

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Abderrahmane Mira de Bejaia  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie

En vue de l'obtention de diplôme d'Ingénieur d'Etat

Option : *Génie Biologique*

# *Thème*

**Activité antibactérienne des extraits  
brut de *Ceratonia siliqua*  
L. (Caroubier)**

*Présenté par :*

**BOUNAB LOUIZA  
GUERROUDJ HOURIA**

**Membre de jury**

Présidente : M<sup>elle</sup> BELHAMICHE N

Promoteur : M<sup>r</sup> ZAIDI F

Co-promotrice : M<sup>me</sup> MAHTOUT R

Examineur : M<sup>me</sup> HASSISSENE N

M<sup>elle</sup> MEZIANI S

**PROMOTION  
2013/2014**



*Nos profonds remerciements au bon Dieu qui a éclairé notre chemin et qui nous a donné la foi et le courage pour réaliser ce modeste travail.*

*Nous tenons à remercier en premier lieu notre promoteur **M ZAIDI. F** et la Co-promotrice **M<sup>me</sup> MEHTOUT. R** de nous avoir encadrés et orientés, ainsi que pour son aide et ses précieux conseils tout au long de ce travail.*

*Nos vifs remerciements s'adressent également à M<sup>lle</sup> BELHAMICHE N, qui nous a faite le grand honneur d'accepter la présidence du jury, qu'il trouve ici l'expression de notre profond respect.*

*Nous adressons également nos grands remerciements à M<sup>lle</sup> MEZIANI S. qui ont bien voulu faire partie du jury et d'apporter leurs vives contributions à l'enrichissement de ce travail.*

*Merci à tous ceux qui, de près ou de loin, nous ont apporté leur aide pour réaliser et mener à terme ce travail.*

*Merci également à tous ceux qui, un jour ou l'autre, nous ont offert leur amitié et des moments inoubliables tout au long de notre cursus universitaire.*

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à :*

- *Mes très chers parents qui m'ont aidé et encouragé énormément dans mes études.*
- *Ma grand-mère.*
- *Ma chère sœur : salima.*
- *A mon marie toufik*
- *Mes cousins et cousines et a toute ma famille et la famille amari louiza,slimane,soraya,fatiha,nacir ,djemel ,sabiha, saidi et sa famille*
- *Mes copains de chambre gurroudi saloua et bouroba kenza*
- *Tous mes ami(e) s LOUIZA, KENZA et HAYETE*
- *Tous ceux que je connais et qui me connaissent.*

**HOURIA**



# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à :*

- *Mes très chers parents qui m'ont aidé et encouragé énormément dans mes études.*

*Ma chère sœurs : fadila, rachida, zakia, hada, rebiha,*

*Mes chère frères, Idir, zindin*

*Tous mes ami(e) ; Houria, fatiha*

*Mes copains de chambre : Assia, katia, lidia*

*Tous ceux que je connais et qui me connaissent.*

**Louiza**



## Liste des figures

Figure	Titre	page
01	Les alcaloïdes dérivés de la phénylalanine et de la tyrosine respectivement	01
02	Structures de quelques acides phénoliques	03
03	Structure de base des flavonoïdes	04
04	Les tanins hydrolysables	04
05	Les tanins condensés	05
06	Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols	08
07	Mécanisme d'inhibition des enzymes par les polyphénols	13
08	les différentes actions des composés phénoliques sur la cellule bactérienne	14
09	Lyse des cellules de <i>Streptococcus. gallolyticus</i>	15
10	Effet de l'acide tannique sur la morphologie des cellules de <i>Streptococcus.</i>	15
11	gousses, pulpe et graines de <i>Ceratonia Siliqua L.</i>	18
12	Protocole d'extraction des composés phénoliques	20
13	protocole de dosage des polyphénols totaux solubles	21
14	Réaction de Chlorure d'Aluminium avec les flavonoïdes	22
15	Protocole de dosage des Flavonoïdes	23
16	Réaction de la vanilline avec la catéchine	24
17	Protocole de dosage des Tanins condensés	24
18	Protocole de dosage des tanins hydrolysables	25
19	Protocole de dosage des phénols polymérisés	26
20	Aromatogramme en milieu solide	29
21	Teneur en phénols totaux solubles	31
22	Aptitude des PTS à se lier ou non aux	31
23	Teneur en flavonoïdes	33
24	Teneur en tanins hydrolysables.	34
25	Teneur en tanins condensés	34
26	Effets de différentes concentrations d'extraits de <i>Ceratonia siliqua</i> sur les souches bactériennes.	35

27	Comportement de la souche <i>S.aureus</i> à différentes concentrations d'extraits	38
28	Comportement de la souche <i>E.coli</i> à différentes concentrations d'extraits	38
29	Comportement de la souche <i>Pcc</i> à différentes concentrations d'extraits	38
30	Comportement de la souche <i>Pca</i> à différentes concentrations d'extraits	39

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
I	Les activités biologiques des composés phénoliques	06
II	Les classes majeures des composés phénoliques à activité antimicrobienne	09
III	les différentes méthodes d'études de l'activité antibactérienne	10
IV	Effet de l'augmentation de la concentration des tannins condensés sur la croissance de <i>F. succinogenes</i>	11
V	effet PH sur l'inhibition de la croissance de <i>Bacillus subtilis</i> (diamètre des zones d'inhibition en mm)	13
VI	Classification de l'espèce <i>Ceratonia siliqua L</i>	19
VII	Source des différentes souches bactériennes étudiées	27
VIII	Effets des différents extraits : Analyse de la variance	37
IX	pourcentage d'augmentation des diamètres des zones d'inhibitions de la concentration 33,33 à 50 mg/ml	39
X	pourcentage d'augmentation des diamètres des zones d'inhibitions de la concentration 50 à 100 mg/ml	39
XI	pourcentage d'augmentation des diamètres des zones d'inhibitions de la concentration 33,33 à 100 mg/ml d'extrait	40
XII	pourcentage d'augmentation des diamètres des zones d'inhibitions de la concentration 20 à 25mg/ml d'extrait	40
XIII	pourcentage d'augmentation des diamètres des zones d'inhibitions de la concentration de 16,66 à 20mg/ml d'extrait	40
XIV	pourcentage d'augmentation des diamètres des zones d'inhibitions de la concentration 14,28 à 16,66 mg/ml d'extrait	41
XV	CMI des extraits vis-à-vis des souches testées.	42

## Liste des abréviations

<b>Abréviation</b>	<b>Signification</b>
<b>g</b>	gousse
<b>P</b>	pulpe
<b>G</b>	Graine
<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>EtOH</b>	Éthanol
<b>ED</b>	L'eau distille
<b>AT</b>	Acide tannique
<b>BSA</b>	Bovine Sérum Albumine
<b>CAT</b>	Catéchine
<b>EqAG</b>	Equivalente Acide Gallique
<b>EqAT</b>	Equivalente Acide Tannique
<b>EqCAT</b>	Equivalente Catéchine
<b>EqQ</b>	Equivalente Quercétine
<b>PCA</b>	Plat Count Agar
<b>PTS</b>	Phénols Totaux Solubles
<b>Q</b>	Quercetine
<b>UFC</b>	Unité Formant Colonies
<b>AG</b>	Acide Gallique
<b>S aureus</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>E.coli</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>Pca</b>	<i>Pectobacterium carotovorum atrosepticum</i>
<b>Pcc</b>	<i>Pectobacterium carotovorum carotovorum</i>



<b>HCl</b>	Acide chlorhydrique
<b>MS</b>	Matière sèche
<b>CMB</b>	Concentration Minimale Bactéricide
<b>CMI</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>DMSO</b>	Diméthyle sulfoxyde
<b>Φ</b>	Diamètre de la zone d'inhibition

# *Sommaire*

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

## *Partie théorique*

### CHAPITRE I

#### *Les Métabolites secondaires*

I. Métabolites secondaires .....	3
I.1. Les alcaloïdes .....	3
I.2. Les huiles essentielles .....	4
I.3. Les composés phénoliques .....	4
I.3.1. Définition .....	4
I.3.2. Classification .....	4
I.3.2.1 Les composés phénoliques simples.....	5
I.3.2.1.1 Les acides phénoliques .....	5
I.3.2.1.2. Les flavonoïdes .....	5
I.3.2.2. Les composés phénolique complexes .....	6
I.3.2.2.1. Les tanins hydrolysables.....	6
I.3.2.2.2. Les tanins condensés .....	6
I-3-2-3. Rôles biologiques des composés phénoliques .....	9
I.3.3 Biosynthèse des composés phénoliques .....	9
I.3.3.1. La voie de l'acide shikimique .....	9
I.3.3.2. La voie de l'acide malonique .....	9

*Activité antibactérienne*

II. Activité antibactérienne des composés phénoliques .....	11
II.1.Méthodes d'études de l'activité antibactérienne.....	12
II.2. Facteurs d'efficacité des composés phénoliques .....	13
II.2. 1. Composé phénolique .....	13
II. 2. 1. 1. Concentration .....	13
II.2.1.2. Solubilité .....	14
II. 2. 2. Microorganisme.....	14
II. 2. 3 Conditions du milieu .....	14
II. 3.les mécanismes d'action des composés phénoliques.....	15
II. 3. 1. Action sur les enzymes .....	15
II.3.2. Action sur la cellule bactérienne .....	15
II.3. 2. 1. Action sur la membrane cellulaire .....	16
II.3. 2. 2. Action sur la synthèse des protéines .....	16
II.3.2. 3.Action sur l'ADN .....	16
II.3.3. Action sur la morphologie et la lyse de la cellule.....	17
II.4. Facteurs influençant l'action antibactérienne.....	17
II.4.1 La nature du composé phénolique .....	17
II.4.2. La taille de l'inoculum et la nature du microorganisme .....	18
II.4.3. La concentration .....	18

# Partie pratique

## CHAPITRE III

### *Matériel et méthodes*

I. Matériel et méthodes .....	19
I.1. Le matériel végétal.....	19
I. 1.1.Origine des échantillons .....	19
I.1.3.Classification botanique de <i>Ceratonia Siliqua L</i> .....	21
I. 2. Méthodes.....	21
I. 2 .1. Séchage.....	21
I. 2.2.Broyage et tamisage.....	21
II. Extraction des composés phénoliques.....	21
III. Dosage des composés phénoliques .....	22
III.1. Dosage des phénols totaux solubles .....	22
III.2.Dosage des flavonoïdes.....	23
III.3.Dosage des tanins condensés.....	24
III.4.Dosage des tanins hydrolysables.....	25
III.5.Dosage des phénols polymérisés par la méthode de précipitation par Sérum Albumine Bovine(BSA) .....	27
VI. Activité antibactérienne.....	29
VI.1.Souches testées .....	29
VI.2. Milieux de culture .....	30
VI.3. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	30
VI.4. Détermination de la CMI sur milieu gélosé.....	32
VII. Analyse statistique.....	32

## CHAPITRE V

### *Résultats et discussions*

I. Résultats et discussion .....	33
I I Activité antibactérienne.....	37
III. Détermination de la CMI.....	43

Discussion général.....45

CONCLUSION.....48

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

# Introduction

## Introduction

Les végétaux ont toujours été employés par l'homme pour des fins thérapeutiques, certaines plantes médicinales sont employées soit sous leur forme naturelle, soit sous forme d'extrait permettant d'avoir les principes actifs recherchés (Cowan ,1999).

Un intérêt grandissant est apporté par la communauté scientifique pour améliorer les connaissances humaines dans l'extraordinaire complexité de la chimie des plantes ayant des effets thérapeutiques. La valeur médicinale des plantes est alors de plus en plus démontrée scientifiquement, ce qui constitue un argument de taille pour leur utilisation en médecine, particulièrement en prophylaxie. Ainsi, l'industrie des plantes médicinales est devenue, en peu de temps, le secteur de l'industrie pharmaceutique connaissant une forte croissance (Gherdia, 2005).

On attribue, généralement à l'activité d'une plante un ou plusieurs principes actifs. Parmi les principes actifs découverts à partir des plantes médicinales, on trouve les polyphénols; qui sont connus par leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple les activités antivirales, anti-inflammatoires, antioxydantes, anticancéreuses, et antimicrobiennes. (Yang *et al.*, 2001 ; Gherdia, 2005).

*Ceratonia siliqua* L., appelée communément « caroubier » figure parmi les plantes qui possèdent des propriétés thérapeutiques importantes. En médecine traditionnelle locale, elle est utilisée comme un anti-diarrhéique très utile dans les gastro-entérites des nourrissons.

L'objectif de notre travail est d'étudier l'activité antibactérienne du fruit de *Ceratonia siliqua* L. à l'égard de quelques bactéries pathogènes. Pour cela le travail est divisé en deux parties :

Dans une première partie, les bases bibliographiques, sur lesquelles s'est construit le travail, sont exposées en deux points: le premier est consacré aux métabolites secondaires et le deuxième point traite l'activité antibactérienne des polyphénols.

La deuxième partie, les travaux ont été portés sur la collecte et le traitement de l'échantillon. Suivi d'une extraction de ses principes actifs (polyphénols), d'une analyse phytochimique (dosage des extraits phénoliques) et d'une étude de leur activité antibactérienne à l'égard de deux bactéries pathogènes (*S.aureus et E.coli*) et deux bactéries phytopathogènes (*Pcc et Pca*).



# Partie théorique

# Chapitre I

## I. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés appartenant à des groupes chimiques extrêmement divers, tels que les acides organiques, les composés aromatiques, les terpènes, les stéroïdes, les alcaloïdes, les carbonyles, etc. (**Kintzios et Barberaki, 2004**).

Leur fonction dans les plantes est habituellement liée à la régulation métabolique, la croissance, le processus de lignification, la coloration de certaines parties des plantes et la protection contre l'attaque des organismes pathogènes (**Bratt, 2000**).

Les métabolites secondaires les plus étudiés sont : Les alcaloïdes, les huiles essentielles, et les polyphénols.

### I.1. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances azotées, plus ou moins basiques, d'origine naturelle et de distribution restreinte. Ils sont issus au moins pour une partie du métabolisme des acides aminés et possèdent des propriétés pharmacologiques marquées (**Bruneton, 2001**).

La (figure 1) présente les structures de deux alcaloïdes : La nicotine et l'arécoline.



