

-C-

13. Chaibeddra Z., Zellagui A. Etude comparative des substances bioactives chez *Rutamontana* L. et *Rutatuberculata* forsk. 2014.

-D-

14. Daoudi A., Hrouk H., Belaidi R.. Valorisation de *Rutamontana* et *Rutachalepensis*: étude ethnobotanique, screening phytochimique et pouvoir antibactérien. *Journal of Materials and Environmental Science*. 2016. Vol,7, no 3, p. 685-1063.
15. Djarri L., Ferhat M., Merabet G., Chelghoum A., Laggoune S., Semra Z., Kabouche Z. (2013). Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Rutamontana* from Constantine (Algeria). *Der Pharm. Lett*, 5(4), 70-73.

-E-

16. Echchaoui Meryem. Le pouvoir antibactérien des huiles essentielles. 2018. Thèse de doctorat

-F-

17. Fontanay S M., Marie E., Duval R E. Évaluation des activités antibactériennes des huiles essentielles et/ou de leurs composants majoritaires. *Hegel*. 2015. no 2, p. 109-118.

-H-

Références bibliographiques

18. Hadjer D., Sedairia Z. Rendement d'huile essentielle d'une plante médicinale *Rutamontana* et leur bio activité sur les moustiques du genre *Culex*. 2020. Universitelaarbitebessitebessa.
19. Hammiche V., Azzouz M. (2013). Les rues : ethnobotanique, phytopharmacologie et toxicité. *Phytothérapie*, 11, 22-30.
20. Hammiche V., Merad R., Azzouz M. (2013). Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. Paris (France), Springer-Verlag. 409 p. ISBN 978-2-8178-0374-6.
21. Herman R A., Ayepa E., Shittu S., Fometu S S., Wang, J. 2019. Essential oils and their applications-a mini review. *Adv. Nutr. Food Sci*, 4(4).

-L-

22. Labbé J. 2018. Les Plantes Médicinales et L'herboristerie: À La Croisée de Savoirs Ancestraux et D'enjeux D'avenir. Rapport D'information, Fait au Nom de la MI Développement de L'herboristerie.
23. Lakhdar Leila. Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Etude in vitro. 2015. Thèse de doctorat.

-M-

24. Magoura M., Moussaoui Z. Etude Comparative De L'efficacité De Quelques Extraits Organiques Des Espèces De La Plante *Ruta*. 2020. Thèse De Doctorat. Université Mohamed Boudiaf-Msila.
25. Masri W., Belwaer I., Khelifi F., Nouiou A., Ben salah D., Amira D., Hedhili A. (2015). A propos d'un cas d'intoxication aigüe par *Rutamontana*. *Phytothérapie*, 13, 36-38.
26. Medjekane, M. 2017. Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* et son inhibition par des molécules bioactives. Thèse de Doctorat : Nutrition humaine Chlef : Université Hassiba Benbouali de Chlef. 171P.
27. Merad F., et Mahiout T.. Contribution à l'étude de conformité des drogues pour tisanes vendues en officines. 2019.
28. Meriem Z., Bendiaf A. Etude ethnobotanique sur l'utilisation de cinq plantes toxiques dans la région de Bordj Bou Arréridj. 2019. Thèse de doctorat.

Références bibliographiques

29. Mohammedi H., Mecherara I., Samira, Hassani A. Variability in essential oil composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Rutamontana L.* collected from different geographical regions in Algeria. Journal of essential oil research. 2020. vol. 32, no 1, p. 88-101.
30. Mohammedi Hichem. Etude Des Extraits Volatils De Quelques Plantes Médicinales Algériennes" *Daucus Carota L., Ruta Montana L. Et Rosa Canina L.*". 2012. Thèse De Doctorat.

