

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

Criblage d'une gamme de fruits rouges pour identifier des alternatives aux antibiotiques contre les pathogènes microbiens antibiorésistants

Par
Samar Hadj Amor

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Dr. Salim Timo Islam Institut national de la recherche scientifique (INRS)
Examineur externe	Dr. Sébastien Cardinal Université du Québec à Rimouski (UQAR)
Directeur de recherche	Dr. Charles Gauthier Institut national de la recherche scientifique (INRS)
Codirecteur de recherche	Dr. Éric Déziel Institut national de la recherche scientifique (INRS)
Codirectrice de recherche	Dr. Janelle Sauvageau Conseil national de recherches du Canada (CNRC)

REMERCIEMENTS

Dans le cadre de l'élaboration de ma maîtrise de recherche en microbiologie appliquée, j'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer ce travail de recherche au Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie de l'Institut national de la recherche scientifique (INRS) sous la direction des Professeurs Charles Gauthier et Éric Déziel.

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de recherche, le Dr Charles Gauthier et le Dr Éric Déziel, Professeurs à l'INRS, pour m'avoir accueillie au sein de leurs équipes et de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet, pour m'avoir fait confiance, m'avoir encouragée et conseillée tout au long de mon projet de maîtrise.

Je remercie sincèrement, madame Marianne Piochon, agente de recherche, qui m'a suivie et guidée tout au long de mon projet. Je lui suis également très reconnaissante pour sa disponibilité et ses conseils avisés, qui ont été essentiels pour la bonne réussite de ma maîtrise.

J'adresse également un très chaleureux remerciement à madame Marie-Christine Groleau, agente de recherche de l'équipe Déziel, pour la confiance qu'elle m'a accordée afin de mener à bien ce projet, pour sa disponibilité et ses précieux conseils, mais surtout pour sa franchise et sa sympathie.

Mes vifs remerciements vont aussi à l'organisation canadienne MITACS et à la Fondation Armand-Frappier pour cette opportunité et pour m'avoir accordé une bourse de recherche, ainsi qu'à l'herbier Marie-Victorin pour l'identification de mes spécimens.

Je souhaiterais également adresser ma gratitude aux membres du jury pour m'avoir honorée en acceptant de juger ce modeste travail et à tous mes professeurs qui ont enrichi mon parcours jusqu'à présent.

Je désire également exprimer ma profonde gratitude à tous les membres de l'équipe du laboratoire Déziel et l'équipe du laboratoire Gauthier, pour leur soutien, leur disponibilité et leurs commentaires et conseils constructifs.

RÉSUMÉ

Face à l'émergence de l'antibiorésistance avec une croissance alarmante à l'échelle mondiale, la découverte de nouvelles molécules bioactives isolées d'extraits de fruits présente des pistes potentielles comme nouveaux agents antimicrobiens. Dans ce contexte, cette étude a visé le criblage antimicrobien d'une gamme de 51 différents extraits (méthanol acidifié, éthanol et chloroforme) de fruits provenant de seize espèces végétales, dont la plupart sont endémiques à la forêt boréale de l'Amérique de Nord, contre un éventail de micro-organismes afin d'identifier de nouvelles molécules naturelles inhibitrices. Les résultats ont montré que la majorité (63%) des extraits étudiés ont été actifs contre au moins une des souches bactériennes testées ; sept extraits enrichis en anthocyanes, seize extraits éthanoliques et neuf extraits chloroformiques. Le criblage antibactérien a montré que les extraits dotés du plus large spectre d'activité contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif sont ceux de *Cornus canadensis* (quatre-temps) et *Rubus setosus* (mûre noire). Cependant, seul l'extrait éthanolique de *Clintonia borealis* (clintonie boréale) a présenté une activité antifongique. À notre connaissance, cette étude a mis en évidence pour la première fois le pouvoir antibactérien d'extraits organiques des fruits de *R. setosus*, *Rubus pubescens* (catherinette), *Vaccinium myrtilloides* (bleuet noir), *Prunus pensylvanica* (merise) et *Actaea rubra* (actée à grappes rouges). Tout particulièrement, l'extrait chloroformique des fruits d'*A. rubra* a montré la meilleure activité contre une souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline (SARM). De surcroît, les extraits éthanoliques des feuilles, tiges et racines d'*A. rubra* ont été sélectivement actifs contre la souche de *Burkholderia thailandensis* E30 ce qui laisse présager une activité contre *Burkholderia pseudomallei*, un pathogène multirésistant à potentiel bioterroriste.

Mots-clés : Antimicrobiens ; *Rubus setosus* ; *Rubus pubescens* ; *Vaccinium myrtilloides* ; *Prunus pensylvanica* ; *Cornus canadensis* ; *Clintonia borealis* ; *Actaea rubra* ; *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline ; *Burkholderia pseudomallei*.

ABSTRACT

Facing the alarming rate of antibiotic resistance worldwide, new bioactive molecules isolated from fruit extracts may have potential as new antimicrobial agents. Within this context, the present study sought to screen the antimicrobial activity of a range of 51 fruit extracts (acidified methanol, ethanol, and chloroform) from 16 plant species, most of which are endemic to the boreal forest of North America. These extracts were tested against a range of microorganisms to identify new naturally inhibitory antimicrobials. Our results showed that the majority (63%) of the studied extracts were active against at least one of the tested bacterial strains, including seven extracts enriched in anthocyanins, 16 ethanolic extracts, and nine chloroform extracts. Moreover, the antibacterial screening showed that the extracts with the broadest activity spectrum against both Gram-positive and Gram-negative bacteria are those from *Cornus canadensis* (bunchberry) and *Rubus setosus* (setose blackberry). However, only the ethanolic extract from *Clintonia borealis* (bluebead) exhibited a significant antifungal activity. To the best of our knowledge, this study has demonstrated for the first time the pronounced antibacterial activity of fruit organic extracts from *R. setosus*, *Rubus pubescens* (dewberry), *Vaccinium myrtilloides* (Canadian blueberry), *Prunus pensylvanica* (pin cherry), and *Actaea rubra* (red baneberry). Specifically, the chloroform extract from *A. rubra* showed the strongest activity against a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Interestingly, the ethanolic extracts of the leaves, stems, and roots from *A. rubra* were active against *Burkholderia thailandensis* E30 and could therefore be active against *Burkholderia pseudomallei*, a potential multidrug-resistant bioterrorism agent.

Keywords: Antimicrobials ; *Rubus setosus* ; *Rubus pubescens* ; *Vaccinium myrtilloides* ; *Prunus pensylvanica* ; *Cornus canadensis* ; *Clintonia borealis* ; *Actaea rubra* ; Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ; *Burkholderia pseudomallei*.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	III
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT.....	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES TABLEAUX	XV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XVII
1 INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
2 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	3
2.1 CHAPITRE 1. L'ÉMERGENCE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES	3
2.1.1 <i>Mode d'action d'antibiotiques</i> :.....	3
2.1.2. <i>Les mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques</i> :	6
2.2 CHAPITRE 2. LES METABOLITES SECONDAIRES DE PLANTES.....	24
2.2.1. <i>Généralité</i> :.....	24
2.2.2. <i>Biosynthèse et classification des métabolites secondaires</i> :	25
2.3 CHAPITRE 3. METHODES D'EXTRACTION DES METABOLITES SECONDAIRES	43
2.3.1. <i>Extraction conventionnelle par solvant (ECS)</i> :	44
2.3.2. <i>Les méthodes d'extraction non conventionnelles</i> :	48
3 PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DU PROJET	54
3.1 PROBLEMATIQUE DU PROJET :.....	54
3.2 HYPOTHESE :	54
3.3 OBJECTIF GENERAL :	55
3.4 OBJECTIFS SPECIFIQUES :.....	55
4 MATÉRIELS ET MÉTHODES	56
4.1 MATÉRIEL VÉGÉTAL :	56
4.1.1 <i>Échantillonnage des plantes</i> :.....	56
4.1.2 <i>Préparation des herbiers</i> :.....	57
4.1.3 <i>La nomenclature des échantillons</i> :	57
4.2 EXTRACTION :	59
4.2.1 <i>Préparation du matériel végétal</i> :.....	59
4.2.2 <i>Extraction méthanol acidifié</i> :	59
4.2.3 <i>Extraction éthanolique</i> :	59
4.2.4 <i>Extraction au chloroforme</i> :.....	60
4.3 MATÉRIEL BIOLOGIQUE :	61

4.3.1	<i>Souches microbiennes</i> :	61
4.3.2	<i>Milieux de cultures</i> :	62
4.4	ACTIVITE ANTIMICROBIENNE :	63
4.4.1	<i>Test de diffusion sur agar</i> :	63
4.4.2	<i>Détermination de la concentration minimale inhibitrice « CMI »</i> :	64
4.5	CARACTERISATION PHYTOCHIMIQUE :	65
4.5.1	<i>Chromatographie sur couche mince</i> :	66
4.5.2	<i>La chromatographie sur colonne de silice</i> :	68
4.5.3	<i>Chromatographie liquide à haute pression</i> :	70
4.5.4	<i>Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire</i> :	74
5	RÉSULTATS ET DISCUSSION	76
5.1	RENDEMENT D'EXTRACTION DES FRUITS :	76
5.2	ACTIVITE ANTIBACTERIENNE :	78
5.2.1	<i>Test de diffusion sur agar</i> :	78
5.2.2	<i>Concentration minimale inhibitrice</i> :	84
5.2.3	<i>Discussion de l'activité antibactérienne</i> :	86
5.3	ACTIVITE ANTIFONGIQUE :	96
5.4	CARACTERISATION PHYTOCHIMIQUE :	97
5.4.1	<i>La chromatographie sur couche mince</i> :	97
5.4.2	<i>La chromatographie sur colonne de silice</i> :	98
5.4.3	<i>Chromatographie liquide à haute pression</i> :	107
5.4.4	<i>Étude des autres parties d'Actaea rubra</i> :	111
6	CONCLUSION	115
7	BIBLIOGRAPHIE	119

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : PROCESSUS DE SELECTION DES SOUCHES RESISTANTES APRES EXPOSITION AUX ANTIBIOTIQUES.....	8
FIGURE 2 : LES PRINCIPAUX MECANISMES DE RESISTANCE BACTERIENNE : PHENOTYPIQUE ET GENOTYPIQUE ET LEURS SUPPORTS MOLECULAIRES.....	10
FIGURE 3 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES CINQ FAMILLES DE POMPES A EFFLUX BACTERIENNES.....	13
FIGURE 4 : LES MECANISMES DE RESISTANCE ACQUISE CHEZ UNE BACTERIE A GRAM-NEGATIVE.....	15
FIGURE 5 : RESISTANCE AUX POLYMYXINES PAR MODIFICATION DES LPS.....	19
FIGURE 6 : ACQUISITION CONTINUE ET DISCONTINUE DE LA RESISTANCE.	20
FIGURE 7 : IMAGE DES BIOFILMS DE <i>S. AUREUS</i> SUR UNE VALVE CARDIAQUE (A) ET UN TUBE ENDOTRACHEAL (B).	22
FIGURE 8 : COMPOSITION DES BIOFILMS BACTERIENS.....	23
FIGURE 9 : STRUCTURES CHIMIQUES DES ACIDES DU TROIS PRINCIPALES VOIES DE BIOSYNTHESE DES METABOLITES SECONDAIRE.	26
FIGURE 10 : STRUCTURES CHIMIQUES DES ACIDES PHENOLIQUES.....	28
FIGURE 11 : STRUCTURES CHIMIQUES DES COUMARINES.....	29
FIGURE 12 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LIGNANES.	30
FIGURE 13 : STRUCTURES CHIMIQUES DES TANNINS HYDROLYSABLES.....	31
FIGURE 14 : STRUCTURE CHIMIQUE DE PROANTHOCYANIDOL A-1.	31
FIGURE 15 : STRUCTURE BASIQUE DES FLAVONOÏDES.	33
FIGURE 16 : STRUCTURES CHIMIQUES DES FLAVONES.....	33
FIGURE 17 : STRUCTURES CHIMIQUES DES FLAVONOLS.....	34
FIGURE 18 : STRUCTURES CHIMIQUES DES FLAVANONES.....	34
FIGURE 19 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA CATECHINE.	35
FIGURE 20 : STRUCTURES CHIMIQUES DES ISOFLAVONOÏDES.....	35
FIGURE 21 : STRUCTURE CHIMIQUE DU CALOPHYLLOLIDE.	36
FIGURE 22 : STRUCTURES CHIMIQUES DES CHALCONES.	36
FIGURE 23 : STRUCTURES CHIMIQUES DES ANTHOCYANES.	38
FIGURE 24 : STRUCTURES CHIMIQUES DES STILBENES.	39

FIGURE 25 : STRUCTURE CHIMIQUE DE L' AFLATOXINE B1.	40
FIGURE 26 : STRUCTURES CHIMIQUES DES TERPENOÏDES.....	41
FIGURE 27 : STRUCTURES CHIMIQUES DES ALCALOÏDES.	42
FIGURE 28 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA MORPHINE.	43
FIGURE 29 : DIAPOSITIF D' EXTRACTION PAR SOXHLET.....	46
FIGURE 30 : DIAPOSITIF D' EXTRACTION PAR MACERATION.....	47
FIGURE 31 : DIAPOSITIF D' EXTRACTION PAR HYDRODISTILLATION.....	48
FIGURE 32 : DIAPOSITIF D' EXTRACTION PAR ULTRASONS.....	49
FIGURE 33 : DIAPOSITIF D' EXTRACTION ASSISTEE PAR MICROONDE.....	50
FIGURE 34 : DIAPOSITIF D' EXTRACTION ASSISTE PAR ENZYME.....	52
FIGURE 35 : MONTAGE D' EXTRACTION ASSISTEE PAR CO ₂ SUPERCRITIQUE.....	53
FIGURE 36 : REPRESENTATION GEOGRAPHIQUE DES LIEUX DE RECOLTE DES FRUITS ET DES SPECIMENS.....	56
FIGURE 37 : PHOTO DE LA TOURBIERE PTARMIGAN A DOLBEAU-MISTASSINI.....	56
FIGURE 38 : LE CARROUSEL HEIDOLPH™ RADLEYS.....	60
FIGURE 39 : PRINCIPE DE TEST DE DIFFUSION SUR AGAR.....	63
FIGURE 40 : PRINCIPE DE CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.....	67
FIGURE 41 : PRINCIPE DE TECHNIQUE DE CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SILICE.....	70
FIGURE 42 : APPAREIL UHPLC A DETECTEUR D' AEROSOLS CHARGES CORONA.....	72
FIGURE 43 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE SYSTEME HPLC.....	72
FIGURE 47 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA DISTRIBUTION DES SPINS NUCLEAIRES SOUS L' EFFET D' UN CHAMP MAGNETIQUE.....	75
FIGURE 45 : PHOTO DE LA PLANTE D' ACTAEA RUBRA, CONTENANT DES FRUITS, PRISE A PERIBONKA.....	97
FIGURE 46 : PROFIL CCM DE L' EXTRAIT CHLOROFORMIQUE D' A. RUBRA AVEC LE SYSTEME HEXANES/ ACETATE D' ETHYLE.....	98
FIGURE 47 : PROFIL CCM DE L' EXTRAIT CHLOROFORMIQUE D' A. RUBRA AVEC LE SYSTEME D' ELUTION DICHLOROMETHANE/ METHANOL.....	98
FIGURE 48 : RESULTAT DU TEST DE DIFFUSION SUR GELOSE DES FRACTIONS DE L' EXTRAIT CHLOROFORMIQUE D' A. RUBRA.....	99

FIGURE 49 : LE PROFIL DE LA FRACTION AR0202 SUR CCM AVEC LE SYSTEME DICHLOROMETHANE/METHANOL (95 : 5).	100
FIGURE 50 : LE SPECTRE ¹ H RMN DE LA FRACTION AR0202 (A), LA STRUCTURE DEVELOPPEE DE P-CRESOL (B).	101
FIGURE 51 : RESULTAT DU TEST DE DIFFUSION SUR GELOSE DES SOUS FRACTIONS DE LA FRACTION AR02.	102
FIGURE 52 : TEST DE DIFFUSION SUR AGAR DE P-CRESOL CONTRE LA SOUCHE DE SARM.	102
FIGURE 53 : RESULTAT DU TEST DE DIFFUSION SUR GELOSE DES SOUS FRACTIONS DE LA FRACTION AR0201.	103
FIGURE 54 : RESULTAT DU TEST DE DIFFUSION SUR GELOSE DES FRACTIONS ISOLEES DE LA FRACTION AR07.	104
FIGURE 55 : PROFIL DE SEPARATION SUR CCM DE LA FRACTION AR0201 AVEC LE SYSTEME HEXANES/ACETATE D'ETHYLE (9:1).	105
FIGURE 56 : PROFIL DE SEPARATION SUR CCM DE LA FRACTION AR07 AVEC LE SYSTEME DCM/MEOH (95:5).	105
FIGURE 57 : SCHEMA RECAPITULATIF DU FRACTIONNEMENT BIOGUIDE DE L'EXTRAIT CHLOROFORMIQUE D'A. RUBRA.	106
FIGURE 58 : PROFIL DE SEPARATION PAR RP-HPLC PREPARATIVE DE LA FRACTION ACTIVE AR020101.	108
FIGURE 59 : FRACTIONNEMENT PAR RP-HPLC PREPARATIVE DE LA FRACTION ACTIVE AR0702.	110
FIGURE 60 : RESULTAT DE TEST DE DIFFUSION SUR AGAR DES EXTRAITS ETHANOLIQUES DES FEUILLES, TIGES ET RACINES D'A. RUBRA CONTRE LA SOUCHE DE B. THAILANDENSIS E30.	112

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : LES PRINCIPAUX SOLVANTS UTILISES POUR L'EXTRACTION DE DIVERS COMPOSES BIOACTIFS.....	45
TABLEAU 2 : LES DONNEES ETHNOBOTANQUES DES FRUITS TESTES.	58
TABLEAU 3 : LISTE DES BACTERIES TESTEES.....	61
TABLEAU 4 : LISTE DES LEVURES TESTEES.....	61
TABLEAU 5 : LISTE DES CHAMPIGNONS TESTEES.....	62
TABLEAU 6 : LES CONDITIONS UTILISEES EN HPLC ANALYTIQUE.....	73
TABLEAU 7 : LES CONDITIONS UTILISEES EN HPLC PREPARATIVE.....	73
TABLEAU 8 : LES DONNEES ETHNOBOTANQUES DES FRUITS TESTES ET LEURS MASSES D'EXTRAITS ET LEURS RENDEMENTS EN POURCENTAGE.	77
TABLEAU 9 : DIAMETRE DES ZONES D'INHIBITIONS DES EXTRAITS METHANOL ACIDIFIE CONTRE LES SOUCHES BACTERIENNES TESTEES, EN (MM) (MOYENNES \pm ECART-TYPE, N = 3).	81
TABLEAU 10 : DIAMETRE DES ZONES D'INHIBITIONS DES EXTRAITS ETHANOLIQUES CONTRE LES SOUCHES BACTERIENNES TESTEES, EN (MM) (MOYENNES \pm ECART-TYPE, N = 3).	82
TABLEAU 11 : DIAMETRE DES ZONES D'INHIBITIONS DES EXTRAITS CHLOROFORME CONTRE LES SOUCHES BACTERIENNES TESTEES, EN (MM) (MOYENNES \pm ECART-TYPE, N = 3).	83
TABLEAU 12 : CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE (CMI, MG/ML) DES EXTRAITS METHANOL ACIDIFIE CONTRE LES SOUCHES BACTERIENNES TESTEES, EN (MG) (MOYENNES \pm ECART-TYPE, N = 2).	91
TABLEAU 13 : CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE (CMI, MG/ML) DES EXTRAITS ETHANOLIQUES CONTRE LES SOUCHES BACTERIENNES TESTEES, EN (MG) (MOYENNES \pm ECART-TYPE, N = 2).	92
TABLEAU 14 : CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE (CMI, MG/ML) DES EXTRAITS CHLOROFORMIQUES CONTRE LES SOUCHES BACTERIENNES TESTEES, EN (MG) (MOYENNES \pm ECART-TYPE, N = 2).	94
TABLEAU 15 : DIAMETRE DES ZONES D'INHIBITIONS DES EXTRAITS ETHANOLIQUES CONTRE LES SOUCHES DE LEVURES TESTEES (N = 3).....	95
TABLEAU 16 : RESULTAT DE FRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE GEL DE SILICE DE L'EXTRAIT CHLOROFORME D'A. RUBRA.	99
TABLEAU 17 : RESULTAT DE FRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE GEL DE SILICE DE LA FRACTION AR02.	100
TABLEAU 18 : RESULTAT DE FRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE GEL DE SILICE DE LA FRACTION AR0201.....	103
TABLEAU 19 : RESULTAT DE FRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE GEL DE SILICE DE LA FRACTION AR07.	104
TABLEAU 20 : RESULTAT DE FRACTIONNEMENT PAR RP-HPLC PREPARATIVE DE LA FRACTION AR0201.....	107

TABLEAU 21 : RESULTAT DE FRACTIONNEMENT PAR RP-HPLC PREPARATIVE DE LA FRACTION AR0702..... 109

TABLEAU 22 : LES MASSES D'EXTRAITS DES FEUILLES, TIGES ET RACINES D'A. RUBRA ET LEURS RENDEMENTS
D'EXTRACTION EN POURCENTAGE..... 111

LISTE DES ABRÉVIATIONS

V/ V	Volume par volume
°C	Degré Celsius
%	Pourcentage
µm	Micromètre
µl	Microlitre
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNt	Acide ribonucléique du transfert
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BLSE	Bêta-Lactamase à Spectre Étendu
CC	Chromatographie sur colonne
CCM	Chromatographie sur couche mince.
CHCl₃	Chloroforme
cm	Centimètre
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DCM	Dichlorométhane
DO	Densité optique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EAE	Extraction assistée par enzyme
EPS	Exopolysaccharides
ERV	Entérocoques Résistant à la Vancomycine
EtOH	Éthanol
g	Gramme
h	Heure
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
Kg	Kilogramme
MeOH	Méthanol
min	Minute

mg	Milligramme
mL	Millilitre
mm	Millimètre
nm	Nanomètre
ppm	Parties par million
RAM	Résistance aux antimicrobiens
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RP-HPLC	Chromatographie liquide haute performance en phase inverse
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
UPLC	Chromatographe en phase liquide à ultra-haute performance
UV	Ultraviolet

1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

Après la révolution de « l'époque d'or » pendant laquelle presque toutes les principales classes d'antibiotiques (tétracyclines, aminoglycosides, céphalosporines et macrolides) ont été découvertes, la surconsommation d'antibiotiques à l'échelle mondiale a entraîné une pression de sélection sur les souches bactériennes qui deviennent de plus en plus résistantes pour un ou plusieurs antibiotiques. Ces bactéries multirésistantes d'origines hospitalières et communautaires provoquent désormais un nombre croissant d'infections chaque année et sont devenues si importantes que maintenir en vie les patients atteints d'infections sévères est devenu très difficile, tout comme à l'ère préantibiotique (Brown et Wright 2016).

La résistance aux antibiotiques est devenue un problème de santé publique en croissance continue auquel aucune région du monde n'échappe. En effet, au fil des ans cette résistance a augmenté à un rythme alarmant, avec l'apparition des gènes de résistance chez les bactéries associées à la production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) (Balouiri, Sadiki et al. 2016). Par conséquent, la découverte et le développement d'agents antimicrobiens ou de stratégies alternatives aux antibiotiques sont devenus d'une extrême importance dans le monde entier. Par ailleurs, plusieurs travaux de recherche sont consacrés au développement d'alternatives face à la résistance multiple aux antibiotiques, notamment, la phagothérapie, l'apithérapie ou les nanoparticules d'antibiotiques. Cependant, ces voies thérapeutiques alternatives sont coûteuses et n'ont pas forcément une activité similaire à celle de l'antibiotique (Aminov 2010, Balouiri, Sadiki et al. 2016).

Les plantes présentent une source efficace d'antimicrobiens et ont fourni à l'industrie pharmaceutique certains de ses principaux produits substantiels. Les agents antimicrobiens d'origine végétale occupent une majeure partie des alternatives efficaces aux antibiotiques découverts jusqu'à présent (Balouiri, Sadiki et al. 2016). En fait, les plantes synthétisent plus de 100 000 composés, plusieurs sont dotés d'une activité antimicrobienne (Lewis et Ausubel 2006). En 1988, Eloff a rapporté que 74 % des composants d'origine végétale ont été prouvés comme pharmacologiquement actifs après des évaluations ethnomédicales des plantes (Eloff 1998). Ainsi, de nombreux composés phytochimiques d'origine végétale, principalement les métabolites secondaires, sont à l'origine de plusieurs médicaments actuellement utilisés en clinique (Lewis et Ausubel 2006).

Un nombre important d'espèces végétales ont été testées *in vitro* contre des centaines de microorganismes, où de nombreuses plantes ont montré des composés phytochimiques actifs contre un large éventail de microorganismes, notamment des bactéries, des champignons et des levures (Heinrich et Gibbons 2001). L'isolement de ces substances phytochimiques antimicrobiennes présente donc une voie thérapeutique potentielle pour lutter contre les infections microbiennes (Taylor 2013). En effet, les métabolites secondaires ont déjà démontré leur potentiel comme agents antibactériens seuls et comme synergistes des antibiotiques (Simões, Bennett et al. 2009). Ces métabolites sont présents en abondance relative dans toutes les parties de la plante telles que les feuilles, l'écorce, les tiges, les racines, les fleurs et les fruits (Heinrich et Gibbons 2001, Simões, Bennett et al. 2009).

Au cours de ce projet, différents extraits d'une gamme de fruits de 17 espèces végétales, où la plupart sont endémiques à la forêt boréale québécoise, ont été étudiés pour leurs activités antibactériennes, antifongique et anti-levure, dans le but de mettre en évidence des substances actives alternatives autres que les antibiotiques actuellement utilisés, auxquels les bactéries ont développé une résistance.

Ce manuscrit comporte trois parties. La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique de cette étude, articulée en trois chapitres. Le premier chapitre décrit la problématique de l'émergence de la résistance aux antibiotiques. Le deuxième chapitre expose la classification, la biosynthèse et les activités biologiques des métabolites secondaires d'origine végétale et le troisième chapitre traite des différentes techniques d'extraction conventionnelles et alternatives des métabolites secondaires.

La deuxième partie illustre le matériel et les méthodes mis en œuvre pour l'extraction des métabolites secondaires en premier lieu, et ensuite pour évaluer leur activité antimicrobienne, ainsi que pour la caractérisation préliminaire de leur phytochimie.

La troisième partie du manuscrit est dédiée à la présentation et la discussion des principaux résultats de cette étude.

2 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Chapitre 1. L'émergence de la résistance aux antibiotiques

Le terme « antibiotique » est dérivé des mots grecs anti, « contre » et bios, « vie » et signifie une substance qui tue tout organisme vivant. Dans la pratique médicale, les antibiotiques se définissent comme des composés d'origine biologique c.-à-d. produits ou dérivés des bactéries, champignons et autres organismes, qui peuvent être utilisés pour combattre les infections bactériennes soit en inhibant la croissance bactérienne (effet bactériostatique), soit en induisant la mort cellulaire (effet bactéricide) (Hall 2004, Davies et Davies 2010, Sommer et Dantas 2011).

Vers le milieu du XX^e siècle, le développement de médicaments antibactériens a subi une évolution majeure par la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928 (McFarland 2000). Après l'introduction de la pénicilline comme premier antibiotique, la découverte de l'ampicilline a représenté un développement majeur en médecine humaine et animale. L'ampicilline a été largement utilisée pour traiter les infections bactériennes depuis 1961, de fait qu'elle offrait un spectre d'activité plus large que la pénicilline d'origine (Armengaud et Auvergnat 1973). Dans les décennies suivantes, de nombreux antibiotiques dotés de nouvelles propriétés ont été découverts, notamment la streptomycine, la tétracycline et le chloramphénicol. En effet, la modification chimique d'antibiotiques déjà connus a conduit à l'apparition de plusieurs dérivés ayant des meilleures activités antibactériennes et propriétés pharmacocinétiques par rapport aux antibiotiques d'origine (Dinur-Schejter, Cohen-Cymerknoh et al. 2013).

En fonction de leurs spectres d'activités antibactériennes et de leurs caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, on distingue cinq classes principales d'antibiotiques ; les aminosides, les quinolones et fluoroquinolones, les macrolides, les cyclines et les bêta-lactames qui sont divisées en sous-classes, notamment les pénicillines des groupes G/V, M, A, les uréidopénicillines et les amidinopénicillines, les carboxypénicillines, les carbapénèmes et les céphalosporines (Cuddy 1997, Etebu et Arikekpar 2016).

2.1.1 Mode d'action d'antibiotiques :

Les antibiotiques agissent comme agents bactéricides ou bactériostatiques sélectifs contre les bactéries en affectant des cibles cellulaires spécifiques (Kohanski, Dwyer et al. 2010). Leurs mécanismes d'actions peuvent être catégorisés selon la fonction affectée par cet antibiotique, ceux-ci comprennent principalement : l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire ou la

synthèse des acides nucléiques, l'inhibition de la synthèse des protéines, la dégradation de la structure de la membrane cellulaire et l'inhibition des voies métaboliques (Gordon et Wareham 2010, Kaufman 2011, Dowling, O'Dwyer et al. 2017).

2.1.1.1. Destruction de la membrane cellulaire :

La membrane cytoplasmique bactérienne est de perméabilité sélective qui contribue au transport actif afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP. Ce transport actif via des protéines de transport intégral contrôle le contenu et le gradient cytoplasmiques, tel que les micromolécules, les macromolécules et les ions. La perturbation de la perméabilité sélective induit un déséquilibre de gradient d'ions cellulaires et une fuite d'ions induisant des lésions de la membrane cellulaire et éventuellement la mort de la cellule. En effet, les membranes cytoplasmiques bactériennes sont construites à base des acides gras qui peuvent être soit synthétisés dans la cellule ou dans son environnement comme des blocs de construction. La cible des antibiotiques est la synthèse métabolique des acides gras et des phospholipides membranaires. Citons l'exemple de la valinomycine, un ionophore qui contribue à la phosphorylation oxydative en formant des pores dans la membrane cellulaire (Brooks, Carroll et al. 2007, Kaufman 2011).

2.1.1.2. Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire :

Contrairement aux cellules eucaryotes chez les humains, les cellules procaryotes sont composées de peptidoglycane, ce qui fait de la paroi cellulaire bactérienne une cible idéale pour l'antibiothérapie (Kaufman 2011). De nombreux antibiotiques fonctionnent en bloquant la synthèse du peptidoglycane de la paroi cellulaire bactérienne, notamment, les bêta-lactamines et les glycopeptides. Les bêta-lactamines ciblent les protéines de liaison à la pénicilline (PBP, Penicillin Binding Protein) qui sont impliquées dans l'étape de réticulation de la synthèse des peptidoglycanes. Les glycopeptides, tel que la vancomycine, se lient aux glucides terminaux de la chaîne peptidoglycane par des liaisons non covalentes. Ceci inhibe à la fois la réticulation effectuée par la transpeptidase et l'allongement du peptidoglycane en bloquant la transglycosylase (Kahne, Leimkuhler et al. 2005).

2.1.1.3. Inhibition de la synthèse de l'acide nucléique :

Les quinolones et/ou fluoroquinolones, des dérivés fluorés, ciblent les enzymes topoisomérases : l'ADN topoisomérase II et l'ADN topoisomérase IV. Ces enzymes sont essentielles pour la catalyse du surenroulement d'ADN, un processus vital du métabolisme cellulaire. Les quinolones

se lient au site actif de ces enzymes et inhibent leur activité. En piégeant ces enzymes, une fois l'ADN clivé, les deux brins d'ADN ne peuvent plus se lier à nouveau. En effet, la formation d'un complexe ADN-quinolone topoisomérase provoque un blocage de la machinerie de réplication de l'ADN induisant ainsi une inhibition de la synthèse de l'ADN (Dowling, O'Dwyer et al. 2017).

Plusieurs antimicrobiens à propriétés antibiotiques utilisés dans la médecine humaine, tels que les mitomycines de la famille des quinones antitumorales, ciblent la réplication de l'ADN. Les mitomycines sont des réticulants d'ADN qui bloquent la réplication d'ADN et entravent la division cellulaire (Kaufman 2011).

2.1.1.4. Inhibition de la synthèse protéique :

La synthèse des protéines se déroule en trois étapes principales. Commençant par la synthèse des aminoacyl-ARNt. Les enzymes aminoacyl-ARNt synthétases permettent d'attacher les molécules d'ARNt aux acides aminés correspondants qui sont ensuite transportés au ribosome. Au niveau du ribosome, l'ARN polymérase transcrit l'ARNm de la région codante d'un gène. Lors de l'initiation de la synthèse protéique, la sous-unité ribosomale 30S se lie au codon de départ de l'ARNm AUG codant pour la méthionine et la sous-unité ribosomale 50S se lie pour compléter le complexe d'initiation 70S. Un ARNt correspondant au codon suivant se lie ensuite au site aminoacyle (site A), et les acides aminés se relient en chaîne peptidique par une réaction de transpeptidation. La chaîne en croissance se déplace vers le site P et l'ARNt suivant pénètre dans le site A. La protéine néoformée se construit de cette manière jusqu'à ce qu'un codon d'arrêt de traduction pénètre dans le site A, la traduction soit terminée et le peptide libéré.

Le ribosome procaryote est suffisamment différent de celui des cellules eucaryotes pour qu'un grand nombre d'antibiotiques fonctionnent en interférant avec les différents stades de la synthèse protéique. En effet, les antibiotiques qui inhibent la synthèse protéique ont une plus grande affinité pour les ribosomes bactériens que pour ceux de l'homme (Mohr 2016). Les antibiotiques ciblant les ribosomes peuvent être divisés en deux sous-classes différentes : les inhibiteurs 50S (lincosamides, macrolides, streptogramines, oxazolidinones et amphénicols) et les inhibiteurs 30S (aminoglycosides et tétracyclines) (Kaufman 2011, Mohr 2016, Dowling, O'Dwyer et al. 2017).

➤ Les inhibiteurs 50S :

Chez les inhibiteurs 50S, il existe deux principaux mécanismes d'action différents. Soit le blocage de l'étape d'initiation de la traduction des protéines en inhibant l'assemblage des ribosomes (les oxazolidinones), soit l'allongement du peptide produit en bloquant l'étape de la translocation des

ARNt (les lincosamides, les macrolides, les amphénicols et les streptogramines) (Patel, Yan et al. 2001, Tenson, Lovmar et al. 2003).

➤ **Les inhibiteurs 30S :**

Dans ce groupe, on trouve les tétracyclines et l'aminocyclitol (aminoglycosides et spectinomycine). Les tétracyclines bloquent la liaison de l'aminocyl-ARNt au site A. Ceci bloque le passage de l'ARNt au ribosome, empêchant ainsi la traduction des protéines (Chopra et Roberts 2001). En outre, les aminoglycosides et la spectinomycine se lient à l'ARNr 16 S. La spectinomycine inhibe la translocation sans altérer la traduction. Tandis que l'interaction des aminoglycosides ou aminosides avec l'ARNr 16S induit une altération de la conformation du complexe ribosome-ARNm, conduisant à un mésappariement de l'ARNt, altérant ainsi la traduction des protéines et induisant éventuellement la mort cellulaire (Bryan et Van Den Elzen 1977, Hurwitz, Braun et al. 1981).

2.1.1.5. Inhibition de la synthèse des folates :

Le folate ou l'acide folique est essentiel à la synthèse de l'ADN. Contrairement aux mammifères qui obtiennent le folate à partir de la nourriture, les bactéries les synthétisent elles-mêmes. Les principaux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse du folate comprennent le triméthoprime et les sulfonamides tels que la sulfadiazine. L'acide folique est essentiel pour différents processus de biosynthèse, notamment de la méthionine, des purines et de la thymine. L'activité antimicrobienne des sulfamides se base sur l'imitation d'un substrat essentiel à la biosynthèse des folates, le tétrahydrofolate, inhibant la synthèse des folates et perturbant ainsi la biosynthèse des acides nucléiques (Bermingham et Derrick 2002).

2.1.2. Les mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques :

Depuis la découverte des antibiotiques, l'antibiothérapie a permis la guérison efficace d'un grand nombre d'infections bactériennes et d'augmenter l'espérance de vie humaine, animale et végétale (Taylor et Reeder 2020). En effet, les organisations de la santé pensaient que la guerre contre les maladies infectieuses était gagnée, toutes en sous-estimant la forte adaptabilité des bactéries. Largement utilisés ces dernières décennies, les antibiotiques ont permis un recul considérable du taux de mortalité associé aux maladies infectieuses et ont contribué ainsi à la préservation de la santé (Davies et Davies 2010).

Toutefois, l'efficacité remarquable des antibiotiques contre les bactéries s'est accompagnée d'une utilisation abusive, qui se manifeste par la consommation accrue et la prescription inappropriée excessive des antibiotiques, à la fois pour les humains et les animaux en médecine

humaine et dans le domaine vétérinaire. En effet, depuis de nombreuses années, les antibiotiques sont utilisés pour traiter ou prévenir les maladies infectieuses chez les animaux d'élevage. L'alimentation des animaux d'élevage contient souvent des antibiotiques en quantités allant de niveaux thérapeutiques inférieurs à des niveaux thérapeutiques complets ; plusieurs antibiotiques utilisés proviennent de classes d'antimicrobiens utilisées chez l'homme (Wax RG 2008, Martinez 2014).

Cet abus dans la consommation d'antibiotiques a généré une pression sur les bactéries qui s'adaptent à leurs environnements en exprimant des mécanismes de défense. Cette pression de sélection a favorisé la sélection de nombreux mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. Ponctuelles au départ, ces résistances sont devenues fréquentes et préoccupantes, où certaines souches sont devenues multirésistantes, c'est-à-dire résistantes à plusieurs antibiotiques, notamment *S. aureus* résistante à la méticilline (SARM) et les souches d'*Enterococcus* résistantes à la vancomycine (ERV). Ces espèces sont principalement répartis dans les départements des soins intensifs des hôpitaux (infections nosocomiales). Aujourd'hui, la résistance bactérienne représente une menace croissante pour la santé publique humaine et animale, dont le taux des échecs thérapeutiques est en croissance continue (Wax RG 2008, Davies et Davies 2010, Kaufman 2011, Reygaert 2018).

En outre, il existe des preuves à l'appui de l'idée que l'administration d'antibiotiques aux animaux peut favoriser la propagation des bactéries résistantes aux antibiotiques et que ces bactéries résistantes peuvent être transférées à l'homme à la suite de la consommation de ces animaux (Pakyz, MacDougall et al. 2008, Goossens 2009).

La transmission de la résistance aux antibiotiques chez les animaux aux humains se produit soit par voie orale directe par la consommation de la viande et l'ingestion de matières fécales dans des aliments ou de l'eau contaminée, soit par le contact direct avec les animaux (Tacconelli 2009, Landers, Cohen et al. 2012).

La figure 1 présente le processus de sélection des souches résistantes dans une population bactérienne donnée après l'exposition aux antibiotiques. Des souches sensibles d'une population donnée peuvent devenir résistantes à la suite d'une ou plusieurs mutations génétiques (Mathurin 2018).

La résistance aux antimicrobiens (RAM) se définit comme la résistance des bactéries à un agent antimicrobien auquel elles étaient d'abord sensibles. Les bactéries multirésistantes de plus en plus nombreuses constituent un problème majeur en raison de la gravité des infections dont elles sont responsables et de leur capacité à se diffuser (Martinez 2014).

La RAM engendre des coûts élevés dans les secteurs de la santé publique sur le plan économique et humain. De ce fait, de nombreux chercheurs à travers le monde entier sont impliqués dans la recherche d'une meilleure compréhension des mécanismes de la résistance et des moyens de l'atténuer. Un large éventail d'antibiotiques a été confronté à la menace de résistance au cours des dernières décennies, et cette résistance peut être générée et transmise de différentes manières (Cox et Wright 2013, Martinez 2014). Les bactéries peuvent être intrinsèquement ou naturellement tolérantes ou résistantes à certains antibiotiques. Toutefois, elles sont également capables d'acquérir des gènes de résistance soit par des mutations ponctuelles au sein de leur génome ou par transfert horizontal de gènes ou par un événement de recombinaison entre deux bactéries. Les différents types de résistance bactérienne sont ainsi classés en trois catégories : naturelle, acquise ou adaptative (Figure 2) (Kim, Killam et al. 2003, Fernandez et Hancock 2012, Cox et Wright 2013, Rodriguez-Rojas, Rodriguez-Beltran et al. 2013).

2.1.2.1. La résistance naturelle :

Les bactéries peuvent être naturellement résistantes à certaines classes d'antibiotiques. Cette forme de résistance, appelée résistance naturelle, est caractéristique de l'espèce ou du genre bactérien concerné (Olivares, Bernardini et al. 2013). De ce fait, elle peut être utilisée comme un moyen d'identification de l'espèce donnée ou même de discrimination entre les espèces (Cox et Wright 2013).

La résistance naturelle peut être intrinsèque, toujours exprimée dans l'espèce ou induite, où les gènes sont naturellement présents chez les bactéries, et ne sont exprimés au niveau de résistance qu'après l'exposition à un antibiotique. Cette forme de résistance est liée à la capacité des bactéries à résister à un antibiotique donné grâce à ses caractéristiques structurales ou fonctionnelles intrinsèques. Les mécanismes les plus courants impliqués dans la résistance intrinsèque sont la perméabilité réduite de la membrane externe (notamment les lipopolysaccharides dans les bactéries à Gram négatif) et le système des pompes à efflux spécifiques, et d'autres mécanismes moins fréquents sont bien détaillés dans les sections suivantes (Fajardo, Martinez-Martin et al. 2008, Cox et Wright 2013).

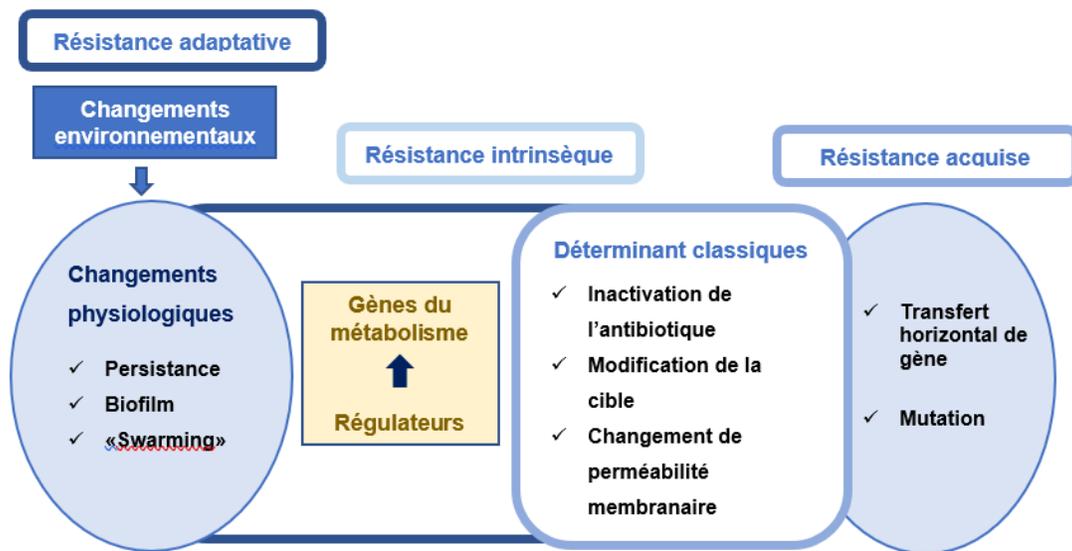


Figure 2 : les principaux mécanismes de résistance bactérienne : phénotypique et génotypique et leurs supports moléculaires.
Adapté de (Olivares, Bernardini et al. 2013).

➤ **L'imperméabilité de la membrane externe :**

En effet, contrairement aux bactéries à Gram positif, les bactéries à Gram négatif contiennent deux membranes, une membrane externe et une membrane interne, qui sont séparées par le périplasme. La membrane externe est de structure asymétrique, constituée d'une couche interne de phospholipides et d'une couche externe de lipopolysaccharide. Ces couches additionnelles rendent la membrane externe imperméable à de nombreuses molécules (Cox et Wright 2013). La présence d'une membrane externe chez les bactéries à Gram négatif leur procure naturellement une barrière supplémentaire de protection vis-à-vis le milieu extérieur. Cependant cette membrane est de perméabilité relative, de ce fait, les bactéries possèdent des mécanismes supplémentaires permettant l'absorption des nutriments essentiels à leur survie (Sanchez, Ruiz et al. 1997, Olesky, Zhao et al. 2006, Cox et Wright 2013).

La résistance intrinsèque conférée par la membrane externe est particulièrement apparente chez l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. Un pathogène opportuniste classé comme naturellement résistant à plusieurs classes d'antibiotiques, à cause de sa membrane externe hautement sélective grâce aux charges négatives contribué par les décorations d'antigène O sur le LPS de la bactérie. Cette membrane est caractérisée par une limite d'exclusion très haute privilégiant le passage de molécules de grande taille d'environ 3000 Da (contrairement à celle de *Escherichia coli* qui est d'environ 500 Da), ce qui retarde le transfert passif de beaucoup de petites molécules, comme les antibiotiques (Bellido, Martin et al. 1992, Cox et Wright 2013). La limitation de passage des molécules est avantageuse pour la bêta-lactamase inductible, une enzyme localisée dans le périplasme chez *P. aeruginosa*, qui inactive les bêta-lactamines de manière optimale lorsqu'elles passent dans le périplasme. Ce mécanisme joue un rôle clé dans la résistance intrinsèque de *P. aeruginosa* aux antibiotiques de la classe de bêta-lactamines (Hancock et Brinkman 2002).

➤ **Absence de la paroi cellulaire :**

La paroi cellulaire est un élément structural présent chez toutes les espèces bactériennes, à Gram positif et à Gram négatif, sauf chez les mycoplasmes. Ce genre bactérien possède un génome de taille réduite en raison d'une évolution régressive, ayant entraîné la perte de plusieurs gènes, notamment ceux impliqués dans la synthèse de la paroi cellulaire. Par conséquent, les mycoplasmes sont naturellement résistants aux antibiotiques de la classe de β -lactamines, qui inhibent la synthèse de peptidoglycane (Cox et Wright 2013, Olivares, Bernardini et al. 2013, Blair, Webber et al. 2015).