**Figure 01** : Les alcaloïdes dérivés de la phénylalanine et de la tyrosine respectivement (**Krief, 2003**).

- **Rôles biologiques des alcaloïdes**

Les alcaloïdes présentent diverses activités biologiques témoins de leur rôle dans la protection des végétaux contre les différents agresseurs extérieurs. Diverses activités associées aux alcaloïdes ont des rôles bénéfiques pour l'Homme, dont certaines incluent des vertus thérapeutiques (morphine). Ainsi, certaines molécules présentent des activités antimicrobiennes (antibactérienne, antifongique et antivirale) d'autre part, d'autres molécules sont utilisées comme des drogues (cocaïne) (**Louis, 2004**).

## I.2. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des produits naturels utilisés comme matières premières dans plusieurs domaines, notamment en parfumerie, cosmétiques, aromathérapie et phytothérapie (Mouhsen, 2004).

Une huile essentielle est un mélange hétérogène complexe qui renferme principalement des terpènes (monoterpènes, sesquiterpènes) et dans certains cas des dérivés phénylpropaniques (Bruneton, 2001).

- **Rôle biologique des huiles essentielles**

Les huiles essentielles ont été employées pendant des siècles à des fins thérapeutiques et cosmétiques, où elles sont incorporées aux savons ou d'autres produits comme parfum ou agent antimicrobien (Hsu *et al.*, 2007). Comme elles attirent aussi les insectes qui transportent les grains de pollen lors de la fécondation (Parry, 1922).

Les principaux constituants en huiles essentielles de la lavande sont : linalool, linalyl acétate, 1,8-cineol, B-ocinene, terpinen-4-ol et camphor (Hsu *et al.*, 2007).

## I.3. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou les polyphénols constituent un des groupes les plus importants de métabolites secondaires distribués dans les plantes. Actuellement, plus de 8000 structures différentes sont connues (Ferguson, 2001 ; Urquiga et Leighton, 2007).

### I.3.1. Définition

Le terme polyphénols a été introduit en 1980, en remplacement du terme ancien de tanin végétal, et a été défini comme suit : «Composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3 000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines». Il s'ajoute à cette définition le fait qu'ils possèdent un pouvoir antioxydant élevé (Chira *et al.*, 2008).

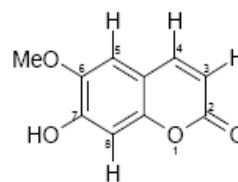
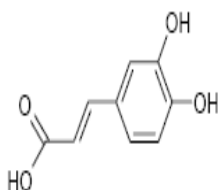
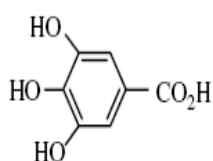
### I.3.2. Classification

Les polyphénols comptent plus de 8000 molécules réparties en une dizaine de classes. Plusieurs classifications sont citées dans la littérature. La classification adoptée dans ce travail est celle de (Freudenberg 1920), qui selon un critère de structures distingue, des composées phénoliques simples de type phénols et des composés phénoliques complexes de type tannins. (Despande *et al.*, 1986)

## I.3.2.1 Les composés phénoliques simples

### I.3.2.1.1 Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (Figure 2). Cette classe est subdivisée en deux sous classes : les acides benzoïques de structure C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (acide gallique, protocatéchique, vanillique, p-hydroxybenzoïque, et syringique) et les acides cinnamiques caractérisés par un squelette en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (acide p-coumarique, caféïque, férulique et l'acide sinapique) (balasundrum *et al.*, 2006).



**Acide gallique**

**Acide caféïque**

**Scopolétine**

**Figure 02** : Structures de quelques acides phénoliques (Jeronne, 2004).

### I.3.2.1.2. Les flavonoïdes

Ce sont des substances généralement colorées d'où leur nom tiré du latin « *flavus* » (jaune). (Heller *et al.*, 1998 ; Guignard, 2000)

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones. Constitués de deux unités aromatiques, deux cycles en C<sub>6</sub> (A et C), reliés par une chaîne en C<sub>3</sub> (Bruneton, 1999).

Il existe six classes des flavonoïdes, qui diffèrent par leur structure chimique : flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (Medié-Sarié *et al.*, 2004).

Les flavonoïdes se composent de deux anneaux benzéniques (A et C) reliés par un anneau pyranne oxygéné (B). La structure de base est présentée dans la (Figure3)

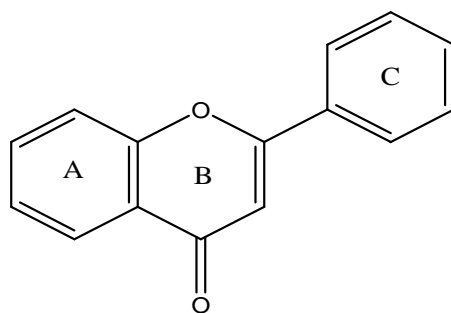


Figure 03 : Structure de base des flavonoïdes (Erlund, 2002).

### I.3.2.2. Les composés phénolique complexes

Les tanins peuvent être subdivisés en tanins hydrolysables et en tanins condensés (Reed, 1995 ; Rob *et al.* 1999 ; Frutos *et al.*, 2004)

#### I.3.2.2.1. Les tanins hydrolysables

Ce sont des molécules complexes qui, après hydrolyse, libèrent l'acide gallique et l'acide ellagique (Gayon, 1968) (Figure 4).

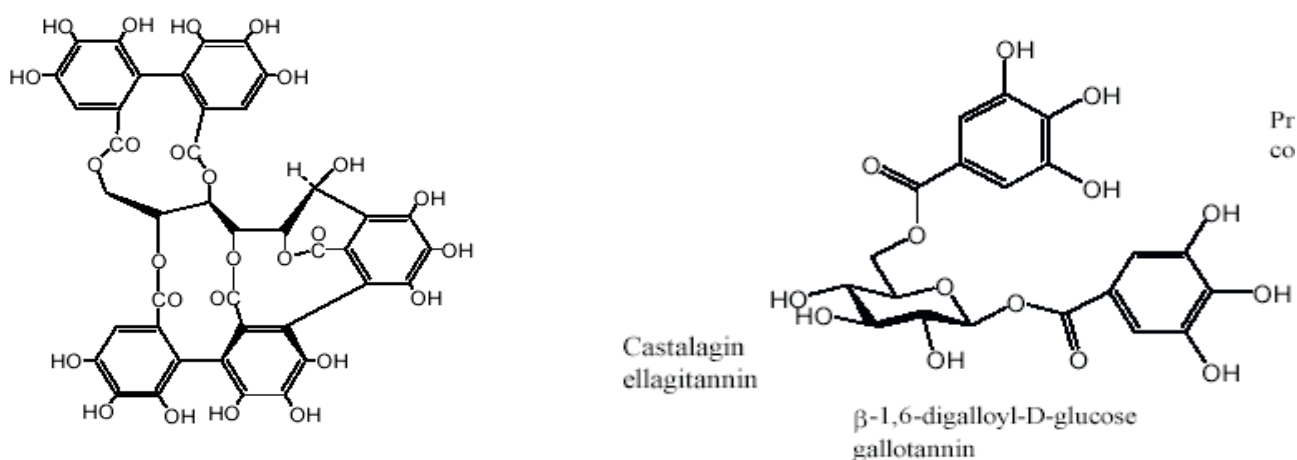
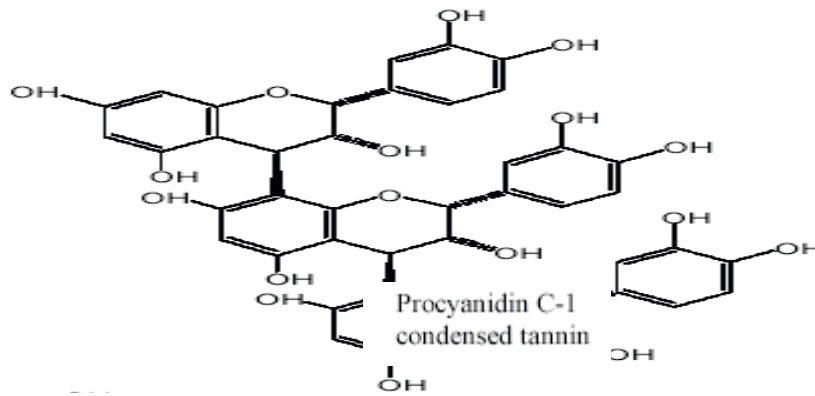


Figure 04 : Les tanins hydrolysables (Rauha, 2001).

#### I.3.2.2.2. Les tanins condensés

Ils sont connus sous le nom de « proanthocyanidines », polymères de 3-polyhydroxyflavonol (Cowan, 1999 ; Balasundram *et al.*, 2006), qui produisent des anthocyanidines quand on les chauffe dans l'acide ( O'Donovan *et al.*, 2001) (Figure 5).



**Figure 05:** Les tanins condensés (Rauha, 2001).

### I-3-2-3. Rôles biologiques des composés phénoliques

Le rôle des polyphénols dans la prévention des maladies cardiovasculaires en particulier l'athérosclérose, les maladies cardiaques coronaires, le diabète (Negrao et Faria, 2009) et des cancers est largement étudié (Edeas, 2007).

Les polyphénols possèdent des activités antimutagenique, antibactérienne, antivirale, anti-inflammatoire, antiallergique, antithrombotique, (Bourgou et al., 2008) et antioxydante et sont capables de piéger les radicaux libres (Edeas, 2007).

Les effets sur l'activité proteosomale peuvent également avoir la pertinence dans le rôle protecteur des polyphénols dans les maladies neurodegeneratives, en particulier la maladie d'Alzheimer (Rossi et al., 2008). Ces composés phénoliques sont dotés de certaines activités résumées dans le **Tableau I**.





### **I.3.3 Biosynthèse des composés phénoliques**

#### **I.3.3.1. La voie de l'acide shikimique :**

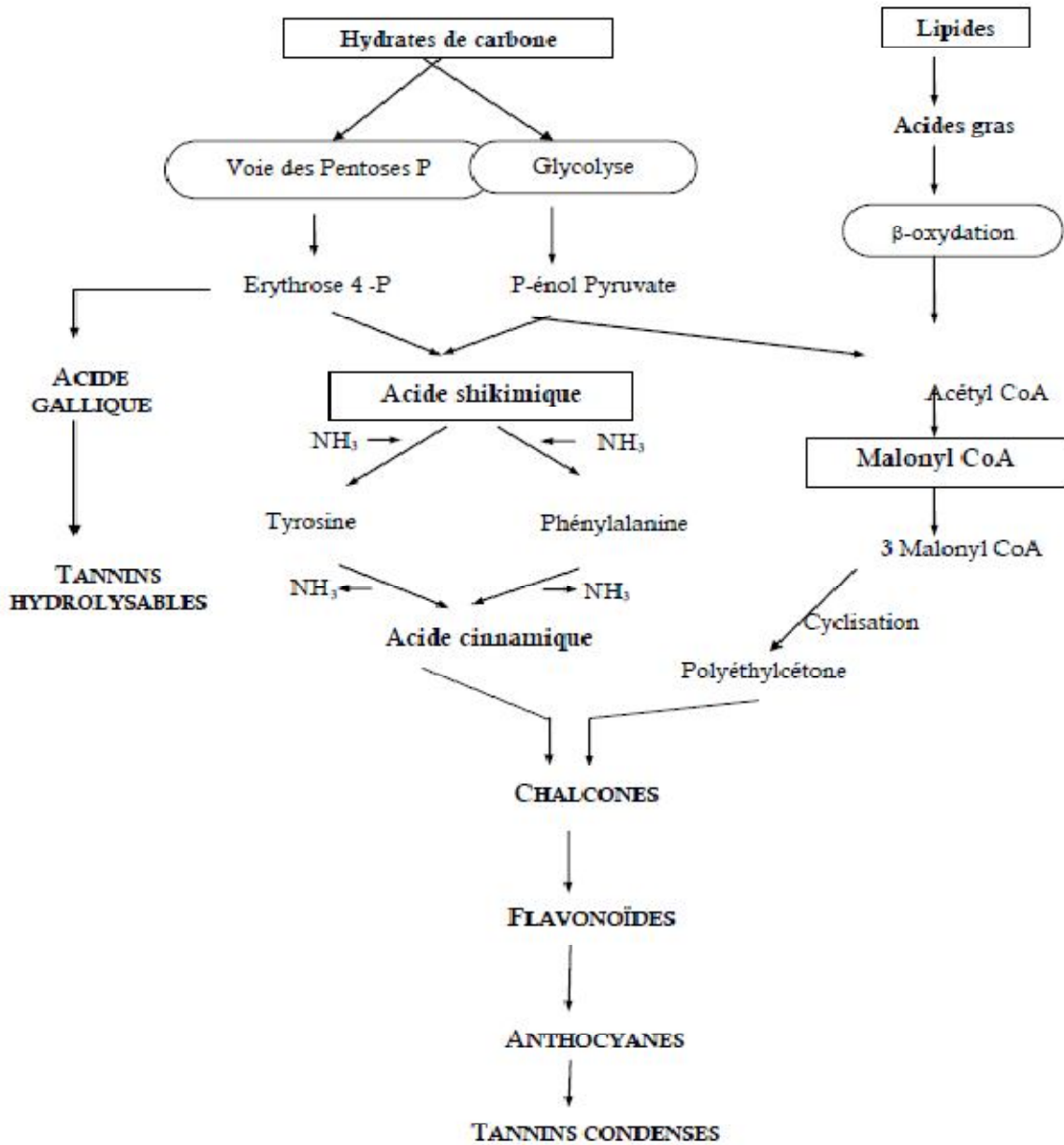
Dans cette voie, l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate sont produits par les hydrates de carbones lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse respectivement.

Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques C6-C1 formant les tannins hydrolysables et de la chalcone qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tannins condensés (**Haslam 1994, Dewick 1995**)

Aussi, il est intéressant de préciser que la tyrosine et la phénylalanine dérivent de cette voie métabolique. En effet, ces deux acides aminés sont des intermédiaires métaboliques entre l'acide shikimique et l'acide cinnamique.

#### **I.3.3.2. La voie de l'acide malonique :**

La glycolyse et la B-oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenue par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (**Fleeger et Flipse 1964, Richter 1993**) (Figure 06).