-N-

31. Nahar L., El-Seedi H R., Khalifa S A., Mohammadhosseini M., Sarker, S D. 2021. *Ruta* essential oils: composition and bioactivities Molecules. 26(16), 4766.
32. Najem M., Belaidi R., Harouak H., Bouiamrine E. H., Ibijbijen J., Nassiri L. 2018. Occurrence de plantes toxiques en phytothérapie traditionnelle dans la région du Moyen Atlas central Maroc. Journal of Animal & Plant Sciences, 35(2), 5651-5673.

-O-

33. OuisNaouel. Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, des fenouils et de persil. Diss. Thèse de doctorat, Université Ahmed Ben Bella-Oran, Alger. 2015.
34. Oullai L., Chamek, C. Contribution à l'étude ethnopharmacognosique des plantes médicinales utilisées pour le traitement des affections de l'appareil digestif en Kabylie. 2018.

-P-

35. Parray S A., Bhat J U., Ahmad G. *Rutagraveolens*: from traditional system of medicine to modern pharmacology: an overview. Am J Pharm Tech Res. 2012. vol. 2, no 2, p. 239-52.

-T-

36. Teixeira B., Marques A., Ramos C., Neng N R., Nogueira J M., Saraiva J A., Nunes, M L. 2013. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. Industrial Crops and Products. 43, 587-595.

Références bibliographie

37. Toure Daouda. Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire. 2015. Thèse de doctorat. Université Felix Houphouët-Boigny, Côte d'Ivoire.

-Y-

38. Yosra B., Abderrabba M., Ayadi S. Biological study from *Ruta* plants extracts growing in Tunisia. Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE). 2019. vol. 38, no 2, p. 85-89.

Annexes

Annexes

Annexe 01

1. Produits chimique et appareillages

Les produits chimiques et appareillage utilisé pour effectuer l'extraction d'HE du *Rutamontana* :

1.1. Produit chimique

- Ethanol.
- Eau distillé.
- Acétone.

1.2. Appareillage

- Mortier avec pilon.
- Chauffe ballon.
- Appareil d'hydrodistillation de type « Clevenger ».
- Eprouvette.
- Flacons en verre.
- Réfrigérateur.
- Balance électronique.

Annexes

Annexe 02



2. Produits et appareillage

Les produits et appareillage utilisé pour réaliser l'étude antibactérienne d'HE de *Rutamontana* :


2.1. Les milieux de culture

- Gélose Muller-Hinton (MH).
- GN (Gélose nutritive).
- Solution physiologique.

2.2. Composition et préparation des milieux de culture

Milieu	Composition	Procédures	Préparation
Gélose nutritif (GN)	-Extrait de viande..1,0 g/L -Extrait de levure2,5 g/L -Peptone 5,0 g/L -Chlorure de sodium...5,0 g/L -Agar-agar.....15,0 g/L - PH = 7,0	- 20 g de milieu déshydraté - 1 L d'eau distillée	
Muller-Hinton (MH)	-Infusion de viande de bœuf déshydraté.....300g - Hydrolysate de caséine.....17.5g - Amidon de maïs ...5g - Agar-agar.....13g - Eau distillée.....1l	Prêt à l'emploi.	

Annexes

Solution physiologique	<ul style="list-style-type: none">- Eau distillée.- Chlorure de sodium (NaCl)	<ul style="list-style-type: none">-9 g NaCl-1 L d'eau distillée.	
-------------------------------	--	---	---

2.3. Appareillage

a) Grands matériels

- Etuve.
- Plaque chauffante.
- Agitateur.
- Autoclave.
- Bain marie.

b) Petits matériels

- Bec Bunsen.
- Boîtes de pétri.
- Anse de platine.
- Portoirs.
- Micropipette.
- Pipettes Pasteurs.
- Spatule.
- Barreaux magnétique.
- Papier Whatman n°1 de 6mm de diamètre.
- Ecouvillons stériles.
- Pince.
- Fond noire.
- Seringue.
- Embouts.
- Pied à coulisse.
- Balance.

Annexes

c) les verreries

- Les flacons.
- Béchers gradués.
- Tubes à essai stériles.