➤ **Système d'efflux actif :**

Les systèmes d'efflux sont médiés par des pompes de nature protéique transmembranaire qui entraînent l'excrétion rapide des déchets cataboliques et l'élimination des molécules antibiotiques en dehors de la cellule, empêchant leur action sur leurs cibles. De ce fait, le système d'efflux actif est appelé aussi mécanisme de détoxification de la cellule. Ces pompes à efflux sont caractérisées par des spécificités moléculaires variables en fonction de leur structure (Pidcock 2006). Il existe des pompes à efflux aspécifiques, universelles, et d'autres, beaucoup plus restreintes et spécifiques à un seul type de molécule. En effet, les principaux systèmes d'efflux chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif sont (Figure 3) :

- Les transporteurs à « ATP-binding cassette », dites les transporteurs ABC.
- Les protéines d'extrusion MATE « Multidrug And Toxic compound Extrusion ».
- La famille des protéines RND « Résistance/Nodulation/Division cellulaire ».
- La famille des pompes majeures MFS « Major Facilitator Superfamily ».
- La famille des petites pompes à résistance multiple SMR « Small Multidrug Resistance ».

Les pompes à efflux peuvent également être classées en fonction de leurs sources d'énergie, dont certaines utilisent la dissipation d'un gradient de protons (RND, MFS et SMR) ou un gradient d'ions Na⁺ ou H⁺ (MATE) et d'autres hydrolysent l'ATP tels que le système des transporteurs (ABC) (Pages, Masi et al. 2005, Pidcock 2006).

La topologie de disposition des protéines des pompes à efflux est différente entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Figure 3). En effet, chez les bactéries à Gram positif, les pompes à efflux présentes sont constituées uniquement de transporteurs localisés dans la membrane cytoplasmique, qui sont directement responsables de l'efflux vers l'espace sous-jacent au peptidoglycane, où les molécules peuvent diffuser vers l'extérieur. Cependant, du fait de la compartimentation de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif, les systèmes d'efflux mettent en jeu des complexes protéiques tripartites appartenant à la famille des RND (Sun, Deng et al. 2014).

Chez de nombreuses espèces bactériennes, notamment *E. coli*, un système à efflux de type RND a été démontré chez quelques souches comme étant responsable de la résistance intrinsèque contre plusieurs familles d'antibiotiques, tels que les β -lactamines, les tétracyclines, les fluoroquinolones et les macrolides (Poole 2000).

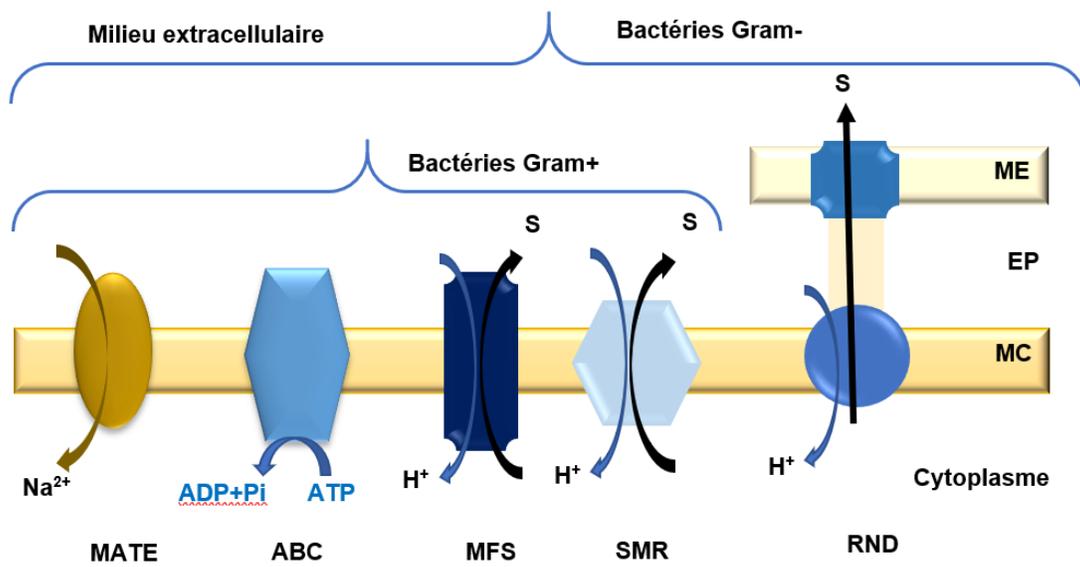


Figure 3 : représentation schématique des cinq familles de pompes à efflux bactériennes.

S: substrat, ME : membrane externe, EP : espace périplasmique, MC : membrane cytoplasmique, MATE : multidrug and toxic compound extrusion, ABC: ATP-Binding Cassette, MFS: Major Facilitator Superfamily, SMR: Small Multidrug Resistance, RND: Resistance Nodulation cell Division. Adapté de (Kumar et Schweizer 2005).

2.1.2.2. La résistance acquise :

Au contraire de la résistance intrinsèque, la résistance acquise résulte des mutations chromosomiques ou de l'acquisition d'un nouveau gène qui se fait par transfert horizontal des gènes ; transformation, transposition et conjugaison des gènes chromosomiques ou plasmidiques, qui confèrent une résistance à un antibiotique donné. Elle ne concerne qu'une proportion plus ou moins importante d'une espèce, et elle est variable dans le temps. Les gènes impliqués dans la résistance, nouvellement acquis ou mutés, sont transmis par voie verticale chez les prochaines générations (Alanis 2005).

L'acquisition des gènes peut être temporaire ou permanente. La voie la plus courante pour l'acquisition de résistance aux antibiotiques est la transmission médiée par des plasmides portant les gènes de résistance. Certaines bactéries sont naturellement compétentes et donc capables d'acquérir du matériel génétique directement de leur environnement, notamment, les genres *Acinetobacter* et *Neisseria*. En outre, plusieurs facteurs de stress tels que la famine, le rayonnement UV et les produits chimiques présentent des causes courantes de mutations génétiques ; substitutions, suppressions, additions (Coculescu 2009, Davies et Davies 2010, Martinez 2014). Afin de fournir une classification complète, les différents mécanismes qui permettent aux bactéries d'acquérir ou de développer des résistances aux antibiotiques sont classés en cinq principaux groupes (Figure 4), comme suit : i) la réduction de la concentration intracellulaire de l'antibiotique, ii) la modification de l'antibiotique, iii) la prévention d'atteindre la cible de l'antibiotique (en diminuant la pénétration ou l'extrusion active du composé antimicrobien), iv) la modification et/ou contournement des sites cibles, et v) la résistance due aux processus adaptatifs globaux des cellules. Chacune de ces stratégies mécanistiques englobe des voies biochimiques spécifiques qui seront décrites en détail :

➤ **La réduction de la concentration intracellulaire de l'antibiotique :**

- Défaut de pénétration dans la cellule :

Plusieurs antibiotiques utilisés dans la pratique clinique possèdent des cibles bactériennes intracellulaires. Pour atteindre leurs cibles, les molécules d'antibiotiques doivent franchir plusieurs barrières : la capsule, la paroi externe et la membrane cytoplasmique. Ce passage se fait, soit par la voie de diffusion passive ou la voie des porines et des lipopolysaccharides (LPS). Les bactéries ont développé divers mécanismes pour empêcher les antibiotiques d'atteindre leurs cibles intracellulaires ou périplasmiques en diminuant leur absorption par les porines (Pai, Kim et al. 2001).

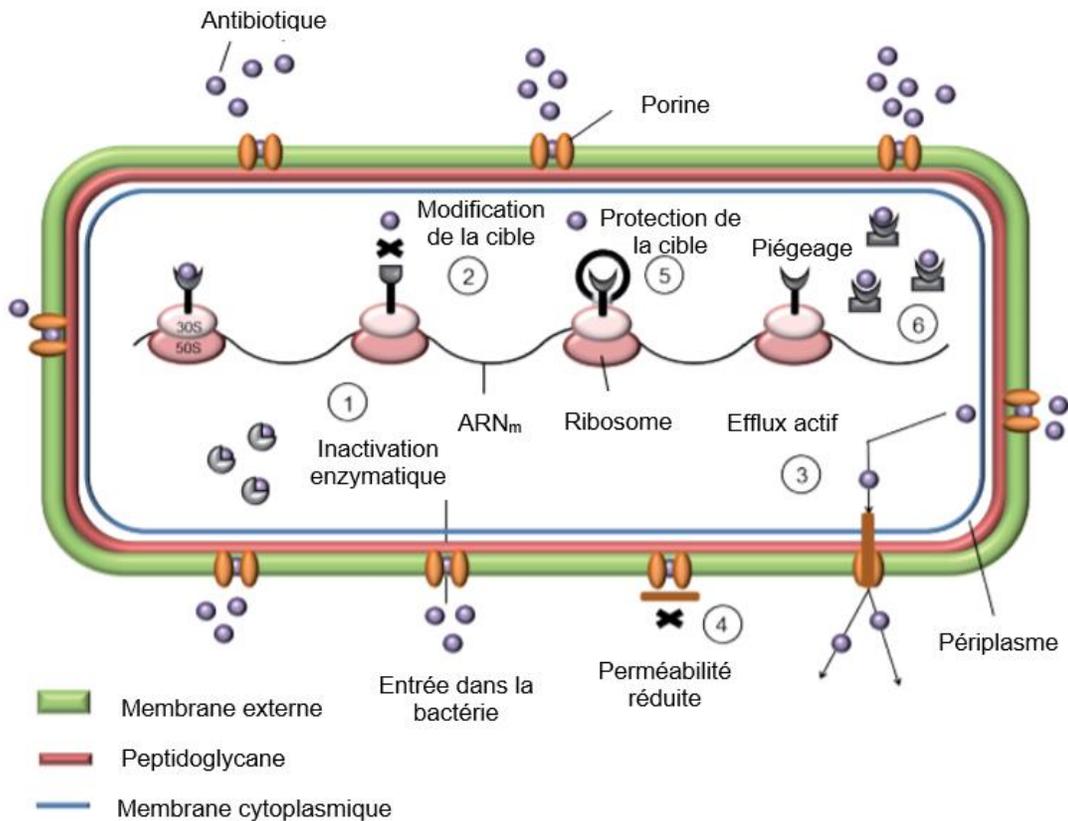


Figure 4 : les mécanismes de résistance acquise chez une bactérie à Gram-négative.

1 : inactivation enzymatique de l'antibiotique, 2 : modification de la cible, 3 : efflux actif de l'antibiotique, 4 : réduction de perméabilité, 5 : protection de la cible, 6 : piégeage de l'antibiotique. D'après (Guardabassi et Courvalin 2005).

- **Efflux actif :**

Ce système constitue également l'un des mécanismes de la résistance intrinsèque. En revanche, dans le cas de la résistance acquise, l'occurrence d'une mutation dans les promoteurs des gènes codant pour les protéines du système d'efflux, entraîne la surexpression de ces gènes. Par conséquent, l'efflux actif devient plus efficace en excréant massivement la molécule d'antibiotique à l'extérieur de la cellule, engendrant ainsi une résistance acquise. Ce mécanisme de résistance affecte un large éventail des familles d'antibiotiques, tels que les inhibiteurs de la synthèse des protéines, les bêta-lactames, les fluoroquinolones, les polymyxines et les carbapénèmes. Ce système est très courant chez plusieurs bactéries comme *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* et *E. coli* (Lee, Huda et al. 2003, Fernandez et Hancock 2012).

➤ **Modifications ou destruction de la molécule antibiotique :**

L'une des stratégies bactériennes les plus efficaces contre les antibiotiques est la production d'enzymes qui les inactivent. L'inactivation enzymatique des antibiotiques constitue le mécanisme de résistance le plus répandu. Ce mécanisme s'effectue soit par destruction de la molécule elle-même par hydrolyse ou par l'addition des fragments chimique (phosphorylation, adénylation, acétylation), empêchant ainsi l'interaction de l'antibiotique avec sa cible. Ces enzymes sont produites naturellement par les bactéries. Toutefois, des copies supplémentaires des gènes codant pour ces enzymes peuvent être apportées par les plasmides, conférant donc une résistance acquise.

- **Altérations chimiques de l'antibiotique :**

La biosynthèse d'enzymes induisant des modifications chimiques dans la molécule antibiotique est l'un des mécanismes de résistance acquise bien connu à la fois chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Ces enzymes affectent principalement les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines au niveau des ribosomes, et confèrent une résistance élevée aux antibiotiques qu'elles modifient (Wilson 2014).

Chez de nombreuses bactéries la résistance par modification chimique d'antibiotiques est basée sur la présence d'enzymes de modification des aminosides (EMA). Celles-ci modifient de manière covalente les groupes hydroxyle(s) ou aminé(s) de la molécule d'aminosides. Ces enzymes de modification sont regroupées en trois catégories en fonction de leurs voies biochimiques : les acyltransférases (AAC), les phosphotransférases (APH) et les nucléotidyltransférases (ANT) (Shaw, Rather et al. 1993).

Les mutations des gènes codant pour ces enzymes peuvent conduire à un élargissement du spectre d'activité. La famille APH est largement distribuée dans les bactéries à Gram positif et à Gram négatif et altère la kanamycine et la streptomycine. Cependant, l'AAC se trouve principalement dans les isolats cliniques à Gram négatif, comme *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* et *Acinetobacter* et affecte la plupart des aminoglycosides, y compris l'amikacine et la gentamicine (Ramirez et Tolmasky 2010).

L'enzyme AAC (6') APH (2"), qui se trouve principalement chez les bactéries à Gram positif, est une enzyme bifonctionnelle, ayant à la fois des activités d'acétylation et de phosphotransférase. Cette protéine est largement produite par les *entérocoques* et les *staphylocoques* et confère une résistance de haut niveau à tous les aminosides à l'exception de la streptomycine (Hollenbeck et Rice 2012).

L'altération enzymatique des antibiotiques peut être effectuée également par la modification du chloramphénicol, un antibiotique inhibiteur de la synthèse protéique en interagissant avec le centre de transfert de peptidyle de la sous-unité ribosomale 50S. L'altération chimique du chloramphénicol est principalement due à l'expression des acétyltransférases (chloramphénicol acétyltransférases), appelées CAT (Schwarz, Kehrenberg et al. 2004, Ramirez et Tolmasky 2010).

- **Inactivation par hydrolyse enzymatique :**

Le principal mécanisme de résistance bactérienne aux bêta-lactamines repose sur leur hydrolyse par l'action des bêta-lactamases, qui détruisent la liaison amide du cycle bêta-lactame, provoquant l'ouverture de l'anneau. Les bêta-lactamines en anneau ouvert ne sont plus capables de se lier à leurs protéines cibles PBP. Les bêta-lactamases sont les hydrolases les plus répandues dans la résistance aux antibiotiques des souches cliniques (Paterson et Bonomo 2005, Bush 2013). La production de bêta-lactamases est le mécanisme de résistance le plus couramment utilisé par les bactéries à Gram négatif contre les bêta-lactamines, particulièrement, contre la pénicilline et les céphalosporines (Bush et Jacoby 2010, Bush et Bradford 2016).

Les gènes codant pour les bêta-lactamases sont appelés *bla*, suivi du nom de l'enzyme spécifique. Ces gènes peuvent se trouver naturellement sur le chromosome bactérien ou peuvent être acquis par un plasmide. De nombreux genres de bactéries à Gram négatif, tels que les *Enterobacteriaceae*, les *Pseudomonas*, les *Aeromonas* et les *Acinetobacter*, possèdent des gènes chromosomiques de bêta-lactamases.

Les plasmides porteurs des gènes de bêta-lactamase se trouvent le plus souvent chez les *Enterobacteriaceae*, mais peuvent être trouvés chez certaines espèces de bactéries Gram positif, tels que *E. faecalis*, *S. aureus* et (Schultsz et Geerlings 2012). Le développement de nouveaux antibiotiques de meilleure affinité pour leurs cibles a entraîné l'émergence de nouvelles bêta-lactamases ayant un spectre d'activité beaucoup plus large, appelées les BLSE (bêta-lactamases à Spectre Etendu) et comprennent des membres des familles d'enzymes TEM, SHV, CTX-M et OXA, dont la plupart sont dérivées des bêta-lactamases des familles TEM ou SHV.

➤ **La modification de la cible :**

Une autre stratégie courante pour que les bactéries développent une résistance aux antibiotiques consiste à la modification de leur site cible. En effet, pour être efficace, chaque molécule d'antibiotique se fixe sur une cible bien précise dans la cellule bactérienne. Ceci leur permet de bloquer sa fonction et, par conséquent, d'inhiber la croissance bactérienne (effet bactériostatique) ou tuer la cellule (effet bactéricide). La cible est une protéine ou une enzyme impliquée dans la synthèse de la paroi cellulaire dans le cas des aminosides et des bêta-lactamines, des gyrases et des topoisomérases dans le cas des fluoroquinolones et le ribosome dans le cas des tétracyclines ou des macrolides. Les bactéries ont développé plusieurs tactiques de modification de leur cible. La tactique de mutation se traduit en cible fonctionnelle avec une affinité réduite pour l'antibiotique qui ne se lie pas efficacement et, par conséquent, son effet sera réduit ou négligeable.

- **Mutation de la cible :**

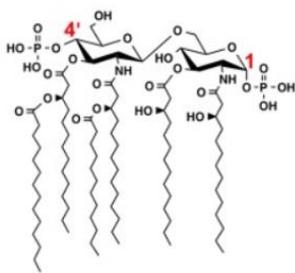
Les bactéries sont capables de développer des résistances aux antibiotiques en incorporant des mutations ponctuelles dans les séquences génomiques codant pour leurs protéines cibles. Dans le cas de la résistance aux fluoroquinolones, le génotype associé au phénotype résistant est généralement caractérisé par des mutations ponctuelles, qui modifient certains acides aminés dans les sous-unités des topoisomérases, des enzymes responsables du surenroulement de l'acide nucléique. Ces mutations se trouvent dans les régions géniques QRDR (Quinolone Resistance Determining Regions). Ces régions contiennent des gènes qui codent pour la synthèse des protéines ParC et ParE, les sous-unités de la topoisomérase et les protéines GyrA et GyrB, les deux sous-unités de la gyrase.

Également, le processus de résistance aux macrolides a été associé à des mutations ponctuelles dans les ARNs ribosomaux chez plusieurs bactéries, notamment *S. aureus*, *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae* et *Bacillus subtilis* (Leclercq 2002, Kelly, Chalmers et al. 2018).

- Protection de la cible :

L'acquisition de la résistance aux antibiotiques par modification de la cible passe également par la surexpression des gènes régulateurs qui sont impliqués dans la protection de la cible de l'action des antibiotiques. Ce mécanisme a été décrit chez certaines souches ERV et *E. coli* (Figure 5). Il se traduit par la production d'un précurseur altéré du peptidoglycane, qui ne sera plus reconnu par la molécule de vancomycine, ce qui empêche par conséquent son action inhibitrice de la synthèse de la paroi cellulaire (Cetinkaya, Falk et al. 2000).

LPS chez *E. coli* sans modification



LPS modifiés chez *E. coli* et *Salmonella*

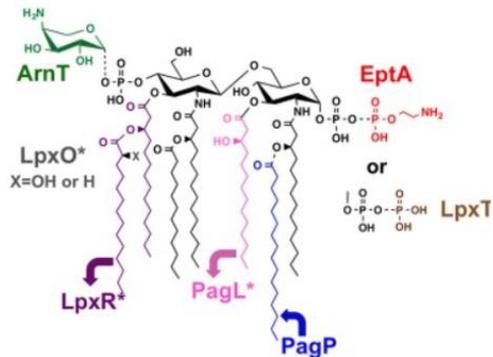


Figure 5 : résistance aux polymyxines par modification des LPS.
D'après (Rubin, Herrera et al. 2015).

2.1.2.3. La résistance adaptative :

La résistance bactérienne peut être aussi tout simplement phénotypique, adaptative et sans modification génétique associée. Cette forme de résistance est associée à la formation des biofilms, à la motilité de type « swarming » ou aux formes de persistance au moment de l'exposition aux antibiotiques. Selon Fernandez & Hancock en 2012, la résistance adaptative se définit comme étant l'augmentation temporaire de la capacité de la cellule bactérienne à survivre en présence d'un antibiotique, résultant de l'altération de l'expression génique et/ou la synthèse des protéines suite à l'exposition à un ou plusieurs signaux environnementaux (Fernandez et Hancock 2012).

La résistance adaptative est une réponse directe dépendante de la présence des antibiotiques et se déclenche au premier contact avec un antibiotique (Fernandez, Breidenstein et al. 2011, Fernandez et Hancock 2012). En réponse à des changements environnementaux, les bactéries peuvent moduler leur expression génique très rapidement, ce qui résulte en certains changements phénotypiques afin d'augmenter leurs chances de survie conférant une plus grande

capacité pour résister aux agressions des antibiotiques (Fernandez, Breidenstein et al. 2011, Antao et Wagner-Ahlf 2018).

La résistance adaptative est donc temporaire ou dite transitoire, car elle résulte des changements phénotypiques sans conférer une résistance permanente. En fonction de la durée d'exposition à l'antibiotique, deux voies de développement de la résistance adaptative bactérienne ont été mises en évidence. D'une part, on cite la voie FTM (Fast and Transient Mechanisms), qui présente la réponse rapide et transitoire résultante des mécanismes épigénétiques. En effet, l'exposition à de faibles concentrations d'antibiotiques augmente le taux de mutations ponctuelles et entraîne la méthylation de l'ADN. Ceci engendre le développement immédiat d'une résistance réversible qui disparaît avec la disparition de l'antibiotique. D'autre part, la deuxième voie est la voie SSM (Slow but Stable Mechanisms), qui présente la réponse lente et stable résultante des mutations génétiques. En effet, le contact prolongé avec l'antibiotique induit l'apparition graduelle et cumulative de mutations génétiques et l'amplification des gènes qui confèrent ainsi une résistance permanente (Figure 6).

Le passage d'un milieu riche à un milieu dépourvu en antibiotiques augmente la fréquence des mutations génétiques induisant ainsi une résistance stable contre ce type de signaux environnementaux. Le FTM permet à la population de survivre à une pression environnementale temporaire et disparaît une fois que les conditions environnementales sont revenues à la normale. Cependant, si cette pression environnementale dure assez longtemps, les mutations auront lieu et la réponse SSM interviendra, augmentant ainsi le taux de survie de la population. Ainsi, la résistance adaptative présente un pont entre les résistance intrinsèque et acquise, en permettant aux bactéries de développer des systèmes de défense en adéquation avec leur milieu environnemental (Figure 6) (Sandoval-Motta et Aldana 2016, Antão et Wagner-Ahlf 2018).

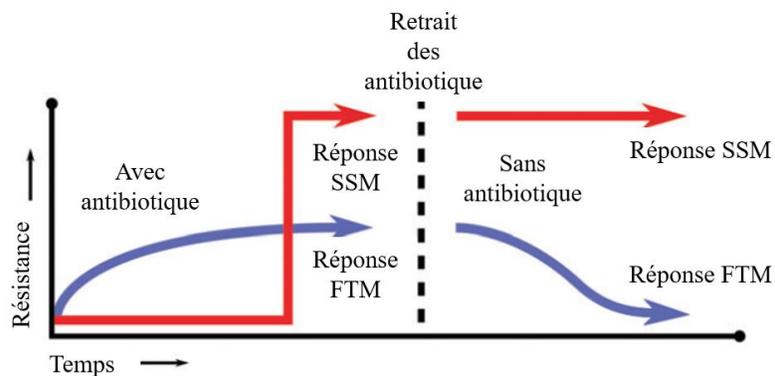


Figure 6 : acquisition continue et discontinue de la résistance. D'après (Sandoval-Motta et Aldana 2016).

En fonction des signaux environnementaux et de la durée d'exposition aux antibiotiques, le niveau de résistance peut varier de façon graduelle jusqu'à l'obtention d'une réponse permanente et stable (réponse SSM, illustrée en rouge) ou de façon rapide avec une réponse transitoire (réponse FTM, illustrée en violet) qui disparaît après le retrait de l'antibiotique (Sandoval-Motta et Aldana 2016).

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la résistance adaptative, notamment (Olivares, Bernardini et al. 2013) :

➤ **La persistance :**

La persistance se définit comme étant la capacité de survie d'une sous-population bactérienne dans des conditions hostiles (la présence d'un antibiotique donné) auxquelles la survie et la croissance du reste de la population sont inhibées. Une fois que le milieu est dépourvu de l'antibiotique et que la croissance reprend, les cellules persistantes seront aussi sensibles à cet antibiotique comme la population d'origine, signifiant ainsi que la persistance ne résulte pas d'un changement génétique. Le mécanisme de persistance des cellules bactériennes dans une population a été signalé pour la première fois en 1944 pour des infections à staphylocoques traitées à la pénicilline (Bigger 1944). Les cellules persistantes sont des variantes phénotypiques ayant une résistance accrue aux antibiotiques et sont génétiquement identiques à la population sauvage (Kim et Wood 2010).

Ces bactéries persistantes peuvent se regrouper en deux catégories :

- Les bactéries persistantes de type I :

Elles correspondent à une sous-population bactérienne qui reste en phase stationnaire en présence d'un antibiotique dans le milieu environnant, contrairement au reste de la population. Ce sont des bactéries survivantes qui sont capables de relancer la génération d'une nouvelle population une fois que l'antibiotique disparaît. Ce type est associé au système *hipBA* toxine-antitoxine (TA) et implique l'expression des gènes *hipA* et *hipB*, où leurs surexpressions inhibent la croissance bactérienne.

- Les bactéries persistantes de type II :

Ce sont des sous-populations bactériennes ayant une croissance ralentie en présence d'un antibiotique dans le milieu environnant. Ce type implique l'expression des gènes *hipQ* (Olivares, Bernardini et al. 2013).

➤ **La formation des biofilms :**

Le biofilm se définit comme une communauté microbienne agrégée en microcolonies et enrobée d'une matrice de substances polymériques extracellulaires autoproduites (Figure 7) (Flemming, Wingender et al. 2016). Celle-ci permet au biofilm d'adhérer fortement à des surfaces biotiques (ex. les muqueuses) ou abiotiques (ex : appareillage médical, les surfaces et les équipements à la ferme ou en usine) (Costerton, Stewart et al. 1999, Goetz, Dufour et al. 2016). La capacité à former un biofilm est une caractéristique propre à plusieurs microorganismes. On estime que 80 % de la biomasse microbienne terrestre réside sous forme de biofilms (Tremblay, Hathroubi et al. 2014). Il s'agit ainsi d'un mode de vie permettant aux bactéries de survivre dans un environnement hostile, et cela grâce à une grande résistance et/ou tolérance aux agents biocides tels que les antibiotiques et les désinfectants, mais également à la réponse immunitaire de l'hôte (Goetz, Dufour et al. 2016). En effet, les bactéries de biofilm peuvent être de 10 à 1000 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens (Tremblay, Hathroubi et al. 2014).

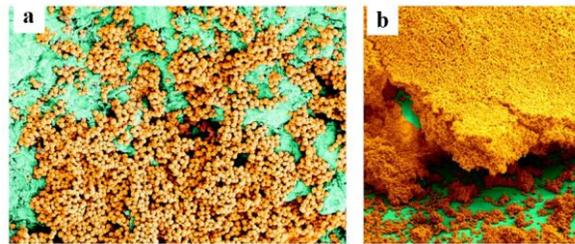


Figure 7 : image des biofilms de *S. aureus* sur une valve cardiaque (a) et un tube endotrachéal (b).
D'après (Boles, Blaise R. et al. 2011).

Le biofilm est un milieu très hétérogène (Tolker-Nielsen et Molin 2000), qui est le résultat d'une stratégie de colonisation des surfaces conduisant au développement d'une architecture tridimensionnelle. Un réseau de canaux hydriques s'intercale entre ces microstructures microbiennes facilitant ainsi l'accès aux nutriments et à l'oxygène à tous les niveaux du biofilm (Costerton, Stewart et al. 1999, Davey et O'Toole G 2000, Donlan 2002). En effet, il possède une organisation stratifiée due à la présence de gradients métaboliques et physico-chimiques entre les couches superficielles et profondes (Stewart et Franklin 2008). Celle-ci favorise l'hétérogénéité métabolique qui génère une hétérogénéité physiologique bactérienne au sein du biofilm, engendrant ainsi une variation de l'expression génétique (Jefferson 2004). Le biofilm est essentiellement composé des microorganismes agglomérés et de la matrice qu'il synthétise (Costerton, Stewart et al. 1999). Les microorganismes représentent 2 à 15 % du volume du

biofilm bien que la matrice extracellulaire représente 50 à 90 % de sa masse organique carbonée (Sutherland 2001, Branda, Vik et al. 2005).

Le développement de l'architecture des biofilms bactériens est essentiellement lié à la synthèse de la matrice. Elle est hautement hydratée contenant jusqu'à 97 % d'eau. La matrice d'exopolysaccharides sert de bouclier pour protéger les communautés bactériennes contre les protozoaires ou les phages lytiques, ainsi que contre les toxines chimiques (ex. : les biocides, les antibiotiques) en se liant directement aux agents antimicrobiens empêchant leur pénétration au sein du biofilm (Donlan et Costerton 2002, McDougald, Rice et al. 2011). Elle est constituée de polymères polysaccharides sécrétés par les microorganismes, d'acides nucléiques, de protéines, d'agents tensioactifs, de lipides, de glycolipides, de cations, de produits de dégradation et de substances provenant du milieu extérieur (Goetz, Dufour et al. 2016). Néanmoins, on peut aussi trouver d'autres composants, tels que l'ADN, l'ARN et les lipides, ceci est bien illustré dans la figure 8. Le processus de formation du biofilm dépend de signaux environnementaux et l'état métabolique des bactéries au sein du biofilm varie d'un endroit à un autre en fonction de la disponibilité de l'oxygène et des nutriments, ce qui contribue au développement de la résistance aux antibiotiques. La matrice extracellulaire va moduler également l'activité de l'antibiotique en limitant sa diffusion au sein du biofilm et en le séquestrant à la surface du biofilm (Sutherland 2001, Roux et Ghigo 2006).

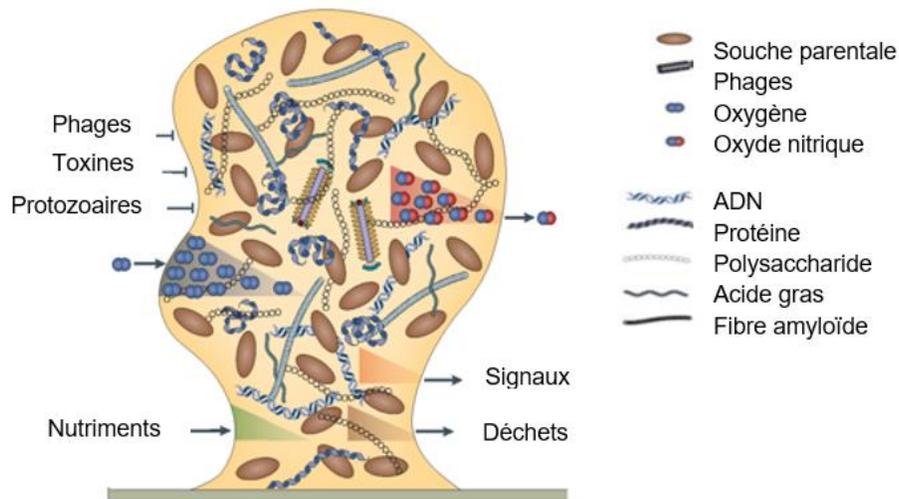


Figure 8 : composition des biofilms bactériens.
D'après (McDougald, Rice et al. 2011).

➤ Le « swarming » :

L'essaimage ou la motilité de type «swarming» est un type spécifique de mouvement rapide des populations bactériennes. En effet, il se caractérise par la formation de cellules hyperflagellées dans des environnements riches en nutriments ce qui induit une colonisation rapide des surfaces. La capacité d'essaimage a été décrite chez plusieurs espèces, notamment *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Burkholderia thailandensis*, *Serratia marcescens*, *Salmonella enterica* et *B. subtilis*. L'essaimage est un mécanisme pertinent pour la colonisation des surfaces pendant une infection, tels que dans la colonisation des poumons des patients atteints de fibrose kystique. Le processus de différenciation entraîne la surexpression des pompes à efflux ce qui peut conférer ainsi la résistance aux antibiotiques (Kim, Killam et al. 2003, Kim et Surette 2004, Overhage, Bains et al. 2008, Abraham, Lamlerthton et al. 2012, Blair, Webber et al. 2015). Toutefois, le vrai mécanisme qui permet aux cellules bactériennes en «swarming» de tolérer de plus hautes doses d'antibiotiques reste incertain (Lai, Tremblay et al. 2009, Butler, Wang et al. 2010, Bhattacharyya, Walker et al. 2020).

2.2 Chapitre 2. Les métabolites secondaires de plantes

2.2.1. Généralité :

Étant donné que les plantes sont sessiles et incapables de fuir des situations hostiles, elles doivent développer des moyens pour s'adapter aux changements environnementaux favorables et défavorables. Les plantes synthétisent une vaste gamme de composés organiques, traditionnellement classés en métabolites primaires et secondaires. Les métabolites primaires englobent les protéines, les lipides, les phytostérols, les nucléotides, les acides aminés et les acides organiques. Ceux-ci sont des composés indispensables à la photosynthèse, la respiration, la croissance et le développement (Cheynier 2012). Afin de se défendre, les plantes ont développé de nombreuses stratégies de survie, notamment la capacité de produire une gamme de plus de 200 000 assortiments très variés de composés organiques de faible poids moléculaire, appelés métabolites secondaires, qui ne sont pas nécessaires pour la survie et la croissance et diffèrent en fonctions des espèces. Ces métabolites secondaires représentent une source importante de molécules actives utilisées par l'homme dans des domaines aussi variés que l'agroalimentaire ou la pharmacologie (Cheynier 2012, Gandhi, Mahajan et al. 2015). La biosynthèse et le stockage des métabolites secondaires sont considérés comme une stratégie de défense et de communication des plantes. En effet, bien que les métabolites secondaires ne jouent pas un rôle direct dans la croissance et le développement des plantes, ils jouent un rôle

essentiel dans leur protection et présentent ainsi un large éventail de propriétés médicinales et pharmacologiques qui les rendent précieux (Hartmann 2007, Wink 2013, Zaynab, Fatima et al. 2018).

Les métabolites secondaires sont des composés complexes qui ont été façonnés et optimisés au cours de l'évolution des plantes. De nombreux composés sont utilisés comme produits pharmaceutiques, parfums, colorants, arômes, pesticides, hallucinogènes, stimulants ou comme précurseurs chimiques médicaux, pharmaceutiques et industriels. Certains jouent encore des rôles exotiques dans certaines cultures comme les hallucinogènes et les poisons de flèche (Gallon 2000, Bourgaud, Gravot et al. 2001, Nwokeji, Enodiana et al. 2016). Certains métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les polyacétylènes, les stilbènes et les glucosinolates présentent des propriétés antimicrobiennes et bénéfiques pour la santé. En effet, les composés polyphénoliques, qui sont caractérisés par une structure cyclique aromatique ou phénolique, comprenant les flavonoïdes, les acides phénoliques et les lignanes, sont souvent associés à une résistance accrue aux agents pathogènes fongiques des plantes et dissuadent des animaux notamment les insectes (DNP 2001, Dewick 2002).

La richesse en métabolites secondaires pourrait générer une plante plus résistante, cependant une telle production continue est considérée comme coûteuse en termes d'utilisation de ressources et d'énergie, ce qui réduit sa croissance et sa reproduction (Simms et Rausher 1987, Dicke 1998, Laforsch et Tollrian 2004).

2.2.2. Biosynthèse et classification des métabolites secondaires :

Bien que les métabolites secondaires ne soient pas indispensables à la croissance et au développement des plantes, leur absence entraîne une altération à long terme de la capacité de survie de l'organisme (Nwokeji, Enodiana et al. 2016). En effet, les métabolites secondaires sont fréquemment produits aux niveaux les plus élevés lors d'une transition de la phase de croissance active à la phase stationnaire (Verpoorte 1998). Comme faisant partie intégrante du métabolisme cellulaire végétale le métabolisme secondaire s'appuie sur le métabolisme primaire pour fournir les enzymes, l'énergie, les substrats et les machineries cellulaires nécessaires et contribue à la survie à long terme des plantes productrices (Hanson 2003, Gandhi, Mahajan et al. 2015). Ce point de vue démontre que les métabolites secondaires sont synthétisés à partir de métabolites intermédiaires du métabolisme primaire et principalement dérivés des voies métaboliques de la glycolyse du cycle de Krebs et du cycle de Calvin. Ces voies entraînent la production de principaux métabolites primaires tels que l'acétyl-CoA, l'acide mévalonique et l'acide shikimique,

qui servent par la suite à l'initiation de la synthèse des métabolites secondaires. La majorité de ces composés appartiennent à l'une des nombreuses familles, chacune ayant des caractéristiques structurales particulières résultantes de la façon dont elles sont construites dans la nature, c'est-à-dire de leur biosynthèse. Il existe trois principales voies de biosynthèse qui conduisent à la diversité des composés chimiques secondaires présents dans les plantes (Figure 9) (Bennett et Wallsgrove 1994, Mazid, Khan et al. 2011). Ceux-ci incluent :

- La voie de biosynthèse de l'acide shikimique qui conduit à la formation de lignine, de coumarines, de tanins, de phénols et de diverses molécules aromatiques.
- La voie de biosynthèse de l'acétate-malonate qui forme les précurseurs des acides gras, des phospholipides, des glycérides, des cires, des glycolipides et des polykétides.
- La voie de biosynthèse de l'acétate-mévalonate qui se traduit par divers terpénoïdes (gibbérélines, caroténoïdes, acide abscissique) et stérols.

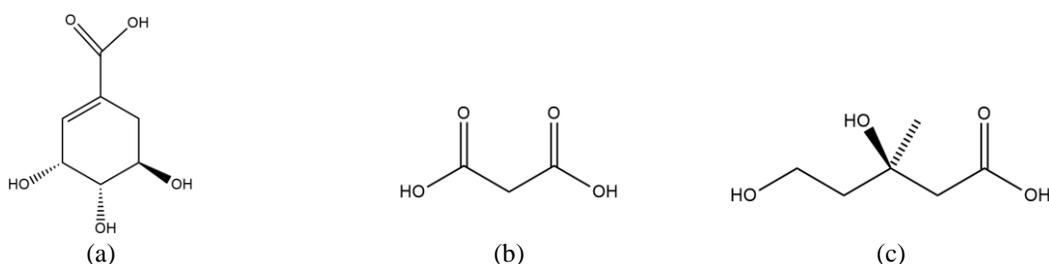


Figure 9 : structures chimiques des acides des trois principales voies de biosynthèse des métabolites secondaire.

(a) : l'acide shikimique; (b) : l'acide malonique; (c) : l'acétate-mévalonate.

Les métabolites secondaires sont classés en fonction de leur origine biosynthétique, en trois classes principales, notamment les terpènes (les glycosides cardiotoniques, les caroténoïdes et les stérols), les composés phénoliques (les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes, les stilbènes, les flavonoïdes, les tanins et la lignine) et les composés contenant de l'azote (les alcaloïdes, les glucosinolates) (Agostini-Costa, Vieira et al. 2012). Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés que sont souvent associée à une très large gamme d'activités aux domaines de la biologie humaine, agroalimentaire et pharmaceutique (Herbert 1989, Kabera 2014).

2.2.2.1. Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques ou polyphénols regroupent un vaste ensemble chimiquement hétérogène de près de 10 000 composés phytochimiques. Ils sont tous caractérisés par la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique (benzéniques) à six carbones,

portant lui-même un nombre variable de fonctions hydroxyles (-OH) (Hennebelle, Sahpaz et al. 2004, Macheix 2005, Benhamou 2009).

La classe des composés phénoliques est divisée en une dizaine de sous-classes chimiques en fonction de la complexité et du degré de modification (méthylation, hydroxylation, etc.) du squelette carboné, ainsi que les liaisons possibles avec d'autres molécules (lipides, protéines, autres métabolites). Ils sont ainsi classés en acides phénoliques, flavonoïdes, proanthocyanidines, coumarines, lignanes, lignines, phénols, tanins, chalcones, quinines, phénylpropanoïdes, stilbéoïdes et xanthones (Macheix 2005, Dai et Mumper 2010).

Deux voies biosynthétiques de base des composés phénoliques sont impliquées : la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acide malonique. La plupart des composés phénoliques sont issus de deux acides aminés essentiels, la phénylalanine et la tyrosine (surtout impliquée chez les monocotylédones), qui sont synthétisées par la voie de l'acide shikimique. Cependant, la voie de l'acide malonique est moins importante chez les plantes supérieures (Benhamou 2009). En effet, la voie de l'acide shikimique convertit les précurseurs glucidiques simples, dérivés du cycle des pentoses et du cycle de Calvin, en acides aminés aromatiques (Bentley 1990, Herrmann et Weaver 1999). La première étape de la biosynthèse des composés phénoliques dérivés de la phénylalanine est la désamination de cet acide aminé via l'élimination d'une molécule d'ammoniac pour former l'acide cinnamique. Cette réaction est catalysée par l'enzyme clé, la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), qui présente le point de liaison entre le métabolisme primaire et secondaire, et donc l'étape principale dans le processus de formation de nombreux composés phénoliques. L'activité de la PAL est augmentée par divers facteurs environnementaux, notamment de faibles niveaux de nutriments, une infection légère et fongique. L'acide cinnamique issu de cette réaction est par la suite hydroxylé par le cinnamate 4-hydroxylase (C₄H), pour former l'acide *p*-coumarique, le précurseur principal de la majorité des composés phénoliques (K Hahlbrock et Scheel 1989, Herrmann et Weaver 1999, Gallon 2000)

➤ **Les acides phénoliques :**

Les acides phénoliques issus de la voie phénylpropanoïde sont tous synthétisés à partir d'un précurseur cinnamate et sont classés en quatre catégories (Figure 10) : acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques, acides hydroxyphénylpropanoïques et acides hydroxyphénylacétiques (Manach, Scalbert et al. 2004, Macheix 2005). En effet, on peut distinguer deux classes d'acides phénoliques en tant que dérivés de l'acide benzoïque et dérivés de l'acide cinnamique (Manach, Scalbert et al. 2004). Une fois catalysé par l'enzyme 4-coumarate CoA ligase (4 CL) l'acide *p*-coumarique est transformé en *p*-coumaroyl CoA. À la suite d'une

hydroxylation, méthylation et réduction du *p*-coumaroyl CoA, de nombreux composés se forment, tels que les acides féruliques, sinapiques et caféiques. L'acide férulique est l'acide phénolique le plus abondant dans les céréales. Cependant, les benzoates d'hydroxyle comprennent l'acide 4-hydroxy benzoïque, l'acide vanillique, l'acide protopcatéchique, l'acide syringique, l'acide salicylique, l'acide gallique et l'acide gentisique. La plante de thé est une source importante d'acide gallique (Gordon et Wareham 2010, Flamini, Mattivi et al. 2013, Del-Castillo-Alonso, Monforte et al. 2020).

La conjugaison de ces acides phénoliques avec du glucose ou des alcools-acides (acide malique, acide quinique. Etc.), via leur fonction carboxylique, crée des esters. Notamment, l'acide chlorogénique (acide 5-caféoylquinique) qui est formé par la liaison entre le groupement hydroxyle en position cis-3 de l'acide quinique et le groupement carboxyle de la chaîne latérale de l'acide caféique (Flamini, Mattivi et al. 2013).

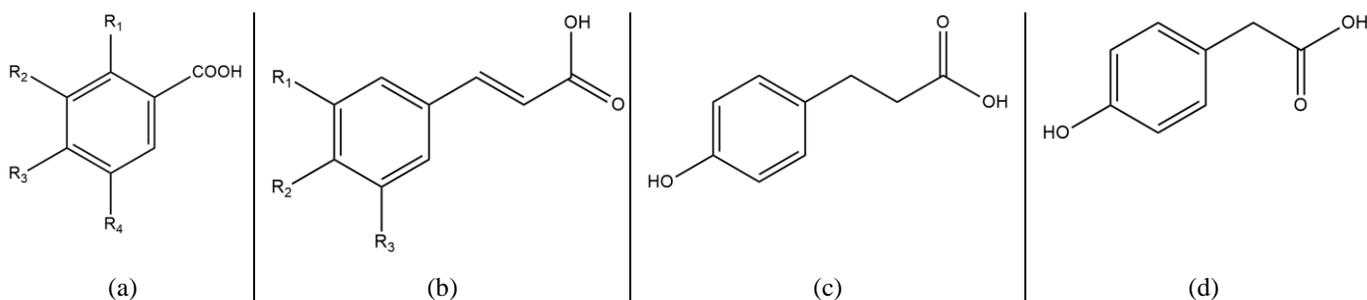


Figure 10 : structures chimiques des acides phénoliques.

(a) : structure chimique des acides hydroxybenzoïques ; (b) : structure chimique des acides hydroxycinnamiques ; (c) : structure chimique des acides hydroxyphénylpropanoïques ; (d) : structure chimique des acides hydroxyphénylacétiques.

➤ **Les coumarines :**

Les coumarines sont des 2*H*-1-benzopyran-2-ones, des lactones des acides *o*-hydroxy-*Z*-cinnamiques et sont classées en fonction de leur noyau benzopyran-2-one. En effet, l'isomérisation de la double liaison *E* en *Z* se réalise sous l'effet de la lumière à une longueur d'onde de 320 nm. Les coumarines (Figure 11) sont fréquemment hydroxylées en position 7. Ces hydroxyles peuvent être soit méthylés ou engagés dans une liaison hétérosidique (Winkel-Shirley 2001). Certaines coumarines végétales bien connues comprennent l'acide cinnamique (la coumarine), l'acide 4-coumarique (l'ombelliférone) et l'acide férulique (la scopolétine) (Bourgaud, Hehn et al. 2006, Qualley, Widhalm et al. 2012). Ces composés cycliques présentent une large gamme d'activité antimicrobienne contre les bactéries et les champignons (Bourgaud, Hehn et al. 2006). On pense également que ces composés jouent un rôle de défense contre les pesticides pour les plantes (Gallon 2000). La prénylation du noyau benzénique des coumarines aboutit à la

formation de furano-coumarines et pyrano-coumarines. Les furano-coumarines sont des coumarines avec un anneau de furane de configuration linéaire ou angulaire. On cite les psoralènes qui sont responsables de la phototoxicité chez certaines espèces végétales, qui se manifestent par une dermatite aiguë (Berenbaum et Zangerl 1993). Lorsqu'ils sont exposés à la lumière UV, ces composés deviennent toxiques dont certains deviennent électro-statiquement activés et peuvent s'insérer dans la double hélice d'ADN en se liant à la pyrimidine, bloquant ainsi la transcription et menant éventuellement à la mort cellulaire (Akeson, Gorz et al. 1963).

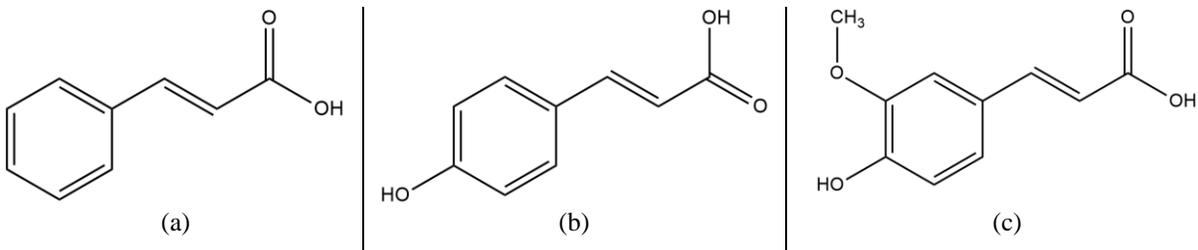


Figure 11 : structures chimiques des coumarines.