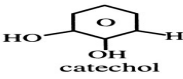
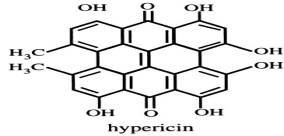
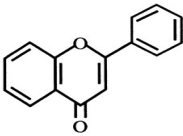
**Figure06.** Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols. (Fleeger et Flipse 1964, Richter 1993)

## II. Activité antibactérienne des composés phénoliques

Les polyphénols sont les principaux composés antimicrobiens des plantes ; ils peuvent avoir une activité inhibitrice sur la croissance d'une grande catégorie de microorganisme et des bactéries pathogènes (Yi et al. 2010).

Cependant, le mécanisme d'action des polyphénols sur les agents pathogènes est sans doute très complexe et n'est pas complètement élucidé (Nohynek, 2006).

**Tableau II :** Les classes majeures des composés phénoliques à activité antimicrobienne (Cowan, 1999)

Classes	Mécanismes
<p>Phénols simples : epicatechine</p>  <p style="text-align: center;">catechol</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Perte de substrat.</li> <li>- Interruption de la membrane.</li> </ul>
<p>Quinones : Hypericine</p>  <p style="text-align: center;">hypericin</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Liaison avec l'adhésine .</li> <li>- Formation de complexes avec la paroi cellulaire.</li> <li>- Inactivation des enzymes.</li> </ul>
<p>Flavonoïdes : flavones</p>  <p style="text-align: center;">flavone</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Liaison avec l'adhésine, se complexe avec la paroi cellulaires.</li> <li>- Inactive les enzymes.</li> <li>- Inhibe la reverse transcriptase de HIV <i>in vitro</i>.</li> </ul>
<p>Tannins : ellagitannins</p>	<p>Liaison avec les protéines, avec les adhésines, inhibition d'enzyme, perte du substrat, complexations avec des ions métalliques, interactions avec l'ADN eucaryotique moisissures)</p>

## II.1.Méthodes d'études de l'activité antibactérienne

Plusieurs types des méthodes d'étude de l'activité antibactériennes sont développées, Le choix d'une technique est fonction des objectifs assignés à l'agent antimicrobien lors de son utilisation (**Crexiex et Gaudin ,1995**). Les méthodes les plus utilisées sont résumés dans le **tableau III**

**Tableau III:** les différentes méthodes d'études de l'activité antibactérienne

Méthode		Références
Antibiogramme	Cette technique consiste à utiliser des disques imprégnés de différents extraits à tester, puis les déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec la suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose en laissant des zones vierges autour des disques appelées «zone d'inhibition».	<b>Gurin et Carret, 1999.</b>
Méthodes de diffusion en puits	Elle consiste à découper un trou circulaire dans la gélose et y verser une solution de la substance à une concentration connue .La substance diffuse radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablement ensemencée avec la suspension bactérienne.	<b>Bin Shan ,2007</b>
Méthode de dilution	Les substances à tester peuvent également être directement mélangées en concentrations connues au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide	<b>Robert-Demuet, 1995</b>
Méthode de détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide	<b>CMI</b> : Concentration minimale inhibitrice est plus petite concentration qui inhibe toute croissance visible d'une souche bactérienne après 18 à 24heures de culture à37°C .Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique, une partie de l'inoculum est capable de se développer après la disparition du composé inhibiteur.	<b>Mann et Markham, 1998</b>
	<b>CMB</b> : plus petite concentration de l'agent inhibiteur laissant au moins 0.01% de l'inoculum initial après 18 à 24 heures de culture à 37°C .Cette valeur caractérise l'effet bactéricide de la substance testée.	<b>Hadouchi et al. ,2009</b>

## II.2. Facteurs d'efficacité des composés phénoliques

Selon de nombreux auteurs, l'action antimicrobienne des composés phénoliques dépend du composé phénolique, de l'espèce microbienne et des conditions du milieu.

### II.2. 1. Composé phénolique

L'efficacité d'un composé phénolique dépend de son poids moléculaire et de son hétérogénéité structurale (**Hagerman et Butter, 1981**). Les facteurs qui peuvent influencer son efficacité sont : la concentration et la solubilité.

#### II. 2. 1. 1. Concentration

Des études réalisées par **Bae et al, (1993)** sur les bactéries de rumen, ont montré que l'augmentation de la concentration des tannins condensés dans le milieu diminue la croissance de *Fibrobacter succinogenes* (Tableau IV).

**Tableau IV** : Effet de l'augmentation de la concentration des tannins condensés sur la croissance de *F. succinogenes* **Bae et al, (1993)**

Tannins condensés (µg/ml)	Nombre de cellules viables (UFC/ml)
0	$4.3 \times 10^8$
100	$2.3 \times 10^8$
200	$9.3 \times 10^7$
300	$2.3 \times 10^7$
400	$2.3 \times 10^6$
500	$4.3 \times 10^5$
600	$2.3 \times 10^3$
700	$9.3 \times 10^2$

### II.2.1.2. Solubilité

Selon **Meyer et al. 1989**, le pouvoir de diffusion de l'antibiotique joue un rôle capital au cours de la mesure au milieu solide. (La polymyxine diffuse mal en milieu gélosé).

Des méthodes d'évaluation comme la méthode des disques par exemple ; n'est pas applicables dans le cas de substance non soluble qui ne diffuse pas dans le milieu. (**Himujima et al. , 1992**).

Selon **Carson et al. , 1995** l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* ainsi que beaucoup de ses composants ont une solubilité limitée en milieu aqueux : la formation d'une suspension turbide rend la détection de la croissance difficile.

### II. 2. 2. Microorganisme

La structure de la paroi des microorganismes intervient beaucoup dans la résistance naturelle. Ainsi, les bactéries Gram négatives sont plus résistantes que les bactéries Gram positives. La résistance des bactéries Gram négatives est liée à leur membrane externe qui est riche en molécules LPS qui présente une barrière à la pénétration de nombreux agents antimicrobiens ( **Nikaido, 1994**).

### II. 2. 3 Conditions du milieu

**Jurd et al. (1971)** ont montré une influence appréciable du pH sur l'activité antibactérienne des composés phénoliques. Ces derniers ont testé le 6-cinnamylresorsinol sur des bactéries Gram positives et Gram négatives (*Bacillus*, *Sarcina*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus sp. et Escherichia coli*). L'étude a montré une inhibition totale de ces bactéries à des pH allant de 4 à 7.

**Jeanfils et al. , 1991, Ont** observés qu'en général, les extraits sont plus actifs à pH 7.2 qu'à PH 6 ou 8 **Tableau V**

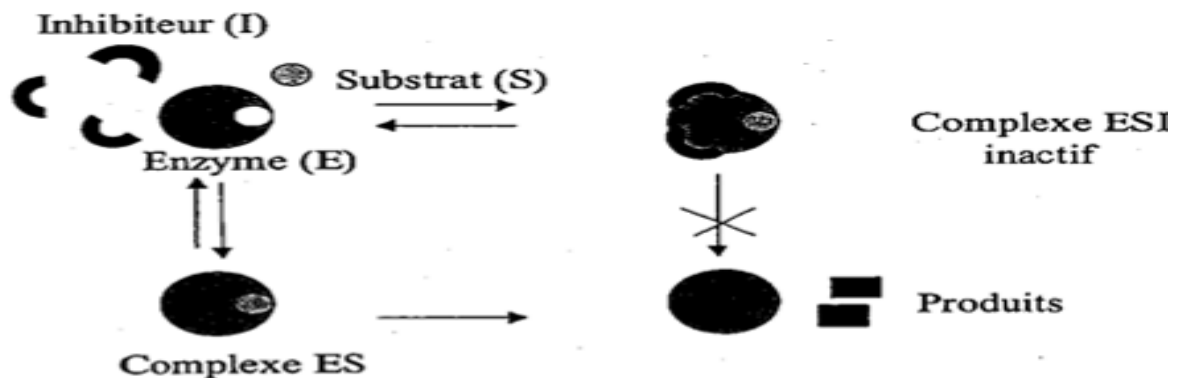
**Tableau V:** Effet du PH sur l'inhibition de la croissance de *Bacillus subtilis* (diamètre des zones d'inhibition en mm) (Jeanfils *et al.*, 1991).

N° d'extrait	pH6	pH7.2	pH8
1	0	8	0
2	8	13	0
3	11	8	0
4	15	17	11
5	7	0	7
6	11	11	9

## II. 3.les mécanismes d'action des composés phénoliques

### II. 3. 1. Action sur les enzymes

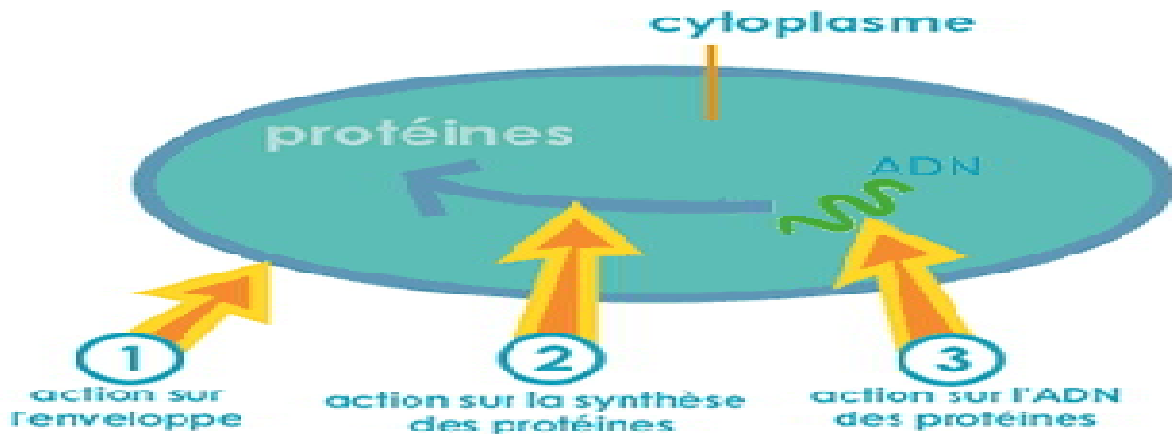
Le mécanisme par lequel les composés phénoliques inhibent les enzymes peut être expliqué par un changement de la structure de l'enzyme (**Figure 7**) et ou une diminution de la disponibilité des substrats au niveau des sites actifs de l'enzyme. **Leinmiller *et al.* (1991).**



**Figure 07:** Mécanisme d'inhibition des enzymes par les polyphénols **Scalbert, (1991)**

### II.3.2. Action sur la cellule bactérienne

Les polyphénols entraînent le changement de perméabilité de la paroi cellulaire bactérienne par liaison avec les ions  $Ca^{2+}$  qui rentrent dans sa structure (**Figure8**). La synthèse de la paroi cellulaire est inhibée par la pénétration des tanins condensés à l'intérieur de la cellule bactérienne qui provoque des réactions avec un ou plusieurs composants intracellulaires (**Jones *et al.*, 1994**).



**Figure 08:** les différentes actions des composés phénoliques sur la cellule bactérienne

### II.3. 2. 1. Action sur la membrane cellulaire

Les composés phénoliques provoquent la perturbation des forces motrices des protons de la membrane cellulaire. Cette perturbation conduit à la perte de l'intégrité structurale de la membrane et altère la perméabilité cellulaire provoquant ainsi, la fuite des constituants intracellulaires vitaux et la lyse complète de la cellule bactérienne. **Mc Donnell (1999)**.

### II.3. 2. 2. Action sur la synthèse des protéines :

Les polyphénols particulièrement les tannins ont l'aptitude de précipiter les protéines par formation des liaisons hydrophobes et covalentes, et les rendre moins accessibles aux enzymes en particulier en les insolubilisant, ou en masquant leurs de reconnaissance (**Zimmer, 1995**).

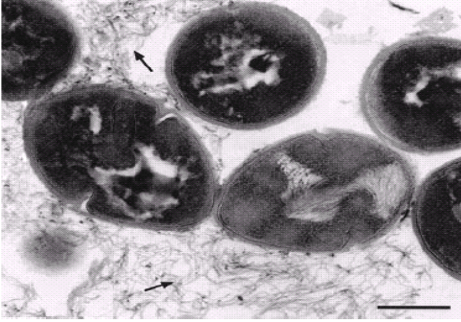
### II.3.2. 3.Action sur l'ADN :

Les polyphénols possédant entres autre, des effets inhibiteurs efficaces sur la biosynthèse des acides nucléiques ADN et ARN .En étudiant l'activité antibactérienne des flavonoïdes, ont montre que la robinetier inhibe fortement la synthèse d'ADN chez *Proteus vulgaris* ainsi que la synthèse d'ARN chez *Staphylococcus aureus*. Ils ont montrés aussi que l'intercalation des composes phenoliques entre les paires de nucléotides dans la double hélice d'ADN peut perturber la réplication et la réparation de l'ADN (**Cushine et lamb, 2005**).

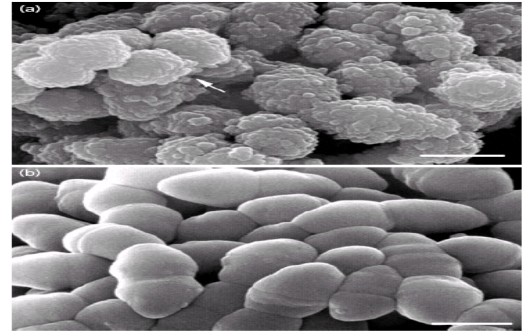


### II.3.3. Action sur la morphologie et la lyse de la cellule

L'examen des cellules de *S. gallolyticus* au microscope électronique a montré des changements morphologiques en présence d'acide tannique à une concentration de 0,2% **O'Donovan et al. , (2001)** ; mais à 0,75%, les cellules sont complètement déformées et la division cellulaire est notamment perturbée (Figures 9 et 10).



**Figure 09** : Lyse des cellules de *Streptococcus. gallolyticus* (O'Donovan et al., 2001).



**Figure 10** : Effet de l'acide tannique sur la morphologie des cellules de *Streptococcus. gallolyticus* (O'Donovan et al, 2001).

### II.4. Facteurs influençant l'action antibactérienne

L'action antibactérienne des composés phénoliques dépend de plusieurs facteurs : la concentration, le temps d'incubation, le pH, la température, la présence de la matière organique, la nature de composé phénolique et le type de microorganisme (**Russell, 2003**).