Annexe 03

3. Repiquage bactérien

Action de prélever une petite partie d'une culture de tissus ou de bactéries, puis de la transplanter sur un milieu neuf où elle continue à croître.

3.1 Procédure

- Dans des conditions stérile prélever une colonie isolée et représentative de la souche à l'aide d'un l'anse stérile.
- Etaler en stries sur une nouvelle boîte de Pétri contenant un milieu de culture choisi et cultiver à 37°C (température ambiante).

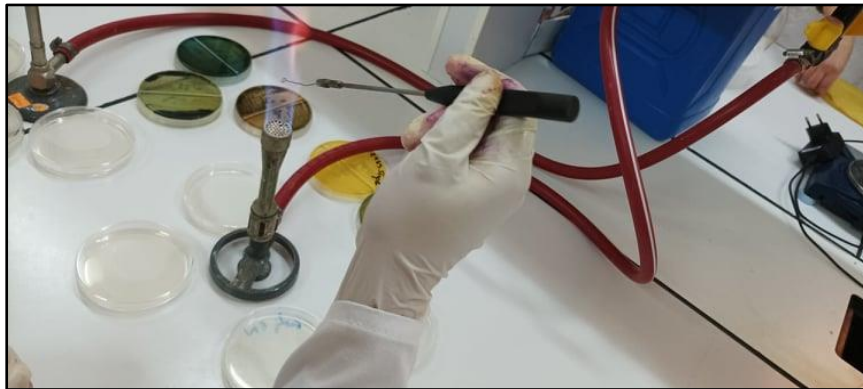


Figure: Repiquage des souches bactériennes testées (**Photo personnelle, 2022**).

Annexes

Annexe 04

4. Coloration de Gram

4.1. But

Il permet de différencier des bactéries dites Gram + de bactéries dites Gram -. Cette méthode permet d'observer :

- la morphologie des bactéries.
- le mode de groupement.
- la couleur : gram + ou -.
- la densité ou proportion de chaque microorganisme en cas de mélange

4.2. Matériel

- une lame.
- Violet de Gentiane (ou Violet Cristal sous forme sèche).
- lugol .
- l'alcool (éthanol à 95°) très peu dilué.
- la Fuchsine fraîchement préparée.
- l'eau déminéralisée.
- papier filtre.
- microscope photonique : objectif x 40 et x100

4.3. Les étapes

a) Avant la coloration

- Préparez le laboratoire.
- Stérilisez une lame de microscope.
- Placez l'échantillon sur la lame : Faites rougir une anse d'inoculation à la flamme du bec Bunsen afin de la stériliser. Une fois refroidie, utilisez-la pour placer une goutte d'eau distillée stérile sur la lame, puis stérilisez et laissez de nouveau refroidir l'anse d'inoculation pour prendre un petit échantillon de bactérie et le mélanger délicatement à la goutte d'eau déposée sur la lame
- Fixez à la chaleur : La chaleur va fixer les bactéries à la lame, de telle sorte qu'elles ne soient pas éliminées lors de la coloration.
- Passez rapidement la lame dans la flamme du bec Bunsen à deux ou trois reprises ou chauffez-la sur le dessus d'un chauffe-lame électrique. Ne la chauffez pas trop, les échantillons pourraient s'en trouver faussés. Si vous utilisez un bec Bunsen, la flamme doit être petite et bleue et non une haute flamme orange.

Annexes

Les bactéries peuvent aussi être fixées au méthanol, en ajoutant une ou deux gouttes de méthanol à l'échantillon une fois sec et en laissant la préparation sécher sur la lame. Cette méthode minimise les dommages aux cellules hôtes et permet d'avoir une vision plus claire des bactéries qui s'y sont développées.