(a) : structure chimique de l'acide cinnamique; (b) : structure chimique de l'acide 4-coumarique; (c) : structure chimique de l'acide férulique.

➤ Les lignanes :

Les lignanes sont des dimères phénylpropanoïdes divisés en quatre groupes : i) les lignanes formées par la liaison entre les deux carbones β des chaînes latérales de deux unités dérivées du phénylpropane, ii) les néolignanes où un seul carbone β est mis en jeu, iii) les « oligomères » issus de la condensation de deux à cinq unités phénylpropaniques et iv) les norlignanes ayant un squelette en C17. Ces derniers sont surtout présents chez les espèces primitives notamment les Magnoliales et les Pipérales, tandis que les lignanes (Figure 12) se trouvent souvent dans les tissus soumis à la lignification chez les Angiospermes et dans le bois des Gymnospermes (Vanholme, De Meester et al. 2019) .

En effet, les précurseurs monomères dits les monolignols sont des alcools cinnamyls, tels que le coniféryl ou l'alcool *p*-coumaryl et sont les mêmes précurseurs de la formation de lignine. Ces monolignols dérivent du *p*-coumaroyl-CoA à la suite d'une série de réactions impliquant des CoA ligases, des hydroxylases, des réductases, des méthylases et des déshydrogénases. La lignine est indispensable au maintien des plantes en présentant des barrières polymères contre les agressions des agents pathogènes et se manifeste sous la forme d'un polymère hautement ramifié de composés phénylpropanoïdes. La lignification des parois cellulaires de la plante inhibe le développement des agents pathogènes et constitue une réponse fréquente à une infection

bactérienne ou fongique (Karkonen et Koutaniemi 2010, Vanholme, Demedts et al. 2010, Weng et Chapple 2010, Vanholme, De Meester et al. 2019).

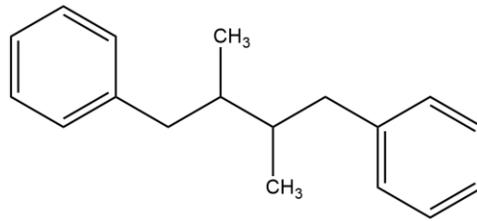


Figure 12 : structure chimique de lignanes.

➤ **Les tanins :**

Les tanins sont des polymères phénoliques ayant la propriété de se combiner aux protéines et sont divisés en deux grandes catégories : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Jacob et Pignal 1972).

- Les tanins hydrolysables sont des esters d'acide gallique avec une fraction de sucre, souvent le β -D-glucose. Les tanins hydrolysables sont regroupés en gallotanins et ellagitanins (Figure 13). Les baies telles que la framboise, la fraise et la mûre sont riches en ellagitanins. Ces tanins sont caractérisés par leur dégradation rapide par hydrolyse chimique ou enzymatique. Ceci permet de libérer une partie non phénolique (du glucose ou de l'acide quinique) et une partie phénolique, soit de l'acide gallique, soit un dimère de la même acide (l'acide ellagique). Ce sont des toxines qui inhibent considérablement la croissance de nombreux herbivores et agissent également comme répulsifs pour l'alimentation de plusieurs animaux (Herbert 1989, Hanson 2003, Ogawa et Yazaki 2018).

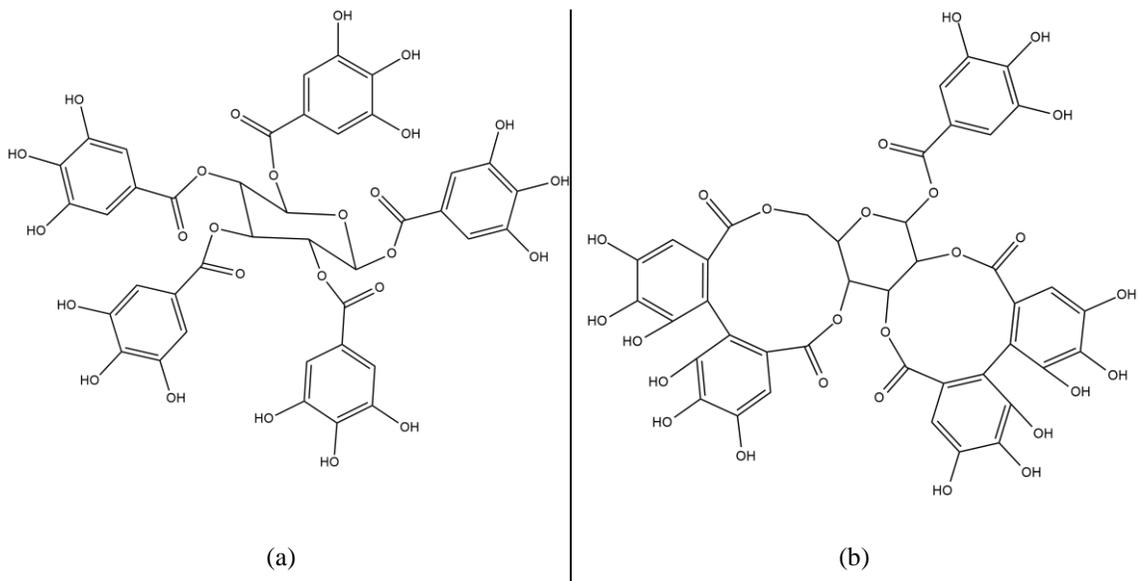


Figure 13 : structures chimiques des tannins hydrolysables.

(a) : structure chimique des gallotanins ; (b) : structure chimique des ellagitanins.

- Les tanins condensés (ou proanthocyanidines, PA) sont des oligomères ou des polymères de flavane-3-ols dérivés de la catéchine. Contrairement aux tanins hydrolysables, les tanins condensés sont beaucoup plus résistants à l'hydrolyse. Cependant, un traitement acide à chaud les transforme en pigments rouges et c'est pour cette raison que les formes dimères et oligomères sont nommés « proanthocyanidines ». Les dimères proanthocyanidines présentent une affinité pour les protéines et ainsi des propriétés tannantes qui augmentent en fonction de la taille moléculaire des polymères. L'enchaînement des unités constitutives se fait soit de manière linéaire via des liaisons C-C, soit par des ramifications par des liaisons C-O-C conduisant à des structures de plus en plus complexes. Les tanins condensés sont très abondants dans de nombreux fruits (fraise, pomme, prune...) (Herbert 1989, Hanson 2003, Harding, Xue et al. 2014, Ogawa et Yazaki 2018). Ils ajoutent un goût d'amertume ou d'astringence distinct chez certains tissus végétaux pour repousser les insectes et les herbivores (Figure 14) (Croteau 2000, Falcone Ferreyra, Rius et al. 2012)

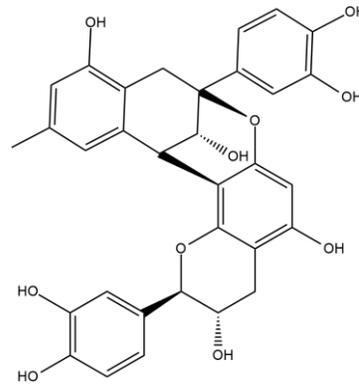


Figure 14 : structure chimique de proanthocyanidol A-1.

➤ Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent la plus grande classe de composés phénoliques avec plus de 9000 représentants différents (Nisar, Wan et al. 2020). Ils sont ubiquitaires chez presque toutes les espèces végétales, souvent trouvés dans les vacuoles. Ils sont principalement des dérivés du 2-phényl-benzo- γ -pyrone. Une partie commune de la structure chimique de tous les flavonoïdes est le squelette carboné basé sur le système flavan : une chaîne de 15 atomes de carbone organisés sous la forme C₆-C₃-C₆ reliant deux cycles aromatiques (A, B) à six atomes de carbone

connectés entre eux par un motif de trois atomes de carbone, qui peut donner naissance à un troisième cycle (C) (Figure 15), formant ainsi une structure phénylbenzopyrane (Marais, Deavours et al. 2006, Symonowicz et Kolanek 2012, Harborne 2013, Brodowska 2017). Les flavonoïdes se présentent sous forme de monomères, de dimères et d'oligomères supérieurs. On les trouve également dans le bois et l'écorce sous forme de mélanges de nombreux composants colorés oligomères et/ou polymères (Croteau 2000, Wang et Mazza 2002, Falcone Ferreyra, Rius et al. 2012).

La synthèse des flavonoïdes se base sur la voie de shikimate (Tripoli, Guardia et al. 2007). Tout comme les acides phénoliques, cette synthèse commence par la formation de *p*-coumaroyl CoA à partir de l'acide *p*-coumarique catalysée par la 4-coumarate-CoA ligase (4 CL). Par la suite, la chalcone synthase catalyse la condensation de trois molécules de malonyl-CoA (anneau A) et d'une molécule 4-coumaroyl-CoA (anneaux B et C) formant ainsi la molécule de chalcone, qui représente l'intermédiaire commun de tous les flavonoïdes. À partir de cette chalcone stéréospécifique, l'enzyme chalcone isomérase catalyse sa cyclisation pour donner une flavanone, conduisant au squelette de flavonoïde commun C₆-C₃-C₆ (Symonowicz et Kolanek 2012, Saito, Yonekura-Sakakibara et al. 2013). Sous l'action de nombreuses enzymes (synthase, réductase, hydroxylase) la flavanone servira par la suite comme composé initial pour la synthèse d'autres classes de flavonoïdes. Dans chaque classe, les molécules sont encore diversifiées par des méthylations avec des O-méthyltransférases, des hydroxylations catalysées par des flavonoïdes 3'-hydroxylases ou des flavonoïdes 3',5'-hydroxylases, des polymérisations avec des laccases, des glycosylations sous l'action des rhamnosyltransférases ou des acylations avec des acyl-CoA transférases (Panche, Diwan et al. 2016, Santos, Maia et al. 2017).

Selon les modifications de la structure des aglycones, ces composés sont regroupés en flavonols, flavones, isoflavonoïdes, flavanols, flavanones, anthocyanes (tels que la cyanidine, la malvidine la pélagonidine, la delphinidine...) et chalcones (Popova et Hinch 2016, Pounis, Di Castelnovo et al. 2016, Brodowska 2017). Les flavonoïdes remplissent des fonctions très différentes chez les plantes, principalement la pigmentation et la défense aux agressions externes. Les flavonols et les flavones protègent les cellules contre l'irradiation UV en s'accumulant dans les couches épidermiques de feuilles et de tiges des plantes, absorbant ainsi la lumière dans la région UV, un rôle parfois attribué au kaempférol. Les isoflavonoïdes sont dérivés d'un intermédiaire de flavonone, la naringénine, un composé omniprésent dans les plantes qui joue un rôle essentiel dans leur croissance et de leur défense contre les pathogènes (Manach, Scalbert et al. 2004). De nombreuses interactions plante-animaux sont influencées par les flavonoïdes. En effet, les

couleurs des fleurs et des fruits, qui fonctionnent souvent pour attirer les agents responsables de la pollinisation et la dispersion de graines, résultent principalement des anthocyanes vacuolaires tels que les cyanidines (magenta et cramoisi), les pélagonidines (orange, saumon, rose, rouge) et les delphinidines (violet, mauve et bleu) (Croteau 2000).

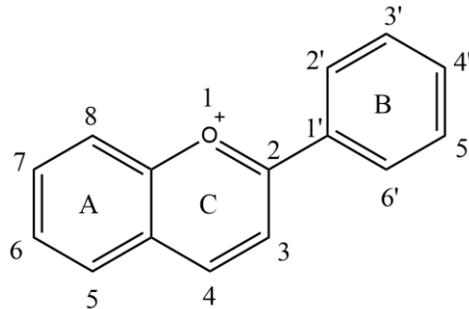


Figure 15 : structure basique des flavonoïdes.

- **Les flavones :**

Les flavones sont l'une des sous-classes les plus importantes de flavonoïdes. Ils sont largement présents sous forme de glucosides, dans les feuilles, fleurs et fruits. Les principales flavones sont l'apigénine et la lutéoline, qu'on trouve dans plusieurs légumes et fruits tels que le brocoli, le céleri, les oranges, la camomille, les carottes, le persil, les choux et les poivrons. Ils sont caractérisés par une double liaison entre les positions 2 et 3, d'une cétone en position 4 du cycle aromatique C et d'un groupe hydroxyle en position 5 du cycle A. En fonction de la classification taxonomique d'un légume ou d'un fruit donné, l'hydroxylation peut avoir lieu soit en position 7 du cycle A soit en position 3' et 4' du cycle B (Figure 16) (Manach, Scalbert et al. 2004).

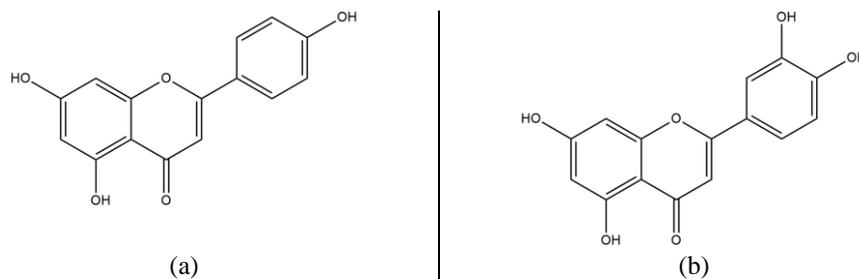


Figure 16 : structures chimiques des flavones.

(a) : structure chimique de l'apigénine ; (b) : structure chimique de la lutéoline.

- **Les flavonols :**

Les flavonols (3-hydroxyflavones) sont caractérisés par un groupe cétone. Cette sous-classe de flavonoïdes est présente également en abondance dans une variété de fruits et légumes (le raisin, la tomate, le brocoli et l'oignon). Les flavonols les plus étudiés sont la quercétine, la myricétine,

le kaempférol et la fisétine. En effet, la seule différence entre les flavonols et les flavones, c'est que le groupe hydroxyle des flavonols est en position 3 du cycle C (Figure 17). Les flavonols possèdent un potentiel antioxydant intéressant et plusieurs activités biologiques, telle que la réduction du risque des maladies cardiovasculaires (Hollman et Katan 1998, Iwashina 2013).

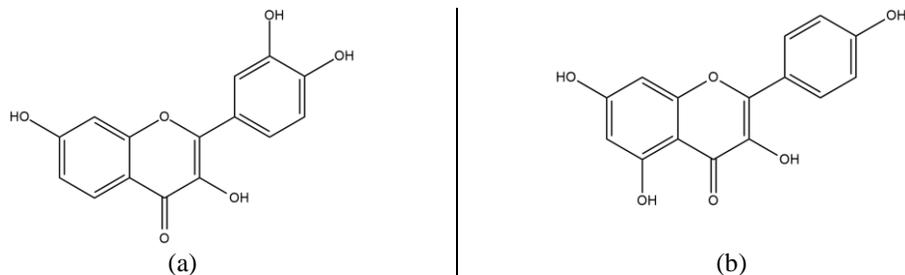


Figure 17 : structures chimiques des flavonols.

(a) : structure chimique de la quercétine ; (b) : structure chimique de la kaempférol.

- **Les flavanones :**

Les flavanones sont principalement présentes dans tous les agrumes (tels que les oranges, les citrons et les raisins) et sont responsables du goût amer du jus et de l'écorce de ces fruits. Parmi ces composés, on cite la naringénine qui se trouve dans le pamplemousse et l'orange aigre, et l'hespéritine, une flavanone caractéristique du citron, de l'orange et du tangelo (Figure 18). Contrairement aux flavones, le cycle C chez les flavanones est saturé ainsi que la double liaison entre les positions 2 et 3, ce qui présente la seule différence structurale entre ces deux sous-groupes de flavonoïdes. Les flavanones sont dotés de nombreuses propriétés anti-radicalaires, antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancéreuses, cardiovasculaires, antivirales, hypocholestérolémiantes et hypolipidémiantes (Iwashina 2013).

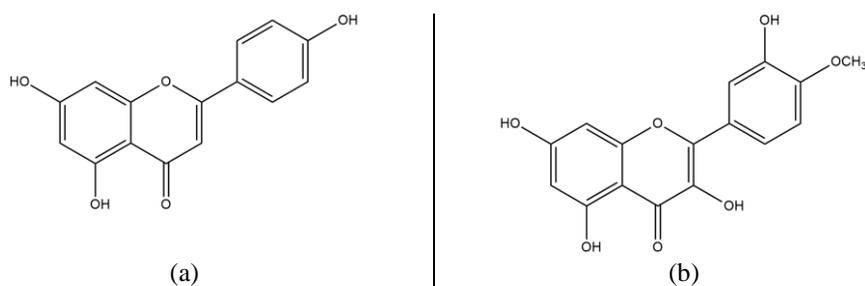


Figure 18 : structures chimiques des flavanones.

(a) : structure chimique de la naringénine ; (b) : structure chimique de l'hespéritine.

- **Les flavanols :**

Les flavanols sont des dérivés 3-hydroxy des flavanones et sont également appelés dihydroflavonols, catéchines ou flavan-3-ols, car le groupe hydroxyle est toujours lié à la position 3 du cycle C. Il s'agit d'un sous-groupe hautement diversifié et très complexe de

polyphénols des monomères flavan-3-ols [tel que la catéchine, la gallocatéchine et l'épicatéchine] aux polymères procyanidines (tels que les tanins condensés) (Figure 19). Les flavanols se trouvent principalement dans les pommes, les bananes, les myrtilles, les poires et les pêches (Panche, Diwan et al. 2016). Les flavanols stimulent les niveaux d'oxyde nitrique dans le sang des fumeurs, réduisant ainsi les altérations liées au tabagisme au niveau des vaisseaux sanguins (Smith 2013).

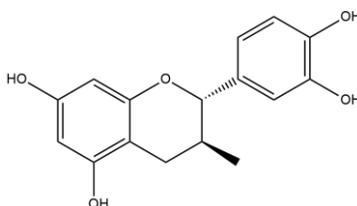


Figure 19 : structure chimique de la catéchine.

- **Les isoflavonoïdes :**

Les isoflavonoïdes sont une sous-classe distinctive et très importante de flavonoïdes. Leur structure chimique est constituée d'un squelette 3-phénylchromène dérivé du squelette 2-phénylchromène par migration aryle. Les isoflavonoïdes se trouvent principalement dans les légumineuses, en particulier, le soja. Les principaux isoflavonoïdes sont la génistéine et la daidzéine (Figure 20), qui existent en quatre structures chimiques apparentées, à savoir les aglycones, les 6'-O-acétylglucosides, les 7-O-glucosides et les 6'-O-malonylglucosides (Clavel, Fallani et al. 2005). Les isoflavonoïdes possèdent un énorme potentiel pour combattre plusieurs maladies cardiovasculaires et ménopausiques, et sont même capables de prévenir le cancer (Aoki, Akashi et al. 2000).

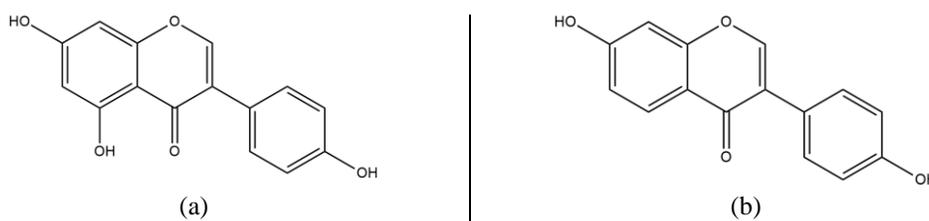


Figure 20 : structures chimiques des isoflavonoïdes.

(a) : structure chimique de la génistéine ; (b) : structure chimique de la daidzéine.

- **Les néoflavonoïdes :**

Les néoflavonoïdes sont un groupe de composés polyphénoliques constitués d'un squelette 4-phénylchromène sans substitution de groupe hydroxyle en position 2. Le calophyllolide (Figure 21) est la première néoflavone isolée à partir de graines de *Calophyllum inophyllum*. Il a été isolé

également de l'écorce et du bois de la plante endémique sri-lankaise *Mesua thwaitesii* (Nishimura, Taki et al. 2000, Garazd, Garazd et al. 2003).

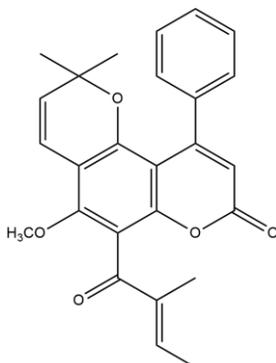


Figure 21 : structure chimique du calophyllolide.

- **Les chalcones et les aurones :**

Les chalcones sont une sous-classe de flavonoïdes caractérisés par l'absence de « cycle C » du squelette des flavonoïdes de base. Ils sont des flavonoïdes à chaîne ouverte ; les deux cycles aromatiques sont liés par un système carbonyle α,β -insaturé à trois atomes de carbone. Les principaux chalcones sont la phloridzine, la phlorétine, l'arbutine et la chalconaringénine (Figure 22).

Les chalcones sont présentes en abondance dans les poires, les tomates, les fraises et les baies d'ours. Les aurones se présentent comme un groupe de type chalcone, toutefois le cycle C est constitué de cinq atomes de carbone au lieu de six. Les chalcones et les aurones ont suscité une attention considérable en raison de leurs avantages nutritionnels et biologiques (Justesen et Knuthsen 2001).

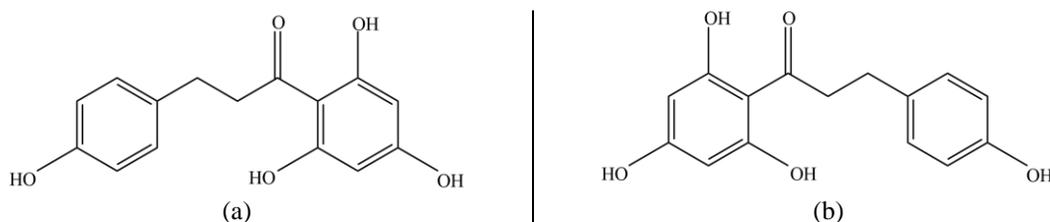


Figure 22 : structures chimiques des chalcones.

(a) : structure chimique de la phlorétine ; (b) : structure chimique de la chalconaringénine.

- **Les anthocyanes :**

Les anthocyanes ou glycosides d'anthocyanidines sont des dérivés glycosylés, polyméthoxy ou polyhydroxy du cation flavylum (2-phénylchroménylium) du flavonol. Ce sont des pigments responsables d'un large spectre de couleurs bleu, rouge, orangé et violet dans les plantes, en particulier les fleurs, les fruits et les tubercules.

En effet, elles sont produites principalement dans les couches cellulaires externes de nombreux fruits notamment, les canneberges, les framboises, les raisins rouges, les fraises, les myrtilles et les mûres. Les anthocyanes se divisent en deux sous-catégories ; les anthocyanes avec une partie sucre qui se présentent sous forme de glycoside et les anthocyanidines qui sont connues sous le nom d'aglycone et sont regroupées en 3-hydroxyanthocyanidines, 3-désoxyanthocyanidines et anthocyanidines O-méthylées.

À ce jour, plus de 700 anthocyanes et anthocyanidines ont été identifiées. Toutefois, les anthocyanes les plus étudiées sont la delphinidine, la cyanidine, la peonidine, la pélagonidine, la pétunidine et la malvidine (Figure 23) (Andersen et Jordheim 2013, Khoo, Azlan et al. 2017). Ces anthocyanidines possèdent le même squelette carboné de base du l'ion flavylum hydroxylé aux positions 3, 5, et 7. Cependant, la diversité structurelle des anthocyanes dépend du nombre, de la position et de degré de méthylation des groupes hydroxyle, du nombre, de la nature et de la position du sucre attaché à l'aglycone ainsi que de groupes aliphatiques et d'acides aromatiques liés à ces sucres (Kong, Chia et al. 2003). La molécule d'anthocyanidine peut se lier à une ou plusieurs molécules de sucres, qui peuvent être acylées ou non par différents acides organiques.

La présence de ces groupements hydroxyles ainsi que d'un ou plusieurs sucres rendent les anthocyanes très solubles dans l'eau, l'éthanol et le méthanol. Cependant, ce sont des composés très instables ; leur stabilité peut être affectée par de nombreux facteurs notamment le pH, la lumière, la température, la présence d'enzymes, la présence d'oxygène, les protéines, les autres flavonoïdes et les ions métalliques (Giusti et Wrolstad 2003, Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández et al. 2009, Khoo, Azlan et al. 2017).

En milieu aqueux, la stabilité des anthocyanes varie avec le pH et leurs structures chimiques, induisant ainsi la formation de plusieurs isoformes structurales. La stabilité optimale des anthocyanes est obtenue à pH acide entre 1 et 3 où elles se présentent sous forme d'ion flavylum de couleur rouge. Avec l'augmentation de pH, les ions flavylum se transforment en formes quinoïdes de couleur bleue, en pseudobase carbinol incolore et en chalcone de couleur jaune (Mazza et Brouillard 1987, Zhao, Chen et al. 2014).

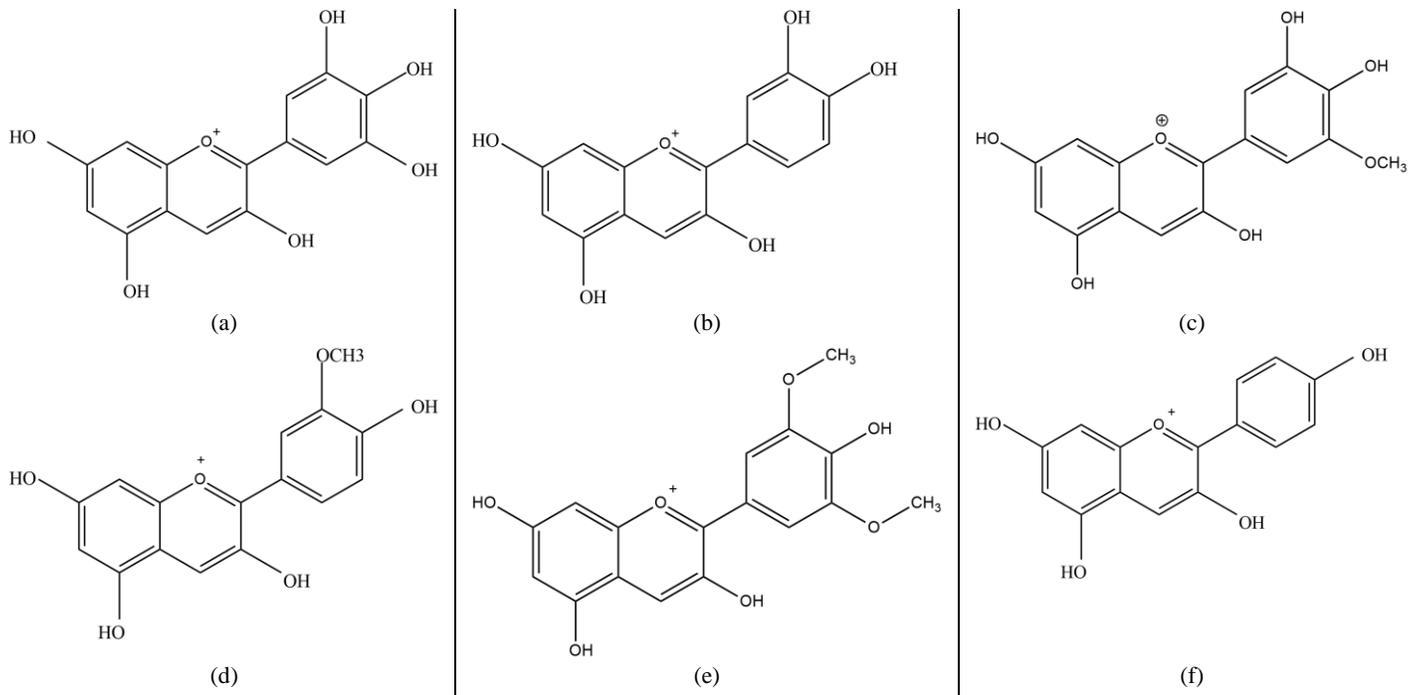


Figure 23 : structures chimiques des anthocyanes.

(a) : structure chimique de la délphinidine ; (b) : structure chimique de la cyanidine ; (c) : structure chimique de la petunidine ; (d) : structure chimique de la peonidine ; (e) : structure chimique de la malvidine ; (f) : structure chimique de la pelargonidine.

Les anthocyanes possèdent un large éventail d'utilisations et d'activités biologiques. En plus d'être utilisées comme colorants dans les industries cosmétiques et agroalimentaires, ils ont été largement étudiés pour leurs potentiels médicaux tels que leurs effets antioxydants, antidiabétiques, anti-inflammatoires, anticancéreux, antimicrobiens, antiviraux et anti-obésité, ainsi que leur pouvoir dans la prévention des maladies cardiovasculaires (MCV) (Mazza et Brouillard 1987, Kalt et Dufour 1997, Kalt, Forney et al. 1999, Castañeda-Ovando, de Lourdes Pacheco-Hernández et al. 2009).

- **Activité antimicrobienne :**

Les anthocyanes possèdent une activité antimicrobienne contre un large éventail de microorganismes. Ainsi, ils inhibent la croissance de nombreux agents pathogènes responsables des altérations dans les produits alimentaires et des infections microbiennes (Cushnie et Lamb 2005). L'activité antimicrobienne des anthocyanes se manifeste selon plusieurs mécanismes, principalement par l'altération de la paroi cellulaire et la membrane intercellulaire (Pojer, Mattivi et al. 2013). Une étude menée a montré que les extraits anthocyanes de baies de maquis avaient une forte activité antibactérienne contre *Aeromonas hydrophilia* et *Listeria innocua*, des bactéries pathogènes généralement associées aux altérations des aliments réfrigérés (Genskowsky,

Puente et al. 2016, Khoo, Azlan et al. 2017). D'autres travaux ont rapporté que l'extrait anthocyane de canneberges possède une activité antibactérienne contre *P. aeruginosa*, *S. aureus*, ERV et *E. coli* (Côté, Caillet et al. 2011). Également, les extraits riches en anthocyanes de framboises, de myrtilles et de fraises inhibent une large gamme des bactéries à Gram négatif, cependant ils n'étaient pas efficaces sur les bactéries à Gram positif étudiées (Puupponen-Pimiä, Nohynek et al. 2001). Ceci peut être due aux différences de la composition de la paroi cellulaire entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif ; la membrane externe des bactéries à Gram négatif agit comme une barrière contre les composés hydrophobes, mais pas contre les composés hydrophiles tels que les anthocyanes (Helander, Alakomi et al. 1998).

➤ **Les stilbènes :**

Plus de 30 stilbènes et glucosides de stilbènes sont présents dans le règne végétal, notamment les resvératrols et les viniférines (Figure 24). Les stilbènes sont composés de deux cycles aromatiques attachés par un pont méthylène (Collin et Crouzet, 2011). Ces composés sont présents dans le raisin en tant que substances induites dans les feuilles et les fruits et des composés constitutifs dans les organes ligneux (racines, tiges), qui agissent comme phytoalexines dans les mécanismes de résistance des plantes contre les agents pathogènes (Bavaresco, Fregoni et al. 1999, Bavaresco 2003, Crouzet 2011).

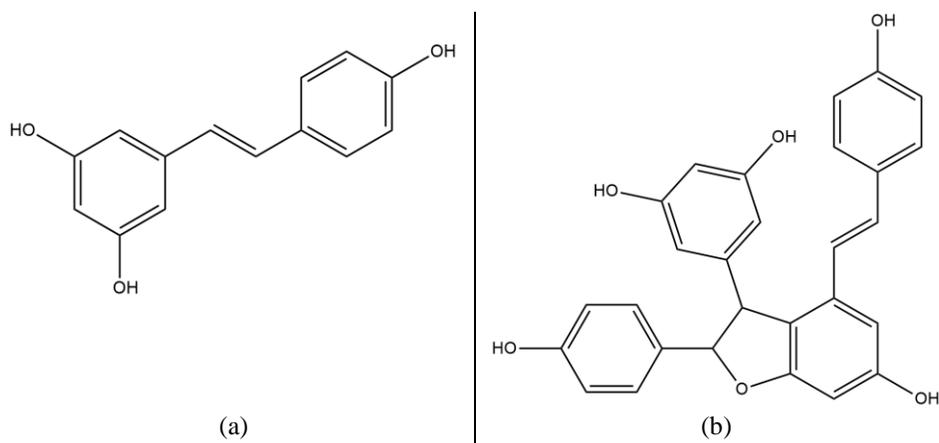


Figure 24 : structures chimiques des stilbènes.

(a) : structure chimique du resvératrol ; (b) : structure chimique de la viniférine.

➤ **Les polykétides :**

Les polycétides ou polykétides sont l'une des familles de composés naturels les plus pharmacologiquement pertinentes dans les plantes et les microorganismes, notamment l'aflatoxine B1 (Figure 25). Les polykétides sont biosynthétisés à partir de précurseurs d'acyl CoA.

En effet, les polykétides synthases (PKS) catalysent la biosynthèse des polykétides via un allongement de la chaîne par une réaction de condensation de la décarboxylase et une cyclisation aboutissant à la formation des polykétides. En fonction de leurs configurations architecturales, les polykétides sont classés en type I, II et III. Les PKS de type III, connus également sous le nom de chalcone synthase-PKS, sont des enzymes condensantes ou dimériques qui agissent principalement de manière itérative. Ces composés utilisent une variété de substrats différents, allant du petit (acétyl-CoA) au substrat volumineux (*p*-coumaroyl-CoA), du substrat aliphatique-CoA au substrat aromatique-CoA, du polaire malonyl-CoA au non polaire isovaléryoyl-CoA, donnant ainsi aux plantes une diversité synthétique et fonctionnelle exceptionnelle (Simpson 1995, Staunton et Weissman 2001, Buchholz, Kittendorf et al. 2008).

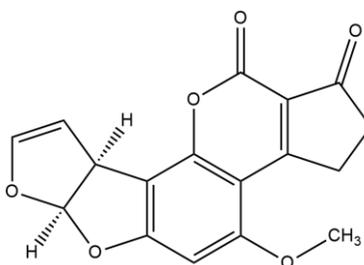


Figure 25 : structure chimique de l'aflatoxine B1.

2.2.2.2. Terpénoïdes :

Les terpénoïdes constituent la famille la plus large de métabolites secondaires d'un point de vue structural avec plus de 30 000 composés individuels qui sont tous liés par leur origine biosynthétique à partir d'acétyl-coA ou des intermédiaires glycolytiques. Ces composés sont formés par l'assemblage d'unités pentacarbonées ramifiées dérivées du 2-méthylebutadiène (polymères de l'isoprène), appelées unités isopréniques (C₅)_n (Figure 26) (Degenhardt, Kollner et al. 2009, Oldfield et Lin 2012). Bien que les terpènes soient issus de l'acétyl CoA ou du malonyl CoA, ils ne sont pas spécifiques aux végétaux puisque les sesquiterpènes, les diterpènes et les cholestérols se trouvent chez les animaux. Cependant, la grande diversité des terpénoïdes et stéroïdes chez les végétaux contraste avec celle détectée chez les animaux. En fonction du nombre d'unités structurales d'isoprène à cinq carbones, les terpènes se regroupent en différentes classes :

- Les monoterpènes (C₁₀) : terpènes à dix atomes de carbone contenant deux unités C₅.
- Les sesquiterpènes (C₁₅) : terpènes à 15 carbones contenant trois unités C₅.
- Les diterpènes (C₂₀) : terpènes à 20 atomes de carbone contenant quatre unités C₅.
- Les sesterterpènes (C₂₅).

- Les triterpènes (C_{30}).
- Les tétraterpènes (C_{40}).
- Les polyterpénoïdes ($(C_5)_n$ carbones, où $n > 8$).

Parmi les voies de synthèse des terpènes les plus étudiées, la voie de HMG-CoA réductase. En effet, la condensation de trois unités d'acétyl-CoA via un intermédiaire d'acide mévalonique, conduit à la formation d'isopentényldiphosphate (IPP) qui est isomérisé en diméthylallylpyrophosphate (DMAPP) par l'enzyme isopenténylpyrophosphate isomérase (Tholl 2006, Degenhardt, Kollner et al. 2009, Chen, Tholl et al. 2011). En outre, certains terpènes sont considérés comme des métabolites primaires ayant une fonction bien caractérisée dans le métabolisme des plantes, notamment les cytokinines et les gibbérellines, qui sont des phytohormones. Par ailleurs, les caroténoïdes jouent un rôle essentiel dans la protection de l'appareil photosynthétique des plantes, tandis que leur rôle écologique est la pigmentation. En revanche, les terpènes produits en tant que métabolites secondaires sont impliqués dans la défense contre une large gamme d'insectes et de mammifères, tels que les monoterpènes insecticides pyréthroïdes ainsi que les composés anti-herbivores limonoïdes (Tholl 2006, Kirby et Keasling 2009, Mewalal, Rai et al. 2017).

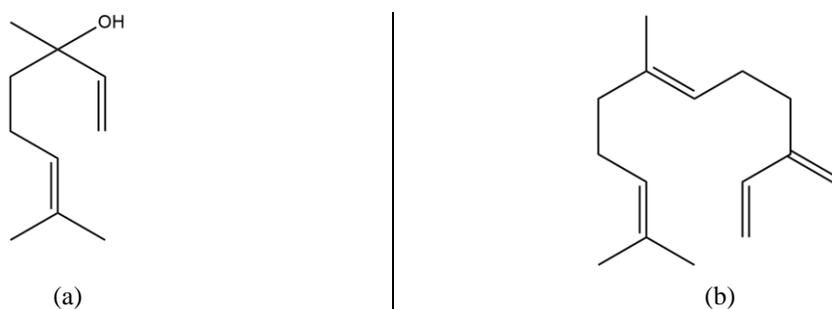


Figure 26 : structures chimiques des terpénoïdes.

(a) : structure chimique du monoterpène (linalool) ; (b) : structure chimique du sesquiterpène (farnésène).

2.2.2.3. Alcaloïdes :

Environ 20 % des espèces de plantes à fleurs produisent des alcaloïdes, chacune en fonction d'un modèle unique et prédéfini. Les alcaloïdes sont des composés végétaux azotés basiques pharmacologiquement actifs ; l'atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique (Croteau 2000). Les structures chimiques des alcaloïdes sont très complexes rendant les études sur leur biosynthèse très difficile. En revanche, la plupart des alcaloïdes sont biosynthétisés à partir d'acides aminés courants, en particulier la lysine, l'acide aspartique, la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine. En effet, plusieurs études ont montré qu'une ou deux transformations

sont nécessaires pour convertir ces acides aminés précurseurs en substrats, catalysées par des enzymes fortement stéréo, régio et substrat spécifiques (Croteau 2000, Taiz 2002). En fonction de l'acide aminé précurseur, les alcaloïdes sont classés selon différentes catégories : les alcaloïdes terpénoïdes indoliques, pyrrolizidiniques, tropaniques, isoquinoléiques, acridoniques et quinolizidiniques (Figure 27).

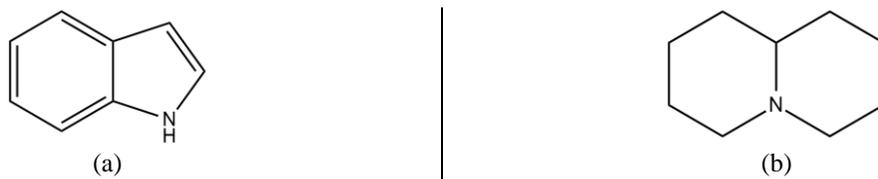


Figure 27 : structures chimiques des alcaloïdes.

(a) : structure chimique des alcaloïdes indoliques ; (b) : structure chimique des alcaloïdes quinolizidiniques.

Ces métabolites secondaires azotés comprennent des défenses contre les infections microbiennes et les attaques d'herbivores, et présentent un intérêt considérable en raison de leur toxicité potentielle pour l'homme et de leurs propriétés médicinales (Taiz 2002). Chez de nombreuses plantes, leur rôle dans le système de défense chimique est supporté par leur large gamme d'effets physiologiques contre les herbivores et répulsifs contre les insectes, ainsi que leur activité antibiotique. Citons l'exemple de la nicotine présent dans le tabac, le premier alcaloïde ayant une activité insecticide utilisée par l'homme. Également, la caféine trouvée dans les graines et les feuilles des plantes de café, de thé et de cacao. Deux catégories d'alcaloïdes ont été étudiées les plus du fait de leurs activités biologiques : les alcaloïdes pyrrolizidiniques et les alcaloïdes quinolizidiniques. En effet, les alcaloïdes pyrrolizidiniques ayant comme précurseur de synthèse l'acide aminé ornithine se caractérisent par la présence du noyau pyrrolizidine dans leurs structures. Ces alcaloïdes sont fréquemment trouvés dans les astéracées et les borraginacées et sont responsables de la toxicité de ces plantes pour les mammifères. Notamment, la sénecionine *N*-oxyde, trouvée dans les racines des plantes du genre *Senecio*, représente un danger pour la santé humaine par l'intoxication du bétail (Aniszewski 2007, Seneca 2007). Cependant, les alcaloïdes quinolizidiniques sont issus de la lysine et se caractérisent par la présence du noyau quinolizidine. Ces alcaloïdes se trouvent principalement chez les plantes du genre *Lupinus* et présentent un effet répulsif aux insectes par la production d'un goût amer (Croteau 2000, Aniszewski 2007).

Outre leur rôle dans le système de défense des plantes contre les agressions externes, les alcaloïdes sont souvent utilisés en médecine humaine. On cite, la codéine qui fait partie de la

catégorie des alcaloïdes isoquinoliniques et qui est considérée comme l'alcaloïde prescrit le plus connu en tant qu'antitussif et analgésique. De même, on cite la morphine (Figure 28), un alcaloïde isoquinolinique fréquemment utilisé en médecine pour ses propriétés analgésiques. La plupart des alcaloïdes sont utilisés comme médicaments, tels que les anti-tumeurs : vincristine et vinblastine. Cependant, certains peuvent être utilisés en tant que substances aromatiques ou comme modèles pour des études pharmacologiques (Verpoorte et Memelink 2002, von Linné 2007, Chida 2011).

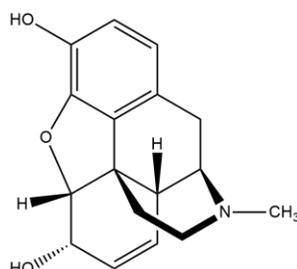


Figure 28 : structure chimique de la morphine.

2.3 Chapitre 3. Méthodes d'extraction des métabolites secondaires

L'extraction des composés bioactifs à partir de plantes peut être décrite comme étant un phénomène de transfert de matière, où les solides solubles contenus dans les cellules végétales migrent vers un solvant sélectif jusqu'à l'équilibre. Dans le processus d'identification de molécules bioactives, cette étape est primordiale puisqu'elle déterminera la nature et la quantité des molécules extraites et ainsi le succès des étapes suivantes. Lors de l'extraction, le solvant diffuse dans la matrice végétale solide et solubilise les métabolites secondaires de polarité similaire. Les produits ainsi obtenus sont des mélanges complexes de métabolites tels que les flavonoïdes, les alcaloïdes, les terpénoïdes, les glycosides et les lignanes (Azmir, Zaidul et al. 2013, Joana Gil-Chávez, Villa et al. 2013).

Les techniques d'extraction des molécules bioactives peuvent être classées en deux catégories (Cheek, Salman et al. 2014) :

- Les techniques conventionnelles sont basées sur la capacité de solubilisation de soluté dans le solvant. Ces techniques se résument en extraction par macération, reflux, Soxhlet ou la combinaison de ces techniques. Cependant, ces méthodes conventionnelles peuvent entraîner la dégradation des métabolites à cause des températures élevées et de la durée d'extraction. Elles nécessitent souvent une grande quantité de solvant pour extraire le soluté

désiré ce qui induit inévitablement un impact significatif sur l'environnement, l'atmosphère et la santé humaine, ainsi que sur les coûts que peut engendrer le traitement de ces déchets toxiques. Afin de résoudre ces problématiques, plusieurs nouvelles approches ont été développées (Wang et Weller 2006, Sasidharan, Chen et al. 2011).

- Les nouvelles techniques ou techniques vertes sont des méthodes ayant plus d'efficacité en une plus courte durée et utilisent des matières premières renouvelables, engendrant par conséquent moins de pollution. Ces techniques se résument essentiellement en extraction assistée par microonde, extraction assistée par ultrasons, extraction accélérée par solvant et extraction par fluide supercritique (Wang et Weller 2006, Azmir, Zaidul et al. 2013). En effet, ces nouvelles techniques consistent à combiner l'extraction conventionnelle avec d'autres facteurs accélérant l'extraction (Chemat, Vian et al. 2009, Vorobiev, Lebovka et al. 2011) pour pallier la dégradation, intensifier l'opération d'extraction et améliorer le rendement d'extraction.

En outre, ces méthodes d'extraction ont été améliorées grâce à l'addition des étapes de traitement préparatoires telles que l'extraction assistée par enzyme ou la chute de pression contrôlée instantanée, qui permet d'aider la libération des composants de la matrice (Joana Gil-Chávez, Villa et al. 2013).

2.3.1. Extraction conventionnelle par solvant (ECS) :

L'extraction conventionnelle par solvant est la voie la plus utilisée pour l'extraction des composés bioactifs. Pour optimiser cette voie et augmenter le rendement d'extraction, plusieurs paramètres doivent être pris en compte, notamment le type et la concentration du solvant organique, la température et la durée d'extraction. En effet, le solvant est choisi pour sa capacité de dissolution, c'est-à-dire la solubilité des composés ciblés dans ce solvant. Également, il doit être sélectif, extrayant principalement des composés apparentés de la matrice végétale. Par ailleurs, la polarité du solvant est un critère sélectif en fonction de son affinité aux composés ciblés, c.-à-d. que les solvants polaires ont plus d'affinité pour les composés polaires et vice versa. Dans certains cas, un mélange de plusieurs solvants peut être utilisé afin d'obtenir des propriétés qu'un seul solvant ne peut pas générer.

À l'échelle du laboratoire, l'eau, l'acétate d'éthyle, l'hexane (ou les hexanes), le chloroforme, l'éther, le dichlorométhane, l'acétone et les alcools tels que l'éthanol et le méthanol sont des solvants fréquemment utilisés, seuls ou en mélanges, offrant une large gamme de polarité. En

effet, l'eau représente un solvant universel très souvent utilisé dans les procédés d'extraction des phytocomposés.