#### II.4.1 La nature du composé phénolique

**Ozaki et al. (1991)** ont montré que l'efficacité de l'activité antibactérienne dépend de la nature du composé phénolique, par exemple : l'activité antibactérienne des 4-oxo-4H-[1,3] thiazeto [3,2-a] quinoline dérivés des acides carboxyliques est plus efficace que celle des 5-oxo-1,2-dihydro-5H-thiazolo [3,2-a] quinoline dérivés des acides carboxyliques.

### II.4.2. La taille de l'inoculum et la nature du microorganisme

D'après le Comité National de Standardisation Clinique des laboratoires (NCCLS), la taille de l'inoculum est considérée comme le facteur le plus important dans l'activité antimicrobienne (**Cushnie, 2005**).

Selon **Maillaird (2002)**, l'activité antibactérienne des phénols varie considérablement selon le type de microorganisme ; diverses contraintes de l'espèce bactérienne peuvent également agir.

**Cowan (1999)** a rapporté qu'une anthraquinone de *Casse italica* (arbre pakistanais) est bactériostatique pour *Bacillus anthracis*, *Corynebactérie pseudodiphthericum*, et *Pseudomonas aeruginosa* et bactéricide pour *Pseudomonas pseudomalliae*.

### II.4.3. La concentration

L'étude de **Haslam (1974)** sur les interactions protéines-polyphénols, a montré que la précipitation des enzymes est fonction de l'augmentation de la concentration des polyphénols ; 20 molécules de phénols sont nécessaires pour précipiter 1 molécule de l'enzyme  $\beta$ -pent-O-galloyl-D-glucose.

L'activité antibactérienne des flavonoïdes varie en fonction de leur concentration, en effet, l'absence de croissance a été démontrée à une concentration de 128  $\mu\text{g/ml}$  contre *S. aureus* ; la même année, d'autres études ont rapporté que les flavones inhibent la croissance de 5 espèces du genre *Staphylococcus* à des concentrations entre 3,9  $\mu\text{g/ml}$  et 15,6  $\mu\text{g/ml}$ .

D'autres paramètres permettent d'exercer un effet sur l'activité antibactérienne : Il a été démontré que l'activité antibactérienne augmente proportionnellement en fonction de la température (**Russell, 2003**).

Le temps d'incubation influence sur l'activité antibactérienne des composés phénoliques ; en effet, l'étude de **Varel et al. (1986)** a mis en évidence la différence du nombre de bactéries viables dans la fermentation in vitro avec l'acide vanillique, et leurs résultats à 24 et à 36h étaient respectivement de  $1,83 \cdot 10^7$  UFC et  $7,85 \cdot 10^7$  UFC.

# Partie pratique

# Chapitre II

## I. Matériel et méthodes

### I.1. Le matériel végétal :

#### I. 1.1. Origine des échantillons:

Le matériel végétal, constitué de gousses mûres de caroubier, qui a été récolté aux hauteurs des montagnes de la commune de Tazmalt (Wilaya de Bejaia) vers la fin du mois d'aout 2011.



Figure 11 : gousses, pulpe et graines de *Ceratonia Siliqua L.*

#### I. 1.2. Description botanique de *Ceratonia siliqua L.* (Caroubier)

Le caroubier est un arbre poussant dans toute la région méditerranéenne, de 6 à 10 m de hauteur, à tronc épais et à cime arrondie :

- Feuilles (A) sont persistantes, composées de 5 à 11 folioles ovales, coriaces, brillantes au-dessus, et légèrement échancrées au sommet. (**Bezanger et al.1990**)
- Fleurs (B) sont très petites, constituées d'un calice pourpre, dépourvu de corolle. (**Bezanger et al.1990**).
- fruit (C) ou caroube est une grande gousse plate, pendante de 10 à 20 cm, brune et luisante, contenant des graines ovales, brunes très dures (**Bezanger et al.1990**).



A



B



C

### I.1.3. Classification botanique de *Ceratonia Siliqua L.*

La classification de *Ceratonia siliqua L.* est présentée dans le tableau VI

**Tableau VI:** Classification de l'espèce *Ceratonia siliqua L.* (Tucker, 1992).

Rang taxonomique	Nomenclature
Règne	Végétal
Embranchement / Sous embranchement	Spermaphytes / Angiospermes
Classe / Ordre	Magnoliopsida/ Rosales
Famille / Sous famille	Fabacées / Césalpiniacées
Genre / Espèce	<i>Ceratonia / Ceratonia siliqua L.</i>

## I. 2. Méthodes

### I. 2 .1. Séchage

Après la récolte, les échantillons ont été décortiqués manuellement (séparation de la pulpe et la graine) puis séchés à l'abri de la lumière.

### I. 2.2. Broyage et tamisage :

La matière sèche obtenue est réduite en poudre à l'aide d'un broyeur électrique. Les poudres obtenues après broyage sont passés au tamiseur électrique de 0,5mm de diamètre, cette dernière est conservée dans des bocaux en verre à l'abri de la lumière pour des analyses ultérieures.

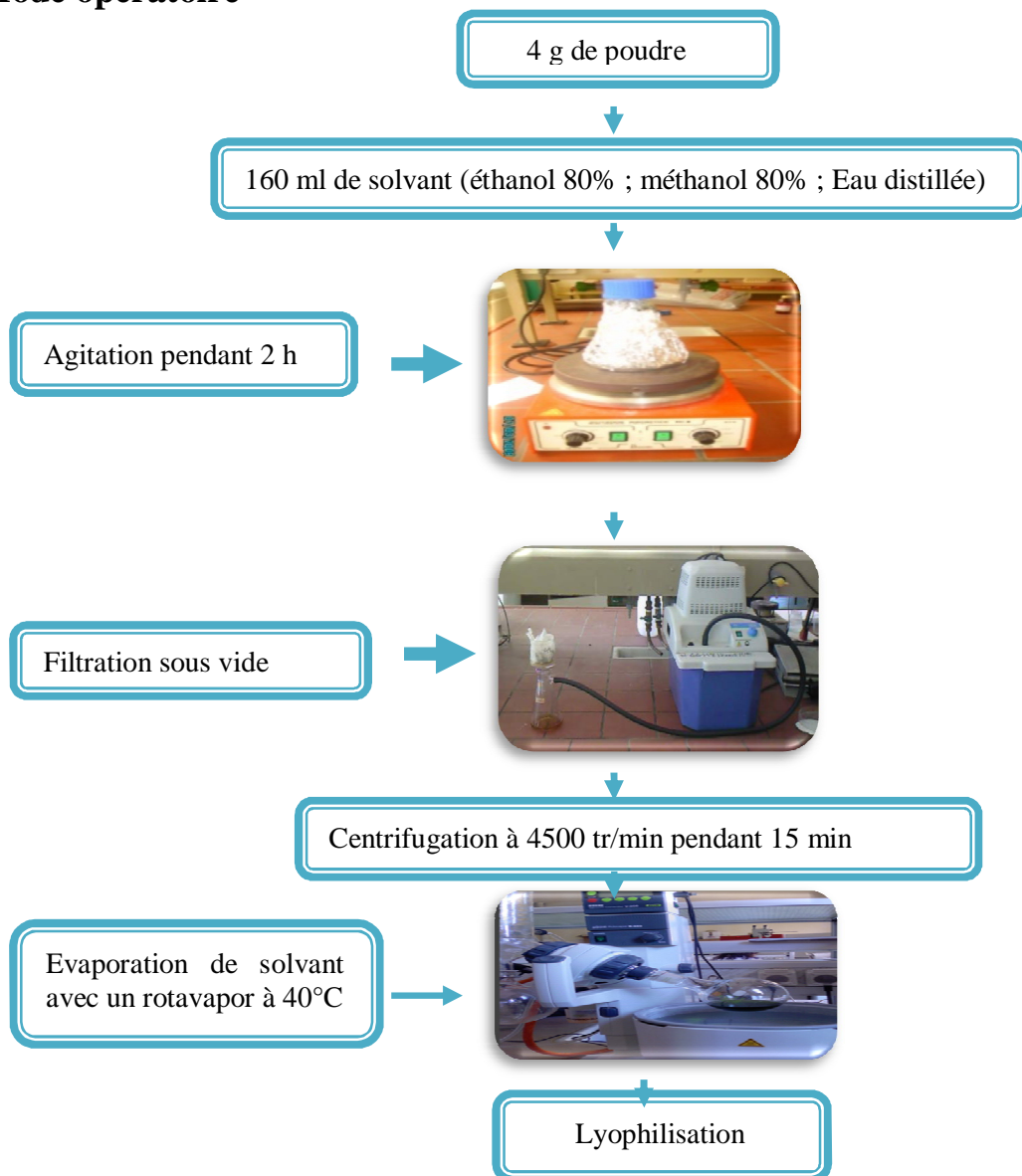
## II. Extraction des composés phénoliques :

L'extraction des composés phénoliques est faite par macération selon la méthode d'Oomah et al (2010) par trois solvants : Eau distillée, Méthanol 80% et Ethanol 80%.

### Principe

Quand une matrice est au contact avec un solvant, les composants solubles dans le matériel migrent vers le solvant ; Ainsi, l'extraction est un transfert du principe actif de la matrice vers le solvant, selon un gradient de concentration (Handa et al, 2008).

• **Mode opératoire**



**Figure 12:** Protocole d'extraction des composés phénoliques (Oomah *et al*, 2010).

Le rendement d'extraction de chaque extrait est calculé par la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = \left[ \frac{P_f}{P_i} \right] * 100$$

**P<sub>f</sub>**: Poids de l'extrait après lyophilisation(g).

**P<sub>i</sub>**: Poids de l'échantillon initial (g).

### III. Dosage des composés phénoliques

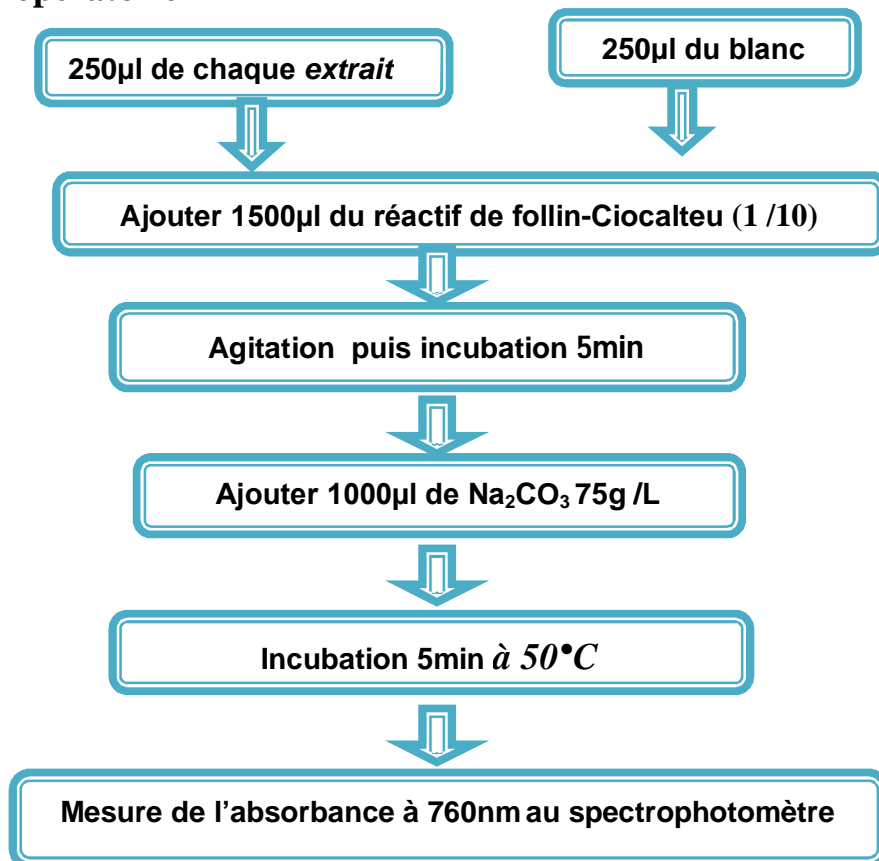
#### III.1. Dosage des phénols totaux solubles :

La teneur en composés phénoliques est estimée selon la méthode de **Skерget et al ., (2005)**.

##### Principe :

Le réactif de Folin-Ciocalteu, mélange de l'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), est réduit en présence de polyphénols en un mélange d'oxyde bleu de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). La coloration bleue produite est proportionnelle au taux des composés phénoliques présents dans le milieu réactionnel (**Ribéreau-Gayon, 1968 ; Lapornik et al, 2005**)

##### Mode opératoire



**Figure13:** protocole de dosage des polyphénols totaux solubles (**Skерget et al, (2005)**)



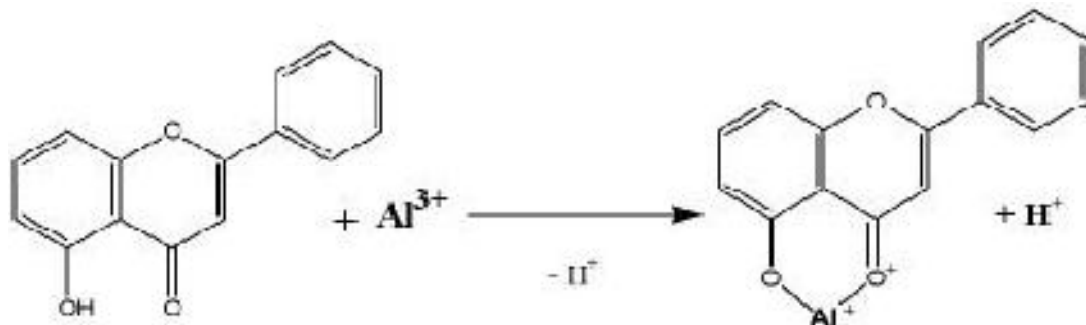
Les concentrations en composés phénoliques sont déterminées par référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec de l'acide gallique utilisée comme standard (annexe2).

Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique (EqAG) par g de matière sèche (mg EqAG/g MS).