- Placez la lame sur un bac de coloration. Un bac de coloration est un bac peu profond en métal, en verre ou en plastique surmonté d'une petite grille ou d'un support permettant d'y placer la lame tout en laissant le liquide utilisé pour la coloration s'écouler dans le bac.

b) Réaliser la coloration

- Versez du cristal violet sur la lame préparée. À l'aide d'une pipette, déposez quelques gouttes de cristal violet (colorant parfois appelé violet de gentiane).
- Attendez 30 à 60 secondes. Le cristal violet (CV) plongé dans une solution aqueuse se dissocie en ions CV^+ et chlorure (Cl^-). Ces ions pénètrent la paroi et la membrane cellulaire des cellules tant à Gram positif qu'à Gram négatif. Les ions CV^+ interagissent avec les particules des cellules bactériennes chargées négativement et colorent ces cellules en violet.
- Rincez doucement le cristal violet. Tapotez la lame et rincez-la à l'aide d'une pissette remplie d'eau distillée ou sous le robinet, en prenant soin de faire couler l'eau sur la lame de haut en bas, mais en évitant de diriger le jet d'eau directement sur l'échantillon. Ne rincez pas excessivement, cela risquerait d'emporter la coloration des bactéries à Gram positif.
- Versez un décolorant et rincez-le aussitôt : un mélange d'acétone et d'éthanol est généralement utilisé pour cette étape essentielle, qui doit faire l'objet d'un minutage précis.
- Tenez la lame inclinée et versez le décolorant jusqu'à ce que le filet qui s'écoule reste clair, sans coloration violette. Cela doit en principe prendre dix secondes maximum, parfois nettement moins suivant la concentration du mélange alcool-acétone.
- Arrêtez immédiatement, sinon le décolorant risque d'enlever toute la coloration violette des cellules à Gram positif et de celles à Gram négatif, il faudrait alors reprendre la coloration depuis le début.
- Rincez immédiatement le décolorant resté sur la lame, suivant la technique décrite plus haut.

Annexes

- Versez un recolorant sur le frottis puis rincez-le. Un recolorant, le plus souvent de la safranine ou de la fuchsine, est utilisé pour renforcer le contraste entre les bactéries à Gram négatif et celles à Gram positif en teintant les bactéries décolorées (à Gram négatif) en rose ou en rouge.

- Laissez le recolorant sur la lame au moins pendant 45 secondes puis rincez-le.
- Séchez la lame. Vous pouvez la laisser sécher à l'air libre ou avec du papier absorbant prévu à cet effet. La coloration de Gram est maintenant complète.

c) Analyser la coloration

- Préparez le microscope optique.
- Placez la lame sous la lumière du microscope. La taille des bactéries est très variable, aussi le grossissement requis peut-il aller de x400 à x1 000.
- Mettez une goutte d'huile sur la lamelle, en évitant tout mouvement pendant l'application pour éviter la formation de bulles.
- Faites pivoter la tourelle jusqu'à ce que l'objectif soit en position, au contact de l'huile.
- Distinguez les bactéries à Gram positif des bactéries à Gram négatif.

d) Résultats

Les bactéries à Gram positif apparaissent violettes, le cristal violet étant piégé au sein de leurs parois cellulaires épaisses, alors que les bactéries à Gram négatif apparaissent roses ou rouges, le cristal violet étant passé à travers leurs fines parois cellulaires et le recolorant rose les ayant pénétrées.

Annexes

Annexe 05

5. Préparation du standard de Mac Ferland

Les normes Mc Ferland sont utilisées comme référence pour ajuster la turbidité des suspensions bactériennes pour que le nombre de bactéries se situe dans une gamme de concentrations donnée afin de normaliser les tests microbiens.