Comme la plupart des composés organiques (aromatiques ou insaturés) bioactifs, isolés à partir des matrices végétales sont relativement peu polaires, ils sont initialement extraits à l'aide des alcools (éthanol ou méthanol) et purifiés par la suite (Cowan 1999). Les alcools facilitent la libération des composants intracellulaires des cellules végétales de fait qu'ils sont efficaces dans la dégradation des parois cellulaires. Les flavonoïdes sont fréquemment extraits par de l'éthanol aqueux (70 %, v/v) en raison de la polarité plus élevée du mélange eau/éthanol que de l'éthanol pur. Cependant, le méthanol est utilisé souvent pour l'extraction de composants de polarité plus élevée tels que les polyphénols. Toutefois, l'acétone solubilise de nombreux composants hydrophiles et lipophiles, et est généralement appliquée dans les procédés d'extraction des composés phénoliques. L'éther diéthylique est principalement utilisé pour l'extraction des coumarines et des lipides non polaires. En revanche, les terpénoïdes sont généralement dissouts dans des solvants moins polaires tels que le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle. Par ailleurs, les lactones terpénoïdes sont extraites par l'hexanes, suivies d'un mélange de solvants (chloroforme-méthanol) (Cowan 1999, Khoddami, Wilkes et al. 2013). Le tableau 1 résume les principales familles des métabolites secondaires extraites par différents solvants chimiques (Cowan 1999).

Tableau 1 : les principaux solvants utilisés pour l'extraction de divers composés bioactifs.

Solvants	Eau	Éthanol	Méthanol	Chloroforme
Composés solubles				
Anthocyanes	X		X	
Tanins	X	X	X	
Polyphénols	X	X	X	
Saponines	X		X	
Flavonoïdes	X	X	X	X
Terpénoïdes	X	X	X	X
Alcaloïdes		X		X

La plupart de ces techniques sont basées sur le pouvoir d'extraction des solvants utilisés sans et/ou sous l'effet de la chaleur et/ou d'agitation. Les techniques conventionnelles d'extraction des

composés bioactifs sont : l'extraction au Soxhlet, la macération et l'hydrodistillation (Azmir, Zaidul et al. 2013, Cheok, Abdelkarim et al. 2014).

2.3.1.1. L'extraction par Soxhlet :

Le principe de fonctionnement de l'extraction par reflux ou par Soxhlet est le même, il se base sur un procédé de distillation qui est largement utilisé dans les laboratoires et les industries alimentaires et non alimentaires. Ce processus consiste à chauffer une solution à ébullition puis à envoyer les vapeurs condensées dans le ballon d'origine. La seule différence entre les deux techniques d'extraction est l'emplacement de la matière végétale dans une cartouche séparée pour le Soxhlet et en mélange avec le solvant dans un ballon pour le reflux (Figure 29). En effet, l'extracteur Soxhlet date de 1879 et représente un modèle de référence pour la comparaison de nouvelles alternatives d'extraction des métabolites secondaires. Généralement, une petite quantité de matrices végétales sèches est placée dans une cartouche en cellulose qui sera placée par la suite dans un ballon de distillation contenant le solvant choisi. Après avoir atteint l'ébullition, la solution du solvant riche en composés solubles s'évapore et passe à travers le réfrigérant, où, le refroidissement par le circuit d'eau froide entraîne sa condensation dans le condenseur. Les gouttes tombent ainsi vers le ballon. Les solutés extraits dans cette solution restent dans le ballon de distillation alors que le solvant retourne à la matrice végétale. Ce processus s'exécute en continu jusqu'à la fin de l'extraction. L'inconvénient des extractions Soxhlet et à reflux se manifeste par la longue durée nécessaire pour une extraction.

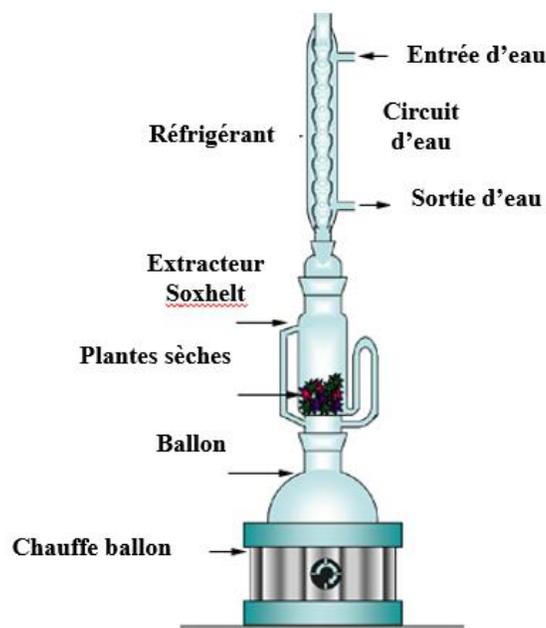


Figure 29 : diapositif d'extraction par Soxhlet.
D'après (Blanchart et Lauvergne 2003).

2.3.1.2. La macération :

La macération est une méthode d'extraction solide-liquide où le composé bioactif intracellulaire (soluté) est extrait en trempant la matrice végétale dans un solvant spécifique pendant une durée bien déterminée. En effet, l'efficacité du processus de macération est déterminée en fonction de deux facteurs principaux, la solubilité et la diffusion. La vitesse de dissolution des solutés dans le solvant d'extraction est déterminée par la vitesse de transfert de masse des solutés de la matrice végétale vers le solvant. Ce transfert des solutés se produit avec une diffusion efficace, en raison du gradient de concentration à l'interface solide-liquide. La macération comprend généralement plusieurs étapes (Figure 30). Tout d'abord, la matrice végétale est broyée afin d'augmenter la surface de contact avec le solvant. Par la suite, le solvant choisi est ajouté dans un récipient fermé et laissé en repos ou sous agitation. Ensuite, le liquide est filtré, mais le résidu solide dit le marc est pressé pour récupérer une plus grande quantité de solutions occluses. Et enfin, le liquide filtré et pressé obtenu est filtré de nouveau. La macération est le choix le plus fréquent des chercheurs vu sa simplicité. Cependant, la durée d'extraction par macération est longue et peut parfois prendre des semaines, par conséquent, cette technique est souvent assistée par agitation mécanique ou magnétique pour raccourcir le temps d'extraction.

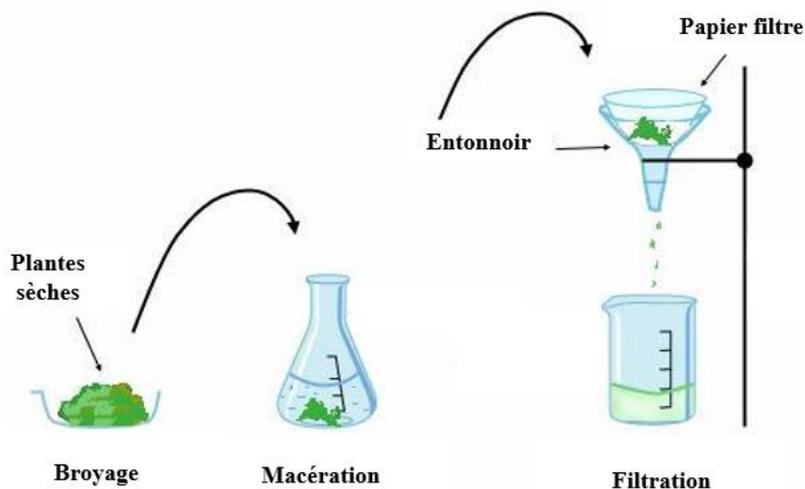


Figure 30 : diapositif d'extraction par macération. D'après (Crevier 2014).

2.3.1.3. L'hydrodistillation :

L'hydrodistillation est une technique traditionnelle d'extraction des composés organiques bioactifs et des huiles essentielles des plantes, sans implication des solvants organiques. Tout d'abord, la matrice végétale est placée dans un compartiment immobile, par la suite, une quantité suffisante d'eau est ajoutée et le mélange est porté à ébullition (Figure 31). De la vapeur directe est injectée,

alternativement, dans l'échantillon. La combinaison d'eau chaude et de vapeur agit comme le principal facteur de pression pour la libération des composés bioactifs et de l'huile des tissus végétaux. Ensuite, le refroidissement indirect par le circuit d'eau froide entraîne la condensation du mélange vapeur d'eau et d'huile. Ce mélange s'écoule du condenseur vers un séparateur où les composés bioactifs et l'huile se séparent automatiquement de l'eau. L'hydrodistillation implique principalement trois processus physico-chimiques ; l'hydrodiffusion, l'hydrolyse et la décomposition par la chaleur. L'extraction à des températures élevées dégrade les composants volatils ce qui limite l'utilisation de cette technique dans l'extraction de composés thermolabiles.

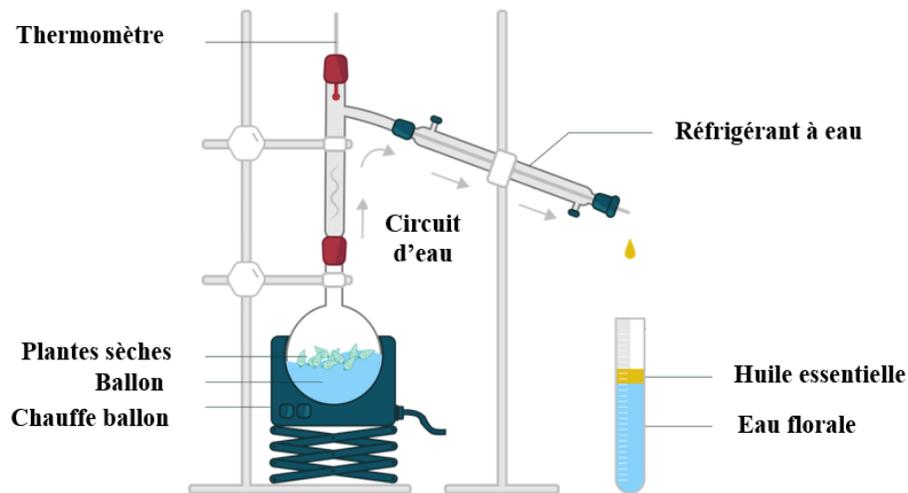


Figure 31 : diapositif d'extraction par hydrodistillation. D'après (Schoolmouv 2020).

2.3.2. Les méthodes d'extraction non conventionnelles :

Les principaux défis de l'extraction conventionnelle se traduisent par la durée d'extraction, la nécessité des grandes quantités de solvants coûteux et de haute pureté, la faible sélectivité d'extraction et la dégradation thermique des composés thermolabiles. En effet, afin de surmonter ces limites, de nouvelles techniques d'extraction prometteuses sont introduites, dites les techniques d'extraction innovantes ou non conventionnelles. Notamment, l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction assistée par microonde, l'extraction assistée par enzymes, l'extraction assistée par champ électrique pulsé, l'extraction de liquide sous pression et l'extraction de fluide supercritique (Luque de Castro et García-Ayuso 1998, Azmir, Zaidul et al. 2013, Cheok, Abdelkarim et al. 2014).

2.3.2.1. Extraction assistée par ultrasons (EAU) :

L'ultrason est un type particulier d'ondes sonores habituellement de 20 kHz à 100 MHz, au-delà de l'audition humaine. Le phénomène des ultrasons consiste à la création des bulles de cavitation dans le solvant d'extraction, qui entraînent la dénaturation de la paroi cellulaire lorsqu'elles s'effondrent à une fraction rare, ce qui augmente le rendement d'extraction des composés bioactifs. Sous l'effet de la conversion de l'énergie cinétique du mouvement en chaleur, les bulles ont une température d'environ 5 000 K et une pression de 1 000 atm. En effet, le mécanisme d'extraction assistée par ultrasons implique deux types principaux de phénomènes physiques : la diffusion à travers la paroi cellulaire et le rinçage du contenu intracellulaire.

L'efficacité de l'extraction dépend de plusieurs facteurs, tels que la teneur en humidité de l'échantillon, la taille des particules, le degré de mouture et le solvant choisi, ainsi que la pression, la fréquence et la température de la sonication. Les EAU ont été également combinées avec diverses techniques classiques afin d'améliorer l'efficacité des systèmes conventionnels. Par ailleurs, un appareil à ultrasons peut être placé dans une position appropriée dans un système d'extraction par solvant, pour améliorer l'efficacité de l'extraction (Figure 32).

Le principal avantage des extractions assistées par ultrasons est l'application de l'énergie ultrasonore qui facilite la lixiviation des composés bioactifs de la matrice végétale. Également, la réduction de la durée d'extraction, de l'énergie et de la quantité de solvant utilisé représentent des avantages par rapport aux méthodes conventionnelles.

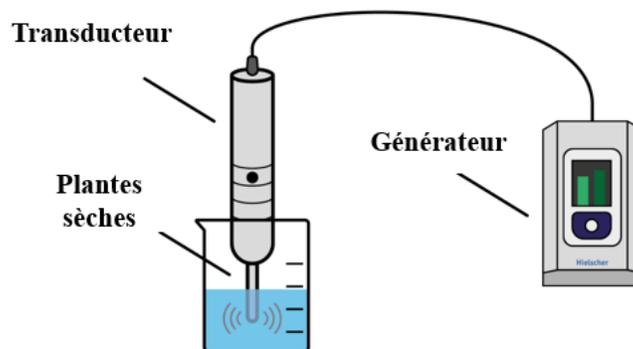


Figure 32 : diapositif d'extraction par ultrasons. D'après (Imlab 2020).

2.3.2.2. Extraction assistée par micro-ondes (EAM) :

Les microondes sont des champs électromagnétiques non ionisants ayant une gamme de fréquences de 0,3 à 300 GHz, qui sont capables de pénétrer dans les cellules végétales et de

générer de la chaleur en interagissant avec des molécules polaires notamment de l'eau continue dans les cellules. En effet, sous l'action des phénomènes de conduction ionique et de rotation dipolaire, l'énergie électromagnétique est convertie en chaleur. Au cours de la conduction ionique, la résistance d'écoulement du fluide, génère de la chaleur. Également, le changement constant des signes de champ entraîne le changement de direction des ions induisant ainsi une collision entre les molécules et générant par conséquent de la chaleur.

En absorbant l'énergie micro-onde, cette eau surchauffe et induit la perturbation de la structure cellulaire, ce qui facilite par conséquent la diffusion des composés bioactifs à travers la matrice végétale. L'efficacité de cette technique dépend de l'effet des micro-ondes sur le solvant d'extraction et sur la paroi cellulaire de la matrice végétale. La profondeur de pénétration des micro-ondes dans la matrice végétale dépend de plusieurs facteurs, notamment la teneur en humidité, la température, la constante diélectrique et la fréquence du champ électrique (Figure 33).

Les avantages que l'extraction assistée par micro-ondes présentent sont la courte durée d'extraction, son mécanisme de chauffage spécial ainsi que l'utilisation minimale de solvants. Cette technique permet d'augmenter le rendement d'extraction des composés bioactifs par rapport aux procédés d'extraction conventionnels. Il s'agit d'une technique sélective pour l'extraction des composés organiques et organométalliques plus intacts (Heng, Tan et al. 2013, Vardanega, Santos et al. 2014).

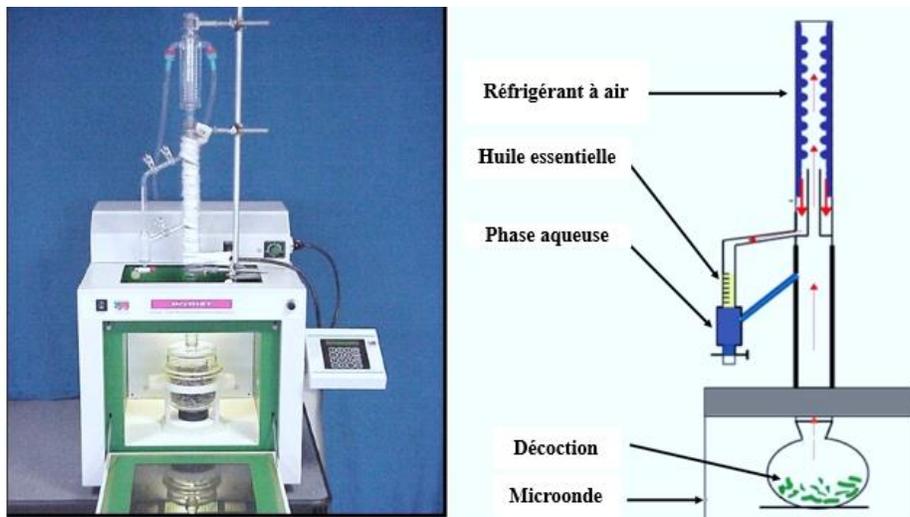


Figure 33 : diapositif d'extraction assistée par microonde. D'après (El Haib 2018).

2.3.2.3. Extraction assistée par enzyme (EAE) :

La plupart des composés phytochimiques sont dispersés dans le cytoplasme cellulaire, cependant, d'autres sont retenus dans le réseau polysaccharide-lignine par des liaisons hydrogènes ou hydrophobes et sont inaccessibles au solvant d'extraction. L'extraction assistée par un prétraitement enzymatique, c.-à-d. par l'ajout des enzymes spécifiques des polysaccharides structuraux tels que l' α -amylase, la cellulase et la pectinase, est une technique efficace pour la libération de ces composés et l'augmentation du rendement d'extraction global (Figure 34).

Deux approches principales sont utilisées, l'extraction aqueuse assistée par enzymes (EAAE) et la pression à froid assistée par enzymes (EAPF). L'efficacité de ces méthodes dépend de divers facteurs, notamment l'enzyme utilisée et sa concentration, la taille des particules des matrices végétales à traiter, le rapport solide/eau ainsi que le temps d'hydrolyse ou d'exposition entre l'enzyme et la biomasse (Azmir, Zaidul et al. 2013, Cheok, Abdelkarim et al. 2014).

Également, la teneur en humidité des matrices végétales est un facteur important pour l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique. En effet, l'EAPF présente une alternative idéale pour l'extraction des composants bioactifs des graines oléagineuses grâce à ses propriétés non toxiques et non inflammables (Domínguez, Núñez et al. 1995). En revanche, l'EAAE est reconnue comme une technologie « verte » et respectueuse de l'environnement car elle utilise l'eau comme solvant au lieu des produits chimiques organiques dans les procédés d'extractions des composés bioactifs et du pétrole (Puri, Sharma et al. 2012).

Cette approche permet un meilleur rendement que les méthodes d'extraction par solvants chimiques et présente l'avantage d'une plus courte durée d'extraction et des quantités plus faibles de solvants (Azmir, Zaidul et al. 2013). L'utilisation d'un mélange d'enzymes pectinolytiques et cellulolytiques entraîne l'augmentation des rendements par rapport à l'extraction assistée par sulfites (Meyer, Jepsen et al. 1998). Cependant, les enzymes sont très coûteuses et dépendent de la souche de microorganisme productrice.

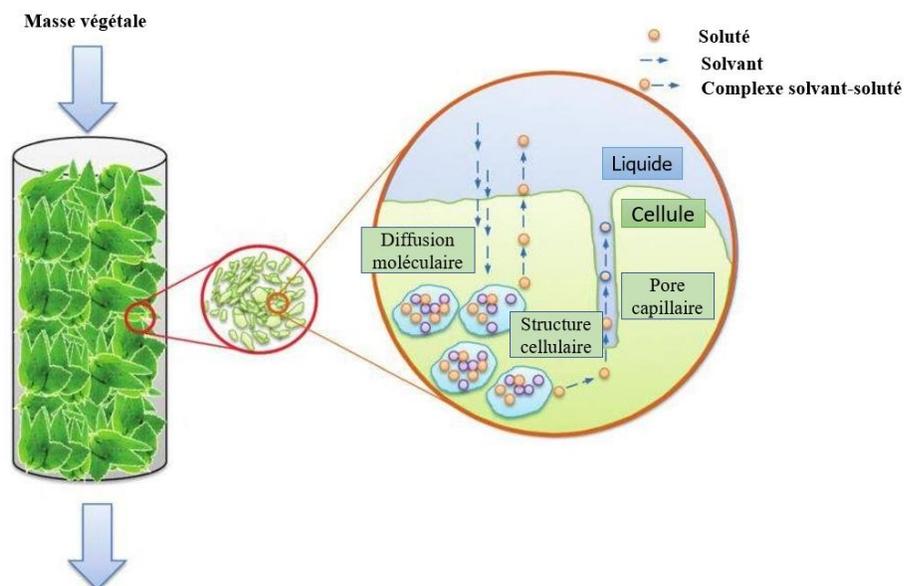


Figure 34 : diapositif d'extraction assisté par enzyme.
D'après (Puspita 2017).

2.3.2.4. Extraction assistée par fluide supercritique (SFE) :

L'extraction par fluides supercritiques (EFS) a été présentée par Zosel comme technique de décaféination du café (Zosel 1964). Depuis, cette technique a suscité un large intérêt scientifique et a été utilisée comme approche d'extraction des composés naturels. En effet, l'état supercritique est un état distinctif qui ne peut être atteint que si le fluide utilisé est soumis à une température et une pression au-delà de son point critique. Ce point critique se définit comme la pression caractéristique (P_c) et la température caractéristique (T_c) au-dessus desquelles l'état gazeux n'est plus distingué de l'état liquide.

À l'état supercritique, les propriétés spécifiques du gaz et/ou du liquide disparaissent, ce qui fait que les fluides supercritiques possèdent les propriétés d'un gaz (viscosité, diffusion et surface de tension) et celles d'un liquide (pouvoir de solvation et densité), ce qui signifie qu'il ne peut pas être liquéfié en modifiant la température et la pression. En raison de ces propriétés, les fluides supercritiques permettent une meilleure extraction de métabolites dans une durée plus courte avec des rendements plus élevés que les méthodes conventionnelles. La figure 35 présente un montage typique de l'instrumentation EFS.

L'utilisation de dioxyde de carbone dans la EFS permet de travailler à des températures proches de la température ambiante (31 °C) et à une basse pression critique (74 bars), ce qui limite la dégradation des composés volatils. Cependant, le dioxyde de carbone est de faible polarité ce qui le rend idéal pour les lipides mais inconvenients pour la plupart des composés

pharmaceutiques. En revanche, l'utilisation des modificateurs chimiques tel que le dichlorométhane peut surmonter la limitation de la faible polarité du dioxyde de carbone. L'efficacité de l'extraction des composés bioactifs par les fluides supercritiques dépend de plusieurs paramètres réglables qui doivent être contrôlés avec précision, notamment la température, la pression, la taille des particules, la teneur en humidité de la matrice végétale, la durée d'extraction, le débit de fluide supercritique et le rapport solvant/charge.

L'extraction par fluide supercritique présente plusieurs avantages, tels que, la réduction du temps d'extraction, l'augmentation du rendement d'extraction par le reflux continu du fluide supercritique vers la matrice végétale, l'amélioration de la pureté de l'extrait grâce à la sélectivité du fluide supercritique, l'extraction de composés thermolabiles et la réutilisation du fluide supercritique ce qui limite la production de déchets et préserve l'environnement. Cependant, les coûts d'investissements d'un dispositif d'extraction par fluide supercritique sont relativement élevés par rapport aux méthodes conventionnelles.

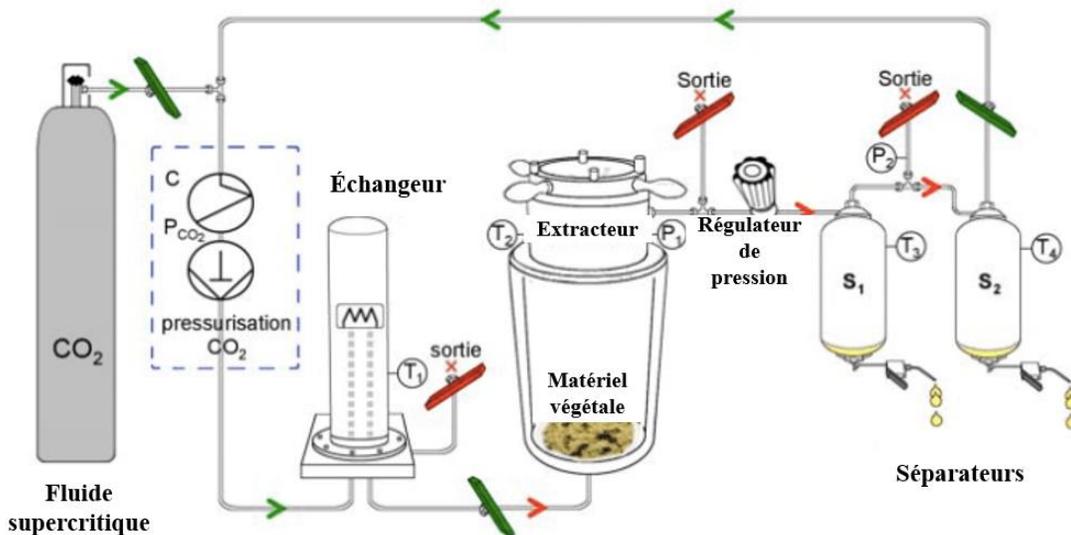


Figure 35 : montage d'extraction assistée par CO₂ supercritique.
D'après (Peterson et al. 2006).

3 PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DU PROJET

3.1 Problématique du projet :

Au cours du 20^e siècle, l'antibiothérapie a réduit considérablement l'impact des maladies infectieuses. Cependant, l'utilisation excessive des antibiotiques, au fil des ans, et l'absence de découverte des nouvelles classes d'antibiotiques ont induit l'apparition et l'augmentation des phénotypes multirésistants chez un grand nombre de microorganismes dans les hôpitaux et les communautés. Les infections causées par ces pathogènes multirésistants engendrent des complications du traitement et peuvent parfois même causer la mort du patient. Il s'agit d'un problème de santé de préoccupation mondiale, dont les conséquences sont lourdes au niveau social et sur le plan économique.

Dans ce contexte, le développement de nouveaux agents antimicrobiens alternatifs aux antibiotiques conventionnels est urgent afin de combattre ce problème de résistance microbienne qui augmente avec un rythme alarmant. Ainsi l'énorme défi posé par la résistance bactérienne aux antibiotiques serait bien servi par la découverte et le développement d'une nouvelle vague d'agents antibactériens naturels, afin d'éviter le début d'une époque post-antibiotique dans laquelle les infections banales pourraient devenir de nouveau fatales.

3.2 Hypothèse :

En se basant sur la littérature scientifique menée jusqu'à présent, les fruits présentent une riche source de métabolites secondaires dotés de propriétés antimicrobiennes potentielles. Ces composés naturels présentent le pilier de la découverte des agents antimicrobiens depuis les débuts de l'ère des antibiotiques, cependant l'exploitation de ressources naturelles précieuses a été pratiquement abandonnée par les principaux acteurs pharmaceutiques au profit de la chimie combinatoire et de synthèse (Balouiri, Sadiki et al. 2016).

À l'heure actuelle, l'application des molécules bioactives naturelles isolées des extraits de plantes et fruits, en tant que médicaments ou compléments alimentaires pour lutter contre l'émergence accrue de la résistance aux antibiotiques, constitue une alternative intéressante. Notamment, les extraits de fruits rouges, qui peuvent être une source potentielle de composés bioactifs. Ceci nous a amenés à nous pencher sur l'étude des activités antimicrobiennes d'une gamme de 16 espèces différentes de fruits endémiques de la forêt boréale québécoise qui sont tous retrouvés à l'état

sauvage dans la région du Saguenay-Lac-St-Jean. En effet, les petits fruits sont de plus en plus populaires dans le régime alimentaire quotidien, sous forme de fruits frais, séchés, congelés ou en conserve tels que les confitures, les yogourts, les jus et les vins. Les petits fruits procurent de nombreux bénéfices considérables pour la santé en raison de leur haute teneur en métabolites secondaires, notamment les anthocyanes, les flavonoïdes, les acides phénoliques, les tanins ainsi que les terpènes, qui peuvent être dotés d'activité antimicrobienne contre les souches multirésistantes.

3.3 Objectif général :

L'objectif général de cette étude est d'exploiter le potentiel antimicrobien d'une gamme de fruits sauvages contre un large éventail des microorganismes, afin d'identifier des candidats antimicrobiens d'origine naturelle.

3.4 Objectifs spécifiques :

Plus précisément, ce projet implique :

- L'extraction des métabolites secondaires des fruits par trois différents solvants (méthanol, éthanol, chloroforme).
- La détermination de l'activité antimicrobienne de tous les extraits contre une gamme de 22 souches des bactéries Gram positif et Gram négatif, deux souches de levures et sept souches de champignons.
- La caractérisation phytochimique de l'extrait le plus actif (la chromatographie sur couche mince, la chromatographie sur colonne de silice, la chromatographie en phase liquide à haute performance et la résonance magnétique nucléaire).

Pour appréhender la démarche technique de ce projet, la méthodologie adoptée sera présentée dans la partie « matériels et méthodes » du mémoire.

4 MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.1 Matériel végétal :

4.1.1 Échantillonnage des plantes :

➤ Récolte :

Les fruits de 16 espèces végétales ont été récoltés au hasard au sein de zones sauvages de la forêt boréale, dans différents endroits de la sous-région du Lac-Saint-Jean durant le mois de juillet 2018 et le mois d'août 2019. Le matériel végétal a été échantillonné au hasard ; 12 échantillons ont été récoltés à Péribonka, trois échantillons à Dolbeau-Mistassini et un échantillon à St-Henri-de-Taillon (Figures 36 et 37).

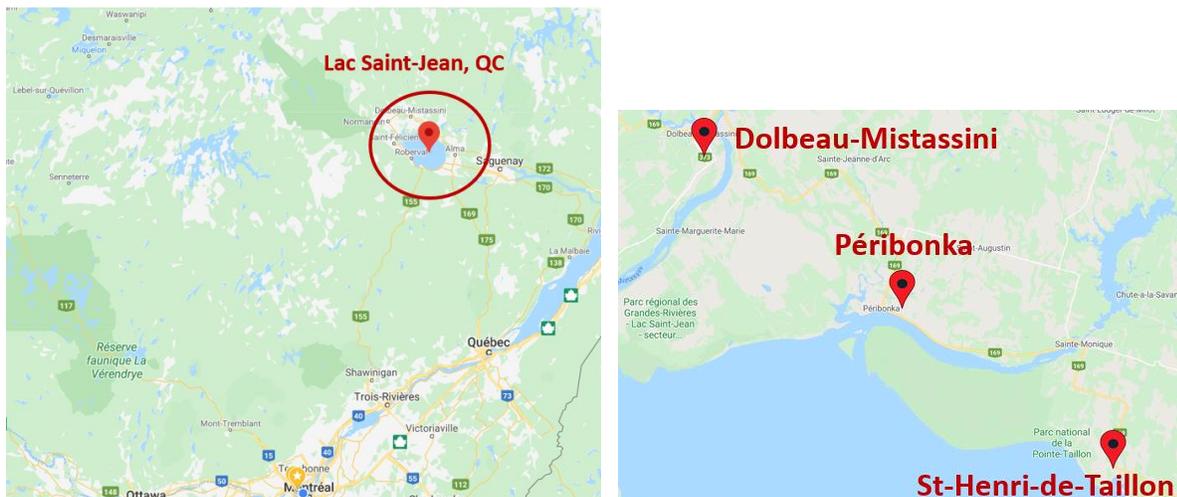


Figure 36 : représentation géographique des lieux de récolte des fruits et des spécimens.



Figure 37 : photo de la tourbière Ptarmigan à Dolbeau-Mistassini.

4.1.2 Préparation des herbiers :

Des spécimens de référence des plantes entières ont été récoltés afin de préparer des herbiers en suivant les indications de guide de l'herbier Marie-Victorin de département des sciences végétales de l'Université de Montréal.

La cueillette de spécimens a été réalisée tout en respectant la propriété privée et les lois qui régissent les parcs, les réserves naturelles et les zones de conservation. Les plantes ont été cueillies au plus complet possible, avec les organes végétatifs et reproducteurs tels que les racines, la tige, les feuilles et les fleurs ou les fruits afin de faciliter et d'accélérer le processus d'identification des espèces végétales.

Les spécimens ont été étiquetés, étalés à l'intérieur des chemises de papier journal et placés dans un milieu sec sous pression d'un fort poids pour quelques jours. Une fois les spécimens bien séchés, ils ont été montés par de petites bandes de ruban gommé sur un carton blanc de 29 cm × 42 cm (format A3) ; les étiquettes ont été placées dans le coin inférieur droit du carton en appliquant un adhésif liquide, tout en évitant de masquer ou de coller les organes essentiels à l'identification. Par la suite les spécimens ont été rangés à l'obscurité, à l'abri des insectes, pour une semaine, et ont été envoyés au service d'identification des herbiers de département des sciences végétales de l'Université de Montréal.

4.1.3 La nomenclature des échantillons :

Les espèces végétales testées dans ce projet ont été toutes assignées à un code voucher par l'herbier Marie-Victorin du Département des sciences végétales de l'Université de Montréal, qui leur permet d'être clairement identifiées et de faciliter leur traçage. Le code commence par les deux lettres du nom de l'herbier suivi de numéros de spécimens de l'espèce dans leur collection. De plus, des codes uniques ont été attribués pour chaque espèce au laboratoire ce qui a permis de faciliter la collecte des données.

Ces codes commencent toujours par les initiales de l'espèce végétale suivie de quatre chiffres de l'année de récolte. Les chiffres qui suivent correspondent à l'ordre d'élution du fractionnement. Le tableau 2 présente toutes les espèces végétales récoltées, leurs codes, les lieux et les années de récolte.

Tableau 2 : les données ethnobotaniques des fruits testés.

Nom commun	Nom latin	Famille	Code voucher	Code des fruits	Lieux de récolte (Québec)	Coordonnées GPS	Année de récolte
Framboises	<i>Rubus idaeus</i> subsp. <i>strigosus</i>	<i>Rosaceae</i>	MT-261413	RI2018	Péribonka	48°46'24.5"N 72°02'39.8"W	2018
Bleuets	<i>Vaccinium angustifolium</i>	<i>Ericaceae</i>	MT-261424	VAB2018	Péribonka	48°46'24.5"N 72°02'39.8"W	2018
Bleuet noirs	<i>Vaccinium myrtilloides</i>	<i>Ericaceae</i>	MT-261423	Vmy2018	Péribonka	48°46'24.5"N 72°02'39.8"W	2018
Mûres noires	<i>Rubus setosus</i>	<i>Rosaceae</i>	MT-261414	RS2018	Péribonka	48°46'24.5"N 72°02'39.8"W	2018
				RS2019			2019
Quatre-temps	<i>Cornus canadensis</i>	<i>Cornaceae</i>	MT-261425	CC2018	Péribonka	48°45'59.1"N 72°05'19.5"W	2018
Catherinettes	<i>Rubus pubescens</i>	<i>Rosaceae</i>	MT-261415	RP2019	Péribonka	48°46'24.5"N 72°02'39.8"W	2019
Merises	<i>Prunus pensylvanica</i>	<i>Rosaceae</i>	MT-261417	PP2018	Péribonka	48°44'21.9"N 71°58'23.0"W	2018
Amélanchier	<i>Amelanchier spicata</i>	<i>Rosaceae</i>	MT-261419	AS2019	Péribonka	48°43'38.3"N 72°15'44.2"W	2019
Canneberges	<i>Vaccinium oxycoccos</i>	<i>Ericaceae</i>	MT-261421	VO2019	Dolbeau-Mistassini	48°43'36.9"N 72°16'07.0"W	2019
Canneberges	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	<i>Ericaceae</i>	MT-261422	VM2019	Dolbeau-Mistassini	48°46'24.5"N 72°02'39.8"W	2019
Clintonie boréale	<i>Clintonia borealis</i>	<i>Liliaceae</i>	MT-261427	CB2019	Péribonka	48°43'36.9"N 72°16'07.0"W	2019
Aronia noire	<i>Aronia prunifolia</i>	<i>Rosaceae</i>	MT-261418	AP2019	Dolbeau-Mistassini	48°46'24.5"N 72°02'39.8"W	2019
Sorbier rouge	<i>Sambucus racemosa</i> subsp. <i>pubens</i> var. <i>pubens</i>	<i>Adoxaceae</i>	MT-261412	SR2019	Péribonka	48°46'24.5"N 72°02'39.8"W	2019
Aralie à tige nue	<i>Aralia nudicaulis</i>	<i>Araliaceae</i>	MT-261411	AN2019	Péribonka	48°46'24.5"N 72°02'39.8"W	2019
Actée à grappes rouges	<i>Actaea rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	<i>Ranunculaceae</i>	MT-261426	AR2019	Péribonka	48°40'34.5"N 71°52'14.9"W	2019
Cerises de sable	<i>Prunus pumila</i>	<i>Rosaceae</i>	MT-261416	Ppu2019	Saint-Henri-de-Taillon	48°46'24.5"N 72°02'39.8"W	2019

4.2 Extraction :

4.2.1 Préparation du matériel végétal :

Après la récolte, les fruits ont été stockés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'au mois de novembre 2019. Par la suite, des quantités de 50 à 200 g (en fonction de la masse initiale) des fruits ont été pesées et réparties sur des tubes de Falcon de 50 mL, congelées à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 24 h et lyophilisées pendant plusieurs jours. Après lyophilisation les fruits ont été congelés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 24 h et broyés à l'aide d'un mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène qui a été répartie dans des tubes Falcon de 50 mL, pesés et stockés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Par la suite, trois différentes extractions ont été réalisées en utilisant trois mélanges de solvants de polarités différentes. En effet, un mélange de méthanol acidifié a été utilisé afin de cibler les anthocyanes dans les fruits, un mélange d'éthanol/eau a été utilisé afin d'extraire surtout les polyphénols et une extraction avec du chloroforme pure a été réalisée afin d'aller chercher les métabolites de plus faible poids moléculaire, tels que les composés terpéniques.

4.2.2 Extraction méthanol acidifié :

Une quantité de 1 g de chaque fruit a été répartie en 100 mg dans des tubes de type Eppendorf de 1,5 mL et 1 mL de solvant d'extraction (méthanol/eau/acide acétique, 70:29:1, v/v/v). Les échantillons ont été vortexés à grande vitesse pendant 1 min et laissés au repos à l'obscurité pendant 1 h. Par la suite, les échantillons ont été traités aux ultrasons pendant 20 min puis centrifugés à $2000 \times g$ pendant 20 min à l'aide d'une microcentrifugeuse. Le surnageant a été filtré à travers un filtre à seringue PTFE avec une membrane en polypropylène (PP) de $0,4\text{ }\mu\text{m}$, dans un ballon de 100 mL et évaporé dans un évaporateur rotatif sous pression réduite à la température ambiante. L'extrait sec a par la suite été récupéré dans de l'eau ultrapure (jusqu'il ne reste rien dans le ballon) dans des tubes Falcon de 15 mL protégés de la lumière avec du papier aluminium, lyophilisés à l'obscurité, pesés et stockés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.3 Extraction éthanolique :

Une quantité de 2 g de chaque poudre de fruit a été distribuée dans un flacon Erlenmeyer de 250 mL, auquel 50 mL du solvant d'extraction (éthanol/eau, 70:30, v/v) ont été ajoutés. Les échantillons ont été vortexés à grande vitesse pendant 1 min et incubés dans l'obscurité à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

pendant 24 h. Par la suite, les échantillons ont été traités aux ultrasons dans un bain pendant 20 min pour aider à éclater la membrane cellulaire, puis filtrés sous vide sur Celite dans un ballon de 250 mL. Le filtrat a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite à température ambiante. L'extrait sec a finalement été recueilli dans de l'eau ultrapure (jusqu'à ce qu'il ne reste plus rien dans le ballon) dans des tubes Falcon de 15 mL qui ont été protégés de la lumière par une feuille d'aluminium. Les tubes ont été congelés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, lyophilisés dans l'obscurité, pesés et stockés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Bourgou et al. 2016).

4.2.4 Extraction au chloroforme :

Des quantités de 2 g de chaque poudre de fruits ont été mélangées avec 50 mL de chloroforme dans des ballons en verres de 250 mL. Les ballons ont par la suite été assemblés sur un carrousel Heidolph™ Radleys (Figure 38) permettant l'extraction à reflux ($65\text{ }^{\circ}\text{C}$) simultanée de six fruits différents sous atmosphère inerte par injection d'azote et sous une agitation de 300 rpm pendant 24 h à l'obscurité. Par la suite, les échantillons ont été filtrés sous vide sur Célite dans un ballon de 250 mL. Le filtrat a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite à $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. L'extrait sec a finalement été recueilli dans le dichlorométhane (jusqu'à ce qu'il ne reste plus rien dans le ballon) dans des tubes en verres de 5 mL et laissé évaporer sous la hotte chimique pendant une nuit, et sous vide pendant 3 h afin d'éliminer toute trace de chloroforme. Enfin, les tubes ont été stockés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Figure 38 : le carrousel Heidolph™ Radleys.

4.3 Matériel biologique :

4.3.1 Souches microbiennes :

Les tableaux suivants (3, 4 et 5) présentent tous les microorganismes qui ont été testés au cours de ce projet.

Tableau 3 : liste des bactéries testées.

	Souches bactériennes	Codes	Espèces bactériennes	Genres bactériens
Bactéries à Gram négatif	<i>B. cepacia</i> LMG18821	ED3919	<i>B. cepacia</i>	<i>Burkholderia</i>
	<i>B. cepacia</i> BTS13	--	<i>B. cepacia</i>	
	<i>B. stabilis</i> LMG18138	ED3922	<i>B. stabilis</i>	
	<i>B. dolosa</i> LMG21820	ED3921	<i>B. dolosa</i>	
	<i>B. ambifaria</i> LMG19466	ED3920	<i>B. ambifaria</i>	
	<i>B. multivorans</i> LMG17588	ED379	<i>B. multivorans</i>	
	<i>B. vietnamiensis</i> LMG22486	ED382	<i>B. vietnamiensis</i>	
	<i>B. ubonensis</i> LMG20358	ED381	<i>B. ubonensis</i>	
	<i>B. cenocepacia</i> LMG19240	ED376	<i>B. cenocepacia</i>	
	<i>B. pyrrocinia</i> LMG21824	ED380	<i>B. pyrrocinia</i>	
	<i>B. glumae</i> AU6208	ED386	<i>B. glumae</i>	
	<i>E. coli</i> O157:H7	ED2612	<i>E. coli</i>	
<i>P. aeruginosa</i> PA14	ED14	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas</i>	
<i>S. typhimurium</i> LT2	ED2636	<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella</i>	
<i>Methicillin-resistant aureus</i>	S. ED711	<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>S. aureus</i> ATCC13565	ED2204	<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus</i>	
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	ED2207	<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus</i>	
<i>B. subtilis</i> PY79	ED66	<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus</i>	
<i>B. subtilis</i> JH642	ED292	<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus</i>	
<i>B. cereus</i> ATCC11778	ED2598	<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus</i>	
<i>B. circulans</i> LSPQ3543	ED2588	<i>B. circulans</i>	<i>Bacillus</i>	
<i>S. agalactiae</i> ATCC27956	ED2596	<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus</i>	
<i>S. pneumoniae</i> ATCC6305	ED2205	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus</i>	

Tableau 4 : liste des levures testées.

Espèces	Souches	Genres	Codes
<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Candida</i>	ED701
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>C. neoformans</i> H99	<i>Cryptococcus</i>	ED1123

Tableau 5 : liste des champignons testées.

Espèces	Genres
<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Rhizoctonia</i>
<i>Moniliaceae 1(22)</i>	<i>Moniliaceae</i>

4.3.2 Milieux de cultures :

➤ **Préparation de bouillon de soja tryptique :**

Le milieu de culture liquide utilisé pour la préparation des précultures bactériennes est le bouillon de soja tryptique, « Tryptic Soy Broth » (TSB) (Bacto™ BD). Ce milieu a été préparé selon les instructions du fabricant. Trente grammes de poudre de bouillon de soja tryptique ont été pesés et ajoutés dans un litre d'eau distillée dans une bouteille. Le mélange a été chauffé sous agitation de manière à dissoudre la poudre d'agar. Le milieu a été ensuite autoclavé pendant 50 min à 121 °C et conservé ensuite à température ambiante.

➤ **Préparation de gélose de dextrose de pommes de terre :**

Le milieu de culture solide pour la culture des champignons est, « Potato Dextrose Agar » (PDA) (Difco™ BD). Ce milieu a été préparé selon les instructions du fabricant, 39 grammes de poudre de bouillon de soja tryptique ont été pesés et ajoutés dans un litre d'eau distillée dans un erlenmeyer. Le mélange a été chauffé sous agitation de manière à dissoudre la poudre d'agar dextrose de pommes de terre. L'erlenmeyer a ensuite été recouvert d'une feuille d'aluminium et autoclavé pendant 50 min à 121 °C. Par la suite, le milieu a été distribué en 20 mL dans des boîtes de Petri par écoulement laminaire. Les géloses ont été laissées à refroidir et conservées à une température de 4 °C.

➤ **Préparation de la gélose Muller-Hinton :**

Le milieu de culture solide pour la culture des souches bactériennes est l'agar « Mueller-Hinton » (MHA) (Difco™ BD). Ce milieu a été préparé selon les instructions du fabricant. Trente-huit grammes de poudre de MHA ont été pesés et ajoutés dans un litre d'eau distillée dans un

Erlenmeyer. Le mélange a été chauffé sous agitation de manière à dissoudre la poudre d'agar. Le flacon a ensuite été recouvert d'une feuille d'aluminium et autoclavé pendant 50 min à 121 °C. Par la suite, le milieu a été distribué en 20 mL dans des boîtes de Petri par écoulement laminaire. Les géloses ont été laissées à refroidir et conservées à une température de 4 °C.

4.4 Activité antimicrobienne :

Dans un premier temps, on a procédé à des méthodes qualitatives pour évaluer la sensibilité des souches bactériennes aux extraits des fruits par le test de diffusion sur agar.

4.4.1 Test de diffusion sur agar :

➤ Principe :

Cette méthode a été proposée pour la première fois en 1944 par Heatley pour tester les antibiotiques (Heatley 1944). Elle a été développée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits naturels en 1946 par Cooper et Woodman, et reprise en 1949 par Schroder et Messing (Salle 2004). En effet, le test de diffusion sur agar a été accepté et approuvé par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) comme une méthode préliminaire utilisée dans les laboratoires de microbiologie clinique pour les tests de routine de sensibilité aux antimicrobiens. Le principe se base sur une diffusion radiale sur gélose à partir d'un disque imbibé par le produit à tester, le pouvoir bactéricide se traduit en fonction de diamètre de la zone d'inhibition (Figure 39) (CLSI 2012, Balouiri, Sadiki et al. 2016).

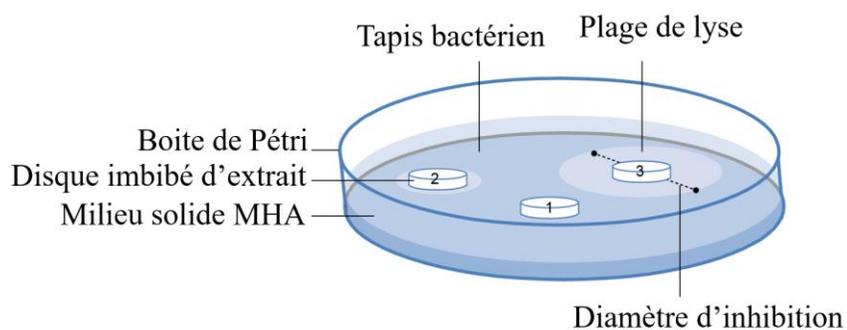


Figure 39 : principe de test de diffusion sur agar.
D'après (Emmanuelle Cantoni 2015).