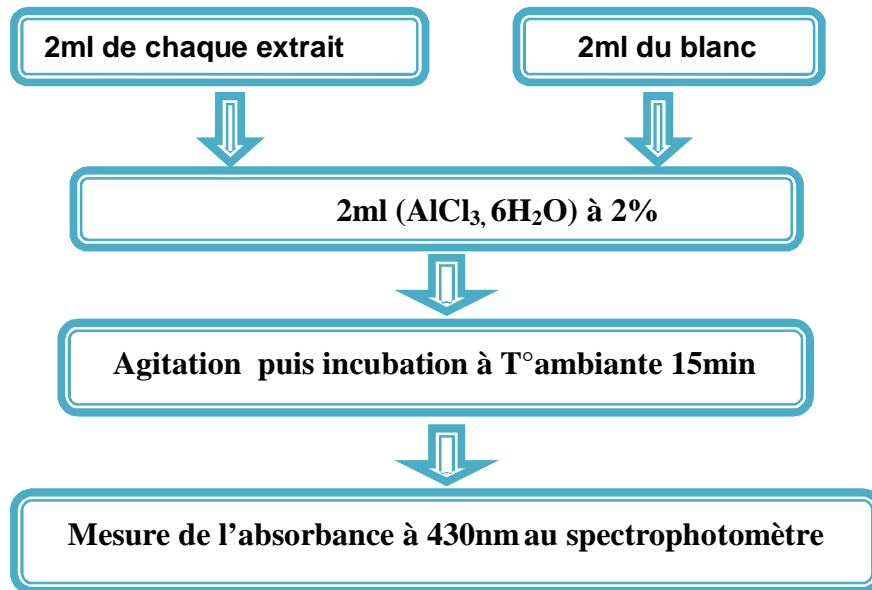
### III.2.Dosage des flavonoïdes

Le contenu en flavonoïdes des différents extraits est estimé par la méthode de **Lamaison et carnet. , (1990)** cité par **Bahri-Sahloul (2009)**.

Cette méthode spectrophotométrique est basée sur la capacité des flavonoïdes à se complexer avec le chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) (Figure14). Il résulte de cette réaction une coloration jaunâtre qui a un maximum d'absorption à 430nm.



**Figure14** : Réaction du Chlorure d'Aluminium avec les flavonoïdes (**Ribéreau- Gayon, 1968**).

**Mode opératoire**

**Figure15:** Protocole de dosage des Flavonoïdes Lamaison et carnet, (1990) cité par Bahri-Sahloul (2009).

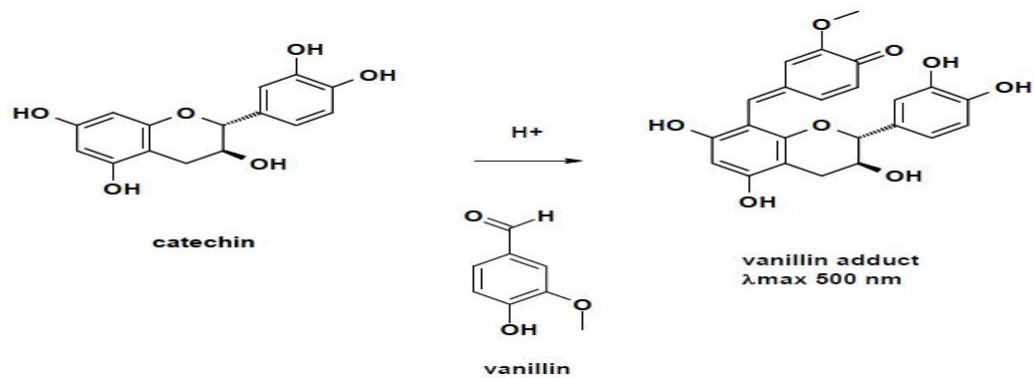
La teneur en flavonoïdes est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage obtenu avec de la Quercetine utilisée comme standard (annexe2). Les résultats sont exprimés en mg équivalent de Quercetine par g de matière sèche (mgEqQ /gMS).

**III.3. Dosage des tanins condensés :**

**Le dosage des tanins est fait par la méthode à la vanilline décrite par Desphande et al, 1986.**

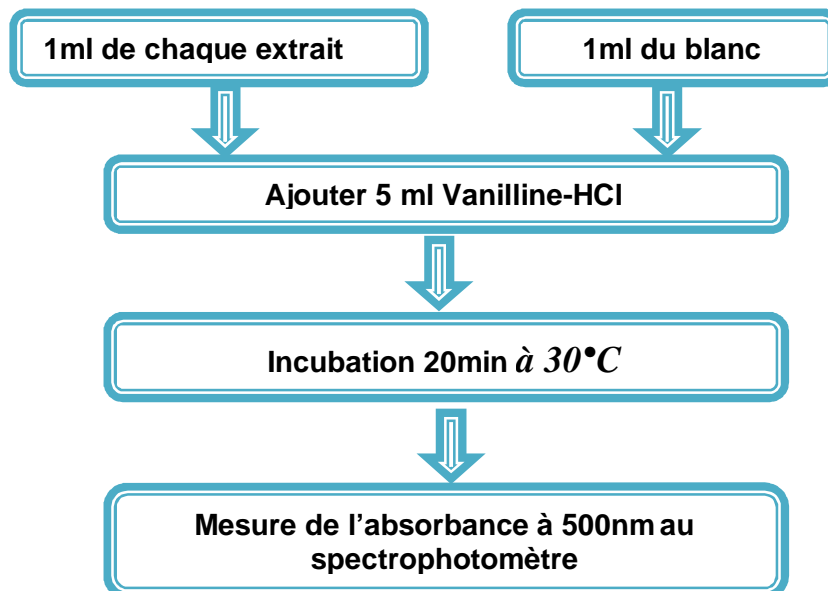
**Principe :**

Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés dans un milieu acide pour produire un complexe rouge (figure16) mesuré à 500 nm (Hagerman, 2002).



**Figure16** : Réaction de la vanilline avec la catéchine (Hegerman, 2002).

### Mode opératoire



**Figure17**: Protocole de dosage des Tanins condensés (Desphande et al., 1986).

La teneur en tanins condensés est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec de la Catéchine utilisée comme standard (annexe2). Les résultats sont exprimés en mg équivalent Catéchine par gramme de matière sèche (mg EqCat/g MS).

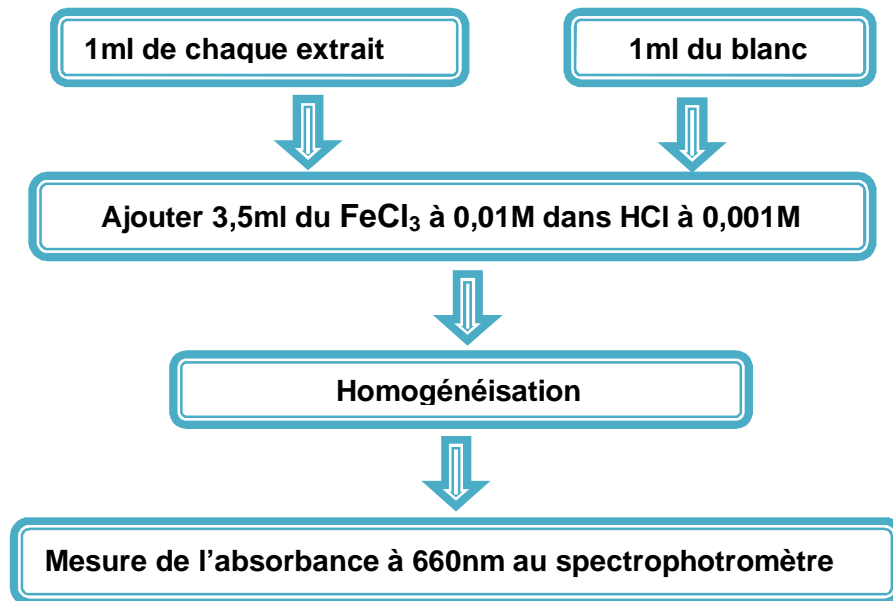
### III.4.Dosage des tanins hydrolysables :

Le dosage des tanins hydrolysables est fait par la méthode au chlorure ferrique cité par Mole et Waterman, (1987).

## Principe

Les tanins hydrolysables réagissent avec le chlorure ferrique et donne une coloration bleue mesurée par spectrophotomètre (Mamadou, 2002)

- **Mode opératoire**



**Figure18:** Protocole de dosage des tanins hydrolysables Mole et Waterman, (1987).

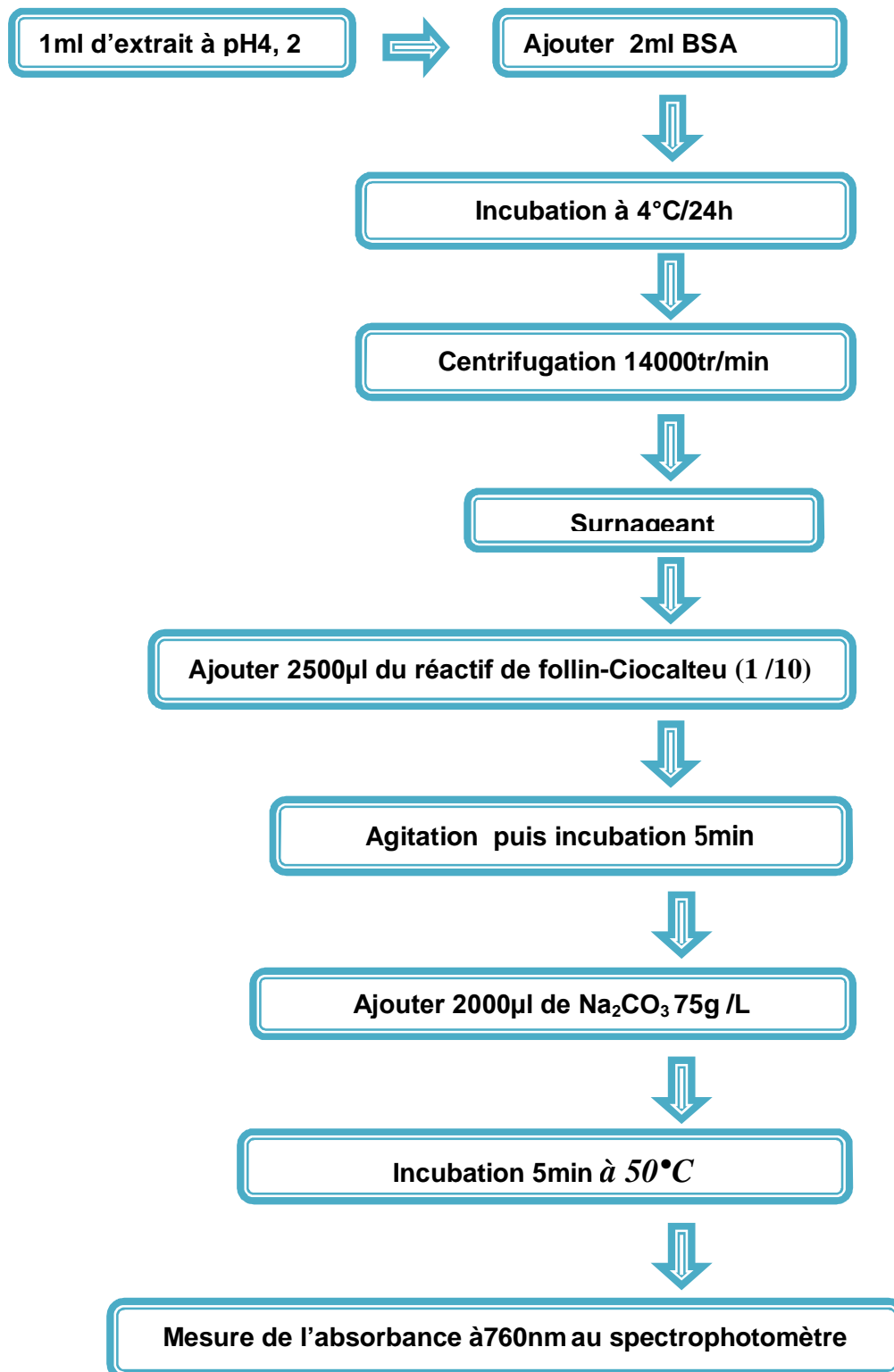
La teneur en tanins hydrolysables est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec de l'acide tannique (annexe2). Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide tannique /g de matière sèche (mg EqAT/g MS).

### III.5.Dosage des phénols polymérisés par la méthode de précipitation par Sérum Albumine Bovine(BSA) :

#### Principe

Le dosage des tannins est basé sur l'aptitude de ces derniers à précipiter les protéines, elle s'effectue suivant la méthode préconisée par **Hagerman et Butler (1978)**, qui repose sur la formation d'un complexe tannins-BSA, les tannins polymérisés sont mesurés par différences de phénols totaux solubles et les phénols simples non attachés à la protéine.

- **Mode opératoire**



**Figure 19:** Protocole de dosage des phénols polymérisés (Desphande et *al.* 1986).

La teneur en tanins précipités par la BSA de l'extrait est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec de l'acide gallique (annexe2). Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EqAG/g MS).

### VI. Activité antibactérienne :

Cette étude consiste à l'évaluation quantitative et qualitative du pouvoir antibactérien des extraits bruts : Méthanoliques, Ethanoliqes et aqueux de *Ceratonia siliqua L.* (gousse, pulpe et graines).

#### VI.1.Souches testées :

L'évaluation de l'activité antibactérienne de nos extraits a été réalisée sur deux souches pathogènes et deux souches phytopatogènes (TableauVII)

**Tableau VII:** Source des différentes souches bactériennes étudiées.

Souches	Référence	Gram	Source
<i>Staphylococcus aureus</i> (pathogène)	ATCC	Positif	Bloc09 (université de Bejaia) labo Microbiologie M <sup>r</sup> TOITI
<i>Escherichia coli</i> (pathogène)	C600NaI	Négatif	Bloc09 (université de Bejaia) labo Microbiologie M <sup>r</sup> TOITI
<i>Pectobacterium carotovorum atrosepticum</i> (Pca) (phytopatogène)	CFBP 8822	Négatif	Bloc de recherche (université de Bejaia) Labo Microbiologie M <sup>me</sup> Zaidi
<i>Pectobacterium carotovorum carotovorum</i> (Pcc) (phytopatogène)	CFBP 8822	Négatif	Bloc de recherche (université de Bejaia) Labo Microbiologie M <sup>me</sup> Zaidi

### VI.2. Milieux de culture

Pour l'entretien des souches et l'étude de la sensibilité bactérienne aux extraits gousse, pulpe et graine de *Ceratonia Siliqua*, le milieu PCA, Chapman, King B et le milieu Mueller-Hinton (MH) ont été utilisés.