a) Composition

- Acide sulfurique (H₂SO₄) : 9,95 ml
- Chlorure de barium (BaCl₂) : 0,05 ml

Tableau : Composition chimique du standard de Mac Ferland

Standard de Mac Ferland	1% BaCl₂ (ml)	1% H₂SO₄ (ml)	Approximatif Bactérien Suspension / ml
0,5	0.05	9.95	1.5 x 10 ⁸

b) Procédures

- Mélanger McFarland Standard sur un mélange vortex avant l'examen. Assurez-vous que McFarland Standard est aliquoté dans un tube c'est la même taille et le même diamètre que le tube utilisé pour préparer la suspension d'essai.
- Préparez une suspension d'essai en obtenant une culture pure de l'organisme d'essai et inoculer un bouillon approprié. Standard McFarland 1% BaCl₂ (mL) 1% H₂SO₄ (mL) Approximatif Bactérien Suspension / ml 0.5 0.05 9.95 1.5 x 10⁸
- En présence d'un bon éclairage, visuellement comparer la turbidité de la suspension d'essai avec celle de la norme McFarland en comparant la clarté des lignes sur le Wickerham carte.
- Si la suspension d'essai est trop légère, inoculer avec des organismes supplémentaires ou incubé le tube jusqu'à ce que la turbidité corresponde à celle de la norme. Si une dilution est nécessaire, utiliser une pipette stérile et ajouter suffisamment de bouillon ou de solution saline pour obtenir une turbidité qui correspond à celle de la norme.

Annexes

c) Contrôle de qualité

Les normes peuvent être vérifiées à l'aide d'un spectrophotomètre avec un trajet lumineux de 1 cm; un 0,5 Mc Ferland Standard a une lecture d'absorbance de 0,08 à 0,1 à 625 nm.

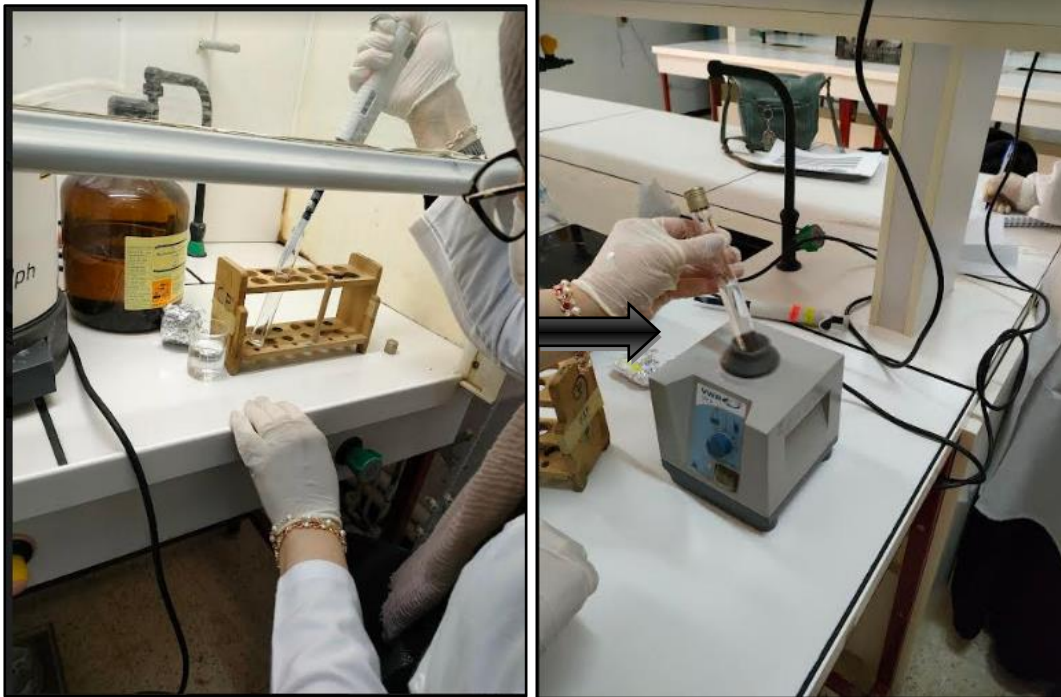


Figure : Préparation du standard de Mac Ferland (Photo personele, 2022).