➤ Protocole des activités antibactériennes et anti-levures :

Les précultures ont été préparées à partir de stock courant des souches bactériennes et des levures conservées dans le glycérol 15 % dans des tubes cryogéniques à -80 °C. La veille des

manipulations ou 4 h avant (en fonction de la vitesse de croissance de la souche), la culture était ensemencée dans un tube en verre contenant 3 mL de TSB et incubée à 37 °C sous agitation.

Cette technique consiste à déposer 15 µL des extraits à tester sur des disques de papier Whatman (N° 3) (7 mm Ø) stérile. Une fois les disques imbibés séchés, ils étaient placés sur la surface de géloses MHA pré-ensemencées par écouvillonnage à partir des suspensions microbiennes standardisées à une $DO_{(600nm)} = 0,05$. La sensibilité a été étudiée après incubation de 24 h à 37 °C, en mesurant le diamètre de zone d'inhibition, disques inclus, directement sur la boîte. L'activité antimicrobienne des extraits à tester est proportionnelle à ce diamètre d'inhibition. À chaque fois, un disque contrôle négatif a été réalisé pour chaque solvant (éthanol 70 %, DMSO, méthanol 70 %, DCM).

➤ **Protocole d'activité antifongique :**

À partir du stock des espèces de champignons conservées sous forme de tapis sur milieu solide PDA à 4 °C, un morceau de l'agar a été enlevé à l'aide d'un cône stérile de micropipette de 1 mL et déposé sur une autre gélose PDA stérile soigneusement à l'aide d'une pince stérile. La boîte a été incubée par la suite à 28 °C de 3 à 5 jours (ou plus pour certaines souches) jusqu'à ce qu'un tapis du champignon ait commencé à se développer au centre de la boîte.

Par la suite, 15 µL des extraits à tester ont été déposés sur des disques de papier Whatman (No. 3) (7 mm Ø) stérile. Une fois les disques séchés, ils ont été placés sur l'agar à 2 cm de la bordure de la boîte, qui a été scellée avec du papier parafilm afin d'éviter l'assèchement du milieu de culture au cours de l'incubation. Ensuite, l'ensemble a été incubé de nouveau à 28 °C pendant 3 à 5 jours jusqu'à ce que le tapis du champignon ait atteint les extrémités de la boîte. L'activité antifongique a été déterminée en fonction de la formation des zones d'inhibitions autour des disques imbibés des extraits.

4.4.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice « CMI » :

➤ **Principe :**

La CMI est le paramètre le plus souvent utilisé dans l'évaluation de l'activité antibactérienne. Elle est définie par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) comme étant la concentration la plus faible d'une gamme de dilutions ½ en cascades d'antibiotiques, entraînant l'inhibition de toute croissance bactérienne visible pendant 24 h d'incubation à 37 °C (de Billerbeck, Roques et al. 2001, Bassole H.N. 2002.).

➤ **Protocole :**

Le mode opératoire a été basé sur la technique de microdilution en milieu liquide. Il a consisté à préparer une série de dilutions de concentrations décroissantes dans une microplaque de 96 puits. Celle-ci comporte un mélange de la suspension bactérienne qui a été ajustée à une DO de 0,05 dans le milieu de culture MHB et la série de concentrations de l'extrait de fruits allant de 20 à 0,15 mg/mL, dont le volume final est de 100 μ L (v/v). La série d'échantillons préparée a été incubée à 37 °C pendant 18 à 20 h. Trois témoins négatifs ont été inclus pour chaque manipulation : un témoin permettant d'identifier les contaminations (l'extrait de fruit + milieu de culture sans bactéries), un témoin contenant le solvant (qui sert à solubiliser l'extrait) en présence de la suspension bactérienne pour évaluer son effet et un témoin contenant la suspension bactérienne. Chaque test a été réalisé en duplicata et en deux répétitions indépendantes.

Après incubation, 30 μ L de résazurine stérilisée et standardisée à 0,015 % ont été ajoutés dans tous les puits de la microplaque, suivi de 2 à 3 h d'incubation supplémentaire. En effet, la résazurine est une substance bleue qui agit comme indicateur rédox. En présence des cellules bactériennes actives, la résazurine non fluorescente de couleur bleue se réduit en résorufine fluorescente de couleur rose qui peut être davantage réduite en hydrorésorufine (incolor), donnant ainsi une mesure quantifiable directe par fluorescence du métabolisme bactérien. À la suite de l'incubation, la fluorescence a été mesurée à l'aide de l'appareil BioTek™ Cytation™ 3 à des longueurs d'ondes de 530 nm pour l'excitation et 590 nm pour l'émission. La détermination de la CMI a été faite à partir du premier puits de la gamme ayant une fluorescence similaire à celle du témoin négatif de l'extrait brut (Sarker, Nahar et al. 2007, Elshikh, Ahmed et al. 2016).

4.5 Caractérisation phytochimique :

La complexité des extraits végétaux nécessite des approches de séparation efficaces pour identifier les molécules actives. Les extraits végétaux peuvent être caractérisés par des empreintes phytochimiques, qui présentent un chimio-profilage caractéristique de l'extrait (Ristivojevic, Trifkovic et al. 2016). Ces empreintes chimiques peuvent être déterminées à l'aide de diverses méthodes analytiques qualitatives et quantitatives, notamment les techniques chromatographiques (Harborne 1998) (e.g., la chromatographie sur couche mince (TLC, *Thin Layer Chromatography*), la chromatographie sur couche mince à haute performance (HPTLC, *High Performance Thin Layer Chromatography*), la chromatographie sur colonne (CC, *Column chromatography*), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), la chromatographie en phase gazeuse, (GC, *Gas chromatography*), la chromatographie en fluide supercritique (SFC, *Supercritical Fluid Chromatography*), la

chromatographie à contre-courant (CCC, *CounterCurrent Chromatography*) et les techniques de séparation par détection, tel que l'approche de résonance magnétique nucléaire (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*), la spectrométrie de masse (MS, mass spectrometry) et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR, *Fourier-transform infrared spectroscopy*) (Milojković-Opsenica, Ristivojevic et al. 2013, Wang, Avula et al. 2014, Li, He et al. 2015).

Parmi ces techniques, la chromatographie sur couche mince, la chromatographie sur colonne de silice et la chromatographie liquide haute performance couplées à deux différents systèmes de détection (UV : ultraviolet et CAD : *Charged Aerosol Detector*) sont celles qui ont été employées pour l'analyse qualitative et/ou quantitative des extraits actifs.

4.5.1 Chromatographie sur couche mince :

➤ Principe :

La chromatographie sur couche mince (CCM) est l'un des outils les plus utiles en phytochimie pour vérifier la pureté des composés. De plus, plusieurs échantillons peuvent être analysés en parallèle sur la même plaque avec une meilleure exactitude grâce à l'analyse simultanée de tous les échantillons et des standards de référence dans les mêmes conditions. Comme toute technique de chromatographie, le principe de la chromatographie sur couche mince se base sur la séparation des composés en fonction de leur affinité relative envers la phase mobile qui les entraîne et la phase stationnaire qui les retient (Figure 40).

En effet, la chromatographie sur couche mince utilise une fine plaque de verre ou d'aluminium revêtue de gel de silice comme phase stationnaire. La phase mobile est un ou plusieurs solvant(s) choisis en fonction des propriétés des composants de l'extrait. En effet, lorsque le solvant se déplace à travers le mélange des particules sur la plaque par l'action capillaire, les composés solubles dans cette phase mobile se dissoudront dans le solvant et remonteront la plaque. En outre, la migration d'un composé à travers la plaque dépend de ses propriétés physiques et de sa structure moléculaire, en particulier, des groupes fonctionnels et donc de sa polarité.

À la fin du processus de séparation, les composants individuels du mélange initial apparaissent sous forme de taches ou bandes à des niveaux respectifs sur les plaques. Le comportement d'un composé individuel en chromatographie sur couche mince se caractérise par une quantité connue sous le nom de facteur de rétention R_f (Retention Factor). Le R_f est le rapport entre la distance parcourue par le composé individuel depuis sa position initiale et la distance parcourue par le solvant depuis la même position d'origine (le front du solvant). Le R_f est caractéristique d'un composé pour un éluant et un support donné. Donc, la comparaison entre les R_f des échantillons

et des étalons de référence authentifiés nous permet d'identifier les composants individuels du mélange initial (Sherma et Fried 2003, Waksmundzka-Hajnos, Sherma et al. 2008).

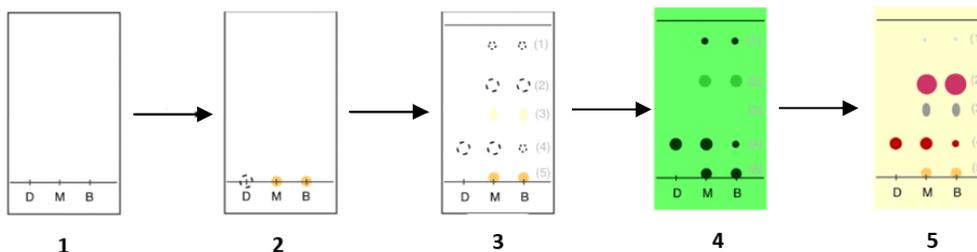


Figure 40 : principe de chromatographie sur couche mince.

1 : préparation de la plaque, 2 : dépôt, 3 : élution, 4 : révélation UV, 5 : révélation chimique. D'après (McNaught et Wilkinson 1997).

➤ **Protocole :**

La chromatographie sur couche mince se déroule en quatre étapes principales : la préparation de la cuve, la préparation de la plaque, l'élution et la révélation (Kumar, Jyotirmayee et al. 2013).

a. Préparation de la cuve :

La cuve de la CCM se compose de la cuve et d'un couvercle, afin d'éviter l'évaporation du solvant et surtout d'assurer une atmosphère saturée par le solvant, de façon à obtenir des valeurs reproductibles. Tout d'abord, 10 mL de deux systèmes d'élution ont été préparés dans deux cuves séparées

- 1^{er} système d'élution : hexanes/acétate d'éthyle (v/v, 7:3)
- 2^e système d'élution : dichlorométhane/méthanol (v/v, 95:5)

Par la suite, un papier filtre Whatman a été placé verticalement dans les cuves de façon à saturer l'atmosphère en vapeurs de solvant et les couvercles ont été fermés hermétiquement.

b. Préparation de la plaque :

Les plaques en verre ont été découpées aux dimensions de 8 × 4 cm et les plaques en aluminium de 5 × 5 cm. Un trait à 1 cm du bas de la plaque a été tracé au crayon, présentant la ligne de dépôt des échantillons. Par la suite, à l'aide d'un capillaire, les solutions des extraits ont été déposées sur des points espacés de 1 cm sur la ligne de dépôt.

c. Élution :

La plaque a été placée dans la cuve et le couvercle a été fermé hermétiquement pour que l'éluant diffuse dans un environnement saturé. Lorsque le front d'éluant est arrivé à 1 cm du haut de la plaque, la CCM a été arrêtée, et le front de solvant a été mesuré au crayon.

d. Révélation :

Cette étape permet de visualiser de manière aisée la position des taches des composants individuels des mélanges déposés sur la plaque, obtenues en fin d'élution. Lorsque les composants individuels n'étant pas colorés, les taches peuvent être invisibles sur la plaque. Donc, on procède aux méthodes de révélation des plaques, en utilisant la révélation aux UV et les réactifs chimiques. Deux méthodes ont été utilisées pour révéler les plaques :

- **Révélation UV** : les plaques ont été placées sous une lampe UV et observées à deux longueurs d'ondes (254 et 356 nm). En absence de révélateur UV inclut dans la CCM, la lumière UV permet de détecter les métabolites naturellement fluorescents dans l'extrait.
- **Révélation à l'acide molybdate d'ammonium cérique (CAM, Cerium Ammonium Molybdate stain ou Hanessian's Stain)** : C'est un révélateur polyvalent qui donne des taches bleues après un chauffage vigoureux. Le CAM a été préparé en dissolvant 25 g de molybdate d'ammonium $[\text{MoO}_4 (\text{NH}_4)_2]$, 10 g de sulfate d'ammonium cérique $[\text{Ce}(\text{SO}_4)_4(\text{NH}_4)_4]$ et 100 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4) dans 900 mL d'eau distillée. Les plaques ont été immergées dans la solution du CAM et séchées par la suite à l'aide d'un séchoir jusqu'à l'apparition des taches bleues.

Une fois les taches localisées (UV et révélation chimique), les R_f ont été mesurés.

4.5.2 La chromatographie sur colonne de silice :

➤ **Principe :**

La chromatographie sur colonne de gel de silice a été réalisée pour la première fois en 1906 par le botaniste Mikhail Tswelt, et depuis elle occupe un rôle central dans plusieurs approches de purification des composants individuels des plantes dans les laboratoires modernes des sciences de la vie. En effet, tout comme la chromatographie sur couche mince, cette technique repose sur le phénomène d'absorption, où la silice est placée dans une colonne de verre. Les molécules du mélange initial sont entraînées vers le bas de la colonne à des vitesses variables, en fonction de leur affinité pour l'absorbant (le gel de silice) et leur solubilité dans l'éluant, où les produits apolaires sont élués les premiers. Toutefois, le but de la chromatographie sur colonne sert à

séparer les produits d'un mélange initial complexe par migration dans un dispositif en verre constitué d'une phase stationnaire (la colonne contenant une quantité calculée de gel de silice dissoute dans le moins polaire des solvants utilisés) et d'une phase mobile (le solvant d'élution utilisé qui est généralement un mélange de deux solvants polaire et apolaire) (Stevens et Hill 2009, Chakravarti, Mallik et al. 2016, Akash et Rehman 2020).

➤ **Protocole :**

Tout d'abord la colonne a été lavée correctement avec de l'eau distillée, puis avec de l'acétone et elle a été séchée sous jet d'azote pour éliminer les impuretés. Par la suite, la colonne a été suspendue le long d'un support métallique à l'aide d'une pince de manière que sa sortie soit tournée vers le bas (Figure 41). Un morceau du coton ou de la laine de verre a été introduit au bas de la colonne afin que la silice n'échappe pas par la valve. Ensuite, une quantité de silice représentant 30 fois de la masse de l'échantillon a été dissoute dans un mélange d'hexanes et introduite délicatement dans la colonne, afin d'éviter la formation des bulles d'air entre la phase mobile et la phase stationnaire et/ou l'apparition de fissures dans la couche de gel de silice. L'échantillon dissout dans une quantité minimale de dichlorométhane (en raison de son excellent pouvoir solubilisant couplé à sa faible force d'élution) a été mélangée avec une quantité de silice dans un ratio de 1:10 (masse de l'échantillon/masse de silice).

Le mélange a été par la suite évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite afin d'obtenir une homogénéité optimale entre l'extrait actif et la silice. La poudre obtenue a été introduite délicatement dans la colonne de manière homogène sur la couche de gel de silice et a été protégée par l'ajout d'une couche de sable de 1,5 cm. Chaque extrait actif a été fractionné avec un gradient de 10 % (hexanes/acétate d'éthyle), suivi d'un gradient (100:0, 90:10, 80:20, 50:50) (dichlorométhane/méthanol).

En outre, les fractions actives polaires ont été fractionnées sur phase inverse sur colonne de silice avec un gradient de 10 % eau/acétonitrile. En fonction de la taille de colonne utilisée à chaque fois des fractions de 50 mL, 8 mL ou 4 mL ont été recueillies. Les fractions collectées ont été soumises parallèlement au contrôle chromatographique sur couche mince et les taches ont été révélées à l'aide d'une lampe UV à 254 et à 365 nm et au CAM. Par la suite, toutes les fractions successives qui ont le même R_f ont été rassemblées, évaporées et/ou lyophilisées, et conservées à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

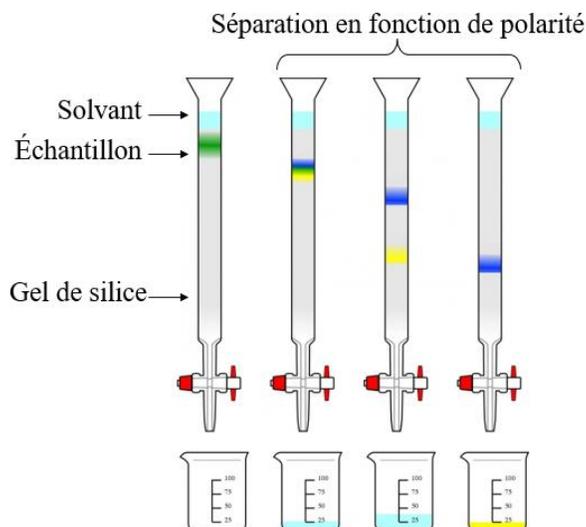


Figure 41 : principe de technique de chromatographie sur colonne de silice.
D'après (Bourgeais et al. 2002)

4.5.3 Chromatographie liquide à haute pression :

➤ **Principe :**

La chromatographie liquide à haute pression (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) est une technique chromatographique utilisée pour la première fois par Kirkland et Huber en 1969 afin de séparer des mélanges complexes des extraits naturels et des produits de synthèse chimique. Depuis, elle a été largement utilisée comme technique analytique et préparative en biochimie et en chimie analytique pour l'identification, la quantification et la purification des composants individuels des mélanges.

La méthode HPLC se base sur le même principe de séparation de la chromatographie sur colonne, le partage différentiel des molécules à séparer entre les deux phases stationnaires et mobiles. Toutefois, en HPLC, la phase mobile est pompée à travers une colonne en appliquant une haute pression d'environ 3000 Pa.

La phase stationnaire est localisée à l'extrémité inférieure de la colonne, tandis que l'autre extrémité est attachée à la source de phase mobile pompée à haute pression. En effet, lorsque l'échantillon est injecté dans la colonne chaque composant individuel passe à travers la colonne à une vitesse différente et sera par la suite détecté par les détecteurs électroniques (notamment le CAD ou par la spectroscopie ultraviolette et visible (UV-VIS), donnant ainsi des temps de rétention caractéristiques des différents composants dans le mélange. La chromatographie liquide à haute pression est dite en phase normale lorsque la phase stationnaire est polaire,

cependant, lorsqu'elle est apolaire on parle de HPLC en phase inverse (RP-HPLC : *reverse phase — high performance liquid chromatography*) (Ahuja 2006, Kumar et Kumar 2012, Akash et Rehman 2020). Également, la chromatographie en phase inverse présente plusieurs applications dans le domaine de la séparation et de la purification biochimiques, à la fois analytiques et préparatives.

Les composants possédant un caractère hydrophobe peuvent être séparés par chromatographie en phase inverse avec une excellente résolution. En effet, le mécanisme de séparation en chromatographie en phase inverse dépend de l'interaction de liaison hydrophobe entre la molécule dissoute dans la phase mobile et le ligand hydrophobe immobilisé de la phase stationnaire (Hoffman et Liao 1977, Vailaya et Horváth 1998, Mallik, Qiu et al. 2018).

➤ **Protocole :**

Les travaux d'identification des composants actifs de polarité élevée ont nécessité deux types de chromatographies liquides à haute performance en phase inverse, la RH-HPLC analytique et la RH-HPLC préparative.

a. Appareillage :

Tous les échantillons injectés en HPLC ont été filtrés préalablement sur des filtres de PTFE de 0,45 µm. L'appareil HPLC utilisé était une UHPLC UltiMate® de la série 3000 fabriquée par Dionex (Figures 42 et 43), équipé d'un module de pompage sans division de débit qui permet d'assurer une analyse en continu sur le long terme, d'un système d'injecteur automatique garantissent des injections fiables, précises et exactes, d'un dégazeur, d'un module chauffe-colonne intégré à l'injecteur ACC-3000 et d'un détecteur optique UV-visible à quatre longueurs d'onde. Néanmoins, un autre détecteur a été utilisé, le détecteur CAD Corona, un détecteur quasi universel. Son principe se base sur la nébulisation de l'échantillon qui sera chargé positivement et analysé à l'aide d'un électromètre.

En effet, cet appareil permet de déterminer avec une meilleure précision la complexité d'une fraction donnée, de donner des informations structurales sur les différents composants, d'évaluer également le niveau de pureté d'un produit et d'élaborer une méthode HPLC préparative de fractionnement.



Figure 42 : appareil UHPLC à détecteur d'aérosols chargés Corona.

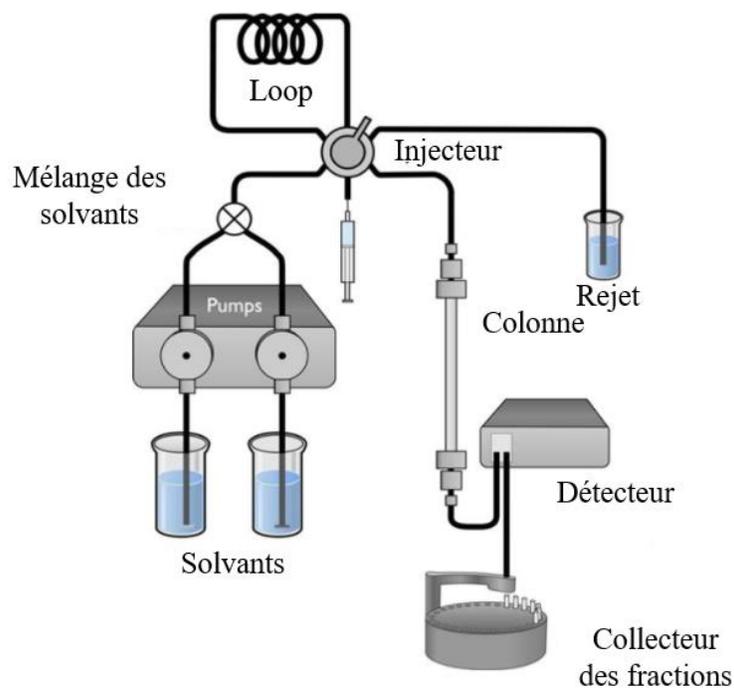


Figure 43 : représentation schématique de système HPLC.

Le système se compose d'une pompe qui assure la distribution haute pression de la phase mobile, d'un injecteur automatique d'échantillons, d'une colonne chromatographique et d'un détecteur. d'après (György Hegyi 2013).

b. RH-HPLC analytique :

Tout d'abord, tous les échantillons polaires actifs ont été analysés par RH-HPLC sur une colonne analytique C₁₈ (Hypersil GOLD™), basée d'origine sur le gel de silice. Les tableaux 6 et 7 présentent les conditions utilisées en HPLC analytique pour l'analyse de chaque échantillon.

Tableau 6 : les conditions utilisées en HPLC analytique.

Appareil : - Modèle : UHPLC des systèmes UltiMate® de la série 3000, Dionex.	Détection UV CAD	Colonne : Hypersil GOLD™ - Longueur : 250 mm - Diamètre : 4,6 mm - Taille : 5 µm - Série : 10 883 221
Conditions chromatographiques : - Injection : 50-100 µL - Draw speed: 1 µL/mL - Solvant A : H ₂ O - Débit : 1 mL/mL - Solvant B : Acétonitrile - Température de la colonne : 26 °C		
UV : Longueurs d'onde 250 nm/254 nm/300 nm/350 nm	Bande passante 20 nm	Bande passante de référence 30 nm

c. RH-HPLC préparative :

Ce type d'HPLC permet la récupération de l'échantillon injecté après analyse de manière automatique par le logiciel thermo-Scientific CDS (Chromeleon Chromatography Data System), en fonction du temps ou des pics à l'aide d'un collecteur de fractions. Le tableau 7 présente les conditions utilisées en HPLC préparative pour le fractionnement de chaque échantillon.

Tableau 7 : les conditions utilisées en HPLC préparative.

Appareil : - Modèle : UHPLC des systèmes UltiMate® de la série 3000, Dionex.	Détection UV	Colonne : Hypersil GOLD™ - Longueur : 250 mm - Diamètre : 10 mm - Taille : 5 µm - Série : 10 904 091
Conditions chromatographiques : - Injection : 250-1000 µL - Draw speed: 10 µL/mL - Solvant A : H ₂ O - Débit : 4 mL/mL - Solvant B : Acétonitrile - Température de la colonne : 26 °C		
UV : Longueurs d'onde 250 nm/254 nm/300 nm/350 nm	Bande passante 4 nm	Bande passante de référence 10 nm

4.5.4 Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire :

➤ Principe :

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN, *Nuclear magnetic resonance*) a été développée pour la première fois en 1946 par des groupes de recherche aux universités de Stanford et M.I.T., aux États-Unis. Depuis, la spectroscopie par RMN est devenue la première spectroscopie organique auquel recourent les chimistes et les biochimistes pour déterminer la structure chimique détaillée des produits purs. Cette technique a été également mise en évidence comme utile dans la détermination quantitative des espèces absorbantes. Elle est fondée sur l'analyse des propriétés magnétiques des noyaux atomiques pour fournir des informations chimiques.

Le principe général de la résonance magnétique nucléaire se base sur la mesure de l'absorption d'une radiation de radiofréquence (RF) par un noyau atomique soumis à un champ magnétique. En effet, toutes les particules atomiques (protons, neutrons et électrons) sont dotées d'un spin nucléaire intrinsèque. Les noyaux atomiques dotés d'un nombre pair de protons et/ou de neutrons (^{12}C , ^{32}S , ^{16}O) ont des spins appariés qui s'annulent de sorte que le spin global de ce noyau est nul. Cependant, dans les noyaux atomiques dotés d'un nombre impair de protons et/ou de neutrons (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{19}F), le noyau possède un spin global (Figure 47). Sous l'action d'un champ magnétique, ce spin nucléaire peut s'aligner soit dans la même direction, soit dans la direction opposée au champ appliqué.

Ces deux types d'alignement de spins nucléaires intrinsèque sont caractérisés par différents niveaux d'énergies. Un noyau atomique dont le spin est aligné avec le champ magnétique aura une énergie plus faible que lorsque son spin est aligné dans la direction opposée du champ. L'application d'un champ magnétique sur les noyaux atomiques facilite la levée de dégénérescence des spins nucléaires.

Néanmoins, l'énergie d'une transition de RMN dépend aussi d'un facteur de proportionnalité qui s'applique à chaque noyau, appelé rapport gyromagnétique. L'environnement intrinsèque d'une molécule autour d'un noyau donné a tendance à perturber légèrement le champ magnétique local exercé sur ce noyau et à affecter ainsi son énergie de transition exacte. L'énergie de transition est donc dépendante de la position des atomes particuliers dans la molécule ce qui rend la RMN une technique robuste, rapide et efficace pour la détermination de la structure des molécules (Smith et Strange 1999, Gerothanassis, Troganis et al. 2002, Hatzakis 2019).

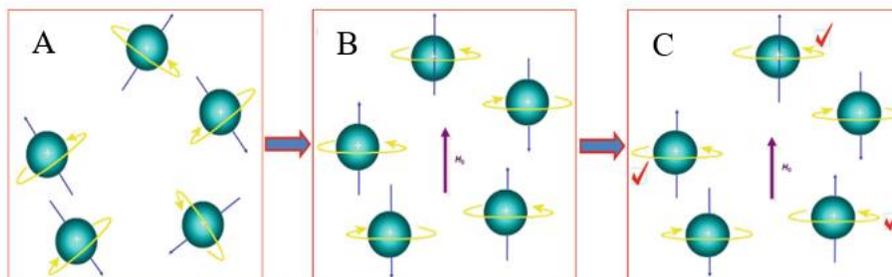


Figure 44 : représentation schématique de la distribution des spins nucléaires sous l'effet d'un champ magnétique.

En absence d'un champ magnétique externe (A) la distribution des spins nucléaires est principalement aléatoire. Toutefois, lorsqu'un champ magnétique externe est appliqué, les spins nucléaires s'alignent avec lui de manière parallèle ou antiparallèle (B). Dans le cas des alignements parallèles au champ magnétique, les moments magnétiques nucléaires seront légèrement plus élevés (C). D'après (Akash et Rehman 2020).

➤ **Protocole :**

Les analyses RMN des protons $^1\text{D}^1\text{H}$ ont été réalisées par un spectromètre Bruker 600 MHz AVANCE III, équipé d'une cryosonde hélium HNCF du service Agilent Crosslab.

Avant chaque analyse, les échantillons ont été dissous dans 250 μL de D_2O , CD_3OD ou CDCl_3 , en fonction de leurs solubilités, dans des tubes spécifiques à la RMN. Les spectres RMN $^1\text{D}^1\text{H}$ obtenus ont été traité par le logiciel MestReNova.

5 RÉSULTATS ET DISCUSSION

5.1 Rendement d'extraction des fruits :

Les extraits de fruits ont été pesés et stockés dans de petites bouteilles en verre à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les pourcentages de rendement d'extraction ont été calculés en utilisant la formule suivante et sont présentés dans le tableau 9 :

$$\text{Pourcentage de rendement d'extraction} = m_1/m_2 \times 100$$

Où m_1 ; est la masse de l'extrait lyophilisé sec et m_2 ; est la masse de l'échantillon brut de fruit lyophilisé sec.

Comme illustré dans le tableau 8, le rendement d'extraction le plus élevé pour la plupart des fruits a été obtenu en utilisant l'éthanol comme solvant organique d'extraction, alors que le rendement d'extraction le plus faible a été obtenu avec le chloroforme. Étant donné que le solvant et la méthode d'extraction étaient différents à chaque extraction au cours de cette étude, nous ne pouvons pas se baser sur ce paramètre dans la comparaison des rendements d'extraction. En effet, le rendement et l'efficacité de l'extraction dépendent de plusieurs facteurs à savoir l'espèce, le milieu de récolte, la période de récolte, la technique, le temps et la température d'extraction et le solvant utilisé. Plusieurs travaux de recherche ont mis en évidence que le solvant choisi pour l'extraction est reconnu comme l'un des paramètres les plus importants dans ce processus. Ainsi, la différence de polarité des solvants d'extraction pourrait entraîner une grande variation des niveaux de composés bioactifs dans l'extrait (Turkmen, Sari et al. 2006, Do, Angkawijaya et al. 2014, Ngo, Scarlett et al. 2017).

Cette étude a utilisé trois solvants organiques (méthanol acidifié, éthanol, chloroforme) pour extraire les composés bioactifs des fruits étudiés, qui ont abouti à divers rendements d'extraction. Un rendement d'extraction plus élevé a été observé dans les extraits anthocyanes (méthanol acidifié) et éthanoliques par rapport aux extraits chloroformiques ce qui indique que l'efficacité d'extraction favorise les solvants hautement polaires. Cela peut être dû au fait que la matière végétale, notamment les fruits colorés sont riches en composés polaires (polyphénols et d'anthocyanes) solubles dans des solvants à polarité élevée tels que le méthanol et l'éthanol (Turkmen, Sari et al. 2006, Sarker et Nahar 2012, Do, Angkawijaya et al. 2014, Ngo, Scarlett et al. 2017).

Tableau 8 : les données ethnobotaniques des fruits testés et leurs masses d'extraits et leurs rendements en pourcentage.

Nom commun	Nom latin	Code des fruits	Masse d'extraits méthanol acidifié (mg)	Rendement d'extraction méthanol acidifié (%)	Masse d'extraits chloroforme (mg)	Rendement d'extraction chloroforme (%)	Masse d'extraits EtOH (mg)	Rendement d'extraction EtOH (%)
Framboises	<i>Rubus idaeus</i> <i>subsp. strigosus</i>	RI2018	250	25	40	2	200	10
Bleuets	<i>Vaccinium angustifolium</i>	VAB2018	420	42	73	3,7	570	28,5
Bleuets noirs	<i>Vaccinium myrtilloides</i>	Vmy2018	300	30	55	2,8	540	27
Mûres noires	<i>Rubus setosus</i>	RS2018	220	22	40	2	500	25
		RS2019	170	17	68	3,4	460	23
Quatre-temps	<i>Cornus canadensis</i>	CC 2018	80	8	70	3,5	350	17,5
Catherinettes	<i>Rubus pubescens</i>	RP2019	260	26	60	3	540	27
Merises	<i>Prunus pensylvanica</i>	PP2018	200	20	64	3,2	400	20
Amélanchier	<i>Amelanchier spicata</i>	AS2019	150	15	52	2,6	630	31,5
Canneberges	<i>Vaccinium oxycoccos</i>	VO2019	190	19	65	3,3	450	22,5
Canneberges	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	VM2019	200	20	80	4	320	16
Clintonie boréale	<i>Clintonia borealis</i>	CB2019	90	9	31	1,6	250	12,5
Aronia noire	<i>Aronia prunifolia</i>	AP2019	260	26	37	1,9	490	24,5
Sorbier rouge	<i>Sambucus racemosa</i> subsp. <i>pubens</i> var. <i>pubens</i>	SR2019	170	17	30	1,5	320	16
Aralie à tige nue	<i>Aralia nudicaulis</i>	AN2019	200	20	34	1,7	610	30,5
Actée à grappes rouges	<i>Actaea rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	AR2019	80	8	66	3,3	260	13
Cerises de sable	<i>Prunus pumila</i>	Ppu2019	130	13	30	1,5	550	27,5

En effet, les solvants alcooliques sont capables de fragiliser davantage les parois cellulaires et augmenter ainsi leurs perméabilités permettant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules polaires (Seidel 2012).

Ainsi, afin de mieux comprendre l'effet des solvants sur le rendement d'extraction, il faut procéder à une analyse plus approfondie en mesurant la teneur en composés bioactifs (phénoliques, alcaloïdes, flavonoïdes et terpénoïdes) dans l'extrait (Turkmen, Sari et al. 2006, Do, Angkawijaya et al. 2014). Il faut noter que la composition et les teneurs en composés bioactifs dans les extraits varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille, mais également en fonction du rendement d'extraction et donc en fonction du solvant d'extraction utilisé (Sarker et Nahar 2012, Seidel 2012).

Toutefois, il est difficile de comparer les rendements obtenus avec ceux de la bibliographie, car plusieurs fruits ont été étudiés pour la première fois au cours de ce projet, notamment, les fruits de *V. myrtilloides*, *R. setosus*, *R. pubescens*, *P. pensylvanica*, *A. rubra* subsp. *rubra*, *C. borealis* et *S. racemosa* subsp. *pubens* var. *pubens*. De plus, le rendement n'est que relatif, il dépend de la méthode et des conditions d'extraction, ainsi que de l'origine géographique du fruit.

5.2 Activité antibactérienne :

5.2.1 Test de diffusion sur agar :

L'activité antimicrobienne de 51 extraits de fruits (méthanol acidifié, éthanol et chloroforme) a été évaluée contre une gamme de 22 bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Les tableaux 9, 10 et 11 illustrent les résultats des tests de diffusion sur disque sur agar, en fonction des diamètres mesurés des zones d'inhibitions (DZI) obtenues. Les résultats ont montré que les souches bactériennes testées ont présenté des sensibilités solvant-dépendantes envers les fruits étudiés.

Ainsi, en se référant à la classification de Ponce (Ponce, Fritz et al. 2003), tous les extraits montrant plus de 7 mm (le diamètre de disque est de 7 mm) du diamètre de zone d'inhibition ont été considérés comme actifs contre les souches étudiées. Les disques témoins imbibés des solvants utilisés pour la solubilisation des extraits : l'EtOH/eau (70 %, v/v), le MeOH/eau (70:30, v/v) et le diméthylsulfoxyde (DMSO), n'ont montré aucune zone d'inhibition. Ces disques servent de témoins négatifs afin de confirmer que les disques des échantillons ont été bien séchés avant d'être déposés sur les boîtes de Pétri.

5.2.1.1. Extraits méthanol acidifié :

L'extraction au méthanol acidifiée favorise l'extraction des anthocyanes. En fait, pour les extraits d'anthocyanes, on remarque comme illustré dans le tableau 9 que la plupart des extraits était inactifs. Ainsi, seulement cinq extraits ont été actifs contre plusieurs souches de bactéries à Gram positif et à Gram négatif, ce sont les extraits de *R. setosus*, *R. pubescens*, *R. idaeus*, *C. canadensis*, et les canneberges ; *V. oxycoccos* et *V. macrocarpon*. En effet, l'extrait de *C. canadensis* a montré l'activité la plus grande avec une moyenne globale de 15,9 mm du diamètre des zones d'inhibitions. En effet, parmi les bactéries à Gram négatif *Burkholderia cepacia* a été la plus sensible avec un DZI de 20 mm alors qu'entre les souches des bactéries à Gram positif la souche *B. subtilis* JH642 a été la plus sensible avec un DZI de 16 mm. Cependant, les zones d'inhibitions obtenues par le reste des extraits anthocyanes actifs ont été moins impressionnantes allant de 8 à 13,7 mm contre les souches testées.

C. canadensis (L.) est une petite plante d'environ 8-15 cm, de la famille de *Cornaceae*, trouvée fréquemment à la forêt boréale en Amérique du Nord et dans le sud-est d'Alaska (Suring, Goldstein et al. 2006). Elle a été étudiée par McCutcheon et coll. (1992), qui ont mis en évidence un large spectre d'activité de l'extrait méthanolique de toute la partie aérienne de *Cornus canadensis* contre *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. aureus* résistant à la méticilline et plusieurs souches de *P. aeruginosa* (McCutcheon, Ellis et al. 1992).

À notre connaissance, l'activité antibactérienne de *R. setosus* et *R. pubescens* de la famille de *Rosaceae*, n'a pas été rapportée auparavant. Cependant, l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *R. idaeus*, de *V. oxycoccos* et de *V. macrocarpon* a été largement étudiée et confirmée par plusieurs travaux de recherche (Leitão, Polizello et al. 2005, Côté, Caillet et al. 2011, Velićanski, Cvetković et al. 2012, Kranz, Guellmar et al. 2020).

5.2.1.2. Extraits éthanoliques :

Entre les extraits éthanoliques, seuls les extraits de *C. canadensis* et *R. setosus* ont montré une activité antibactérienne sur milieu solide contre les bactéries à Gram négatif, en particulier toutes les espèces de genre *Burkholderia* à l'exception du *Burkholderia multivorans* et *Burkholderia pyrrocinia* et la plupart des bactéries à Gram positif. En effet, le pouvoir antimicrobien de l'extrait éthanolique de *C. canadensis* a été mis en évidence précédemment dans une étude menée par Haider et coll. (2014), où ils ont trouvé que l'extrait éthanol 95 % de *C. canadensis* est actif contre toutes les souches testées ; *E. coli*, *Aeromonas caviae*, *Paenibacillus alvei*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium avium* subsp. *avium* et *Bacillus cereus* (Hassan, Jiang et al. 2014). Cependant,

cette étude est le premier travail de recherche qui a mis en évidence l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de *R. setosus*. Fait intéressant, comme illustré par le tableau 10 on remarque que bien que l'extrait éthanolique de *R. setosus* récolté en juillet 2018 ait été actif contre la majorité des souches testées, l'extrait éthanolique de *R. setosus* récolté en août 2019 n'a été actif que contre la souche de *B. subtilis* PY79.

Toutefois, à l'exception de *V. angustifolium*, tous les autres extraits éthanoliques ont été actifs contre au moins une des souches à Gram positif testées. Tout particulièrement, *R. idaeus*, *V. myrtilloides*, *P. pensylvanica* et *V. macrocarpon* qui ont eu les meilleures activités contre les souches à Gram positif montrant des zones d'inhibitions allant de 14 à 21 mm contre *S. aureus* résistant à la méticilline, *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis* PY79 et *B. cereus*. Ces résultats sont en corrélation avec plusieurs travaux de recherche antérieurs qui ont démontré le potentiel antibactérien des extraits éthanoliques de *R. idaeus* et *V. macrocarpon* contre ces espèces bactériennes (Viskelis, Rubinskienė et al. 2009, Krauze-Baranowska, Majdan et al. 2014, Tian, Puganen et al. 2018). Toutefois, à notre connaissance, l'activité antibactérienne de *V. myrtilloides* et *P. pensylvanica* n'a pas été rapportée auparavant. On note également une activité antibactérienne plus prononcée sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif.

5.2.1.3. Extraits chloroformiques :

Entre les 17 extraits chloroformiques testés, seulement l'extrait de *C. canadensis* a été actif contre les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif testées ; *E. coli* O157 : H7 et *B. subtilis* PY79 avec des diamètres de zones d'inhibitions de 10,7 mm et de 8,7 mm respectivement. En effet, l'activité antibactérienne de l'extrait éthanol 95 % de *C. canadensis* contre *E. coli* a été mise en évidence précédemment par Haider et coll. (2014). Cependant, à notre connaissance, l'activité antibactérienne de l'extrait chloroformique de *C. canadensis* n'avait pas été étudiée précédemment. Néanmoins, entre les 17 extraits chloroformiques, neuf extraits ont été actifs contre les souches à Gram positif ; *R. setosus*, *C. canadensis*, *R. idaeus*, *V. myrtilloides*, *A. prunifolia*, *P. pensylvanica*, *A. rubra*, *P. pumila* et *A. spicata*, ce qui est en corrélation avec les travaux de recherche de Krauze-Baranowska et coll. (2014) sur *R. idaeus* (Krauze-Baranowska, Glód et al. 2014).

Tableau 9 : diamètre des zones d'inhibitions des extraits méthanol acidifié contre les souches bactériennes testées, en (mm)
(moyennes ± écart-type, n = 3).

Extraits Souches	RS18	RS19	RP19	RI18	CC18	Vmy18	VA 18	VM19	VO19	CB19	AP19	PP18	AS19	SR19	AN 19	AR 19	Ppu 19
<i>B. cepacia</i>	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	11,3 ± 0,6	20,0 ± 1,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. stabilis</i>	9,3 ± 1,2	8,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	10,0 ± 0,0	17,7 ± 2,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. dolosa</i>	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	—	18,3 ± 1,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. ambifaria</i>	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	17,3 ± 3,2	—	—	—	8,6 ± 0,6	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. multivorans</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. vietnamiensis</i>	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,3 ± 0,6	9,3 ± 0,6	17,3 ± 0,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. ubonensis</i>	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	—	12,0 ± 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. cenocepacia</i>	8,5 ± 0,7	8,5 ± 0,7	8,5 ± 0,7	9,5 ± 0,7	19,5 ± 2,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. pyrrocinia</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. glumae</i>	8,7 ± 0,6	8,7 ± 0,6	8,7 ± 0,6	10,0 ± 0,0	18,7 ± 2,3	—	—	—	11,5 ± 3,5	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. thailandensis</i>	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,3 ± 0,6	19,0 ± 1,7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. coli</i> O157:H7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. aeruginosa</i> PA14	—	—	—	—	10,0 ± 1,4	—	—	9,5 ± 2,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. typhimurium</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. aureus</i> RM	8,3 ± 0,6	8,3 ± 0,6	8,3 ± 0,6	10,3 ± 2,1	14,7 ± 0,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. aureus</i>	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,5 ± 0,0	10,0 ± 1,0	14,0 ± 2,0	—	—	—	8,5 ± 0,7	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. faecalis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. subtilis</i> PY79	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,3 ± 0,6	13,7 ± 5,5	14,3 ± 1,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. subtilis</i> JH642	10,0 ± 0,0	9,7 ± 0,6	10,3 ± 1,5	12,0 ± 0,0	16,0 ± 1,0	—	—	—	9,5 ± 0,7	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. cereus</i>	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,7 ± 0,6	8,5 ± 0,7	10,3 ± 0,6	—	—	9,5 ± 0,7	10,0 ± 1,4	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. circulans</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. agalactiae</i>	—	—	—	—	15,5 ± 0,7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

● : Attribué pour les DZI entre 8 mm et 9,9 mm ; ● : Attribué pour les DZI entre 10 mm et 14,9 mm ; ● : Attribué pour les DZI entre 15 mm et 19,9 mm ; ● : Attribué pour les DZI supérieur à 20 mm.

Tableau 10 : diamètre des zones d'inhibitions des extraits éthanoliques contre les souches bactériennes testées, en (mm)
(moyennes ± écart-type, n = 3).

Extraits	RS18	RS1	RP19	RI18	CC18	Vmy18	VA18	VM19	VO19	CB19	AP19	PP18	AS19	SR19	AN19	AR19	Ppu19
Souches	9																
<i>B. cepacia</i>	9,3 ± 0,6	—	—	—	13,0 ± 3,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. stabilis</i>	10,0 ± 0,0	—	—	—	11,7 ± 1,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. dolosa</i>	9,0 ± 0,0	—	—	—	15,3 ± 4,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. ambifaria</i>	9,7 ± 0,6	—	—	—	16,3 ± 4,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. multivorans</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. vietnamiensis</i>	12,0 ± 0,0	—	—	—	14,0 ± 2,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. ubonensis</i>	—	—	—	—	15,0 ± 5,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. cenocepacia</i>	10,0 ± 0,0	—	—	—	13,5 ± 6,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. pyrrocinia</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. glumae</i>	10,3 ± 0,6	—	—	—	14,7 ± 1,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. thailandensis</i>	9,7 ± 0,6	—	—	—	13,0 ± 4,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. coli</i> O157:H7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. aeruginosa</i> PA14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. typhimurium</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. aureus</i> RM	13,3 ± 2,9	—	8,5 ± 0,7	17,3 ± 4,6	15,0 ± 2,0	19,3 ± 2,1	—	15,7 ± 1,5	11,0 ± 1,4	12,3 ± 4,2	10,7 ± 2,1	16,3 ± 4,0	12,0 ± 0,0	11,3 ± 1,5	14,0 ± 3,5	—	12,7 ± 2,3
<i>S. aureus</i>	11,5 ± 0,7	—	—	17,3 ± 2,9	13,7 ± 2,3	18,0 ± 1,0	—	14,0 ± 1,0	9,0 ± 1,0	8,3 ± 0,6	9,3 ± 0,6	14,7 ± 1,5	8,5 ± 0,7	8,7 ± 0,6	10,7 ± 1,2	—	10,3 ± 0,6
<i>E. faecalis</i>	15,0 ± 0,0	—	—	21,0 ± 1,4	17,0 ± 1,4	21,0 ± 0,0	—	15,7 ± 5,9	12,0 ± 0,0	15,5 ± 2,1	14,0 ± 1,4	20,0 ± 0,0	13,5 ± 0,7	15,0 ± 0,0	16,0 ± 1,4	9,0 ± 1,4	15,0 ± 0,0
<i>B. subtilis</i> PY79	15,0 ± 0,0	11,0 ± 1,4	—	20,7 ± 0,6	16,7 ± 0,6	21,3 ± 2,1	—	18,3 ± 1,5	10,7 ± 1,2	12,3 ± 1,5	14,0 ± 1,7	19,3 ± 4,0	12,5 ± 0,7	16,0 ± 2,0	17,5 ± 0,7	13,0 ± 4,2	14,3 ± 3,8
<i>B. subtilis</i> JH642	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. cereus</i>	—	—	11 ± 1,4	10,0 ± 2,0	15,3 ± 5,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. circulans</i>	—	—	—	12,0 ± 5,7	10,0 ± 0,0	—	—	10 ± 0,0	9,5 ± 0,7	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. agalactiae</i>	—	—	—	—	14,0 ± 4,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

● : Attribué pour les DZI entre 8 mm et 9,9 mm ; ● : Attribué pour les DZI entre 10 mm et 14,9 mm ; ● : Attribué pour les DZI entre 15 mm et 19,9 mm ; ● : Attribué pour les DZI supérieur à 20 mm.