### VI.3. Evaluation de l'activité antibactérienne:

L'activité antibactérienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (Muller Hinton) citée par **Celiktas et al. (2007)**.

#### Principe

La méthode repose sur la diffusion de l'extrait à partir des disques imprégnés d'extraits à différentes doses et déposés sur le Milieu solide, préalablementensemencé par inondation avec une suspension bactérienne. L'extrait diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration faisant apparaître une zone claire : plus la zone d'inhibition est grande plus la sensibilité de la souche bactérienne testée vis-à-vis de l'extrait est grande (**Bektas et al, 2003**).

#### Mode opératoire

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à l'étuve à 37°C pour (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) et 27°C pour (*Pca* et *Pcc*) pendant 24 heures afin d'obtenir des cultures jeunes et des colonies isolées .

Les colonies isolées ont servi à préparer l'inoculum (**Moroh et al ., 2008**). Les suspensions bactériennes ont été préparées à partir de pré-cultures de 24 heures ,dans 9 ml d'eau distillée stérile, la DO a été mesurée à 600 nm, puis une série de dilution a été réalisée pour avoir une absorbance de 0,1 correspondant à  $10^6$  UFC/ml pour *S.aureuse* et *E.coli* ,et absorbance de 0,2 correspondant à  $4 \times 10^8$  UFC/ml pour *Pcc* et *Pca* (**V .G. de Billerbeck1 et al.,2002**).

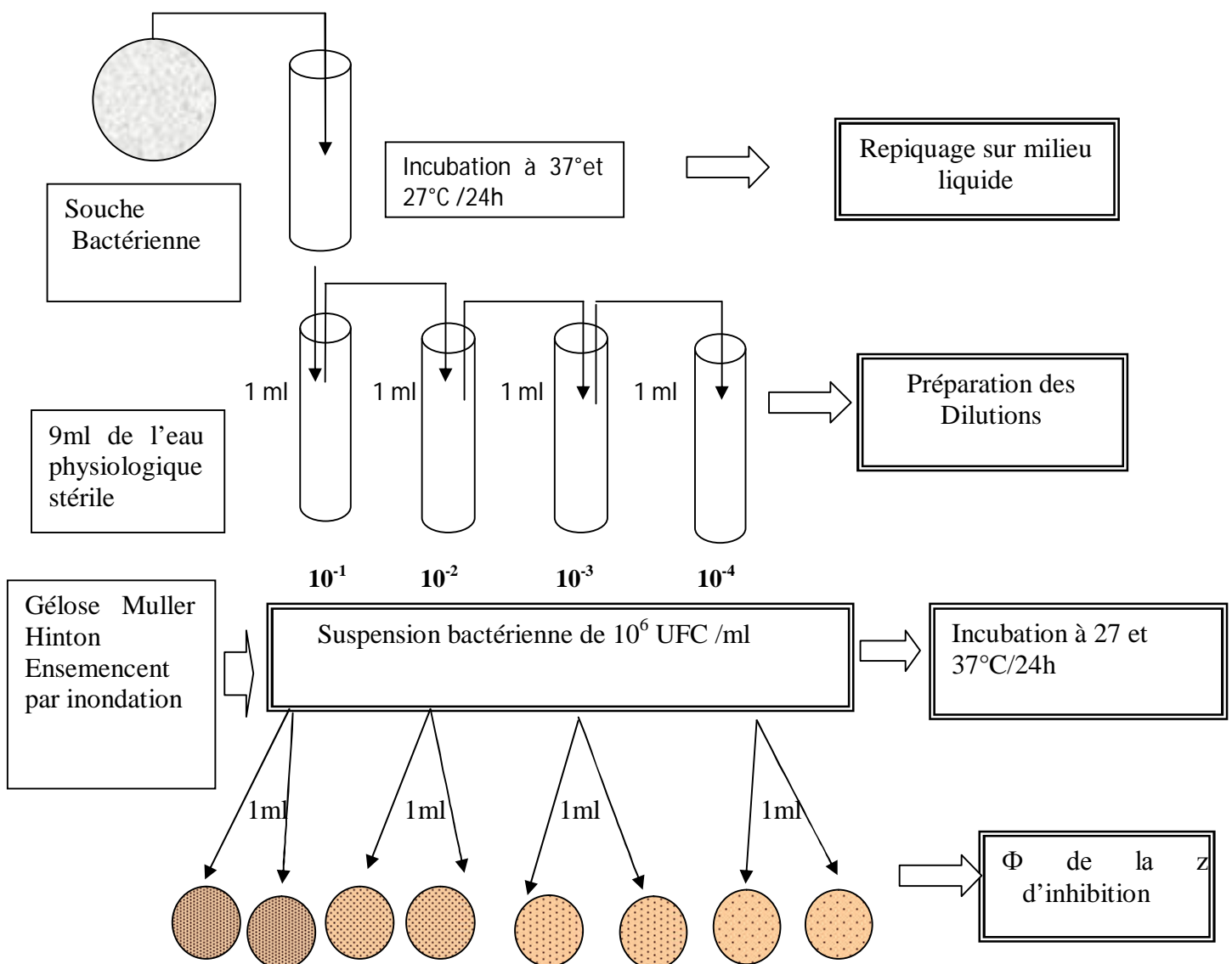
Pour les essais des activités antibactériennes nous avons utilisé la technique de diffusion en milieu gélosé de Muller Hinton en boîte de Pétri (figure 20). Les milieux gélosés ont étéensemencés par inondation de 1ml de la suspension bactérienne et l'excès (est récupéré de manière à n'étaler que 100 µl de la suspension, par boîte).

Les boîtes de Pétri sont ensuite mises à sécher dans les conditions stériles, pendant 15min.

À l'issue de notre expérimentation, nous avons respectivement repris nos extraits méthanolique, éthanolique et aqueux de *Ceratonia Siliqua L* avec 1ml de DMSO à des concentrations de 100 mg /ml; 50mg/ml; 33,33mg/ml.

Les disques stériles sont imprégnés à partir de ces différentes concentrations à raison de 20 µl par disque, puis déposés stérilement sur la surface de la gélose. Les boîtes sont par la suite incubées pendant 24h à 27°C pour (*Pcc et Pca*) et 37°C pour (*S.aureus et E.coli*).

L'activité antimicrobienne a été déterminée en nous basant sur le diamètre des zones d'inhibition mesuré à l'aide d'un pied à coulisse.



**Figure 20** : Aromatogramme en milieu solide



### **VI .4.Détermination de la CMI :**

- **Principe**

Cette étude permet de définir la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes aux substances antimicrobiennes par la mesure de la CMI qui est la plus faible concentration d'extrait inhibant toute la croissance visible à l'œil après un temps d'incubation de 24 heures (Kablan *et al.*, 2008).

#### **Mode opératoire :**

Une suspension bactérienne est préparée par transfert des colonies (à partir d'une culture Jeune), dans 9ml d'eau distillée stérile.

Les boîtes de Pétri coulées par la gélose Muller Hinton sontensemencées par inondation .Une série de concentration allant de 1/2 jusqu'à 1/10 est préparée à partir d'une concentration de 100mg/ml de chaque extrait.

Les disques stériles imprégnés de ces différentes concentrations à raison de 20µl par disque, ont été déposés stérilement sur la surface de la gélose. Les boites ont été incubées pendant 24heures.

La CMI correspond à la concentration de la boite qui représente les plus faibles zones d'inhibition mesurées à l'aide d'un pied à coulisse.

#### **Analyse statistique**

Tous les essais sont menés en triple. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse de la variance (ANOVA) et comparaison des moyennes au moyen du logiciel Statistica.

## I. Résultats et discussion

### II.1. Teneur en composés phénoliques

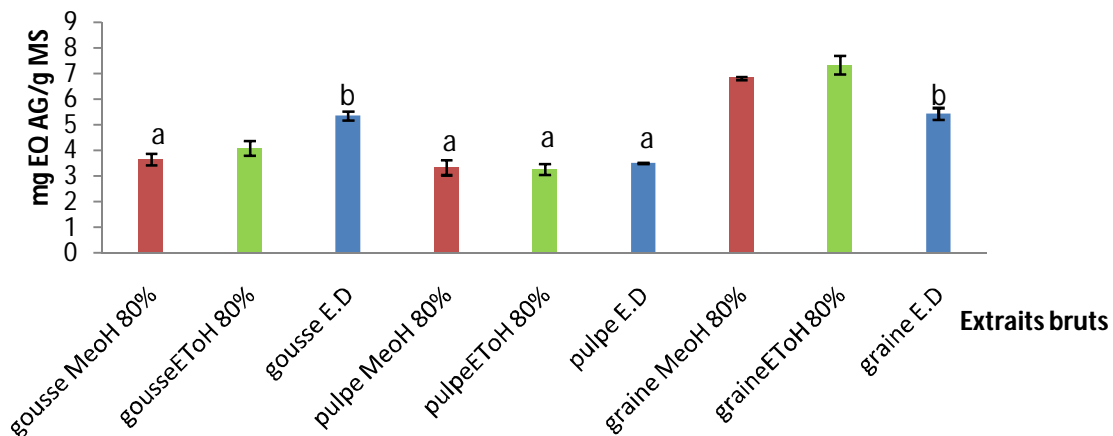
#### II.1.1. Teneur en phénols totaux solubles :

Les résultats de dosage des phénols totaux solubles (**Figure21**) révèlent une variabilité de teneur entre les différents extraits. Le contenu en PTS varie de 3,27 à 7,34 mg Eq AG/ g MS ; L'analyse de la variance de la teneur montre un effet significative ( $p < 0,05$ ) du facteur solvant et une interaction entre les deux facteurs étudiés (partie de la plante et solvant).

La substitution partielle de l'eau distillée par du méthanol ou de l'éthanol s'accompagne d'une diminution significative ( $p < 0,05$ ) de la teneur en PTS de la gousse (37% et 20%) respectivement ; par contre nous notons une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de 25,5 à 34,9% dans le cas de la graine ; La pulpe ne voit pas sa teneur en PTS varier en fonction de solvant ( $p > 0,05$ )

Pour un même solvant, la graine est plus riche en phénols totaux solubles. Les extraits à l'eau distillée de graine et gousse ne présentent pas de différences significatives ( $p < 0,05$ ).

Pour un même solvant hydro-alcoolique, les extraits de graine affichent les teneurs les plus élevées en PTS ( $p < 0,05$ ) ; la gousse et la graine présentent des similitudes de teneur en PTS ( $p > 0,05$ ) lorsque l'eau distillée est utilisée.



**Figure21 : Teneur en phénols totaux solubles.**

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0,05$ )

### II.1.2. Teneur en phénols polymérisés.

L'addition de BSA dans les extraits s'accompagne par l'apparition d'un précipité (tanins – protéine). Le dosage en foline-ciocalteu réalisé sur le surnageant montre une diminution de la teneur en PTS.

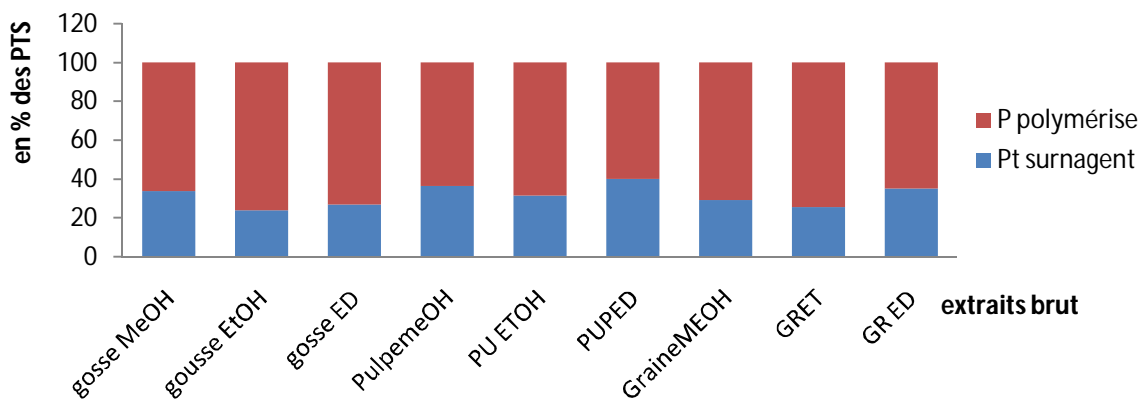
Les teneurs en PTS non liée à la protéine varient d'un échantillon à un autre, en fonction aussi bien de solvant d'extraction que de la partie de fruit considéré (**Figure22**).

La substitution de l'eau distille par de l'alcool diminue les proportions de PTS non liée à la protéine pour la graine et la pulpe ; nous observons une singularité de la gousse : le méthanol augmente cette proportion alors que l'éthanol la diminue.

L'aptitude des PTS à se lier à la protéine concerne 64 à 74% de PTS de la graine contre 60 à 68% pour la pulpe et 67,9 à 75,9% pour la gousse.

Les graines de caroube sont plus riche en phénols polymérisés 3,5 à 4,84 mg E AG. Contre 2,09 à 2,24 pour la pulpe et 2,42 à 3,91 pour la gousse.

On observe que l'utilisation d'un solvant moins polaire indique une diminution de la teneur en phénols polymérisés cette diminution est plus importante lorsque le MeOH80% est utilisé.



**Figure 22 : Aptitude des PTS à se lier ou non aux**

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0,05$ )

### II.1.3. Teneur en flavonoïdes

L'analyse statistique des résultats montre un effet significative de chacun des facteurs testés (partie de plante et solvants).