Annexes

Annexe 06

Les résultats d'activité antibactérienne d'huile essentielle pure de *Rutamontana* testées sur des souches bactériennes pathogènes sont mentionnés dans l'histogramme suivant :

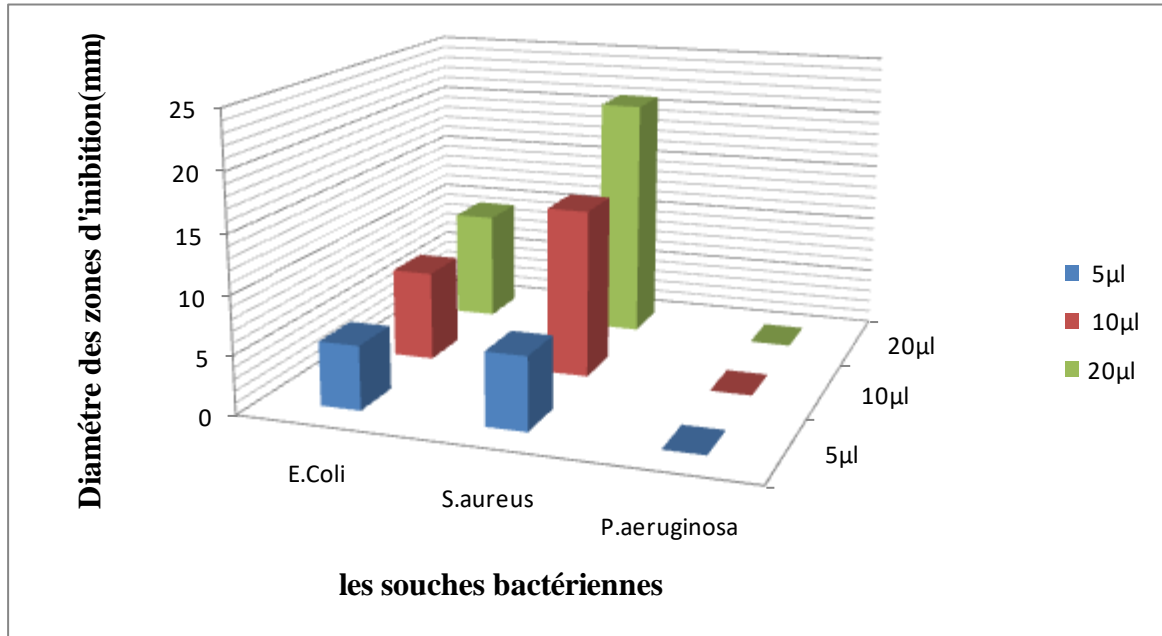


Figure : les diamètres des zones d'inhibitions (mm) des souches bactériennes testées par l'HE pure de *Rutamontana*.

Annexes

Annexe 07

7. La classification des souches bactériennes testées

Tableau : la classification des souches bactériennes testé.

Bactéries	Classification
<i>Escherichia coli</i>	Règne : <i>Bacteria</i> Embranchement : <i>Proteobacteria</i> Classe : <i>Gammaproteobacteria</i> Ordre : <i>Enterobacterales</i> Famille : <i>Enterobacteriaceae</i> Genre : <i>Escherichia</i> Espèce : <i>Escherichia coli</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Règne : <i>Bacteria</i> Division : <i>Firmicutes</i> Classe : <i>Bacilli</i> Ordre : <i>Bacillales</i> Famille : <i>Staphylococcaceae</i> Genre : <i>Staphylococcus</i> Espèce : <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Règne : <i>Bacteria</i> Division : <i>Proteobacteria</i> Classe : <i>Gammaproteobacteria</i> Ordre : <i>Pseudomonadales</i> Famille : <i>Pseudomonadaceae</i> Genre : <i>Pseudomonas</i> Espèces : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Annexes

Annexe 08



Figure : Guide de chromagar d'orientation