Tableau 11 : diamètre des zones d'inhibitions des extraits chloroforme contre les souches bactériennes testées, en (mm) (moyennes ± écart-type, n = 3).

Extraits Souches	RS18	RS19	RP19	RI18	CC18	Vmy18	VA18	VM19	VO19	CB19	AP19	PP18	AS19	SR19	AN19	AR19	Ppu19
<i>B. cepacia</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. stabilis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. dolosa</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. ambifaria</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. multivorans</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. vietnamiensis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. ubonensis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. cenocepacia</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. pyrrocinia</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. glumae</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. thailandensis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. coli</i> O157:H7	—	—	—	—	10,7 ± 1,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. aeruginosa</i> PA14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. typhimurium</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. aureus</i> RM	13,7 ± 8,1	—	—	19,7 ± 0,6	—	21,7 ± 3,5	—	—	—	—	17,0 ± 6,6	26,3 ± 3,5	22,0 ± 1,0	—	—	27,7 ± 2,1	—
<i>S. aureus</i>	12,3 ± 4,0	—	—	18,7 ± 1,5	—	20,3 ± 0,6	—	—	—	—	18,3 ± 2,1	24,7 ± 5,0	23,7 ± 7,1	—	—	18,7 ± 3,5	—
<i>E. faecalis</i>	27,0 ± 0,0	—	—	—	—	27,0 ± 0,0	—	—	—	—	23,0 ± 0,0	28,0 ± 0,0	20,0 ± 0,0	—	—	24,0 ± 0,0	19,0 ± 0,0
<i>B. subtilis</i> PY79	13,3 ± 1,5	—	—	24,0 ± 1,4	8,7 ± 0,6	24,0 ± 1,7	—	—	—	—	18,7 ± 2,3	27,7 ± 4,9	24,0 ± 5,3	—	—	26,0 ± 7,8	14,3 ± 0,6
<i>B. subtilis</i> JH642	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. cereus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. circulans</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. agalactiae</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

● : Attribué pour les DZI entre 8 mm et 9,9 mm ; ● : Attribué pour les DZI entre 10 mm et 14,9 mm ; ● : Attribué pour les DZI entre 15 mm et 19,9 mm ; ● : Attribué pour les DZI supérieur à 20 mm.

Cependant, comme illustré par le tableau 11, on remarque que tandis que l'extrait chloroformique de *R. setosus* récolté en juillet 2018 a été actif contre plusieurs souches à Gram positif testées avec une moyenne des diamètres des zones d'inhibitions de 16,6 mm, l'extrait chloroformique de *R. setosus* récolté en août 2019 n'a été actif contre aucune souche testée.

En effet, ceux qui ont la plus forte activité sur milieu solide sont *V. myrtilloides*, *P. pensylvanica*, *A. rubra* et *A. spicata* montrant des diamètres des zones d'inhibitions allant de 18,7 à 27,7 mm contre *S. aureus* résistant à la méticilline, *S. aureus*, *E. faecalis* et *B. subtilis* PY79. Tout particulièrement, l'extrait chloroformique d'*A. rubra* a montré la zone d'inhibition la plus élevée contre la souche de *S. aureus* résistant à la méticilline, de 27,7 mm.

Fait intéressant, les activités antibactériennes de l'extrait chloroformique d'*A. rubra*, de *V. myrtilloides*, de *P. pensylvanica* et de *R. setosus* n'ont jamais été étudiées auparavant.

5.2.2 Concentration minimale inhibitrice :

Une fois que les extraits dotés du pouvoir antibactérien ont été criblés par criblage qualitatif par diffusion sur milieu solide, c.à.d. ceux qui ont montré une zone d'inhibition sur agar. On est passé à la quantification de leurs activités antibactériennes par détermination de leurs concentrations minimales inhibitrices (CMI). En effet, la limite de diffusibilité dans l'agar des différents solvants utilisés, par exemple entre le chloroforme et l'éthanol, impose une restriction artificielle, faussant partiellement les résultats. De ce fait, une quantification de la croissance bactérienne par le test de microdilution en milieu liquide permette une meilleure interprétation de l'activité antibactérienne.

5.2.2.1. Extraits méthanol acidifié :

Les résultats *in vitro* des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits (méthanol acidifié) anthocyanes étudiés sont présentés dans le tableau 12.

Tout d'abord on remarque que bien que l'extrait anthocyane de *C. canadensis* ait montré l'activité la plus intéressante sur milieu solide, ses CMI sont relativement fortes par rapport aux autres extraits actifs puisqu'elles varient entre 1,25 et 10 mg/mL, ce qui est en corrélation avec les résultats trouvés par Hassan et coll, montrant des CMI entre 1,25 et 10 mg/mL pour l'extrait méthanolique de *C. canadensis* (Hassan, Jiang et al. 2014).

On remarque que *R. pubescens* a montré les plus faibles CMI, allant jusqu'à 0,15 mg/mL contre *B. glumae*. Les CMI obtenues ont été entre 0,15 et 5 mg/mL contre les souches à Gram négatif

et entre 0,6 et 1,25 mg/mL contre les souches à Gram positif. Cette activité est espèce dépendante, ou les CMI obtenues diffèrent entre les espèces bactériennes, mais sont les mêmes contre les souches de la même espèce, soit 0,6 mg/mL contre les souches de *B. subtilis* et 1,25 mg/mL contre les souches de *S. aureus* notamment *S. aureus* résistant à la méticilline.

Toutefois, les canneberges, *V. macrocarpon* et *V. oxycoccos* ont eu les mêmes CMI contre les souches sensibles. *V. macrocarpon* a donné une CMI de 1,25 mg/mL contre *P. aeruginosa* et *B. cereus*, et *V. oxycoccos* a donné une CMI de 2,5 mg/mL contre *Burkholderia ambifaria*, *Burkholderia glumae*, *S. aureus*, *B. subtilis* JH642 et *B. cereus*.

Également, *R. idaeus* a montré des CMI relativement faibles, allant de 0,6 à 5 mg/mL contre les souches à Gram négatif et de 0,6 à 1,25 mg/mL contre les souches à Gram positif. Cependant, *R. setosus* a donné des valeurs de CMI plus fortes contre les souches à Gram négatif allant de 1,25 à 10 mg/mL alors que les CMI enregistrées ont été plus faibles contre les souches à Gram positif de 0,6 à 2,5 mg/mL.

5.2.2.2. Extraits éthanoliques :

D'après le tableau 13, on observe que les extraits éthanoliques de *R. setosus* et *C. canadensis* ont donné des valeurs de CMI beaucoup plus faibles contre les souches à Gram positif allant de 1,25 à 2,5 mg/mL et 0,6 à 2,5 mg/mL, respectivement, que celles contre les souches à Gram négatif allant de 2,5 à 10 mg/mL et 5 à 10 mg/mL, respectivement.

Entre les extraits éthanoliques étudiés, l'extrait de *V. oxycoccos* a montré la plus forte activité avec une CMI de 0,15 mg/mL contre *S. aureus* résistant à la méticilline, *S. aureus*, *E. faecalis* et *B. subtilis* PY79. Également, l'extrait éthanolique de *R. pubescens* a montré des CMI de 0,15 mg/mL contre *S. aureus* résistant à la méticilline et de 0,6 mg/mL contre *B. cereus*.

Les extraits éthanoliques de *V. macrocarpon* et d'*A. nudicaulis* ont donné aussi des faibles valeurs de CMI qui varient entre 0,15 et 1,25 mg/mL contre les souches à Gram positif sensibles. *R. idaeus*, *V. myrtilloides*, *P. pensylvanica*, *P. pumila*, *A. spicata* et *A. prunifolia* ont donné des CMI qui varient entre 0,6 et 2,5 mg/mL contre ces souches. Pour *C. borealis* et *S. racemosa*, les concentrations minimales pour inhiber les souches sensibles étaient comprises entre 1,25 et 2,5 mg/mL. *A. rubra* a donné une faible CMI de 0,3 mg/mL contre *B. subtilis* PY79 tandis que sa concentration minimale pour inhiber *E. faecalis* a été plus forte à 2,5 mg/mL.

5.2.2.3. Extraits chloroformiques :

Les concentrations minimales inhibitrices des extraits chloroformiques (Tableau 14) ont été considérées élevées, dont la plus faible concentration obtenue est de 2,5 mg/mL. En effet, les extraits qui ont montré la meilleure activité en milieu liquide sont *V. myrtilloides* et *A. rubra* avec des CMI comprises entre 2,5 et 5 mg/mL.

La CMI de l'extrait chloroformique de *C. canadensis* contre *E. coli* O157:H7 a été 10 mg/mL, cependant celle qui a été nécessaire pour inhiber *B. cereus* a été de 2,5 mg/mL. *P. pensylvanica* et *P. pumila* ont montré des CMI comprises entre 5 et 10 mg/mL.

Alors que la CMI obtenue pour *R. idaeus*, *A. spicata* et *A. prunifolia* est de 10 mg/mL.

5.2.3 Discussion de l'activité antibactérienne :

Au cours de cette étude, 51 extraits de fruits (méthanol acidifié, éthanol et chloroforme) ont été criblés pour leurs activités antimicrobiennes contre une gamme de 22 bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Entre les 51 extraits, 32 ont été actifs contre au moins une des souches testées ; 7 extraits méthanoliques, 16 extraits éthanoliques et 9 extraits chloroformiques. En effet, les spectres d'activités limités des extraits anthocyanes (méthanol acidifié) et chloroformiques peut être influencés par plusieurs facteurs externes tels que, la stabilité des anthocyanes vis-à-vis les conditions des cultures bactériennes et la limite de diffusion des extraits chloroformiques qui sont insolubles dans l'eau sur la gélose du milieu MHA.

Les anthocyanes sont une sous-classe de flavonoïdes, responsables de la coloration bleue, violette et rouge de différentes parties de la plante (fleurs, fruits et autres tissus végétaux). Ils sont très abondants dans différents fruits, en particulier dans la majorité des types de baies (Mazza 2007). Cependant, la teneur en anthocyanes dans les fruits dépend de l'origine des plantes, des caractéristiques des cultivars, des conditions climatiques et des conditions et du lieu de la végétation (Majiene, Liobikas et al. 2014).

Les anthocyanes possèdent un très large spectre d'activités pharmacologiques, ils peuvent agir comme des composés anti-inflammatoires, anticancéreux, antidiabétiques, antioxydants et antimicrobiens (Majiene, Liobikas et al. 2014, Liu, Liu et al. 2018). En effet, le potentiel antibactérien des anthocyanes est connu depuis le XVI^e siècle, lorsque le jus de mûres a été utilisé dans le traitement des infections bactériennes au niveau de la bouche et des yeux (Dai, Patel et al. 2007). Toutefois, les anthocyanes sont extrêmement instables. Leur dégradation au cours du traitement est influencée par la température (Skrede, Wrolstad et al. 2000), le pH (Lee,

Durst et al. 2005), l'activité enzymatique (Kader, Irmouli et al. 1999), l'oxygène (Pang, Zhang et al. 2001) et la lumière (G.H, Frydoonfar et al. 2006). La température demeure l'un des facteurs de dégradation les plus importants. En effet, après incubation des disques imbibés des extraits anthocyanes pendant 18 à 24 h à 30 °C, les extraits changent ou perdent totalement leur couleur. En effet, les anthocyanes sont très instables vis-à-vis la température et la couleur peut disparaître totalement lorsque la température atteint 60 °C (Fracassetti, Del Bo' et al. 2013, Martinsen, Aaby et al. 2020).

Les anthocyanes ont quatre structures différentes : le cation flavylum de couleur rouge, la base quinoïdale de couleur bleu-mauve, la base carbinol qui est incolore et la chalcone de couleur jaune clair, respectivement, quatre formes protonées, déprotonées, hydratées et isomères. Les quantités relatives de ces quatre structures en équilibre varient en fonction du pH (Spayd, Tarara et al. 2002). Les anthocyanes sont les plus stables en pH acide (pH 1-3) en raison des changements de protonation et d'hydratation, à pH 4-5, elles sont incolores ou jaunes, et à des valeurs de pH comprises entre 6 et 7, elles sont devenues bleu-violet (Cisowska, Dorota et al. 2011).

Ainsi, le spectre d'activité antibactérienne limité des extraits anthocyanes testés peut être influencé par le pH élevé du milieu de culture MHA d'environ $7,3 \pm 0,1$ à 25 °C, de la température d'incubation de 30 °C pendant une durée prolongée ou de l'effet des deux paramètres combinés.

C. canadensis est le seul fruit ayant été actif pour les trois extraits (méthanol acidifié, éthanol et chloroforme) contre au moins une des souches Gram positifs et Gram négatifs testées.

En effet, entre les extraits méthanoliques, *C. canadensis* et *R. pubescens* ont eu les plus fortes activités. Les extraits éthanoliques qui ont été les plus actifs sont *R. setosus*, *R. idaeus*, *V. myrtilloides* et *V. macrocarpon*. Cependant, les extraits chloroformiques qui ont été plus actifs en milieu solide qu'en milieu liquide sont *P. pensylvanica*, *A. rubra* et *V. myrtilloides*. Toutefois, les concentrations minimales inhibitrices des extraits chloroformiques ont été plus fortes que celles des extraits méthanoliques et éthanoliques.

Fait intéressant, bien que les extraits éthanoliques et chloroformiques de *R. setosus* récolté en juillet 2018 ont été actifs contre la majorité des souches testées, l'extrait éthanolique de *R. setosus* récolté en août 2019 n'a été actif que contre la souche de *B. subtilis* PY79 et l'extrait chloroformique a été inactif. Les baies, en particulier les membres de famille de *Rosaceae* (fraise, framboise, mûre) et de *Ericaceae* (canneberge) sont d'excellentes sources alimentaires de composés bioactifs. Elles sont riches en composés phénoliques tels que les acides phénoliques,

les flavonoïdes (les anthocyanes), les tanins et l'acide ascorbique. En effet, la composition et la teneur en composés bioactifs des baies varient en fonction du cultivar, de la variété, du lieu de croissance, des conditions environnementales, de la nutrition des plantes, du stade de maturité et du moment de la récolte (Skrovankova, Sumczynski et al. 2015). Des études antérieures réalisées sur les rosacées ont montré que le moment de la récolte affectait tout particulièrement le contenu phénolique des fruits. Ceci peut être potentiellement la cause de la différence d'activité entre les extraits de fruits de *R. setosus* récolté en juillet 2018 et en Août 2019 (Ayala-Zavala, Wang et al. 2004, Pincemail, Kevers et al. 2012, Ariza, Martinez-Ferri et al. 2015).

Une étude menée par Ariza et coll, (2015) a mis en évidence qu'une différence de 18 jours de temps de récolte (21 mars et 9 avril) a significativement affecté la teneur en acides organiques et en composés phénoliques des fruits (au même stade de maturation) des 10 cultivars étudiés (Ariza, Martinez-Ferri et al. 2015).

Également, on remarque que les souches à Gram positif ont été beaucoup plus sensibles en milieu solide que liquide aux extraits éthanoliques et chloroformiques que les souches à Gram négatif. Ainsi, seulement les extraits éthanoliques de *C. canadensis* et *R. setosus* et les extraits chloroformiques de *C. canadensis* ont été actifs contre les souches à Gram négatif.

En effet, ceci peut s'expliquer par les différentes structures des parois cellulaires des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, ce qui engendre une différence au niveau de la perméabilité membranaire et ainsi de leurs sensibilités aux composés phénoliques (Vaara 1992, Nikaido 1994). La structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif est constituée d'environ 90 % à 95 % de peptidoglycane, auquel d'autres molécules, telles que l'acide téichoïque et les protéines, sont liées, permettant aux molécules hydrophobes de pénétrer facilement dans les cellules et d'agir à la fois sur la paroi cellulaire et dans le cytoplasme.

En revanche, la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif est caractérisée par une structure plus complexe, constituée d'une couche de peptidoglycane plus mince et fermement liée à une membrane externe. Cette bicouche lipidique composée de phospholipides est partiellement imperméable aux molécules hydrophobes, où certaines peuvent traverser lentement les porines (Plesiat et Nikaido 1992, Wu, Fleming et al. 2014), conférant ainsi aux bactéries à Gram négatif plus de résistance vis-à-vis des molécules bioactives.

Cette étude est le premier travail de recherche qui a mis en évidence l'activité antibactérienne de *R. pubescens*, *R. setosus*, *V. myrtilloides*, *P. pensylvanica* et *A. rubra*.

➤ ***Rubus pubescens* :**

Son nom commun est la catherinette ou la framboise naine. C'est un membre de la famille des rosacées (Debnath 2004). Une plante herbacée vivace d'été, originaire de l'Amérique du Nord, de 15 cm d hauteur avec des branches dressées à fleurs (Landhäuser, Stadt et al. 1997). Les feuilles sont astringentes, gastriques et dotés des propriétés médicinales (traitement des menstruations irrégulières) et les fruits ressemblent à des framboises naines et sont comestibles (Debnath 2004). Toutefois, ni la phytochimie ni l'activité antimicrobienne de cette plante n'ont été étudiées auparavant.

➤ ***Rubus setosus* :**

Son nom commun est la mûre hérissée. C'est une espèce nord-américaine de plante à fleurs de la famille des rosacées (Fernald 1950). Cette espèce est répandue dans une grande partie du centre et de l'est du Canada et dans le nord-est et le centre-nord des États-Unis. *R. setosus* est un arbuste épineux qui peut atteindre 150 cm de hauteur. Le fruit est noir et comestibles (Weakley 2012). Cependant, nous avons très peu d'informations sur cette espèce, ou les études sont limités à ses caractéristiques botaniques.

➤ ***Vaccinium myrtilloides* :**

Son nom commun est le bleuet fausse-myrtille, aussi appelé le bleuet rameau-velouté. Cette espèce de la famille des ericacées, est très répandues dans les forêts boréales canadiennes. C'est une plante arbuste qui peut atteindre 60 cm d hauteur, à fleurs peu nombreuses et à baie bleue ou noirâtre comestibles (Fadaei, Khan et al. 2021). Également, la littérature sur cette espèce est limitée à ces caractéristiques botaniques.

➤ ***Prunus pensylvanica* :**

Son nom commun est le cerisier de pin. Il s'agit d'un membre de la famille des rosacées (Auchmoody 1979). Il s'agit d'un petit arbre commun habitant une grande partie des écosystèmes de feuillus nordiques et de forêt boréale. Appelée parfois cerise de feu, de fait qu'il agit comme agent de reboisement après les incendies de forêt, en formant des peuplements purs qui fournissent de l'ombre aux autres espèces à croissance plus lente. Ces fruits sont comestibles, il est également appelé, la cerise des oiseaux, reflétant la consommation répandue du fruit par les

oiseaux comme source de nourriture (Marks 1974). Toutefois, la phytochimie et le pouvoir antimicrobien de cette espèce n'ont pas été étudiés auparavant.

➤ ***Actaea rubra*** :

Son nom commun est l'actée à grappes rouges. Il s'agit d'un membre de la famille des renonculacées. C'est une plante rhizomateuse à baies rouge brillant. Elle est originaire de l'Amérique du Nord et se trouve en Alaska et au Yukon jusqu'en Californie en allant vers le sud, et jusqu'à l'Atlantique en allant à l'est. Elle est suspectée être toxique de fait qu'elle contient la toxine renonculine, en particulier les baies (Majak, McDiarmid et al. 2010). Cette plante est rarement étudiée et sa composition phytochimique complète reste inconnue. Toutefois, une étude réalisée par Majak et Coll. a mis en évidence la présence des cycloartanes glycosides, tels que l'actéine dans ses baies (Majak, McDiarmid et al. 2010). Une autre étude menée par Nuntanakorn et Coll. sur les racines d'*A. rubra* a mis en évidence son activité antioxydante et sa richesse en polyphénols (Nuntanakorn, Jiang et al. 2007).

Tableau 12 : concentration minimale inhibitrice (CMI, mg/mL) des extraits méthanol acidifié contre les souches bactériennes testées, en (mg) (moyennes \pm écart-type, n = 2).

Extraits Souches	RS18	RS19	RP19	RI18	CC18	Vmy 18	VA18	VM19	VO19	CB1 9	AP1 9	PP1 8	AS1 9	SR1 9	AN1 9	AR1 9	Ppu 19
<i>B. cepacia</i>	10,0 \pm 0,0	10,0 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0	10,0 \pm 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. stabilis</i>	5,0 \pm 0,0	10,0 \pm 0,0	1,25 \pm 0,0	2,5 \pm 0,0	10,0 \pm 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. dolosa</i>	10,0 \pm 0,0	10,0 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0	—	10,0 \pm 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. ambifaria</i>	10,0 \pm 0,0	10,0 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0	2,5 \pm 0,0	10,0 \pm 0,0	—	—	—	2,5 \pm 0,0	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>B. multivorans</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. vietnamiensis</i>	2,5 \pm 0,0	2,5 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	0,9 \pm 0,4	10,0 \pm 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. ubonensis</i>	2,5 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	—	5,0 \pm 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. cenocepacia</i>	2,5 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0	2,5 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. pyrrocinia</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. glumae</i>	1,25 \pm 0,0	1,25 \pm 0,0	0,15 \pm 0,0	2,5 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0	—	—	—	2,5 \pm 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. thailandensis</i>	2,5 \pm 0,0	2,5 \pm 0,0	0,3 \pm 0,0	1,25 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. coli</i> O157:H7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. aeruginosa</i> PA 14	—	—	—	—	10,0 \pm 0,0	—	—	1,25 \pm 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. typhimurium</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. aureus</i> RM	2,5 \pm 0,0	1,25 \pm 0,0	1,87 \pm 0,8	1,25 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. aureus</i>	1,25 \pm 0,0	1,25 \pm 0,0	1,25 \pm 0,0	1,25 \pm 0,0	2,5 \pm 0,0	—	—	—	2,5 \pm 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. faecalis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. subtilis</i> PY79	1,25 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	1,25 \pm 0,0	1,25 \pm 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. subtilis</i> JH642	2,5 \pm 0,0	2,5 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0	—	—	—	2,5 \pm 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. cereus</i>	2,5 \pm 0,0	2,5 \pm 0,0	1,25 \pm 0,0	1,25 \pm 0,0	10,0 \pm 0,0	—	—	1,25 \pm 0,0	2,5 \pm 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. circulans</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. agalactiae</i>	—	—	—	—	10,0 \pm 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Tableau 13 : concentration minimale inhibitrice (CMI, mg/mL) des extraits éthanoliques contre les souches bactériennes testées, en (mg) (moyennes ± écart-type, n = 2).

Extraits Souches	RS18	RS19	RP19	RI18	CC18	VMY18	VA18	VM19	VO19	CB19	AP19	PP18	AS19	SR19	AN19	AR 19	PPu1 9
<i>B. cepacia</i>	10,0 ± 0,0	—	—	—	10,0 ± 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. stabilis</i>	5,0 ± 0,0	—	—	—	5,0 ± 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. dolosa</i>	5,0 ± 0,0	—	—	—	10,0 ± 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. ambifaria</i>	5,0 ± 0,0	—	—	—	10,0 ± 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. multivorans</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. vietnamiensis</i>	2,5 ± 0,0	—	—	—	5,0 ± 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. ubonensis</i>	--	—	—	—	5,0 ± 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. cenocepacia</i>	2,5 ± 0,0	—	—	—	5,0 ± 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. pyrrocinia</i>	--	—	—	—	--	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. glumae</i>	2,5 ± 0,0	—	—	—	5,0 ± 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. thailandensis</i>	2,5 ± 0,0	—	—	—	5,0 ± 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. coli</i> O157:H7	—	—	—	—	--	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. aeruginosa</i> PA14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. typhimurium</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. aureus</i> RM	1,25 ± 0,0	—	0,15 ± 0,0	2,5 ± 0,0	1,25 ± 0,0	2,5 ± 0,0	—	0,15 ± 0,0	0,15 ± 0,0	2,5 ± 0,0	1,25 ± 0,0	1,25 ± 0,0	0,6 ± 0,0	2,5 ± 0,0	1,25 ± 0,0	—	1,25 ± 0,0
<i>S. aureus</i>	1,25 ± 0,0	—	—	1,25 ± 0,0	1,25 ± 0,0	2,5 ± 0,0	—	0,3 ± 0,0	0,15 ± 0,0	1,25 ± 0,0	0,9 ± 0,4	1,25 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,25 ± 0,0	0,6 ± 0,0	—	0,6 ± 0,0
<i>E. faecalis</i>	2,5 ± 0,0	—	—	1,25 ± 0,0	2,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0	—	0,3 ± 0,0	0,15 ± 0,0	1,25 ± 0,0	2,5 ± 0,0	1,25 ± 0,0	2,5 ± 0,0	2,5 ± 0,0	1,25 ± 0,0	2,5 ±	2,5 ± 0,0

<i>B. subtilis</i> PY79	1,25 ± 0,0	5,0 ± 0,0	—	1,25 ± 0,0	1,25 ± 0,0	1,25 ± 0,0	—	0,6 ± 0,0	0,15 ± 0,0	2,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	2,5 ± 0,0	2,5 ± 0,0	0,15 ± 0,0	0,3 ± 0,0	1,25 ± 0,0
<i>B. subtilis</i> JH642	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. cereus</i>	—	—	0,6 ± 0,0	1,25 ± 0,0	2,5 ± 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. circulans</i>	—	—	—	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	—	—	1,25 ± 0,0	1,25 ± 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. agalactiae</i>	—	—	—	—	2,5 ± 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Tableau 14 : concentration minimale inhibitrice (CMI, mg/mL) des extraits chloroformiques contre les souches bactériennes testées, en (mg) (moyennes \pm écart-type, n = 2).

Extraits Souches	RS18	RS19	RP19	RI18	CC18	VMY18	VA18	VM19	VO19	CB19	AP19	PP18	AS19	SR19	AN19	AR19	PPu19
<i>B. cepacia</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. stabilis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. dolosa</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. ambifaria</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. multivorans</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. vietnamiensis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. ubonensis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. cenocepacia</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. pyrrocinia</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. glumae</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. thailandensis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>E. coli</i> O157:H7	—	—	—	—	10,0 \pm 0,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. aeruginosa</i> PA14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. typhimurium</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. aureus</i> RM	5,0 \pm 0,0	—	—	10,0 \pm 0,0	—	2,5 \pm 0,0	—	—	—	—	10,0 \pm 0,0	10,0 \pm 0,0	10,0 \pm 0,0	—	—	2,5 \pm 0,0	—
<i>S. aureus</i>	5,0 \pm 0,0	—	—	10,0 \pm 0,0	—	2,5 \pm 0,0	—	—	—	—	10,0 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0	10,0 \pm 0,0	—	—	5,0 \pm 0,0	—
<i>E. faecalis</i>	10,0 \pm 0,0	—	—	—	—	5,0 \pm 0,0	—	—	—	—	10,0 \pm 0,0	10,0 \pm 0,0	10,0 \pm 0,0	—	—	5,0 \pm 0,0	10,0 \pm 0,0
<i>B. subtilis</i> PY79	2,5 \pm 0,0	—	—	10,0 \pm 0,0	2,5 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0	—	—	—	—	10,0 \pm 0,0	10,0 \pm 0,0	10,0 \pm 0,0	—	—	5,0 \pm 0,0	5,0 \pm 0,0
<i>B. subtilis</i> JH642	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. cereus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. circulans</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. agalactiae</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Tableau 15 : diamètre des zones d'inhibitions des extraits éthanoliques contre les souches de levures testées (n = 3).

Extraits	RS18	RS19	RP19	RI18	CC18	VMy18	VA18	VM19	VO19	CB19	AP19	PP18	AS19	SR19	AN19	AR19	PPu19
Souches																	
<i>Candida albicans</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10,7 ± 1,2	—	—	—	—	—	—	—
<i>Cryptococcus neoformans</i> H99	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

5.3 Activité antifongique :

Entre les 51 extraits de fruits (méthanol acidifié, éthanol et chloroforme) testés contre les deux souches de levures *C. albicans* et *C. neoformans* H99, comme illustré dans le tableau 15, et les sept souches de champignons on remarque que seul l'extrait éthanolique de *C. borealis* a été actif contre *C. albicans* avec un diamètre de zone d'inhibition de 10,7 mm et une CMI de 2,5 mg/mL. Ceci est en corrélation avec une étude réalisée par Borchardt et coll. (2008) qui ont mis en évidence les extraits éthanoliques des feuilles et des racines de *C. borealis* pour l'inhibition de la croissance de *C. albicans* avec des diamètres de zones d'inhibition de 11 mm (Borchardt, Wyse et al. 2008). Toutefois, les sept souches fongiques testées ont été résistantes à tous les différents extraits étudiés.

Bien que de nombreuses études aient documenté l'activité antibactérienne et anti-*Candida* des extraits de plantes (Inouye, Takizawa et al. 2001, Oliva, Piccirilli et al. 2003, Chami, Chami et al. 2004, Friedman, Henika et al. 2004, Hammer, Carson et al. 2004), il y a eu peu d'études sur les effets exercés par les extraits de fruits sur les champignons filamenteux, probablement en raison de la forte résistance de ces mycètes, notamment *A. niger* et *Fusarium sambucinum* (Inouye, Tsuruoka et al. 2000, Hammer, Carson et al. 2004). Également, plusieurs études portant sur le criblage des activités antibactérienne et antifongique des extraits de plantes ont trouvé que l'activité antimicrobienne de ces extraits était plus prononcée contre les bactéries que contre les champignons (Avato, Vitali et al. 1997, Zavala S, Pérez G et al. 1997, Ertürk 2006, Czerwińska et Szparaga 2015).

Les champignons peuvent s'adapter rapidement aux changements environnementaux et aux conditions hostiles. La rapidité avec laquelle ces adaptations surviennent et se propagent dépend de plusieurs facteurs tels que la reproduction sexuée, les changements de ploïdie et la stabilité génétique. Ces processus induisent une grande capacité pour développer et transmettre des mécanismes de résistance, qui se propagent à travers la population (Hokken, Zwaan et al. 2019).

En fonction de la nature de l'agent antifongique utilisé, la résistance peut se manifester par : (i) la formation des biofilms qui agit comme un bouclier contre les composés antifongiques et augmente l'adhérence des cellules fongiques à la surface de l'hôte (Fanning et Mitchell 2012) ; (ii) la modification structurelle du site cible suite à des mutations dans les gènes codant pour les cibles des composés antifongiques (Balkis, Leidich et al. 2002); (iii) la surexpression des pompes à efflux spécifiques aux composés antifongiques (Cannon, Lamping et al. 2009); (iv) l'activation des voies de stress (Hagiwara, Sakamoto et al. 2016).

5.4 Caractérisation phytochimique :

L'extrait doté du meilleur pouvoir antimicrobien a été sélectionné pour une étude phytochimique préliminaire, commençant par un criblage en chromatographie sur couche mince suivi d'une extrapolation de l'analyse à la chromatographie éclair sur gel de silice afin de fractionner les différents composants de l'extrait en fonction de leur polarité en continu jusqu'à l'isolement d'un composé pur responsable de cette activité antibactérienne (fractionnement bioguidé). On a commencé la caractérisation phytochimique de l'extrait chloroforme d'*A. rubra* qui a montré la meilleure activité contre une souche de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM), afin d'identifier le ou les composé(s) actif(s) pur(s) responsable(s) du pouvoir antibactérien.

Actaea rubra subsp. *rubra* (Figure 45) est une sous-espèce d'*A. rubra* de genre *Actaea* et de la famille de *Ranunculaceae*. C'est une plante herbacée originaire de l'Amérique du Nord. Ses fruits sont considérés comme particulièrement toxiques, et peuvent provoquer un arrêt cardiaque ou une paralysie respiratoire si consommés en grandes quantités (Bacon 1903, Boutin 2006).



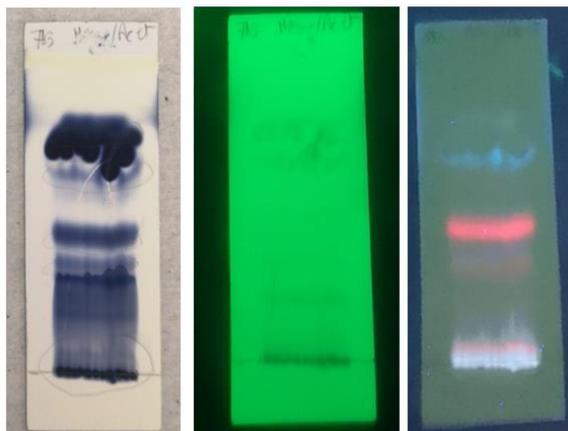
Figure 45 : photo de la plante d'*Actaea rubra*, contenant des fruits, prise à Péribonka.

5.4.1 La chromatographie sur couche mince :

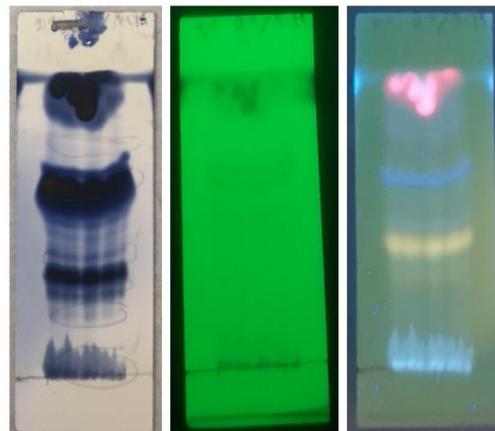
L'étude par chromatographie sur couche mince (CCM) nous a donné une première orientation sur les classes de composés présents dans l'extrait chloroformique d'*A. rubra*. Deux systèmes d'élution ont été utilisés à différentes proportions, le système dichlorométhane/méthanol et le système hexanes/acétate d'éthyle. Les résultats de la révélation sous UV à 356 nm (Figures 46 et 47) montrent l'apparition de quatre bandes de couleurs différentes pour les deux systèmes d'élution et donc de la présence de quatre familles différentes de métabolites secondaires. La bande bleue fluorescente observée sous UV à 356 nm pourrait être des triterpènes (lactones sesquiterpéniques) (Waksmundzka-Hajnos, Sherma et al. 2008). La bande violette fluorescente pourrait être des alcaloïdes (Wagner et Bladt 1996, Harborne 1998).

1er système d'élution : hexanes/acétate d'éthyle
(7:3)

2e système d'élution : DCM/MeOH (9:1)



(a) (b) (c)
Figure 46 : profil CCM de l'extrait chloroformique d'*A. rubra* avec le système hexanes/acétate d'éthyle.



(a) (b) (c)
Figure 47 : profil CCM de l'extrait chloroformique d'*A. rubra* avec le système d'élution dichlorométhane/méthanol.

(a) avec CAM, (b) sous UV 254 nm et (c) sous UV 356 nm

La bande rose pourrait être des flavonoïdes (Syarifah, Retnowati et al. 2019) et la bande jaune orangé pourrait être des saponines (Simão, Barboza et al. 2018). En effet, les alcaloïdes, les flavonoïdes et les sesquiterpènes sont de puissants métabolites secondaires végétaux dotés d'un large spectre de bioactivité (Mazid, Khan et al. 2011). L'activité antimicrobienne la plus élevée de l'extrait chloroformique d'*A. rubra* sur la SARM pourrait être attribuée à la présence de grandes quantités d'alcaloïdes, qui sont des composés de base pharmacogéniquement actifs (Das, Tiwari et al. 2010). En effet, une étude menée par Karou et coll. (2006) a démontré que l'alcaloïde indoloquinoline inhibe la croissance de *S. aureus* par la lyse cellulaire (Karou, Savadogo et al. 2006). Ainsi, l'activité biologique est attribuée à la nature et la quantité de divers métabolites secondaires dans un extrait de plante donnée (Mazid, Khan et al. 2011). De plus, la présence de plusieurs classes de métabolites secondaires dans un extrait végétal donné déterminera également l'étendue de l'activité biologique de l'extrait (Wang, Ni et al. 2010).

5.4.2 La chromatographie sur colonne de silice :

➤ Fractionnement de l'extrait chloroformique d'*A. rubra* :

Le fractionnement chromatographique de 534 mg de l'extrait chloroformique d'*A. rubra* avec un gradient d'élution de 10 % d'hexanes/acétate d'éthyle et un gradient de dichlorométhane/méthanol allant de (100:0, v/v) à (50:50, v/v) a permis de récupérer sept fractions, présentées dans le tableau 16.

Tableau 16 : résultat de fractionnement sur colonne de gel de silice de l'extrait chloroforme d'*A. rubra*.

N° de la fraction	Nom de la fraction	Gradient d'élué	Masse de la fraction	Rendement de fractionnement	Couleur
1	AR01	Hexanes/acétate d'éthyle (90:10 v/v)	100 mg	18,7 %	Jaune huileux
2	AR02	Hexanes/acétate d'éthyle (90:10 v/v)	89 mg	16,7 %	Blanchâtre
3	AR03	Hexanes/acétate d'éthyle (80:20, v/v)	83 mg	15,5 %	Jaune
4	AR04	Hexanes/acétate d'éthyle (70:30, v/v)	66 mg	12,3 %	Blanchâtre
5	AR05	Hexanes/acétate d'éthyle (20:80, v/v)	125 mg	23,4 %	Jaune
6	AR06	Hexanes/acétate d'éthyle (10:90, v/v)	46 mg	8,6 %	Blanchâtre
7	AR07	Dichlorométhane/méthanol (50:50, v/v)	31 mg	5,8 %	Orangé

➤ **Activité anti-SARM des fractions isolées par chromatographie sur colonne :**

Toutes les fractions obtenues par chromatographie sur colonne de silice de l'extrait chloroformique d'*A. rubra* ont été ensuite soumises à un criblage antibactérien contre une souche de *S. aureus* résistante à la métilcilline pour identifier les fractions les plus actives. Le résultat du test de diffusion sur agar présenté par la figure 48 a révélé que sur sept fractions (appelées AR01-AR07), seules deux fractions présentaient une activité antibactérienne contre la souche testée, AR02 et AR07.

La fraction AR02 a montré une activité plus forte avec un diamètre de zone d'inhibition de 13 mm contre 10 mm pour la fraction AR07. En effet, les composants de ces deux fractions sont de polarité très différente.



Figure 48 : résultat du test de diffusion sur gélose des fractions de l'extrait chloroformique d'*A. rubra*.

Ainsi, la fraction AR02 est apolaire, elle a été éluée avec une proportion de (90:10, v/v) hexanes/acétate d'éthyle, tandis que la fraction AR07 est la plus polaire comme elle a été éluée avec une proportion de (1:1, v/v) dichlorométhane/méthanol.

Tout en suivant un fractionnement bioguidé, maintenant que nous avons identifié des fractions actives de l'extrait chloroformique d'*A. rubra*, les deux fractions actives ont été choisies pour un deuxième fractionnement sur colonne afin d'isoler un ou plusieurs composé(s) responsable(s) de cette activité antibactérienne.

➤ Fractionnement de la fraction apolaire AR02 :

Le fractionnement sur colonne de silice de 89 mg de la fraction AR02 avec un gradient d'éluion de 1 % d'hexanes/acétate d'éthyle a permis de récupérer cinq fractions, présentées dans le tableau 17.

Tableau 17 : résultat de fractionnement sur colonne de gel de silice de la fraction AR02.

N° de la fraction	Nom de la fraction	Gradient d'éluion	Masse de la fraction	Rendement de fractionnement	Couleur
1	AR0201	Hexanes/acétate d'éthyle (99:1 v/v)	21 mg	23,6 %	Jaune-blanchâtre
2	AR0201	Hexanes/acétate d'éthyle (98:2 et 97:3 v/v)	15 mg	14,6 %	Blanchâtre
3	AR0203	Hexanes/acétate d'éthyle (96:4 et 95:5 v/v)	27 mg	29,2 %	Blanche
4	AR0204	Hexanes/acétate d'éthyle (94:6 à 91:9 v/v)	14 mg	21,3 %	Jaune orangé
5	AR0205	Hexanes/acétate d'éthyle (90:10 à 80:20 v/v)	8 mg	16,8 %	Blanchâtre

Les fractions obtenues ont été analysées sur CCM. Le résultat du profil CCM a montré que la fraction AR0202 a donné une bande qui semble être pure avec le système d'éluion (95:5, v/v) de dichlorométhane/méthanol, comme illustré dans la figure 49. De ce fait, afin de déterminer la structure moléculaire de la fraction AR0202, l'analyse par des techniques de spectrométrie avancées, notamment la RMN ¹H, a été effectuée.

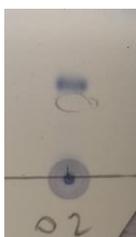


Figure 49 : le profil de la fraction AR0202 sur CCM avec le système dichlorométhane/méthanol (95 : 5).

Le spectre obtenu est illustré par la figure 50. En effet, en se basant sur les déplacements chimiques et l'intégration des signaux, on remarque que le spectre RMN ^1H de la fraction AR0202, présente un profil qui ressemble à celui de *para*-crésol (Hafiz et Oakley 1976).

Le *para*-crésol est un composé phénolique produit par la microflore intestinale chez l'homme et l'animal par la dégradation de la tyrosine via le *para*-hydroxyphénylacétate (p-HPA) (Dawson, Donahue et al. 2011).

Plusieurs études ont montré que ce composé a des propriétés antibactériennes contre une large gamme des bactéries, notamment, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* et *Salmonella Sp.* (Höferl, Buchbauer et al. 2009, Passmore, Letertre et al. 2018). En effet, l'intégration des déplacements chimiques (δ) des protons à 7,18 ppm et 6,28 ppm peut nous proposer la présence de deux atomes d'hydrogène, le déplacement chimique des protons à 5,32 ppm montre le groupement hydroxyle OH avec le déplacement chimique des protons à 1,7 ppm peut donner trois atomes d'hydrogène.

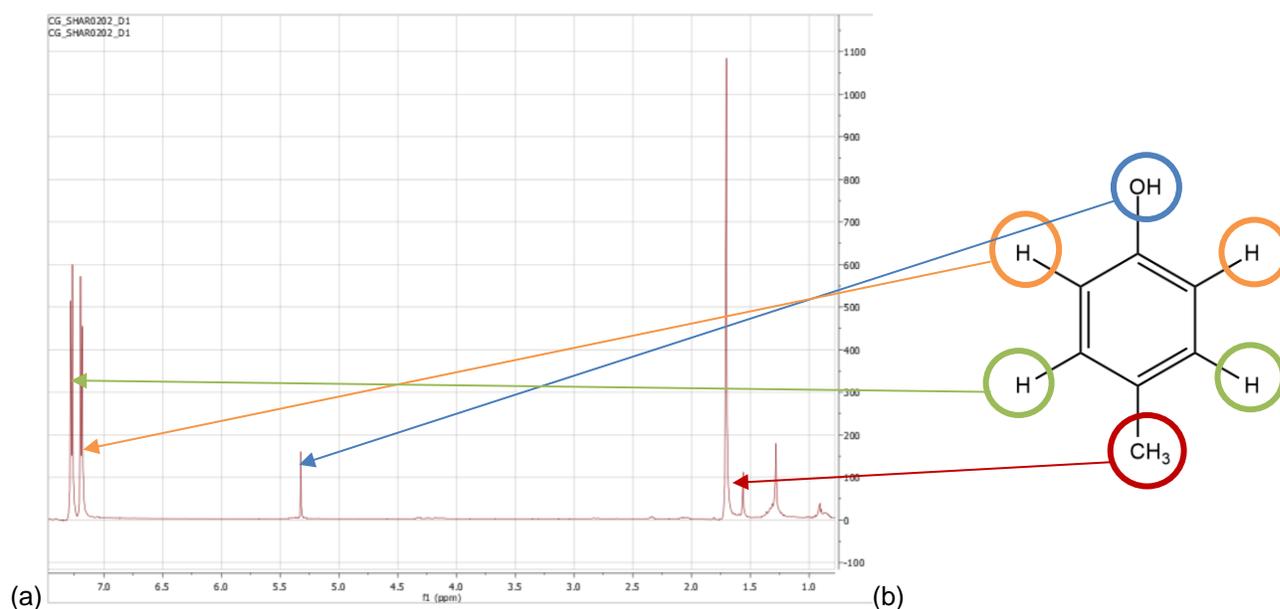


Figure 50 : le spectre ^1H RMN de la fraction AR0202 (a), la structure développée de p-Crésol (b).

➤ Activité anti-SARM des sous fractions de la fraction AR02 :

Les cinq fractions obtenues par fractionnement par chromatographie sur colonne de silice de la fraction AR02 ont été criblées pour leur pouvoir antibactérien contre *S. aureus* résistant à la méticilline afin d'isoler les biomolécules actives. Le résultat du test de diffusion sur agar présenté à la figure 51 a révélé que sur les cinq fractions testées, seule la fraction la plus apolaire AR0201 a été active contre la souche testée, avec un diamètre de zone d'inhibition de 11 mm.

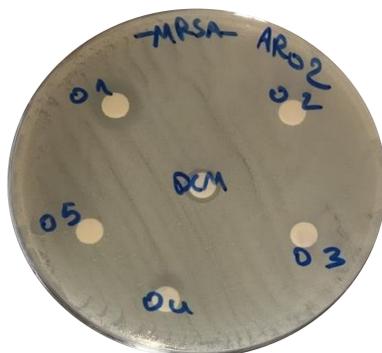


Figure 51 : résultat du test de diffusion sur gélose des sous fractions de la fraction AR02.

Également, un test de diffusion sur agar de *p*-crésol contre *S. aureus* résistant à la méticilline a été réalisé. Le résultat, illustré par la figure 52, présente que le *p*-crésol inhibe la croissance de cette souche avec un diamètre de zone d'inhibition de 30 mm.

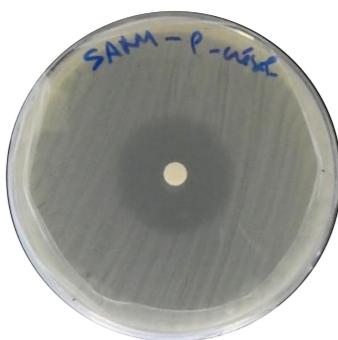


Figure 52 : test de diffusion sur agar de P-crésol contre la souche de SARM.

Cependant, comme illustré dans la figure 51 la fraction AR020102 qui a montré un spectre ¹H RMN ressemblant celui de *p*-crésol, a été inactif contre cette souche. Ceci peut nous laisser supposer que soit cette fraction est différente de *p*-crésol, soit que son pouvoir antibactérien a été limité par sa faible masse.

➤ Fractionnement de la fraction active AR0201 :

Tout en suivant le fractionnement bioguidé, la fraction active AR0201 a été choisie pour un troisième fractionnement sur colonne afin d'isoler un ou plusieurs composé(s) responsable(s) de cette activité antibactérienne. Le fractionnement sur colonne de silice par phase inverse de 21 mg de la fraction AR0201 a donné quatre fractions, présentées dans le tableau 18.