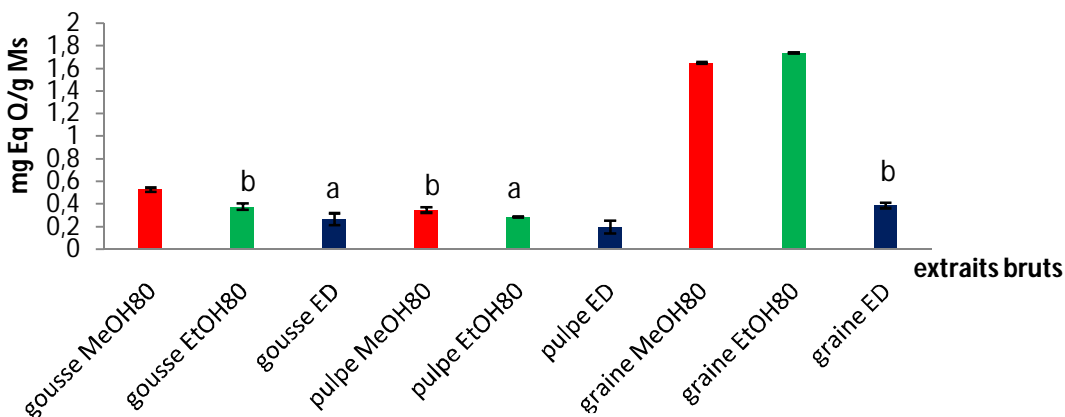
Nos données (**Figure23**) montrent une variabilité de teneur d'un substrat à un autre (0,2 à 1,74 mg Eq Q/g MS).

La substitution de l'eau distillée montre une augmentation de la teneur de 0,27 à 0,53 pour la gousse ; 0,2 à 0,35 pour la pulpe et 0,39 à 1,65 pour la graine.

L'utilisation de méthanol ou de l'éthanol en remplacement partielle de l'eau distillée conduit une augmentation systématique en teneur en flavonoïde.

Cette amélioration peut plus notes pour la graine (323 à 346%) suivie de la gousse (40 à 96%) et de la pulpe (45 à 75%).

Ce sont les extrais de graine obtenue avec un solvant hydro alcoolique, qui affectent le continue le plus élevés ( $p < 0,05$ ) en flavonoïdes (1,65 et 1,74 mg Eq Q/g MS)



**Figure23 : Teneur en flavonoïdes**

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0,05$ )

### I.1.4. Teneur en Tanins hydrolysables

Les données illustrées par la **figure 24** montrent que la graine est plus riche en tanins hydrolysables (9,75 à 15, 87 contre 2,63 à 3,33 pour la pulpe et 3,2 à 3,79 pour la gousse).

L'utilisation de solvants binaire s'accompagne d'une augmentation des teneurs en TH de la graine; cette augmentation est plus marqué en présence de l'EtOH80% (101,74% contre 62,76% pour le méthanol).

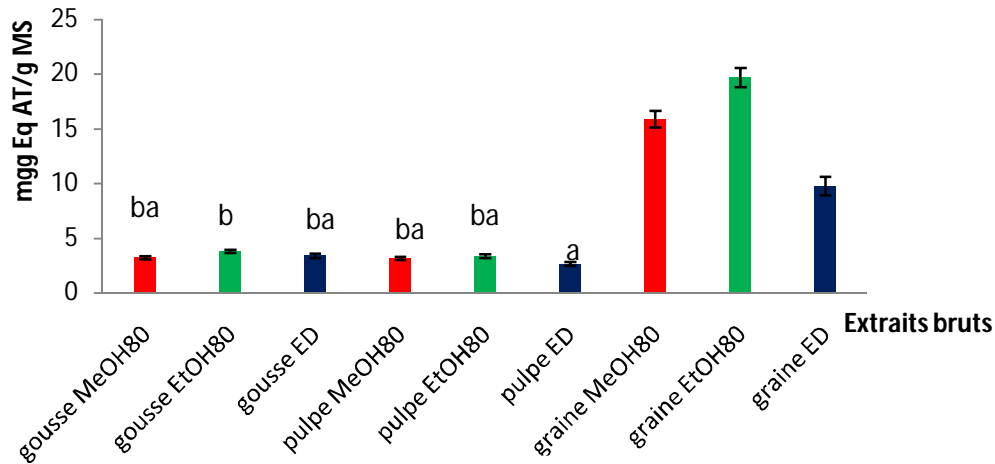


Figure 24 : teneur en tanins hydrolysables.

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0,05$ )

### I.1.5. Teneur en Tanins condensés

Les graines de caroube sont plus riches en tanins condensés que la pulpe et gousse (Figure 25) avec une teneur de 1,69-5,3 contre 0,35-1,22 pour la gousse et 0,37-0,95 pour la pulpe.

Nous observons que l'utilisation d'un solvant moins polaire induit une diminution des teneurs en tanins condensés : 5,2 à 61,25% pour la pulpe ; 21,13 à 68% pour la graine et 23,77 à 71,31% pour la gousse.

Quelle soit le substrat considéré, c'est en présence de méthanol que nous enregistrons la plus forte diminution.

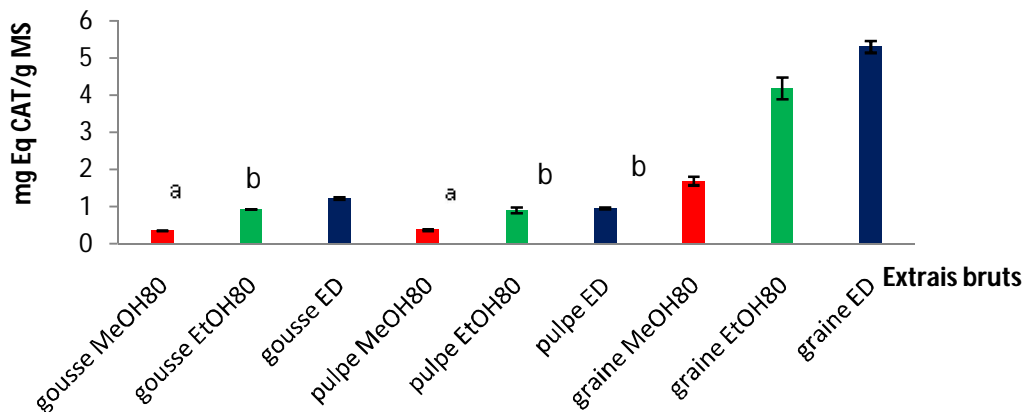


Figure 25 : Teneur en tanins condensés.

**II. Activité antibactérienne des extraits**

Dans nos conditions expérimentales, les différents extraits utilisés à différentes concentrations, se sont avérés actifs contre l'ensemble des souches bactériennes testées (figure26).

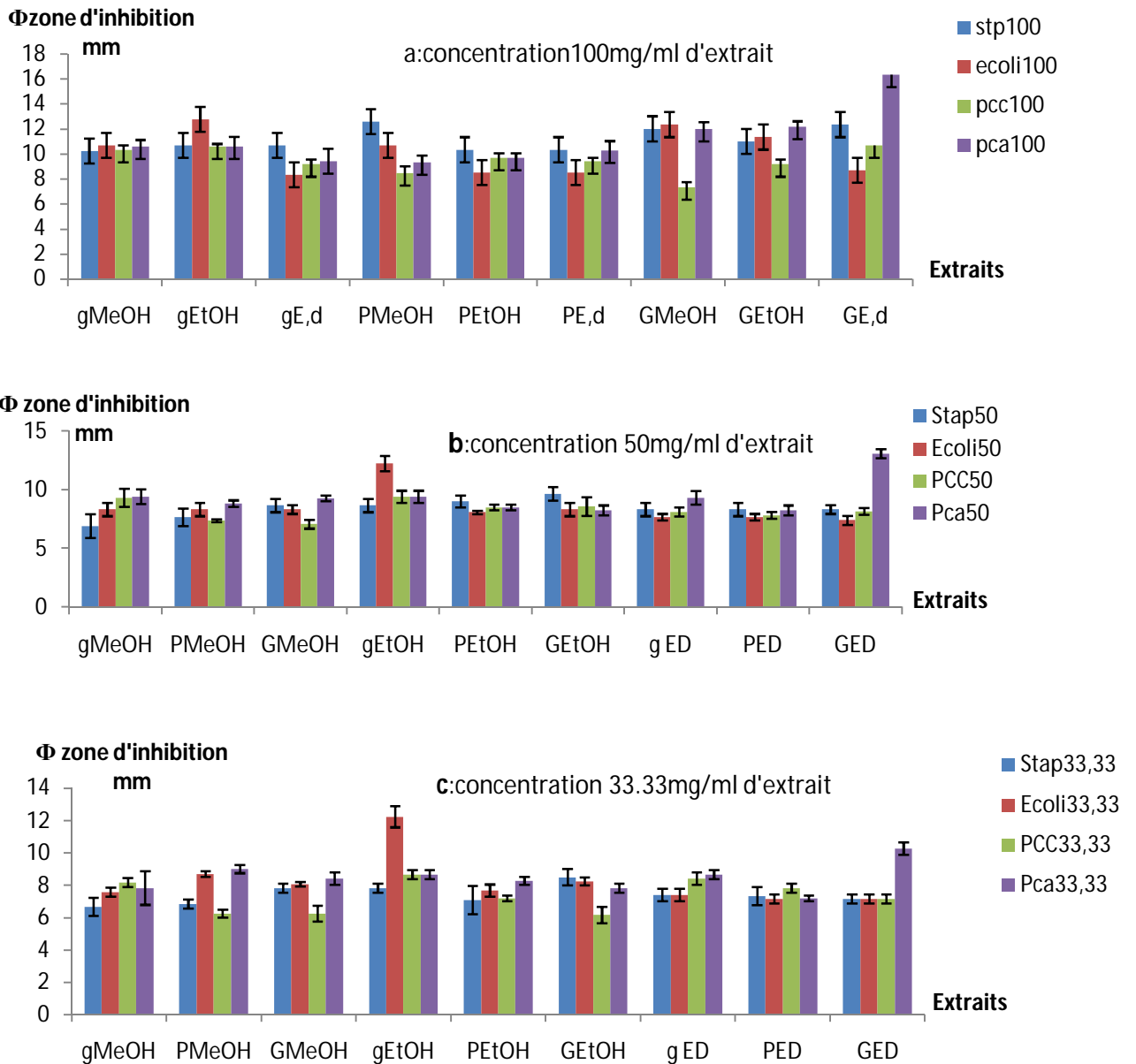


Figure26 : Effets de différentes concentrations d'extraits de Ceratonia siliqua sur les souches bactériennes.

Pour la concentration de 100mg/ml, Les meilleures activités en termes de diamètre de la zone d'inhibition sont obtenues pour la souche *Pca* avec l'extrait aqueux de graine ( $\Phi$  de la zone d'inhibition 16.33mm) suivie d'*E.coli* avec l'extrait éthanolique de gousse ( $\Phi$  de la zone d'inhibition de 12.75mm). Pour la souche *S.aureus*, l'extrait méthanolique de pulpe induit une zone d'inhibition de 12.58mm alors que pour *Pcc*, l'optimum d'inhibition est observé avec l'extrait aqueux de graine (10,67mm).

Pour la concentration de 50mg/ml, Les meilleures activités sont obtenues pour la souche *Pca* avec l'extrait aqueux de graine ( $\Phi$  de la zone d'inhibition 13,08mm) suivie d'*E.coli* avec l'extrait éthanolique de gousse ( $\Phi$  de la zone d'inhibition de 12.25mm).

Pour la souche *S.aureus*, l'extrait éthanolique de graine induit une zone d'inhibition de 9.67mm alors que pour *Pcc*, l'optimum d'inhibition est observé avec l'extrait éthanolique de gousse ( $\Phi$  de la zone d'inhibition 9,41mm).

Pour la concentration de 33,33mg/ml, Les meilleures activités en terme de diamètre de la zone d'inhibition sont obtenues pour la souche *E.coli* avec l'extrait éthanolique de gousse ( $\Phi$  de la zone d'inhibition 12,25mm) suivie de *Pca* avec l'extrait aqueux de graine ( $\Phi$  de la zone d'inhibition de 10,41mm). Pour la souche *S.aureus*, l'extrait éthanolique de graine induit une zone d'inhibition de 8,5mm alors que pour *Pcc*, l'optimum d'inhibition est observé avec l'extrait éthanolique de gousse ( $\Phi$  de la zone d'inhibition de 8,67mm).

Le classement des quatre souches testées, sur la base de leur sensibilité aux différents extraits, change en fonction des facteurs mis en jeu dans notre expérimentation. Il s'établit comme suit :

### **Pour la concentration de 100mg/ml :**

*Pca* (16,33 mm avec l'extrait aqueux de graine) > *E.coli* (12,75mm avec l'extrait éthanolique de gousse) > *S.aureus* (12.58 mm avec l'extrait méthanolique de pulpe) > *Pcc* (10.67 mm avec l'extrait aqueux de graine).

### **Pour la concentration de 50 mg/ml :**

*Pca* (13.08mm avec l'extrait aqueux de la graine) > *E.coli* (12.25mm avec l'extrait éthanolique de gousse) > *S.aureus* (9.67mm avec l'extrait éthanolique de graine) > *Pcc* (9.41 de mm avec l'extrait éthanolique de gousse).

### Pour la concentration de 33.33 mg/ml :

E.coli (12.25mm avec l'extrait éthanolique de gousse)> Pca (10.41 avec l'extrait aqueux de graine)> Pcc(8.67mm avec l'extrait éthanolique de gousse)> S.aureus (8.5 avec l'extrait éthanolique de graine).

L'analyse de la variance (**Tableau VIII**) montre que chacun des quatre facteurs exerce un effet significatif ( $p < 0,05$ ) sur le comportement des souches bactériennes utilisées. De même nous enregistrons des interactions significatives ( $p < 0,05$ ) entre ces différents facteurs.

**Tableau VIII : Effets des différents extraits : Analyse de la variance.**

Univariate Tests of Significance for DIAMETRE (new.sta)					
Suite...					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	26213,23	1	26213,23	81664,60	0,000000
{1}PARTIE	38,47	2	19,24	59,93	0,000000
{2}SOLVANT	14,24	2	7,12	22,18	,000000
{3}CONCENTR	389,03	2	194,51	605,99	0,000000
{4}BACTERIE	76,47	3	25,49	79,41	0,000000
PARTIE*SOLVANT	56,22	4	14,06	43,79	0,000000
PARTIE*CONCENTR	21,84	4	5,46	17,01	,000000
SOLVANT*CONCENTR	6,80	4	1,70	5,30	,000435
PARTIE*BACTERIE	82,04	6	13,67	42,60	0,000000
SOLVANT*BACTERIE	75,65	6	12,61	39,28	0,000000
CONCENTR*BACTERIE	31,50	6	5,25	16,36	,000000
PARTIE*SOLVANT*CONCENTR	6,70	8	,84	2,61	,009583
PARTIE*SOLVANT*BACTERIE	107,62	12	8,97	27,94	0,000000
PARTIE*CONCENTR*BACTERIE	21,98	12	1,83	5,71	,000000
SOLVANT*CONCENTR*BACTERIE	25,30	12	2,11	6,57	,000000
1*2*3*4	24,30	24	1,01	3,15	,000004
Error	69,33	216	,32		

Les effets de chacun des facteurs (partie du fruit ; solvant d'extraction ; concentration d'extrait et souche bactérienne) et des interactions entre eux sont illustrés par les figures (annexe 4).