Tableau 18 : résultat de fractionnement sur colonne de gel de silice de la fraction AR0201.

N° de la fraction	Nom de la fraction	Gradient d'élution	Masse de la fraction	Rendement de fractionnement	Couleur
1	AR020101	H ₂ O/acétonitrile (90:10 v/v)	9 mg	42,8 %	Blanchâtre
2	AR020102	H ₂ O/acétonitrile (80:20 v/v)	6 mg	28,6 %	Blanchâtre
3	AR020103	H ₂ O/acétonitrile (70:30 v/v)	5,7 mg	27,1 %	Blanchâtre
4	AR020104	100% acétonitrile	5 mg	23,8 %	Blanchâtre

➤ Activité anti-SARM des sous fractions de la fraction AR0201 :

Le test de diffusion sur agar des fractions isolées de la fraction AR0201 contre *S. aureus* résistant à la méticilline présenté à la figure 53 a révélé que les deux fractions AR020101 et AR020103 ont été actives contre la souche testée, avec des diamètres de zones d'inhibitions de 10 et 12 mm, respectivement.



Figure 53 : résultat du test de diffusion sur gélose des sous fractions de la fraction AR0201.

➤ Fractionnement de la fraction active AR07 :

Le fractionnement sur phase inverse sur gel de silice de la fraction AR07 de l'extrait chloroformique d'*A. rubra* avec un gradient d'éluion de 10 % d'eau/acétonitrile a permis de récupérer quatre fractions, présentées dans le tableau suivant 19.

Tableau 19 : résultat de fractionnement sur colonne de gel de silice de la fraction AR07.

N° de la fraction	Nom de la fraction	Gradient d'éluion	Masse de la fraction	Rendement de fractionnement	Couleur
1	AR0701	H ₂ O/acétonitrile (100:0 v/v)	14 mg	45,2 %	Orangé
2	AR0702	H ₂ O/acétonitrile (20:80 v/v)	6 mg	19,3 %	Jaune
3	AR0703	H ₂ O/acétonitrile (10:90 v/v)	5,9 mg	19 %	Blanchâtre
4	AR0704	100% acétonitrile	12 mg	38,7 %	Blanchâtre

➤ Activité anti-SARM des fractions isolées de la fraction AR07 :

Le test de diffusion sur agar des fractions isolées de la fraction AR07 contre *S. aureus* résistant à la métiline présenté par la figure 54 a révélé qu'entre les quatre fractions obtenues, seule la fraction AR0702 a été active, avec un diamètre de zone d'inhibition de 20 mm. En effet, la fraction AR0702 a montré une activité beaucoup plus importante que la fraction originale AR07, ce qui montre que plus l'extrait actif est pur, plus l'activité antibactérienne est forte.



Figure 54 : résultat du test de diffusion sur gélose des fractions isolées de la fraction AR07.

Pour récapituler, l'extrait chloroformique d'*A. rubra* a été le plus actif contre *S. aureus* résistant à la métiline (SARM). De ce fait, il a été sélectionné pour passer à l'étude phytochimique afin d'identifier le ou les composé(s) actif(s) pur(s) responsable(s) de pouvoir

antibactérien. Dans cette étude, la chromatographie sur colonne de gel de silice a été utilisée tout d'abord, pour le fractionnement et la purification de l'extrait brut, dont on a suivi un fractionnement bioguidé. C-à-d. que les fractions obtenues après chaque séparation ont été criblées par test biologique, et ceux qui ont présenté une activité antibactérienne ont été sélectionnés pour la prochaine purification. Deux systèmes d'élution ont été utilisés, le système hexanes/acétate d'éthyle et le système dichlorométhane/méthanol. Les analyses par CCM des fractions AR0201 avec le système (hexanes/acétate d'éthyle 9:1) et AR07 avec le système dichlorométhane/méthanol (Figures 55 et 56) n'ont pas permis d'obtenir une meilleure séparation entre les fractions, qui semblent avoir le même profil, sauf pour la fraction AR020103 qui a montré une bande pure sur CCM et qui est également une fraction active. Par la suite, on est passé à un fractionnement par RP-HPLC afin d'isoler les composés responsables de cette activité antibactérienne. En effet, comme illustré dans le schéma récapitulatif (Figure 57), en se basant sur le fractionnement bioguidé, on a pu isoler trois sous-fractions actives contre *S. aureus* résistant à la méticilline ; AR020101, AR020103 et AR0702.

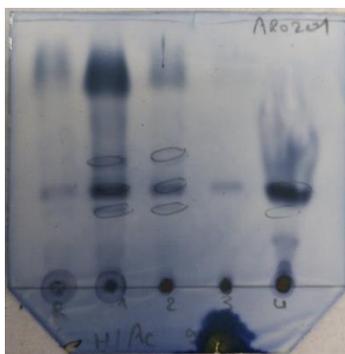


Figure 55 : profil de séparation sur CCM de la fraction AR0201 avec le système hexanes/acétate d'éthyle (9:1).

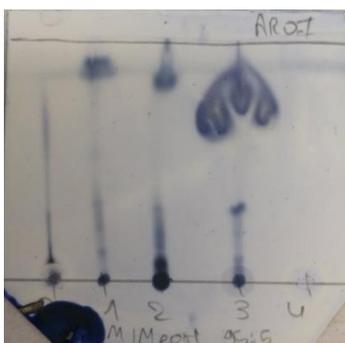


Figure 56 : profil de séparation sur CCM de la fraction AR07 avec le système DCM/MeOH (95:5).

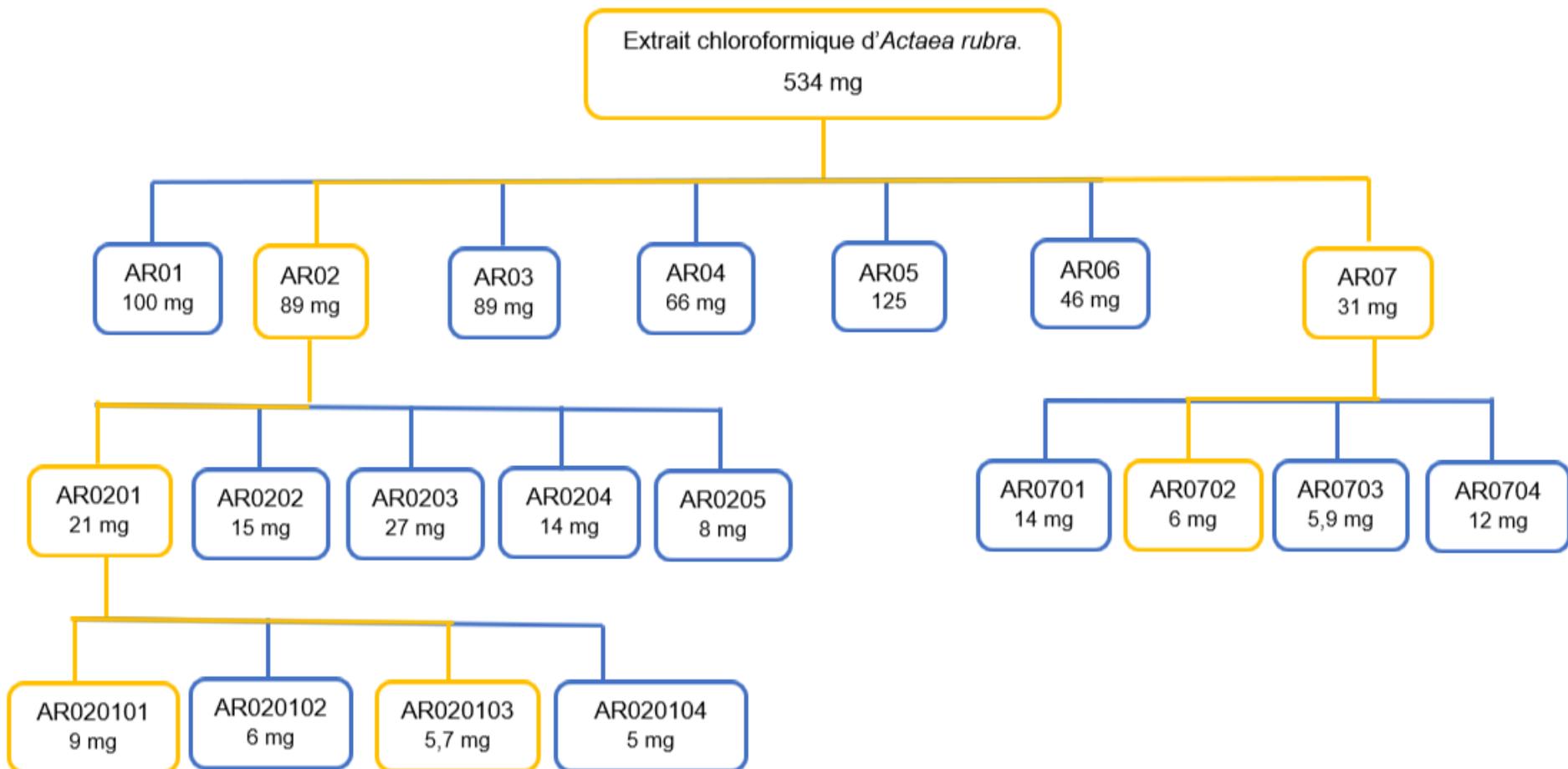


Figure 57 : schéma récapitulatif du fractionnement bioguidé de l'extrait chloroformique d'*A. rubra*.

(Les fractions actives contre une souche de SARM sont présentées en jaune)

5.4.3 Chromatographie liquide à haute pression :

Les fractions actives de l'extrait chloroformique d'*A. rubra* (AR020101, AR020103 et AR0702) obtenues par fractionnement bioguidé sur chromatographie sur colonne de silice ont été étudiées par la suite par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC) afin de purifier des composés purs actifs.

➤ Fractionnement par RP-HPLC préparative de la fraction active AR020101 :

La fraction AR020101 obtenue précédemment avec la colonne sur gel de silice a été fractionnée par RP-HPLC préparative, les masses des fractions et les rendements de fractionnement sont présentés dans le tableau 20, le chromatogramme de fractionnement est présenté par la figure 58. En effet, la méthode utilisée au préalable sur la RP-HPLC analytique est transposée sur la RP-HPLC préparative permettant d'obtenir 8 fractions en fonction des pics obtenus par le détecteur optique UV-visible à quatre longueurs d'onde 215 nm, 254 nm, 300 nm et 350 nm, ainsi que le détecteur d'aérosols chargés Corona (CAD, Charged aerosol detector).

Tableau 20 : résultat de fractionnement par RP-HPLC préparative de la fraction AR0201.

N° de la fraction	Nom de la fraction	Intervalle de temps de rétention (Minute)	Masse de la fraction	Rendement de fractionnement
1	AR02010101	0 à 4	0,4 mg	4,44 %
2	AR02010102	4 à 8	0,9 mg	10 %
3	AR02010103	8 à 36	0,6 mg	6,66 %
4	AR02010104	36 à 38	0,7 mg	7,77 %
5	AR02010105	38 à 42	0,2 mg (traces)	2,22 %
6	AR02010106	42 à 44	0,3 mg	3,33 %
7	AR02010107	44 à 48	0,3 mg	3,33 %
8	AR02010108	48 à 65	0,3 mg	3,55 %

La première fraction a été récoltée en fonction d'un pic majoritaire qui a été détectée en CAD et à 215 nm, à un temps de rétention entre 2 et 4 min, il s'agit ainsi d'une fraction très polaire. La deuxième et la cinquième fractions ont été récoltées en fonction des pics détectés à 300 nm. La troisième fraction a été récoltée en fonction du pic détecté par le CAD à un temps de rétention de 9 min. Tandis que les fractions 4, 6, 7 et 8 ont été récoltées en fonction des pics détectés à 215 nm et 254 nm. Cependant, comme indiqué dans le tableau 20, le rendement global de ce fractionnement a été relativement faible (41,3 %), ainsi les fractions n'ont pas été récoltées en quantité suffisante pour être testées biologiquement, puisque les masses obtenues étaient inférieures à 1 mg.

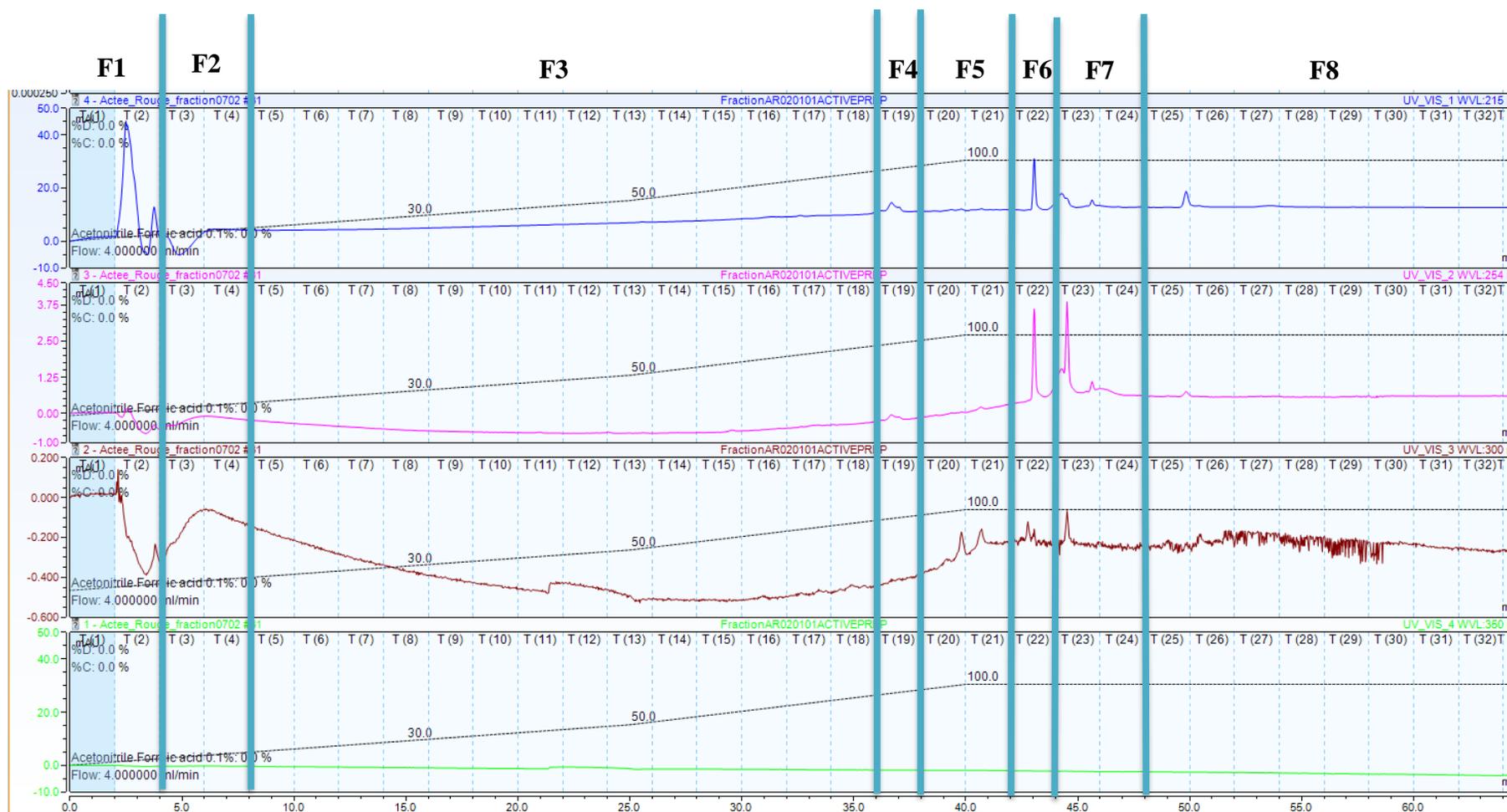


Figure 58 : profil de séparation par RP-HPLC préparative de la fraction active AR020101.
 (En bleu $\lambda = 215$ nm, en rose $\lambda = 254$ nm, en rouge $\lambda = 300$ nm et vert $\lambda = 355$ nm)

➤ Fractionnement par RP-HPLC préparative de la fraction active AR0702 :

Le fractionnement sur RP-HPLC préparative de 6 mg de la fraction AR0702 a donné quatre fractions, leurs masses sont présentées dans le tableau 21 et le chromatogramme de fractionnement est présenté à la figure 59. En effet, la première fraction a été récoltée en fonction d'un pic majoritaire qui a été détecté en CAD à 215 nm et à 254 nm à un temps de rétention de 4 min, c-à-d. qu'elle a été récoltée à 100 % d'eau et donc il s'agit d'une fraction très polaire. La deuxième et la quatrième fractions ont été récoltées en fonction des pics détectés à 300 nm et à 350 nm. La troisième fraction a été récoltée en fonction du pic détecté à 215 nm et à 254 nm à un temps de rétention de 38 min. Également, le rendement global de ce fractionnement a été faible (56 %). Donc, les fractions récoltées sont en quantités insuffisantes pour être testés puisque les masses obtenues étaient inférieures à 1 mg.

Tableau 21 : résultat de fractionnement par RP-HPLC préparative de la fraction AR0702.

N° de la fraction	Nom de la fraction	Intervalle de temps de rétention (Minute)	Masse de la fraction	Rendement de fractionnement
1	AR070201	0 à 10	0,9 mg	15 %
2	AR070202	10 à 18	0,6 mg	10 %
3	AR070203	18 à 40	0,96 mg	16 %
4	AR070204	40 à 65	0,9 mg	15 %

Malheureusement le fractionnement par RP-HPLC préparative n'était pas optimal puisque la moitié des masses des deux échantillons ont été retenues sur la colonne utilisée. De ce fait, il se peut que la colonne Hypersil GOLD™ de taille de 5 µm n'été pas optimale pour le fractionnement de notre échantillon en phase inverse. Toutefois, la faible efficacité de ce fractionnement peut être aussi due au fait que les masses des fractions de départ étaient trop faibles (de quelques milligrammes).

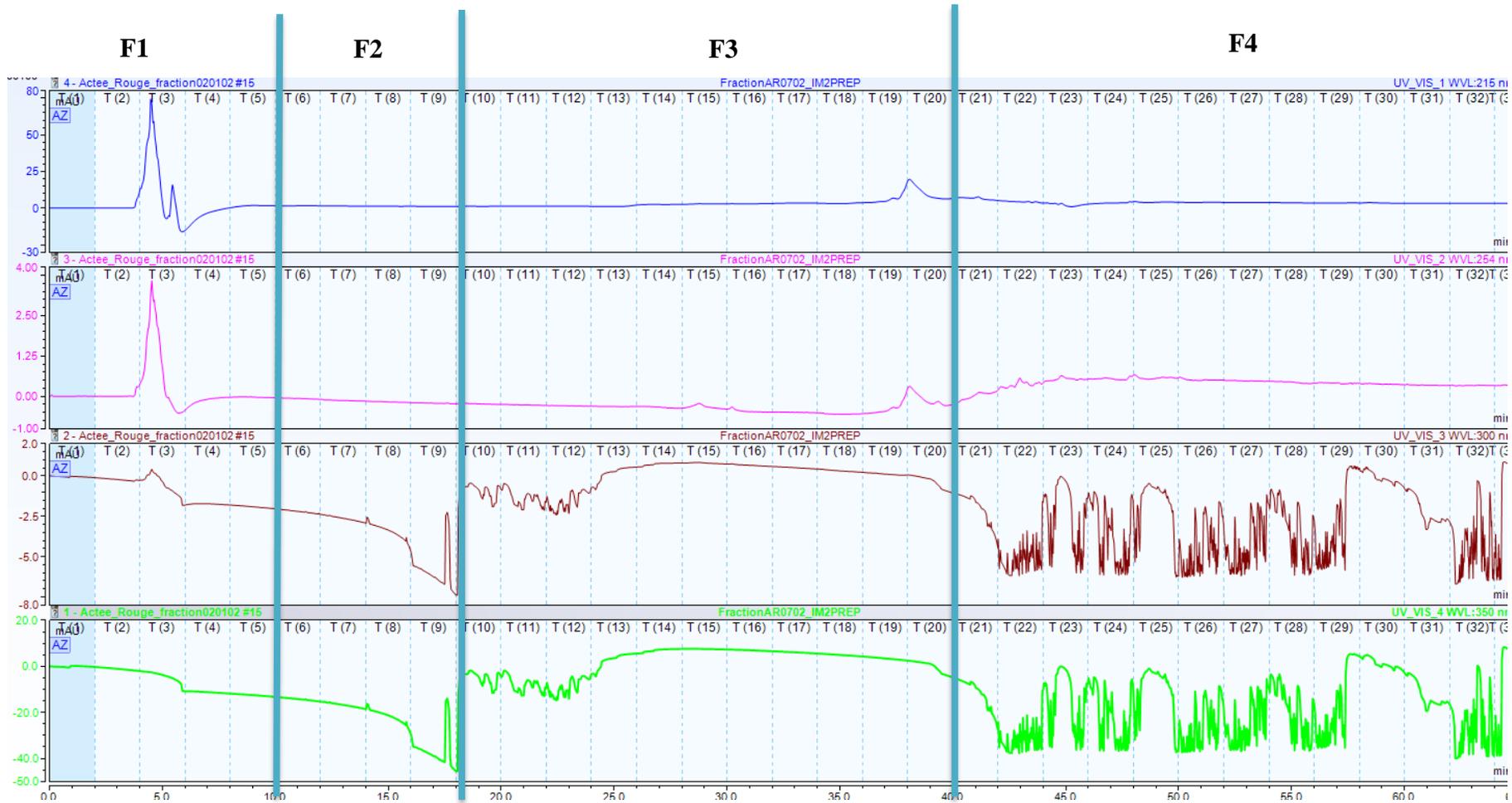


Figure 59 : fractionnement par RP-HPLC préparative de la fraction active AR0702.
 (En bleu $\lambda = 215$ nm, en rose $\lambda = 254$ nm, en rouge $\lambda = 300$ nm et vert $\lambda = 355$ nm)

5.4.4 Étude des autres parties d'*Actaea rubra* :

En raison des faibles masses des sous fractions obtenues par le fractionnement sur RP-HPLC préparative, qui sont insuffisantes pour poursuivre l'isolement et la purification des composés purs dotés d'un pouvoir antimicrobien, on a réalisé une deuxième cueillette de fruits ainsi que des feuilles, tiges et racines d'*A. rubra*, afin d'étudier le potentiel antimicrobien de plusieurs parties de cette plante.

Des extractions éthanoliques et chloroformiques ont été réalisées avec le matériel végétal récolté (feuilles, tiges et racines) en suivant les mêmes protocoles d'extractions des métabolites secondaires des fruits. Les résultats des rendements d'extractions sont présentés dans le tableau suivant. Comme illustré dans le tableau 22, le rendement d'extraction obtenu avec l'éthanol a été beaucoup plus fort que celui obtenu avec le chloroforme, ce qui confirme que l'efficacité d'extraction favorise les solvants hautement polaires. Et donc la différence de polarité entre l'éthanol et le chloroforme pourrait entraîner une grande variation des niveaux de composés bioactifs dans l'extrait. En effet, la matière végétale est riche en composés phénoliques polaires notamment les tanins qui sont insolubles dans le chloroforme (Dhawan et Gupta 2017).

Tableau 22 : les masses d'extraits des feuilles, tiges et racines d'*A. rubra* et leurs rendements d'extraction en pourcentage.

	Masse d'extraits chloroforme (g)	Rendement d'extraction chloroforme (%)	Masse d'extraits EtOH (g)	Rendement d'extraction EtOH (%)
Feuilles	0,4	10	1,2	30
Tiges	0,21	5,25	1,1	27,5
Racines	0,1	2,5	1	25

De plus, les solvants alcooliques tel que l'éthanol sont capables d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires permettant l'extraction d'une plus grande quantité de molécules polaires (Seidel 2012).

On constate que les rendements d'extractions obtenues avec les extraits chloroformique et éthanolique des feuilles sont plus élevés que les extraits des tiges et des racines. On note également que les rendements d'extractions obtenues avec les feuilles, tiges et racines d'*A. rubra* sont beaucoup plus élevés que ceux obtenus de l'extraction des fruits d'*A. rubra*. En effet, plusieurs études ont mis en évidence que la quantité, la pureté et la qualité de l'extrait végétal dépendent majoritairement de la partie de la plante utilisée, ainsi que du solvant utilisé pour l'extraction (Ullah, Wakeel et al. 2017, Jacotet-Navarro, Laguerre et al. 2018, Wakeel, Jan et al. 2019).

Les extraits obtenus ont été criblés pour leurs activités antimicrobiennes contre les mêmes souches testées précédemment. Les résultats de l'activité antimicrobienne présentés par la figure 60 sont corrélés avec les résultats de rendement d'extraction. Les extraits éthanoliques des feuilles et des tiges qui ont montré les plus forts rendements d'extractions, ont montré également les activités les plus fortes avec des moyennes des diamètres des zones d'inhibitions de $27,7 \pm 2,5$ mm et de $25,7 \pm 2$ mm, respectivement. Tandis que l'extrait éthanolique des racines a montré une activité plus faible avec une moyenne des diamètres des zones d'inhibitions de $18 \pm 2,6$ mm.

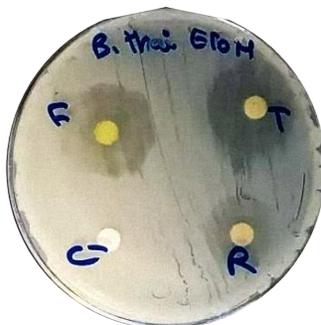


Figure 60 : résultat de test de diffusion sur agar des extraits éthanoliques des feuilles, tiges et racines d'*A. rubra* contre la souche de *B. thailandensis* E30.

Ainsi, les composés bioactifs responsables de cette activité antibactérienne ont été spécifiquement solubles dans l'éthanol et insolubles dans le chloroforme, ce qui indique que ce sont des métabolites hautement polaires. Ainsi, l'impact plus élevé des extraits éthanoliques par rapport aux extraits chloroformiques peut être attribué à la présence de quantités plus élevées de polyphénols dans les extraits éthanoliques (Tiwari, Kumar et al. 2011). En effet, la quasi-totalité des composants actifs identifiés des plantes sont des composés organiques aromatiques ou saturés, qui sont le plus souvent obtenus par extraction initiale à l'éthanol ou au méthanol. Le groupe hydroxyle dans l'éthanol aide à dissoudre les molécules polaires et les substances ioniques (Bimakr, Abdul Rahman et al. 2011).

En effet, entre les 22 souches des bactéries, les deux souches de levures et les sept souches des champignons testées, seule la souche de *B. thailandensis* E30 a été sensible aux extraits éthanoliques. *B. thailandensis* est une bactérie à Gram négatif du genre *Burkholderia*, non pathogène, isolée du sol et de l'eau dans le sud-est de l'Asie et le nord de l'Australie. Elle est étroitement apparentée à *B. pseudomallei*, un pathogène responsable de la maladie de la mélioïdose (Garcia 2017), qui peut être acquis par inhalation. En effet, de fait que la manipulation de *B. pseudomallei* nécessite une installation de confinement de niveau de sécurité biologique 3 (BSL-3) et que ce pathogène est multirésistant à un large spectre d'antibiotiques (Haraga, West et al. 2008), il serait très intéressant d'étudier l'isolement d'un composé actif pur des extraits

éthanoliques des feuilles, tiges et racines d'*A. rubra*, qui pourrait potentiellement être actif également contre ce pathogène.

6 CONCLUSION

La pandémie des souches microbiennes résistantes aux antibiotiques est devenu un problème de santé majeur, très préoccupant et coûtant des milliers de vies, partout dans le monde (Balouiri, Sadiki et al. 2016). La consommation abondante des antibiotiques au fil des années a exercé une pression de sélection sur les souches microbiennes, qui sont devenues de plus en plus résistantes. En effet, la capacité d'une seule souche pathogène à résister à plusieurs antibiotiques constitue un défi majeur pour la santé publique (Brown et Wright 2016). Par conséquent, la découverte de nouveaux agents antimicrobiens est devenue une priorité dans le monde entier. Par exemple, les plantes présentent une source riche de métabolites secondaires, qui sont des candidats antimicrobiens potentiels contre un large éventail de micro-organismes, y compris les bactéries, les champignons et les levures. En effet, les plantes étant des êtres vivants sessiles donc continuellement exposés aux infections, elles ont développé des métabolites bioactifs inhibant la croissance des microorganismes. Ces molécules bioactives sont présentes en abondance dans toutes les parties de la plante, et la majorité de ces produits naturels bioactifs ne sont toujours pas identifiés (Simoes, Bennett et al. 2009, Balouiri, Sadiki et al. 2016). Ainsi, la purification des agents antimicrobiens d'origine végétale présente une piste potentielle de médicaments pour lutter contre les infections microbiennes (Taylor 2013).

Cette étude a visé le criblage antimicrobien d'une gamme de 51 différents extraits (méthanol acidifié, éthanol et chloroforme) de fruits de 16 espèces végétales endémiques à la forêt boréale québécoise contre un large éventail de micro-organismes (22 souches bactériennes, deux souches de levure et sept souches de champignons), en mettant l'accent sur le candidat antimicrobien le plus actif pour illustrer sa composition chimique. L'activité antimicrobienne a été criblée qualitativement par le test de diffusion sur gélose et quantitativement par détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par le test de microdilution. Les résultats ont montré tout d'abord que les souches bactériennes testées ont présenté des sensibilités solvant-dépendantes envers les fruits étudiés.

Entre les 51 extraits étudiés, 32 ont été actifs contre au moins une des souches bactériennes testées ; sept extraits méthanoliques, 16 extraits éthanoliques et neuf extraits chloroformiques. Les spectres d'activités limités des extraits anthocyanes et chloroformiques peuvent être influencés par plusieurs facteurs externes tels que la stabilité des anthocyanes vis-à-vis des conditions d'incubation et la limite de diffusion des extraits chloroformiques. Également,

les souches à Gram positif ont été beaucoup plus sensibles aux extraits éthanoliques et chloroformiques que les souches à Gram négatif en raison des différences structurales entre les parois cellulaires de ces deux classes de bactéries, engendrant une différence au niveau de la perméabilité membranaire et ainsi de leur sensibilité aux métabolites secondaires (Vaara 1992, Nikaido 1994).

Toutefois, seul l'extrait éthanolique de *C. borealis* a été actif contre *C. albicans* parmi les souches fongiques testées. Ainsi, les levures et les champignons sont plus résistants aux agents antimicrobiens que les bactéries.

Pour récapituler, les résultats de criblages antimicrobiens ont montré que les extraits méthanoliques les plus actifs ont été obtenus de *R. setosus*, *R. pubescens*, *R. idaeus* et *C. canadensis*. Les extraits éthanoliques qui ont montré les plus fortes activités antimicrobiennes sont *R. setosus*, *R. idaeus*, *V. myrtilloides* et *V. macrocarpon*. De surcroît, les extraits chloroformiques qui ont été les plus actifs en milieu solide qu'en milieu liquide sont *P. pensylvanica*, *A. rubra* et *V. myrtilloides*. En effet, à notre connaissance, cette étude a mis en évidence pour la première fois l'activité antibactérienne des extraits organiques des fruits de *R. setosus*, *R. pubescens*, *V. myrtilloides*, *P. pensylvanica* et *A. rubra*. L'extrait chloroforme d'*A. rubra* a montré la meilleure activité contre une souche de *S. aureus* résistante à la méticilline (SARM) entre tous les extraits étudiés. Ainsi, l'extrait chloroforme d'*A. rubra* a été sélectionné pour une étude phytochimique afin d'identifier un ou plusieurs composé(s) actif(s) pur(s) responsable(s) de ce pouvoir antimicrobien.

Au cours de la caractérisation phytochimique un fractionnement guidé par un test biologique a été suivi par chromatographie sur colonne de gel de silice qui a abouti à l'isolement de trois sous-fractions actives contre *S. aureus* résistant à la méticilline, AR020101, AR020103 et AR0702 ; seule la fraction AR020103 a montré une bande qui semble être pure sur CCM. Toutefois, les deux autres fractions ont été séparées par RP-HPLC préparative afin d'isoler les composés responsables de cette activité antibactérienne. Malheureusement le fractionnement par RP-HPLC préparative n'était pas optimale et les rendements de fractionnement ont été faibles.

Ainsi, ce projet a permis d'explorer le pouvoir antimicrobien d'une large gamme de fruits sauvages, et l'isolement de plusieurs fractions actives de l'extrait chloroformique d'*A. rubra*. Malheureusement, la faible quantité de matière première n'a pas permis d'aller plus loin dans l'isolement et la purification des composés purs. Toutefois, avec des quantités plus importantes

des fruits d'*A. rubra*, il sera possible de mettre au point une méthode de fractionnement optimale et donc d'obtenir de plus grandes masses des fractions d'intérêt.

Bien qu'on ne soit pas arrivé à une caractérisation structurale ou moléculaire exacte des composés bioactifs purs pour le moment, en raison des limites de temps et de quantité de matière première, cette étude préliminaire est très prometteuse, car le pouvoir antimicrobien des extraits étudiés présente des pistes potentielles dans la découverte des principes actifs alternatifs autres que les antibiotiques actuellement utilisés, auxquels les bactéries ont développé une résistance.

7 BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, N. M., S. Lamlerthton, V. G. Fowler and K. K. Jefferson (2012). "Chelating agents exert distinct effects on biofilm formation in *Staphylococcus aureus* depending on strain background: role for clumping factor B." Journal of Medical Microbiology **61**(8): 1062-1070.
- Agostini-Costa, T., R. Vieira, H. Bizzo, D. Silveira and M. Gimenes (2012). "Secondary Metabolites." Sasikumar D, Chromatography and its applications. London: **60**(30): 7474–82.
- Ahuja, S. (2006). "High-pressure liquid chromatography." Comprehensive Analytical Chemistry **47**: 485-559.
- Akash, M. S. H. and K. Rehman (2020). "Column Chromatography." Essentials of pharmaceutical analysis. Springer sciences, Singapore: 167-174.
- Akeson, W. R., H. J. Gorz and F. A. Haskins (1963). "Effect of Genotype and Growth Stage on Distribution of Melilotic Acid, o-Coumaric Acid, and Coumarinic Acid in *Melilotus alba* Desr.1." Crop Science **3**(2): 167-171.
- Alanis, A. J. (2005). "Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era?" Archives of Medical Research **36**(6): 697-705.
- Aminov, R. I. (2010). "A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future." Frontiers in microbiology **1**: 134-134.
- Andersen, Ø. M. and M. Jordheim (2013). "Basic anthocyanin chemistry and dietary sources." Anthocyanins in health and disease **1**: 13-89.
- Antão, E. M. and C. Wagner-Ahlf (2018). "Antibiotic resistance : A challenge for society." Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz **61**(5): 499-506.
- Aoki, T., T. Akashi and S.-i. Ayabe (2000). "Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis." Journal of Plant Research **113**(4): 475.
- Ariza, M., E. Martinez-Ferri, P. Dominguez Morales, J. Medina-M'inguez, L. Enamorado and C. Soria (2015). "Effect of harvest time on functional compounds and fruit antioxidant capacity in ten strawberry cultivars." Journal of Berry Research **5**: 71-80.
- Armengaud, M. and J. C. Auvergnat (1973). "Voie endoveineuse rapide ou lente. Influence des modes d'administration de la Pénicilline et de l'Ampicilline sur les variations de leur diffusion dans le liquide céphalo-rachidien. Etude préliminaire expérimentale." Médecine et Maladies Infectieuses **3**(8-9): 335-343.
- Auchmoody, L. R. (1979). "Nitrogen fertilization stimulates germination of dormant pin cherry seed." Canadian Journal of Forest Research **9**(4): 514-516.
- Avato, P., C. Vitali, P. Mongelli and A. Tava (1997). "Antimicrobial activity of polyacetylenes from *Bellis perennis* and their synthetic derivatives." Planta medica **63**(6): 503-507.
- Ayala-Zavala, J. F., S. Wang, C. Wang and G. Aguilar (2004). "Effect of storage temperature on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit." LWT - Food Science and Technology **37**: 687-695.
- Azmir, J., I. S. M. Zaidul, M. M. Rahman, K. M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M. H. A. Jahurul, K. Ghafoor, N. A. N. Norulaini and A. K. M. Omar (2013). "Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review." Journal of Food Engineering **117**(4): 426-436.
- Bacon, A. E. (1903). "An experiment with the fruit of red baneberry." Rhodora **5**(51): 77-79.

- Balkis, M. M., S. D. Leidich, P. K. Mukherjee and M. A. Ghannoum (2002). "Mechanisms of fungal resistance: an overview." Drugs **62**(7): 1025-1040.
- Balouiri, M., M. Sadiki and S. K. Ibnsouda (2016). "Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review." Journal of pharmaceutical analysis **6**(2): 71-79.
- Bassole H.N. (2002). "Étude des profils bactériostatiques et bactéricides d'extraits végétaux vis-à-vis de germes pathogènes impliqués dans la contamination des denrées alimentaires d'origine animale." Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine **11**: 113-122.
- Bavaresco, L. (2003). "Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine." Drugs under experimental and clinical research **29**(5-6): 181-187.
- Bavaresco, L., C. Fregoni, E. Cantu and M. Trevisan (1999). "Stilbene compounds: from the grapevine to wine." Drugs under experimental and clinical research. **25**(2-3): 57-63.
- Bellido, F., N. L. Martin, R. J. Siehnel and R. E. Hancock (1992). "Reevaluation, using intact cells, of the exclusion limit and role of porin OprF in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability." Journal of Bacteriology **174**(16): 5196-5203.
- Benhamou, N. (2009). "La résistance chez les plantes. Principes de la stratégie défensive et applications agronomiques." Éditions TEC & DOC - Lavoisier, Paris. **376**: 47-48.
- Bennett, R. N. and R. M. Wallsgrave (1994). "Secondary metabolites in plant defence mechanisms." New Phytologist **127**(4): 617-633.
- Bentley, R. (1990). "The shikimate pathway--a metabolic tree with many branches." Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology **25**(5): 307-384.
- Berenbaum, M. R. and A. R. Zangerl (1993). "Furanocoumarin metabolism in *Papilio polyxenes*: biochemistry, genetic variability, and ecological significance." Oecologia **95**(3): 370-375.
- Birmingham, A. and J. P. Derrick (2002). "The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: evaluation of potential for antibacterial drug discovery." Bioessays **24**(7): 637-648.
- Bhattacharyya, S., D. M. Walker and R. M. Harshey (2020). "Dead cells release a 'necrosignal' that activates antibiotic survival pathways in bacterial swarms." Nature Communications **11**(1): 4157.
- Bigger, J. (1944). "Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation." The Lancet **244**(6320): 497-500.
- Bimakr, M., R. Abdul Rahman, F. Taip, A. Ganjloo, J. Selamat, A. Abdul Hamid and M. Z. Sarker (2011). "Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves." Food and Bioproducts Processing **89**: 67-72.
- Blair, J. M., M. A. Webber, A. J. Baylay, D. O. Ogbolu and L. J. Piddock (2015). "Molecular mechanisms of antibiotic resistance." Nature Reviews Microbiology **13**(1): 42-51.
- Blanchart, A. Lauvergne, B. (2003), pris de <https://portes-inconnu.pagesperso-orange.fr/grimoire/magieverte3.html> , consulté le 19-04-2021.
- Boles BR, Horswill AR. (2011). "Staphylococcal biofilm disassembly." Trends in Microbiology **19**(9): 449–455.
- Borchardt, J., D. Wyse, C. Sheaffer, K. Kauppi, R. Fulcher, N. Ehlke, D. Biesboer and R. Bey (2008). "Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin." Journal of Medicinal Plants Research **2**: 98-110.

- Bourgau, F., A. Gravot, S. Milesi and E. Gontier (2001). "Production of plant secondary metabolites: A historical perspective." Plant Science **161**: 839-851.
- Bourgau, F., A. Hehn, R. Larbat, S. Doerper, E. Gontier, S. Kellner and U. Matern (2006). "Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes." Phytochemistry Reviews **5**(2): 293-308.
- Bourgeois, A., Thummen, E., (2002) prise de <https://ellasciences.jimdofree.com/m%C3%A9thodo/chimie/chromatographie>, consulté le 19-04-2021.
- Bourgou, S., Raja Serairi Beji, Faten Medini and Riadh Ksouri. (2016). "Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*." Journal of New Sciences, Agriculture and Biotechnology **28**(12): 1649-1655.
- Boutin, C. (2006). "Comparison of the vegetation and seedbanks of soybean fields, adjacent boundaries, and hedgerows in Ontario." Canadian Journal of Plant Science **86**: 557-567.
- Branda, S. S., S. Vik, L. Friedman and R. Kolter (2005). "Biofilms: the matrix revisited." Trends in Microbiology **13**(1): 20-26.
- Brodowska, K. M. (2017). "Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues." European Journal of Biological Research **7**(2): 108–123.
- Brooks, G. F., K. C. Carroll, J. S. Butel, S. Morse and T. Mietzner (2007). "Antimicrobial chemotherapy." Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 24th ed. McGraw Hill Companies: New York: McGraw-Hill **7**(3): 185-186.
- Brown, E. D. and G. D. Wright (2016). "Antibacterial drug discovery in the resistance era." Nature **529**(7586): 336-343.
- Bryan, L. E. and H. M. Van Den Elzen (1977). "Effects of membrane-energy mutations and cations on streptomycin and gentamicin accumulation by bacteria: a model for entry of streptomycin and gentamicin in susceptible and resistant bacteria." Antimicrobial agents and chemotherapy **12**(2): 163-177.
- Buchholz, T., J. Kittendorf and D. Sherman (2008). "Polyketide Biosynthesis: Modular Polyketide Synthases." Wiley Encyclopedia of Chemical Biology, Tadgh Begley, John Wiley & Sons **1**: 1-14.
- Bush, K. (2013). "Proliferation and significance of clinically relevant beta-lactamases." Annals of the New York Academy of Sciences **1277**: 84-90.
- Bush, K. and P. A. Bradford (2016). "beta-Lactams and beta-Lactamase Inhibitors: An Overview." Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine **6**(8): a025247.
- Bush, K. and G. A. Jacoby (2010). "Updated functional classification of beta-lactamases." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **54**(3): 969-976.
- Butler, M. T., Q. Wang and R. M. Harshey (2010). "Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**(8): 3776-3781.
- Cannon, R. D., E. Lamping, A. R. Holmes, K. Niimi, P. V. Baret, M. V. Keniya, K. Tanabe, M. Niimi, A. Goffeau and B. C. Monk (2009). "Efflux-mediated antifungal drug resistance." Clinical microbiology reviews **22**(2): 291-321.

- Castañeda-Ovando, A., M. de Lourdes Pacheco-Hernández, M. E. Páez-Hernández, J. A. Rodríguez and C. A. Galán-Vidal (2009). "Chemical studies of anthocyanins: A review." Food chemistry **113**(4): 859-871.
- Castañeda-Ovando, A., M. d. L. Pacheco-Hernández, M. E. Páez-Hernández, J. A. Rodríguez and C. A. Galán-Vidal (2009). "Chemical studies of anthocyanins: A review." Food Chemistry **113**(4): 859-871.
- Cetinkaya, Y., P. Falk and C. G. Mayhall (2000). "Vancomycin-resistant enterococci." Clinical microbiology reviews **13**(4): 686-707.
- Chakravarti, B., B. Mallik and D. Chakravarti (2016). "Column Chromatography." Current Protocols Essential Laboratory Techniques: **13**(1) : 6.2.1-6.2.15.
- Chami, F., N. Chami, S. Bennis, J. Trouillas and A. Remmal (2004). "Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model." Journal of antimicrobial chemotherapy **54**(5): 909-914.
- Chemat, F., M. Vian and E. H. Zill (2009). "Microwave assisted - separations: Green chemistry in action." Green Chemistry Research Trends, Nova Science Publishers, New York: 33-62.
- Chen, F., D. Tholl, J. Bohlmann and E. Pichersky (2011). "The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom." Plant Journal **66**(1): 212-229.
- Cheok, C. Y., H. Abdelkarim and R. Sulaiman (2014). "Extraction and quantification of saponins: A review." Food Research International **59**: 16–40.
- Cheok, C. Y., H. A. K. Salman and R. Sulaiman (2014). "Extraction and quantification of saponins: A review." Food Research International **59**: 16-40.
- Cheyrier, V. (2012). "Phenolic compounds: from plants to foods." Phytochemistry Reviews **11**(2): 153-177.
- Chida, N. (2011). "Recent advances in the synthesis of morphine and related alkaloids." Topics in Current Chemistry **299**: 1-28.
- Chopra, I. and M. Roberts (2001). "Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance." Microbiology and Molecular Biology Reviews **65**(2): 232-260.
- Cisowska, A., W. Dorota and A. Hendrich (2011). "Anthocyanins as Antimicrobial Agents of Natural Plant Origin." Natural product communications **6**: 149-156.
- Clavel, T., M. Fallani, P. Lepage, F. Levenez, J. Mathey, V. Rochet, M. I. Sérézat, M. n. Sutren, G. Henderson and C. Bennetau-Pelissero (2005). "Isoflavones and functional foods alter the dominant intestinal microbiota in postmenopausal women." The Journal of nutrition **135**(12): 2786-2792.
- CLSI (2012). "Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 7th ed., CLSI document M02-A11." Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.
- Coculescu, B.-I. (2009). "Antimicrobial resistance induced by genetic changes." Journal of medicine and life **2**(2): 114-123.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart and E. P. Greenberg (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." Science **284**(5418): 1318-1322.

- Côté, J., S. Caillet, G. Doyon, D. Dussault, J.-F. Sylvain and M. Lacroix (2011). "Antimicrobial effect of cranberry juice and extracts." Food Control **22**(8): 1413-1418.
- Côté, J., S. Caillet, G. Doyon, D. Dussault, J. F. Sylvain and M. Lacroix (2011). "Antimicrobial effect of cranberry juice and extracts." Food Control **22**(8): 1413-1418.
- Cowan, M. M. (1999). "Plant products as antimicrobial agents." Clinical microbiology reviews **12**(4): 564-582.
- Cox, G. and G. D. Wright (2013). "Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions." International Journal of Medical Microbiology **303**(6-7): 287-292.
- Crevier, A. (2014), pris de <https://www.maxicours.com/se/cours/les-differentes-techniques-d-extraction>, consulté le 19-04-2021.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. and Lewis, N.G (2000). " Natural Products (Secondary Metabolites). ." Biochemistry and Molecular Biology of Plants **24**: 1250-1319.
- Crouzet, C. S. (2011). "Polyphénols et procédés, Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agroalimentaires " Édition Lavoisier, Paris **1**: 6-17.
- Cuddy, P. G. (1997). "Antibiotic classification: implications for drug selection." Critical care nursing quarterly **20**(3): 89-102.
- Cushnie, T. T. and A. J. Lamb (2005). "Antimicrobial activity of flavonoids." International journal of antimicrobial agents **26**(5): 343-356.
- Czerwińska, E. and A. Szparaga (2015). "Antibacterial and Antifungal Activity of Plant Extracts." Rocznik Ochrona Srodowiska **17**: 209-229.
- Dai, J. and R. Mumper (2010). "Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties." Molecules **15**(10): 7313-7352.
- Dai, J., J. D. Patel and R. J. Mumper (2007). "Characterization of blackberry extract and its antiproliferative and anti-inflammatory properties." Journal of medicinal food **10**(2): 258-265.
- Das, K., R. Tiwari and D. Shrivastava (2010). "Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends." Journal of medicinal plants research **4**(2): 104-111.
- Davey, M. E. and A. O'Toole G (2000). "Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics." Microbiology and molecular biology reviews **64**(4): 847-867.
- Davies, J. and D. Davies (2010). "Origins and evolution of antibiotic resistance." Microbiology and molecular biology reviews **74**(3): 417-433.
- Dawson, L. F., Donahue, E. H., Cartman, S. T., Barton, R. H., Bundy, J., McNerney, R., Minton , N. P. and Wren, B. W. (2011). "The analysis of para-cresol production and tolerance in *Clostridium difficile* 027 and 012 strains." BMC Microbiology **11**(1): 86.
- de Billerbeck, V. G., C. G. Roques, J. M. Bessiere, J. L. Fonvieille and R. Dargent (2001). "Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*." Canadian Journal of Microbiology **47**(1): 9-17.
- Debnath, S. C. (2004). "Clonal Propagation of Dwarf Raspberry (*Rubus pubescens* Raf.) through in vitro Axillary Shoot Proliferation." Plant Growth Regulation **43**(2): 179-186.
- Degenhardt, J., T. G. Kollner and J. Gershenzon (2009). "Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants." Phytochemistry **70**(15-16): 1621-1637.

- Del-Castillo-Alonso, M. A., L. Monforte, R. Tomas-Las-Heras, J. Martinez-Abaigar and E. Nunez-Olivera (2020). "Phenolic characteristics acquired by berry skins of *Vitis vinifera* cv. *Tempranillo* in response to close-to-ambient solar ultraviolet radiation are mostly reflected in the resulting wines." Journal of the Science of Food and Agriculture **100**(1): 401-409.
- Dewick, P. M. (2002). "Medicinal natural products: a biosynthetic approach." John Wiley & Sons 3d édition, Chichester, England.
- Dhawan, D. and J. Gupta (2017). "Comparison of different solvents for phytochemical extraction potential from datura metel plant leaves." International Journal of Biological Chemistry **11**: 17-22.
- Dicke, M. (1998). "Induced Responses to Herbivory by R. Karban and I.T. Baldwin." Trends in Ecology & Evolution **13**(2): 83.
- Dinur-Schejter, Y., M. Cohen-Cymerknoh, A. Tenenbaum, R. Brooks, D. Averbuch, S. Kharasch and E. Kerem (2013). "Antibiotic treatment of children with community-acquired pneumonia: comparison of penicillin or ampicillin versus cefuroxime." Pediatric pulmonology **48**(1): 52-58.
- DNP (2001). "Dictionary of Natural Products, Version 9: 2.", Chapman & HallCRC, Florida.
- Do, Q. D., A. E. Angkawijaya, P. L. Tran-Nguyen, L. H. Huynh, F. E. Soetaredjo, S. Ismadji and Y.-H. Ju (2014). "Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*." Journal of food and drug analysis **22**(3): 296-302.
- Domínguez, H., M. J. Núñez and J. M. Lema (1995). "Enzyme-assisted hexane extraction of soya bean oil." Food Chemistry **54**(2): 223-231.
- Donlan, R. M. (2002). "Biofilms: microbial life on surfaces." Emerging Infectious Diseases **8**(9): 881-890.
- Donlan, R. M. and J. W. Costerton (2002). "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." Clinical microbiology reviews **15**(2): 167-193.
- Dowling, A., J. O'Dwyer and C. Adley (2017). "Antibiotics: Mode of action and mechanisms of resistance." Antimicrobial Research: Novel bioknowledge and educational programs. Formatex Research Center, Badajoz, Spain : 536-545.
- El Haib, A. (2018) "Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques" Université de Toulouse III-Paul Sébastien, Toulouse.
- Eloff, J. N. (1998). "Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?" Journal of Ethnopharmacology **60**(1): 1-8.
- Elshikh, M., S. Ahmed, S. Funston, P. Dunlop, M. McGaw, R. Marchant and I. M. Banat (2016). "Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants." Biotechnology letters **38**(6): 1015-1019.
- Emmanuelle Cantoni, J. C., Stéphane Chatachvilly, Julia Chesneau, Philippe Cosentino, Benoit Morazé, Ludovic Mounier, Sébastien Péan, Claire Wilczynski, . (2015). "Sciences de la vie et de la Terre - première & terminale." CANOPÉ éditions, from <http://www.reseau-canope.fr/svt-taches-complexes/chapitre.html?page=pt3st2c3ua>.
- Ertürk, Ö. (2006). "Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants." Biologia **61**(3): 275-278.
- Etebu, E. and I. Arikekpar (2016). "Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives." International Journal of Microbiology and Biotechnology **4**: 90-101.

- Fadaei, S., S. Khan, M. Young, I. Sherr and J. J. Zwiazek (2021). "Impact of soil stockpiling on ericoid mycorrhizal colonization and growth of velvetleaf blueberry (*Vaccinium myrtilloides*) and Labrador tea (*Ledum groenlandicum*)."
Restoration Ecology **29**(1): e13276.
- Fajardo, A., N. Martinez-Martin, M. Mercadillo, J. C. Galan, B. Ghysels, S. Matthijs, P. Cornelis, L. Wiehlmann, B. Tummler, F. Baquero and J. L. Martinez (2008). "The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens." PLOS One **3**(2): e1619.
- Falcone Ferreyra, M. L., S. P. Rius and P. Casati (2012). "Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications." Frontiers in Plant Science **3**: 222.
- Fanning, S. and A. P. Mitchell (2012). "Fungal biofilms." PLOS Pathogens **8**(4): e1002585.
- Fernald, M. L. (1950). "Gray's manual of botany." American Book Company, Science Education, New York: **34**(5): 342-342.
- Fernandez, L., E. B. Breidenstein and R. E. Hancock (2011). "Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics." Drug Resistance Updates **14**(1): 1-21.
- Fernandez, L. and R. E. Hancock (2012). "Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance." Clinical Microbiology Reviews **25**(4): 661-681.
- Flamini, R., F. Mattivi, M. De Rosso, P. Arapitsas and L. Bavaresco (2013). "Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols." International Journal of Molecular Sciences **14**(10): 19651-19669.
- Flemming, H. C., J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S. A. Rice and S. Kjelleberg (2016). "Biofilms: an emergent form of bacterial life." Nature Reviews Microbiology **14**(9): 563-575.
- Fracassetti, D., C. Del Bo', P. Simonetti, C. Gardana, D. Klimis-Zacas and S. Ciappellano (2013). "Effect of Time and Storage Temperature on Anthocyanin Decay and Antioxidant Activity in Wild Blueberry (*Vaccinium angustifolium*) Powder." Journal of Agricultural and Food Chemistry **61**(12): 2999-3005.
- Friedman, M., P. R. Henika, C. E. Levin and R. E. Mandrell (2004). "Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(19): 6042-6048.
- G.H, L., H. Frydoonfar, H. R, R. Jamei and S. Zare (2006). "The Effect of Light, Temperature, pH and Species on Stability of Anthocyanin Pigments in Four Berberis Species." Pakistan Journal of Nutrition **5**(1): 90-92.
- Gallon, J. (2000). "Plant metabolism" New Phytologist **147**(3): 483-485.
- Gandhi, S. G., V. Mahajan and Y. S. Bedi (2015). "Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants." Planta **241**(2): 303-317.
- Garazd, M., Y. L. Garazd and V. Khilya (2003). "Neoflavones. 1. Natural distribution and spectral and biological properties." Chemistry of natural compounds **39**(1): 54-121.
- Garcia, E. C. (2017). "*Burkholderia thailandensis*: Genetic Manipulation." Current Protocols in Microbiology **45**: 4C 2 1-4C 2 15.
- Genskowsky, E., L. A. Puente, J. A. Pérez-Álvarez, J. Fernández-López, L. A. Muñoz and M. Viuda-Martos (2016). "Determination of polyphenolic profile, antioxidant activity and antibacterial properties of maqui [*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz] a Chilean blackberry." Journal of the Science of Food and Agriculture **96**(12): 4235-4242.

- Gerothanassis, I., A. Troganis, V. Exarchou and K. Barbarossou (2002). "Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: Basic principles and phenomena, and their applications to chemistry, biology and medicine." Chemistry Education Research and Practice **3**: 229-252.
- Giusti, M. M. and R. E. Wrolstad (2003). "Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems." Biochemical engineering journal **14**(3): 217-225.
- Goetz, C., S. Dufour, M. Archambault, F. Malouin and M. Jacques (2016). "Importance and control of biofilm formation by *staphylococci* during intra-mammary infections in dairy cows: A review of literature." Journal of Veterinary Medicine **167**: 215-229.
- Goossens, H. (2009). "Antibiotic consumption and link to resistance." Clinical Microbiology and Infection **15**(3): 12-15.
- Gordon, N. C. and D. W. Wareham (2010). "Antimicrobial activity of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*." International Journal of Antimicrobial Agents **36**(2): 129-131.
- Guardabassi, L. and P. Courvalin (2005). "Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance." Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin: **1**: 1-18.
- György Hegyi, J. K., Mihály Kovács, András Málnási-Csizmadia, László Nyitray, Gábor Pál, László Radnai, Attila Reményi, István Venekei (2013). "Introduction to Practical Biochemistry." Eötvös Loránd University, Hungary **6**(5): 84.
- Hafiz, S. and C. Oakley (1976). "*Clostridium difficile*: isolation and characteristics (Plate VIII)." Journal of medical microbiology **9**(2): 129-136.
- Hagiwara, D., K. Sakamoto, K. Abe and K. Gomi (2016). "Signaling pathways for stress responses and adaptation in *Aspergillus* species: stress biology in the post-genomic era." Bioscience, Biotechnology and Biochemistry **80**(9): 1667-1680.
- Hall, B. G. (2004). "Predicting the evolution of antibiotic resistance genes." Nature Reviews Microbiology **2**(5): 430-435.
- Hammer, K. A., C. F. Carson and T. V. Riley (2004). "Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **53**(6): 1081-1085.
- Hancock, R. E. and F. S. Brinkman (2002). "Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux." Annual Review of Microbiology **56**: 17-38.
- Hanson, J. R. (2003). "The biosynthesis of secondary metabolites. Natural Products: The Secondary Metabolites." Abel, E. W., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge **17**: 105–130.
- Haraga, A., T. E. West, M. J. Brittnacher, S. J. Skerrett and S. I. Miller (2008). "*Burkholderia thailandensis* as a Model System for the Study of the Virulence-Associated Type III Secretion System of *Burkholderia pseudomallei*." Infection and Immunity **76**(11): 5402-5411.
- Harborne, A. (1998). "Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis.", springer science & business media, Berlin.
- Harborne, J. B. (2013). "The flavonoids: advances in research since 1980." Chapman & Hall, New York.
- Harding, S. A., L. J. Xue, L. Du, B. Nyamdari, R. L. Lindroth, R. Sykes, M. F. Davis and C. J. Tsai (2014). "Condensed tannin biosynthesis and polymerization synergistically condition carbon use, defense, sink strength and growth in *Populus*." Tree Physiology **34**(11): 1240-1251.

- Hartmann, T. (2007). "From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism." Phytochemistry **68**(22-24): 2831-2846.
- Hassan, H., Z.-H. Jiang, C. Asmussen, E. McDonald and W. Qin (2014). "Antibacterial Activity of Northern Ontario Medicinal Plants." Canadian Journal of Plant Science **94**: 417-424.
- Hatzakis, E. (2019). "Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science: A Comprehensive Review." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **18**(1): 189-220.
- Heatley, N. (1944). "A method for the assay of penicillin." Biochemical Journal **38**(1): 61-65.
- Heinrich, M. and S. Gibbons (2001). "Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution." Journal of Pharmacy and Pharmacology **53**(4): 425-432.
- Helander, I. M., H.-L. Alakomi, K. Latva-Kala, T. Mattila-Sandholm, I. Pol, E. J. Smid, L. G. Gorris and A. von Wright (1998). "Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria." Journal of agricultural and food chemistry **46**(9): 3590-3595.
- Heng, M. Y., S. Tan, J. Yong and E. Ong (2013). "Emerging green technologies for the chemical standardization of botanicals and herbal preparations." Trends in Analytical Chemistry **50**: 1-10.
- Hennebelle, T., S. Sahpaz and F. Bailleul (2004). "Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif." Phytotherapie **2**(1): 3-6.
- Herbert, R. B. (1989). "The Biosynthesis of Secondary Metabolites." Springer sciences, London: 200.
- Herrmann, K. M. and L. M. Weaver (1999). "The shikimate pathway." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **50**: 473-503.
- Höferl, M., G. Buchbauer, L. Jirovetz, E. Schmidt, A. Stoyanova, Z. Denkova, A. Slavchev and M. Geissler (2009). "Correlation of Antimicrobial Activities of Various Essential Oils and Their Main Aromatic Volatile Constituents." The Journal of Essential Oil Research **21**: 459-463.
- Hoffman, N. E. and J. C. Liao (1977). "Reversed phase high performance liquid chromatographic separations of nucleotides in the presence of solvophobic ions." Analytical chemistry **49**(14): 2231-2234.
- Hokken, M. W. J., B. J. Zwaan, W. J. G. Melchers and P. E. Verweij (2019). "Facilitators of adaptation and antifungal resistance mechanisms in clinically relevant fungi." Fungal Genetics and Biology **132**: 103254.
- Hollenbeck, B. L. and L. B. Rice (2012). "Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *enterococcus*." Virulence **3**(5): 421-433.
- Hollman, P. C. and M. B. Katan (1998). Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. Archives of toxicology. Supplement **20**: 237-248.
- Hurwitz, C., C. B. Braun and C. L. Rosano (1981). "Role of ribosome recycling in uptake of dihydrostreptomycin by sensitive and resistant *Escherichia coli*." Biochimica et Biophysica Acta **652**(1): 168-176.
- Imlab France (2020) prise de <https://www.imlab.eu/fr/ultrason>, consulté le 19-04-2021.
- Inouye, S., T. Takizawa and H. Yamaguchi (2001). "Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact." Journal of antimicrobial chemotherapy **47**(5): 565-573.

- Inouye, S., T. Tsuruoka, M. Watanabe, K. Takeo, M. Akao, Y. Nishiyama and H. Yamaguchi (2000). "Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact." *Mycoses* **43**(1-2): 17-23.
- Iwashina, T. (2013). "Flavonoid properties of five families newly incorporated into the order Caryophyllales." *Bulletin of the National Museum of Nature and Science* **39**: 25-51.
- Jacob, F. H. and M. C. Pignal (1972). "Interactions levures-tanins. I-croissance et survie de diverses levures dans des solutions tannantes." *Mycopathologia et mycologia applicata* **48**(2): 121-142.
- Jacotet-Navarro, M., M. Laguerre, A. S. Fabiano-Tixier, M. Tenon, N. Feuillère, A. Bily and F. Chemat (2018). "What is the best ethanol-water ratio for the extraction of antioxidants from rosemary? Impact of the solvent on yield, composition, and activity of the extracts." *Electrophoresis* **39**: 1946–1956.
- Jefferson, K. K. (2004). "What drives bacteria to produce a biofilm?" *FEMS Microbiology Letters* **236**(2): 163-173.
- Joana Gil-Chávez, G., J. A. Villa, J. Fernando Ayala-Zavala, J. Basilio Heredia, D. Sepulveda, E. M. Yahia and G. A. González-Aguilar (2013). "Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **12**(1): 5-23.
- Justesen, U. and P. Knuthsen (2001). "Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes." *Food chemistry* **73**(2): 245-250.
- K Hahlbrock, a. and D. Scheel (1989). "Physiology and Molecular Biology of Phenylpropanoid Metabolism." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**(1): 347-369.
- Kabera, J. (2014). "Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Classification, Function and Pharmacological Properties." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2**: 377-392.
- Kader, F., M. Irmouli, N. Zitouni, J.-P. Nicolas and M. Metche (1999). "Degradation of cyanidin 3-glucoside by caffeic acid o-quinone. Determination of the stoichiometry and characterization of the degradation products." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**(11): 4625-4630.
- Kahne, D., C. Leimkuhler, W. Lu and C. Walsh (2005). "Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics." *Chemical Reviews* **105**(2): 425-448.
- Kalt, W. and D. Dufour (1997). "Health functionality of blueberries." *HortTechnology* **7**(3): 216-221.
- Kalt, W., C. F. Forney, A. Martin and R. L. Prior (1999). "Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits." *Journal of agricultural and food chemistry* **47**(11): 4638-4644.
- Karkonen, A. and S. Koutaniemi (2010). "Lignin biosynthesis studies in plant tissue cultures." *Journal of Integrative Plant Biology* **52**(2): 176-185.
- Karou, D., A. Savadogo, A. Canini, S. Yameogo, C. Montesano, J. Simporé, V. Colizzi and A. S. Traore (2006). "Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*." *African journal of biotechnology* **5**(2): 195-200.
- Kaufman, G. (2011). "Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance." *Nursing Standard* **25**(42): 49-55.

- Kelly, C., J. D. Chalmers, I. Crossingham, N. Relph, L. M. Felix, D. J. Evans, S. J. Milan and S. Spencer (2018). "Macrolide antibiotics for bronchiectasis." Cochrane Database of Systematic Reviews **3**: CD012406.
- Khoddami, A., M. A. Wilkes and T. H. Roberts (2013). "Techniques for analysis of plant phenolic compounds." Molecules **18**(2): 2328-2375.
- Khoo, H. E., A. Azlan, S. T. Tang and S. M. Lim (2017). "Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits." Food & Nutrition Research **61**(1): 1361779.
- Kim, W., T. Killam, V. Sood and M. G. Surette (2003). "Swarm-cell differentiation in *Salmonella enterica serovar typhimurium* results in elevated resistance to multiple antibiotics." Journal of Bacteriology **185**(10): 3111-3117.
- Kim, W. and M. G. Surette (2004). "Metabolic differentiation in actively swarming *Salmonella*." Molecular Microbiology **54**(3): 702-714.
- Kim, Y. and T. K. Wood (2010). "Toxins Hha and CspD and small RNA regulator Hfq are involved in persister cell formation through MqsR in *Escherichia coli*." Biochemical and Biophysical Research Communications **391**(1): 209-213.
- Kirby, J. and J. D. Keasling (2009). "Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering." Annual Review of Plant Biology **60**: 335-355.
- Kohanski, M. A., D. J. Dwyer and J. J. Collins (2010). "How antibiotics kill bacteria: from targets to networks." Nature Reviews Microbiology **8**(6): 423-435.
- Kong, J.-M., L.-S. Chia, N.-K. Goh, T.-F. Chia and R. Brouillard (2003). "Analysis and biological activities of anthocyanins." Phytochemistry **64**(5): 923-933.
- Kranz, S., A. Guellmar, P. Olschowsky, S. Tonndorf-Martini, M. Heyder, W. Pfister, M. Reise and B. Sigusch (2020). "Antimicrobial Effect of Natural Berry Juices on Common Oral Pathogenic Bacteria." Antibiotics **9**(9): 533.
- Krauze-Baranowska, M., D. Głód, M. Kula, M. Majdan, R. Hałasa, A. Matkowski, W. Kozłowska and A. Kawiak (2014). "Chemical composition and biological activity of *Rubus idaeus* shoots – a traditional herbal remedy of Eastern Europe." BMC Complementary and Alternative Medicine **14**(1): 480.
- Krauze-Baranowska, M., M. Majdan, R. Hałasa, D. Głód, M. Kula, I. Fecka and A. Orzeł (2014). "The antimicrobial activity of fruits from some cultivar varieties of *Rubus idaeus* and *Rubus occidentalis*." Food & function **5**(10): 2536-2541.
- Kumar, A. and H. P. Schweizer (2005). "Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake." Advanced Drug Delivery Reviews **57**(10): 1486-1513.
- Kumar, S., K. Jyotirmayee and M. Sarangi (2013). "Thin layer chromatography: a tool of biotechnology for isolation of bioactive compounds from medicinal plants." International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research **18**(1): 126-132.
- Kumar, S. D. and D. H. Kumar (2012). "Importance of RP-HPLC in analytical method development: a review." International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research **3**(12): 4626.
- Laforsch, C. and R. Tollrian (2004). "Inducible Defenses in Multipredator Environments: Cyclomorphosis in *Daphnia cucullata*." Ecology **85**(8): 2302-2311.

- Lai, S., J. Tremblay and E. Déziel (2009). "Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance." Environmental Microbiology **11**(1): 126-136.
- Landers, T. F., B. Cohen, T. E. Wittum and E. L. Larson (2012). "A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential." Public Health Reports **127**(1): 4-22.
- Landhäuser, S. M., K. J. Stadt and V. J. Lieffers (1997). "Photosynthetic strategies of summergreen and evergreen understory herbs of the boreal mixedwood forest." Oecologia **112**(2): 173-178.
- Leclercq, R. (2002). "Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications." Clinical Infectious Diseases **34**(4): 482-492.
- Lee, E. W., M. N. Huda, T. Kuroda, T. Mizushima and T. Tsuchiya (2003). "EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **47**(12): 3733-3738.
- Lee, J., R. W. Durst and R. E. Wrolstad (2005). "Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study." Journal of AOAC international **88**(5): 1269-1278.
- Leitão, D., A. Polizello, I. Ito and A. Spadaro (2005). "Antibacterial Screening of Anthocyanic and Proanthocyanic Fractions from Cranberry Juice." Journal of medicinal food **8**: 36-40.
- Lewis, K. and F. M. Ausubel (2006). "Prospects for plant-derived antibacterials." Nature biotechnology **24**(12): 1504-1507.
- Li, J., X. He, M. Li, W. Zhao, L. Liu and X. Kong (2015). "Chemical fingerprint and quantitative analysis for quality control of polyphenols extracted from pomegranate peel by HPLC." Food Chemistry **176**: 7-11.
- Liu, Y., Y. Liu, C. Tao, M. Liu, Y. Pan and Z. Lv (2018). "Effect of temperature and pH on stability of anthocyanin obtained from blueberry." Journal of Food Measurement and Characterization **12**(3): 1744-1753.
- Luque de Castro, M. D. and L. E. García-Ayuso (1998). "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future." Analytica Chimica Acta **369**(1): 1-10.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., (2005). "Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique." Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne: 192.
- Majak, W., R. McDiarmid, B. Surridge, B. Brooke and M. Benn (2010). "Cycloartane glycosides from *Actaea rubra* berries." Biochemical Systematics and Ecology **38**: 1077-1080.
- Majiene, D., J. Liobikas, S. Trumbeckaite, D. Kopustinskiene, V. Bendokas, A. Sasnauskas, T. Šikšnianas, S. Liegiūtė and N. Anisimovienė (2014). "Antioxidative and antimicrobial activity of anthocyanin-rich extracts from fruits of blackcurrant and cherry." Acta horticulturae **1040**: 173-177.
- Mallik, A. K., H. Qiu, M. Takafuji and H. Ihara (2018). "High molecular-shape-selective stationary phases for reversed-phase liquid chromatography: A review." Trends in Analytical Chemistry **108**: 381-404.
- Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy and L. Jimenez (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability." The American Journal of Clinical Nutrition **79**(5): 727-747.
- Marais, J. P., B. Deavours, R. A. Dixon and D. Ferreira (2006). "The stereochemistry of flavonoids. The science of flavonoids", Springer science, New York: 1-46.

- Marks, P. L. (1974). "The Role of Pin Cherry (*Prunus pensylvanica* L.) in the Maintenance of Stability in Northern Hardwood Ecosystems." Ecological Monographs **44**(1): 73-88.
- Martinez, J. (2014). "General principles of antibiotic resistance in bacteria." Drug Discovery Today: Technologies **11**(1): 33-39.
- Martinsen, B. K., K. Aaby and G. Skrede (2020). "Effect of temperature on stability of anthocyanins, ascorbic acid and color in strawberry and raspberry jams." Food Chemistry **316**: 126297.
- Mathurin, T. (2018). "Résistance aux antibiotiques : une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale" Ombelliscience.
- Mazid, M., T. Khan and F. Mohammad (2011). "Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants." Biology and medicine **3**(2): 232-249.
- Mazza, G. (2007). "Anthocyanins and heart health." Annali-Istituto Superiore Di Sanita **43**(4): 369.
- Mazza, G. and R. Brouillard (1987). "Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products." Food chemistry **25**(3): 207-225.
- McCutcheon, A., S. Ellis, R. Hancock and G. Towers (1992). "Antibiotic screening of medicinal plants of the British Columbian native peoples." Journal of Ethnopharmacology **37**(3): 213-223.
- McDougald, D., S. A. Rice, N. Barraud, P. D. Steinberg and S. Kjelleberg (2011). "Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal." Nature Reviews Microbiology **10**(1): 39-50.
- McFarland, L. V. (2000). "Normal flora: diversity and functions." Microbial ecology in health and disease **12**(4): 193-207.
- McNaught, A. D., Wilkinson. A., (1997) "Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed." Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Mewalal, R., D. K. Rai, D. Kainer, F. Chen, C. Kulheim, G. F. Peter and G. A. Tuskan (2017). "Plant-Derived Terpenes: A Feedstock for Specialty Biofuels." Trends in Biotechnology **35**(3): 227-240.
- Meyer, A. S., S. M. Jepsen and N. S. Sørensen (1998). "Enzymatic Release of Antioxidants for Human Low-Density Lipoprotein from Grape Pomace." Journal of Agricultural and Food Chemistry **46**(7): 2439-2446.
- Milojković-Opsenica, D., P. Ristivojevic, F. Andrić and J. Trifkovic (2013). "Planar Chromatographic Systems in Pattern Recognition and Fingerprint Analysis." Chromatographia **76**: 1239–1247.
- Mohr, K. I. (2016). "History of Antibiotics Research." Current Topics in Microbiology and Immunology **398**: 237-272.
- Ngo, T. V., C. J. Scarlett, M. C. Bowyer, P. D. Ngo and Q. V. Vuong (2017). "Impact of different extraction solvents on bioactive compounds and antioxidant capacity from the root of *Salacia chinensis* L." Journal of Food Quality **2017**: 1-8.
- Nikaido, H. (1994). "Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux." Science **264**(5157): 382-388.
- Nisar, M. F., C. Wan, Z. Manzoor, Y. Waqas, K. Niaz and M. M. Ayaz (2020). "Glycosidic derivatives of flavonoids": 57-84.

- Nishimura, S., M. Taki, S. Takaishi, Y. Iijima and T. Akiyama (2000). "Structures of 4-aryl-coumarin (neoflavone) dimers isolated from *Pistacia chinensis* BUNGE and their estrogen-like activity." Chemical and Pharmaceutical Bulletin **48**(4): 505-508.
- Nuntanakorn, P., B. Jiang, H. Yang, M. Cervantes-Cervantes, F. Kronenberg and E. J. Kennelly (2007). "Analysis of polyphenolic compounds and radical scavenging activity of four American *Actaea* species." Phytochemical Analysis **18**(3): 219-228.
- Nwokeji, P., O. I. Enodiana, R. Ezenweani, O.-I. Osasere and A. Abiola (2016). "The Chemistry Of Natural Product: Plant Secondary Metabolites." International Journal of Technology Enhancements and Emerging Engineering Research **4**(8) : 2347-4289.
- Ogawa, S. and Y. Yazaki (2018). "Tannins from *Acacia mearnsii* De Wild. Bark: Tannin Determination and Biological Activities." Molecules **23**(4).
- Oldfield, E. and F. Y. Lin (2012). "Terpene biosynthesis: modularity rules." Angewandte Chemie International Edition **51**(5): 1124-1137.
- Olesky, M., S. Zhao, R. L. Rosenberg and R. A. Nicholas (2006). "Porin-mediated antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: ion, solute, and antibiotic permeation through PIB proteins with penB mutations." Journal of Bacteriology **188**(7): 2300-2308.
- Oliva, B., E. Piccirilli, T. Ceddia, E. Pontieri, P. Aureli and A. Ferrini (2003). "Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components." Letters in Applied Microbiology **37**(2): 185-187.
- Olivares, J., A. Bernardini, G. Garcia-Leon, F. Corona, M. B Sanchez and J. L. Martinez (2013). "The intrinsic resistome of bacterial pathogens." Frontiers in microbiology **4**: 103-103.
- Overhage, J., M. Bains, M. D. Brazas and R. E. Hancock (2008). "Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance." Journal of Bacteriology **190**(8): 2671-2679.
- Pages, J. M., M. Masi and J. Barbe (2005). "Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria." Trends in Molecular Medicine **11**(8): 382-389.
- Pai, H., J. Kim, J. Kim, J. H. Lee, K. W. Choe and N. Gotoh (2001). "Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates." Antimicrobial agents and chemotherapy **45**(2): 480-484.
- Pakyz, A. L., C. MacDougall, M. Oinonen and R. E. Polk (2008). "Trends in antibacterial use in US academic health centers: 2002 to 2006." Archives of internal medicine **168**(20): 2254-2260.
- Panche, A., A. Diwan and S. Chandra (2016). "Flavonoids: An overview." Journal of Nutritional Science **5**: 1-15.
- Pang, X., Z. Q. Zhang, X. W. Duan and Z. L. Ji (2001). "Influence of pH and active oxygen on the stability of anthocyanins from litchi pericarp." Acta Horticulturae **558**: 339-342.
- Passmore, I. J., M. P. M. Letertre, M. D. Preston, I. Bianconi, M. A. Harrison, F. Nasher, H. Kaur, H. A. Hong, S. D. Baines, S. M. Cutting, J. R. Swann, B. W. Wren and L. F. Dawson (2018). "Paracresol production by *Clostridium difficile* affects microbial diversity and membrane integrity of Gram-negative bacteria." PLOS pathogens **14**(9): e1007191-e1007191.
- Patel, U., Y. P. Yan, F. Hobbs, J. Kaczmarczyk, A. Slee, D. Pompliano, M. Kurilla and E. Bobkova (2001). "Oxazolidinones Mechanism of Action: Inhibition of the First Peptide Bond Formation." The Journal of biological chemistry **276**: 37199-37205.

- Paterson, D. L. and R. A. Bonomo (2005). "Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update." Clinical Microbiology Reviews **18**(4): 657-686.
- Peterson, A., Machmudah, S., Roy, B.C., Goto, M., Sasaki, M. and Hirose, T. (2006), "Extraction of essential oil from geranium (*Pelargonium graveolens*) with supercritical carbon dioxide." Journal of Chemical Technology & Biotechnology **81**: 167-172.
- Piddock, L. J. (2006). "Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria." Clinical Microbiology Reviews **19**(2): 382-402.
- Piddock, L. J. (2006). "Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance." Nature Reviews Microbiology **4**(8): 629-636.
- Pincemail, J., C. Kevers, J. Tabart, J.-O. Defraigne and J. Dommes (2012). "Cultivars, Culture Conditions, and Harvest Time Influence Phenolic and Ascorbic Acid Contents and Antioxidant Capacity of Strawberry (*Fragaria x ananassa*)." Journal of food science **77**: C205-210.
- Plesiat, P. and H. Nikaido (1992). "Outer membranes of gram-negative bacteria are permeable to steroid probes." Molecular Microbiology **6**(10): 1323-1333.
- Pojer, E., F. Mattivi, D. Johnson and C. S. Stockley (2013). "The case for anthocyanin consumption to promote human health: a review." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **12**(5): 483-508.
- Poole, K. (2000). "Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-positive bacteria and the mycobacteria." Antimicrobial agents and chemotherapy **44**(10): 2595-2599.
- Popova, A. V. and D. K. Hinch (2016). "Effects of flavonol glycosides on liposome stability during freezing and drying." Biochimica et Biophysica Acta **1858**(12): 3050-3060.
- Pounis, G., A. Di Castelnuovo, M. Bonaccio, S. Costanzo, M. Persichillo, V. Krogh, M. B. Donati, G. de Gaetano and L. Iacoviello (2016). "Flavonoid and lignan intake in a Mediterranean population: proposal for a holistic approach in polyphenol dietary analysis, the Moli-sani Study." European Journal of Clinical Nutrition **70**(3): 338-345.
- Puri, M., D. Sharma and C. J. Barrow (2012). "Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants." Trends in Biotechnology **30**(1): 37-44.
- Puspita, M. (2017). "Extraction assistée par enzyme de phlorotannins provenant d'algues brunes du genre *Sargassum* et les activités biologiques", Universitas Diponegoro, Semarang.
- Puupponen-Pimiä, R., L. Nohynek, C. Meier, M. Kähkönen, M. Heinonen, A. Hopia and K. M. Oksman-Caldentey (2001). "Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries." Journal of applied microbiology **90**(4): 494-507.
- Qualley, A. V., J. R. Widhalm, F. Adebessin, C. M. Kish and N. Dudareva (2012). "Completion of the core beta-oxidative pathway of benzoic acid biosynthesis in plants." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**(40): 16383-16388.
- Ramirez, M. S. and M. E. Tolmasky (2010). "Aminoglycoside modifying enzymes." Drug Resistance Updates **13**(6): 151-171.
- Reygaert, W. C. (2018). "An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria." AIMS Microbiol **4**(3): 482-501.
- Ristivojevic, P., J. Trifkovic, I. Vovk and D. Milojković-Opsenica (2016). "Comparative study of different approaches for multivariate image analysis in HPTLC fingerprinting of natural products such as plant resin." Talanta **162** : 72-79.

- Rodriguez-Rojas, A., J. Rodriguez-Beltran, A. Couce and J. Blazquez (2013). "Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution." International Journal of Medical Microbiology **303**(6-7): 293-297.
- Roux, A. and J.-M. Ghigo (2006). "Les biofilms bactériens." Académie vétérinaire de France, Paris.
- Rubin, E. J., C. M. Herrera, A. A. Crofts and M. S. Trent (2015). "PmrD is required for modifications to escherichia coli endotoxin that promote antimicrobial resistance." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **59**(4): 2051-2061.
- Saito, K., K. Yonekura-Sakakibara, R. Nakabayashi, Y. Higashi, M. Yamazaki, T. Tohge and A. R. Fernie (2013). "The flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis: Structural and genetic diversity." Plant Physiology and Biochemistry **72**: 21-34.
- Salle, J.-L. (2004). "Les huiles essentielles - Synthèse d'aromathérapie, 2ème édition." Frison-Roche, Paris: 486.
- Sanchez, L., N. Ruiz, S. Leranoz, M. Vinas and M. Puig (1997). "The role of outer membrane in Serratia marcescens intrinsic resistance to antibiotics." Microbiologia **13**(3): 315-320.
- Sandoval-Motta, S. and M. Aldana (2016). "Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective." Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine **8**(3): 253-267.
- Santos, E., B. Maia, A. Ferriani and S. Teixeira (2017). "Flavonoids: Classification, Biosynthesis and Chemical Ecology. Flavonoids-From Biosynthesis to Human Health" IntechOpen, London, UK: 1-14.
- Sarker, S. D. and L. Nahar (2012). "An introduction to natural products isolation. Natural products isolation 3rd ed" Springer science & Business Media, NewYork, **864**: 1-25.
- Sarker, S. D., L. Nahar and Y. Kumarasamy (2007). "Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals." Methods **42**(4): 321-324.
- Sasidharan, S., Y. Chen, D. Saravanan, K. M. Sundram and L. Yoga Latha (2011). "Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts." African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM **8**(1): 1-10.
- Schoolmouv (2020) pris de <https://www.schoolmouv.fr/savoir-faire/realiser-une-hydrodistillation/fiche-pratique>, consulté le 19-04-2021.
- Schultsz, C. and S. Geerlings (2012). "Plasmid-mediated resistance in Enterobacteriaceae: changing landscape and implications for therapy." Drugs **72**(1): 1-16.
- Schwarz, S., C. Kehrenberg, B. Doublet and A. Cloeckaert (2004). "Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol." FEMS Microbiology Reviews **28**(5): 519-542.
- Seidel, V. (2012). "Initial and bulk extraction of natural products isolation." Methods in Molecular Biology **864**: 27-41.
- Seneca (2007). "CHAPTER 1 - Definition, Typology and Occurrence of Alkaloids. Alkaloids - Secrets of Life." T. Aniszewski. Elsevier, Amsterdam : 1-59.
- Shaw, K. J., P. N. Rather, R. S. Hare and G. H. Miller (1993). "Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes." Microbiology and Molecular Biology Reviews **57**(1): 138-163.

- Sherma, J. and B. Fried (2003). "Handbook of thin-layer chromatography", CRC press, NewYork: 1048.
- Simão, M., T. Barboza, M. G. Vianna, R. O. Garcia, E. Mansur, A. Ignacio and G. Pacheco (2018). "A comparative study of phytoconstituents and antibacterial activity of in vitro derived materials of four *Passiflora* species." Anais da Academia Brasileira de Ciencias **90**.
- Simms, E. and M. Rausher (1987). "Costs and Benefits of Plant Resistance to Herbivory." American Naturalist **130**.
- Simões, M., R. N. Bennett and E. A. Rosa (2009). "Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms." Natural product reports **26(6)**: 746-757.
- Simpson, T. (1995). "Polyketide biosynthesis." Chemical Industry Journal: 407-411.
- Skrede, G., R. Wrolstad and R. Durst (2000). "Changes in Anthocyanins and Polyphenolics During Juice Processing of Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.)." Journal of Food Science **65**: 357-364.
- Skrovankova, S., D. Sumczynski, J. Mlcek, T. Jurikova and J. Sochor (2015). "Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries." International journal of molecular sciences **16(10)**: 24673-24706.
- Smith, D. F. (2013). "Benefits of flavanol-rich cocoa-derived products for mental well-being: A review." Journal of Functional Foods **5(1)**: 10-15.
- Smith, M. and J. Strange (1999). "NMR techniques in materials physics: A review." Measurement Science and Technology **7**: 449.
- Sommer, M. O. A. and G. Dantas (2011). "Antibiotics and the resistant microbiome." Current Opinion in Microbiology **14(5)**: 556-563.
- Spayd, S., J. Tarara, D. L. Mee and J. C. Ferguson (2002). "Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. *Merlot* berries." American Journal of Enology and Viticulture **53**.
- Staunton, J. and K. J. Weissman (2001). "Polyketide biosynthesis: a millennium review." Natural Product Reports **18(4)**: 380-416.
- Stevens, W. and D. Hill (2009). "General methods for flash chromatography using disposable columns." Molecular diversity **13**: 247-252.
- Stewart, P. S. and M. J. Franklin (2008). "Physiological heterogeneity in biofilms." Nature Reviews Microbiology **6(3)**: 199-210.
- Sun, J., Z. Deng and A. Yan (2014). "Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations." Biochemical and Biophysical Research Communications **453(2)**: 254-267.
- Suring, L. H., M. I. Goldstein, S. Howell and C. S. Nations (2006). "Effects of *spruce beetle* infestations on berry productivity on the *Kenai Peninsula*, Alaska." Forest Ecology and Management **227(3)**: 247-256.
- Sutherland, I. W. (2001). "The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment." Trends in Microbiology **9(5)**: 222-227.
- Syarifah, A., R. Retnowati and S. Soebiantoro (2019). "Characterization of Secondary Metabolites Profile of Flavonoid from Salam Leaves (*Eugenia polyantha*) Using TLC and UV Spectrophotometry." Pharmaceutical Sciences and Research **6**.

- Symonowicz, M. and M. Kolanek (2012). "Flavonoids and their properties to form chelate complexes." Food Science and Biotechnology **76**: 35-41.
- Tacconelli, E. (2009). "Antimicrobial use: risk driver of multidrug resistant microorganisms in healthcare settings." Current Opinion in Infectious Diseases **22**(4): 352-358.
- Taiz, L. a. Z., E (2002). "Plant physiology. 3rd edn." Annals of Botany **91**(6): 750-751.
- Taylor, P. and R. Reeder (2020). "Antibiotic use on crops in low and middle-income countries based on recommendations made by agricultural advisors." CABI Agriculture and Bioscience **1**(1): 1.
- Taylor, P. W. (2013). "Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents." International Journal of Antimicrobial Agents **42**(3): 195-201.
- Tenson, T., M. Lovmar and M. Ehrenberg (2003). "The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome." Journal of Molecular Biology **330**(5): 1005-1014.
- Tholl, D. (2006). "Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism." Current Opinion in Plant Biology **9**(3): 297-304.
- Tian, Y., A. Puganen, H.-L. Alakomi, A. Uusitupa, M. Saarela and B. Yang (2018). "Antioxidative and antibacterial activities of aqueous ethanol extracts of berries, leaves, and branches of berry plants." Food Research International **106**: 291-303.
- Tiwari, P., B. Kumar, M. Kaur, G. Kaur and H. Kaur (2011). "Phytochemical screening and Extraction: A Review." Internationale Pharmaceutica Scientia **1**: 98-106.
- Tolker-Nielsen, T. and S. Molin (2000). "Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities." Microbial Ecology **40**(2): 75-84.
- Tremblay, Y., S. Hathroubi and M. Jacques (2014). "Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique." Canadian Journal of Veterinary Research **78**(2): 110-116.
- Tripoli, E., M. L. Guardia, S. Giammanco, D. D. Majo and M. Giammanco (2007). "Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review." Food Chemistry **104**(2): 466-479.
- Turkmen, N., F. Sari and Y. S. Velioglu (2006). "Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods." Food chemistry **99**(4): 835-841.
- Ullah, I., A. Wakeel, Z. K. Shinwari, S. A. Jan, A. T. Khalil and M. Ali (2017). "Antibacterial and antifungal activity of *Isatis tinctoria* L.(*Brassicaceae*) using the micro-plate method." Pakistan Journal of Botany **49**(5): 1949-1957.
- Vaara, M. (1992). "Agents that increase the permeability of the outer membrane." Microbiology and Molecular Biology Reviews **56**(3): 395-411.
- Vailaya, A. and C. Horváth (1998). "Retention in reversed-phase chromatography: partition or adsorption?" Journal of Chromatography A **829**(1-2): 1-27.
- Vanholme, R., B. De Meester, J. Ralph and W. Boerjan (2019). "Lignin biosynthesis and its integration into metabolism." Current Opinion in Biotechnology **56**: 230-239.
- Vanholme, R., B. Demedts, K. Morreel, J. Ralph and W. Boerjan (2010). "Lignin biosynthesis and structure." Plant physiology **153**(3): 895-905.

- Vardanega, R., D. T. Santos and M. A. A. Meireles (2014). "Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation." Pharmacognosy reviews **8**(16): 88-95.
- Velićanski, A., D. D. Cvetković and M. Sinisa (2012). "Screening of antibacterial activity of raspberry (*Rubus idaeus* L.) fruit and pomace extracts." Acta Periodica Technologica **43**: 305-313.
- Verpoorte, R. (1998). "Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development." Drug Discovery Today **3**(5): 232-238.
- Verpoorte, R. and J. Memelink (2002). "Engineering secondary metabolite production in plants." Current Opinion in Biotechnology **13**(2): 181-187.
- Viskelis, P., M. Rubinskienė, I. Jasutienė, A. Šarkinas, R. Daubaras and L. Česonienė (2009). "Anthocyanins, Antioxidative, and Antimicrobial Properties of American Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) and their Press Cakes." Journal of Food Science **74**(2): C157-C161.
- von Linné, C. (2007). "CHAPTER 3 - Biological Significance of Alkaloids. Alkaloids - Secrets of Life." T. Aniszewski. Elsevier, Amsterdam: 141-180.
- Vorobiev, E., N. Lebovka and J.-L. Lanoisellé (2011). "Eco-Extraction du Végétal: Procédés innovants et solvants alternatifs" Dunod : 51–90.
- Wagner, H. and S. Bladt (1996). "Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2nd Edition " Springer Science & Business Media, NewYork: 400.
- Wakeel, A., S. A. Jan, I. Ullah, Z. K. Shinwari and M. Xu (2019). "Solvent polarity mediates phytochemical yield and antioxidant capacity of *Isatis tinctoria*." PeerJ **7**: e7857-e7857.
- Waksmundzka-Hajnos, M., J. Sherma and T. Kowalska (2008). "Thin layer chromatography in phytochemistr." CRC Press. NewYork: 119–174.
- Wang, J. and G. Mazza (2002). "Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(15): 4183-4189.
- Wang, L. and C. L. Weller (2006). "Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants." Trends in Food Science & Technology **17**(6): 300-312.
- Wang, M., B. Avula, Y.-H. Wang, J. Zhao, C. Avonto, J. Parcher, V. Raman, J. Zweigenbaum, P. Wylie and I. Khan (2014). "An integrated approach utilising chemometrics and GC/MS for classification of chamomile flowers, essential oils and commercial products." Food chemistry **152C**: 391-398.
- Wang, Y. F., Z. Y. Ni, M. Dong, B. Cong, Q. W. Shi, Y. C. Gu and H. Kiyota (2010). "Secondary metabolites of plants from the genus *Saussurea*: chemistry and biological activity." Chemistry & Biodiversity **7**(11): 2623-2659.
- Wax RG, L. K., Salyers A & Taber H (2008). "Bacterial resistance to antimicrobials, 2nd edition." CRC press, Floride, USA.
- Weakley, A. S. (2012). "Flora of the Southern and Mid-Atlantic States." University of North Carolina Herbarium (NCU), North Carolina Botanical Garden, Chapel Hill.
- Weng, J. K. and C. Chapple (2010). "The origin and evolution of lignin biosynthesis." New Phytologist **187**(2): 273-285.
- Wilson, D. N. (2014). "Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance." Nature Reviews Microbiology **12**(1): 35-48.

- Wink, M. (2013). "Evolution of secondary metabolites in legumes (*Fabaceae*)."
South African Journal of Botany **89**: 164-175.
- Winkel-Shirley, B. (2001). "Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology." Plant Physiology **126**(2): 485-493.
- Wu, Emilia L., Patrick J. Fleming, Min S. Yeom, G. Widmalm, Jeffery B. Klauda, Karen G. Fleming and W. Im (2014). "*E. coli* Outer Membrane and Interactions with OmpLA." Biophysical Journal **106**(11): 2493-2502.
- Zavala S, M. A., S. Pérez G and R. M. Pérez G (1997). "Antimicrobial screening of some medicinal plants." Phytotherapy Research **11**(5): 368-371.
- Zaynab, M., M. Fatima, S. Abbas, Y. Sharif, M. Umair, M. H. Zafar and K. Bahadar (2018). "Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens." Microbial Pathogenesis **124**: 198-202.
- Zhao, C. L., Z. J. Chen, X. S. Bai, C. Ding, T. J. Long, F. G. Wei and K. R. Miao (2014). "Structure–activity relationships of anthocyanidin glycosylation." Molecular diversity **18**(3): 687-700.
- Zosel, K. (1964). "Brevet allemand." **1493**(190): Page 138.