Les différentes mesures réalisées et rapportées par les figures **27, 28, 29 et 30** montrent des différences de comportement des différentes souches bactériennes. Elles se distinguent par des différences d'amplitudes de l'augmentation du diamètre de la zone d'inhibition (Tableaux ). Deux à trois phases peuvent être relevées en fonction de la diminution de la viabilité des souches bactériennes.



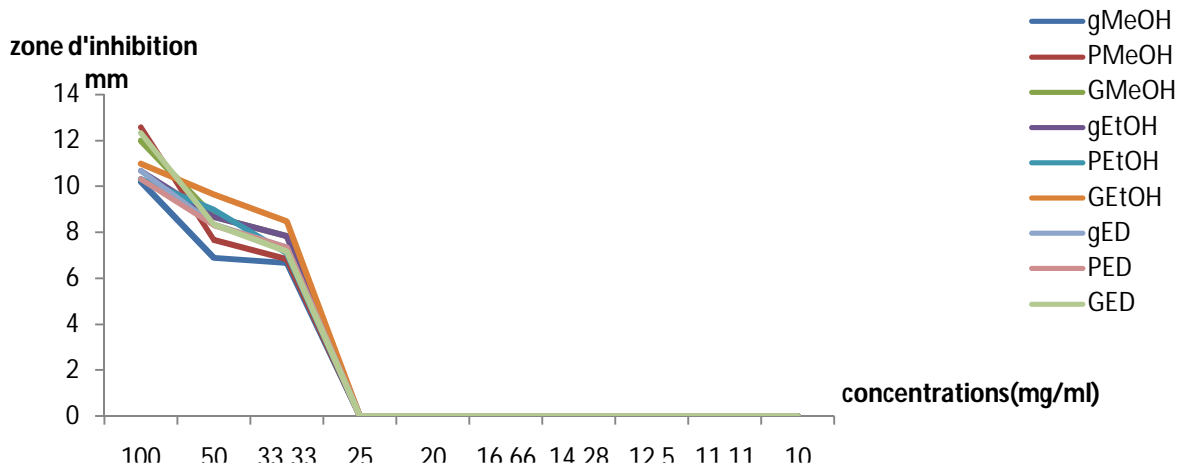


Figure27 : Comportement de la souche *S.aureus* à différentes concentrations d'extraits

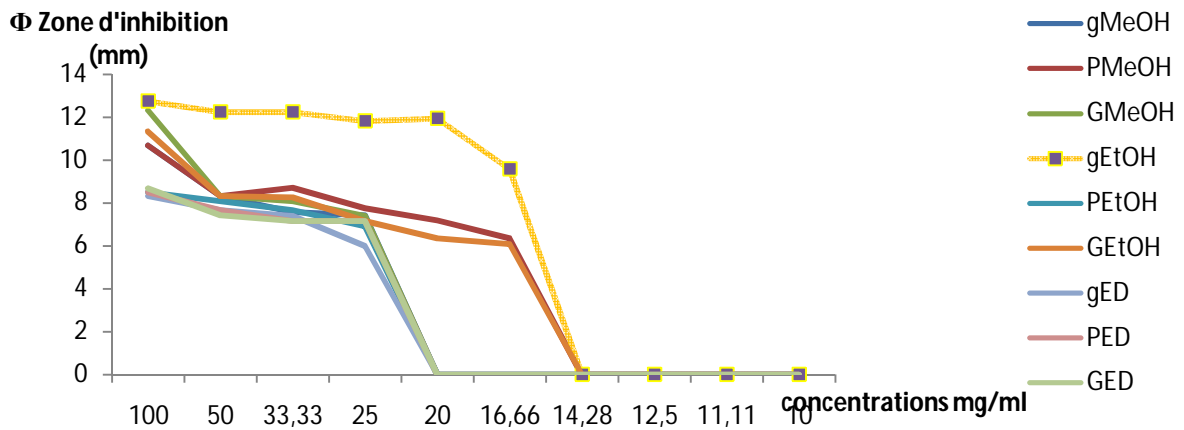


Figure28 : Comportement de la souche *E.coli* à différentes concentrations d'extraits

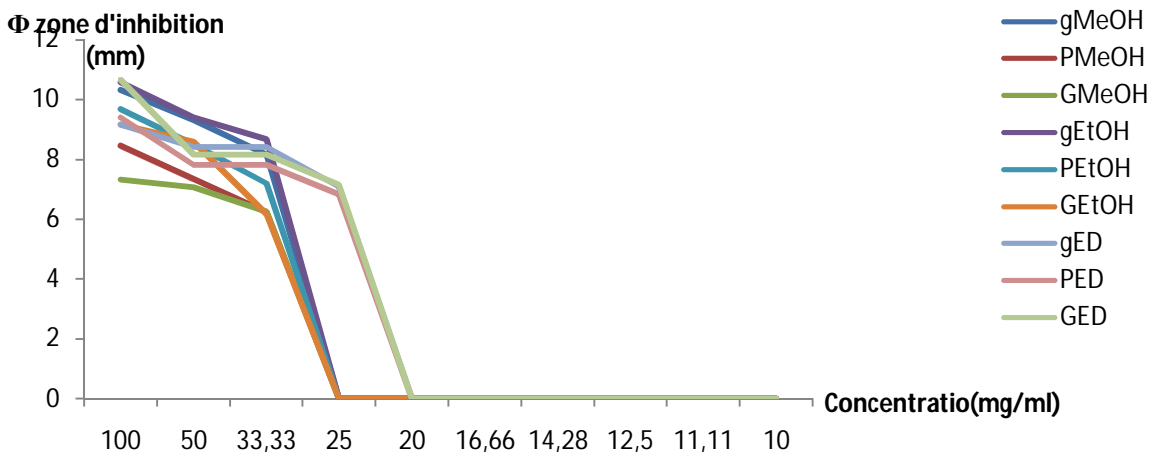
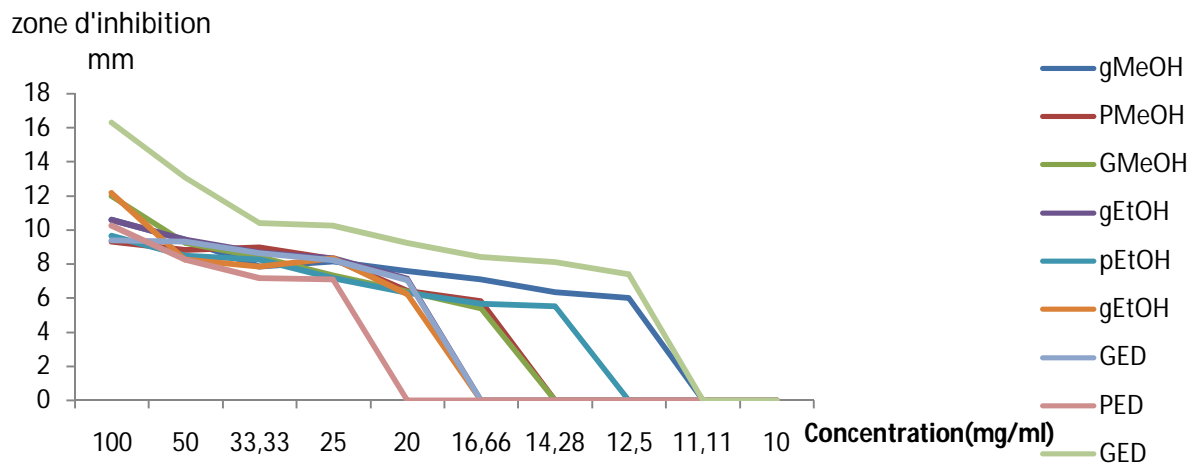


Figure29 : Comportement de la souche *Pcc* à différentes concentrations d'extraits



**Figure30 : Comportement de la souche *Pca* à différentes concentrations d'extraits**

**Tableau IX : pourcentage d'augmentation des diamètres des zones d'inhibitions de la concentration 33,33 à 50 mg/ml**

	g MeOH	PMeOH	GMeOH	gEtOH	PEtOH	GEtOH	gED	pED	GED
<b>S.aureus</b>	03,59 8	12,298	10,727	10,727	27,118	13,764	13,642	13,642	16,340
<b>E.coli</b>	09,89 4	95,8573	03,094	00	05,345	00,969	03,508	07,122	03,491
<b>Pcc</b>	14,33 8	17,76	13,28	08,535	18,219	39,285	00	00	00
<b>Pca</b>	20,17	98,111	10,22	08,66	02,78	05,363	07,612	14,742	25,648

**Tableau X : pourcentage d'augmentation des diamètres des zones d'inhibitions de la concentration 50 à 100 mg/ml**

	gMeOH	PMeOH	GMeOH	gEtOH	PEtOH	GEtOH	gED	PED	GED
S.aureus	47,901	64,015	38,408	23,068	14,777	13,753	28,091	24,009	24,009
E.coli	28,091	28,091	48,019	04,081	05,198	36,014	08,604	10,821	17,004
Pcc	10,7	115,0	103,5	12,433	13,764	06,759	08,917	20,178	15,318
Pca	12,4	105,6	129,4	12,43	113,64	47,39	00,85	14,0606	24,847095

**Tableau XI : pourcentage d'augmentation des diamètres des zones d'inhibitions de la concentration 33,33 à 100 mg/ml d'extrait**

	gMeOH	PMeOH	GMeOH	gEtOH	PEtOH	GEtOH	gED	PED	GED
Stap	53,223	84,187	53,256	36,270	45,903	29,411	45,566	40,927	44,273
E.coli	40,765	22,784	52,599	04,081	10,821	37,333	12,415	18,715	21,089
Pcc	26,593	35,52	17,28	22,029	34,492	48,701	08,917	20,178	15,318
Pca	35,12	03,66	42,68	22,17	16,80	55,30	08,535	30,876	56,8683

**Tableau XII : pourcentage d'augmentation des diamètres des zones d'inhibitions de la concentration 20 à 25mg/ml d'extrait**

	gMeOH	PMeOH	GMeOH	gEtOH	PEtOH	GEtOH	gED	PED	GED
S.aureus	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E. coli	0	07,78	0	00,76	0	12,57	0	0	0
Pcc	07,65	28,88	14,35	16,83	13,58	33,49	16,52		
Pca	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tableau XIII : pourcentage d'augmentation des diamètres des zones d'inhibitions de la concentration de 16,66 à 20mg/ml d'extrait**

	gMeOH	PMeOH	GMeOH	gEtOH	PEtOH	GEtOH	gED	PED	GED
<i>S.aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	86,163522	0	66,388309	0	0	0	0	0	0
Pcc	00,706215	08,576329	15,341959	0	0	0	0	0	64,0995261
Pca	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tableau XIV : pourcentage d'augmentation des diamètres des zones d'inhibitions de la concentration 14,28 à 16,66 mg/ml d'extrait**

	gMeOH	PMeOH	GMeOH	gEtOH	PEtOH	GEtOH	gED	PED	GED
<i>S.aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pcc</i>	11,84	0	0	0	03,07	0	0	0	04,06
<i>Pca</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### III. Concentration minimale inhibitrice CMI

Les valeurs de la CMI (**tableau VIII**) traduisent des différences de sensibilité de chacune des quatre souches bactériennes utilisées.

*S.aureus* affiche la plus grande résistance à chacun des neuf extraits testés. La valeur de la CMI s'établit à 25mg/ml d'extrait.

Le comportement de cette souche s'apparente à celui relevé pour *Pcc*. Le seuil de sensibilité de cette dernière s'établit à 25mg/ml pour les extraits hydro alcooliques contre 20mg/ml pour les extraits aqueux.

Les souches *Ecoli* et *Pca* manifestent une plus grande sensibilité aux extraits testés.

Nos données montrent que pour *E.coli* les valeurs de CMI s'établissent à 14.28 mg/ml pour les extraits ethanologiques de gousse et graine et methanoliques de pulpe contre 20 mg/ml pour les extraits aqueux.

*Pca* affiche la plus grande sensibilité aux extraits testés et les extraits testés se distinguent par une grande variabilité de la valeur de CMI (11.11 à 16.66 mg/ml).

La plus faible CMI (11.11 mg/ml) est relevée pour les extraits methanoliques de gousse et aqueux de graine suivis des extraits methanoliques de pulpe et graine et l'extrait ethanologique de pulpe (14.28 mg/ml).

**Tableau XV:** CMI des extraits vis-à-vis des souches testées.

	Extrait	B1			B2			B3			B4		
		S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3
CMI (mg/ml)	g	25	25	25	20	14,28	20	25	25	20	11,11	16,66	16,66
	P	25	25	25	14,28	20	20	25	25	20	14,28	14,28	20
	G	25	25	25	20	14,28	20	25	25	20	14,28	16,66	11,11

**g:** gousse

**P :** pulpe

**G :** graine

**S1:** Ethanol

**S2:** Méthanol

**S3:** Eau distillée

**B1:** *S.aureus*

**B2:** *E.coli*

**B3:** Pcc

**B4:** Pca

## IV. Discussion général

### IV .1 Dosage des composés phénoliques

Nos données analytiques ont montré la présence de diverses classes de composés Phénoliques (phénols totaux solubles, flavonoïdes, tanins hydrolysables, tanins condensés,...) Dans chacun des trois substrats de caroube et s'accordent avec les données de la littérature (**Vercauteren, 1996 ; Lugasi *et al.* ,2003; Rahman *et al.*, 2006), (Owen *et al.*, 2003), (Macheix *et al.* , 2006).**

La comparaison de nos résultats avec ceux rapportés par la littérature est difficile en raison, non seulement de la localisation des matières premières (altitude et type de sol) et le management des cultures (**Elias, 1979**), mais également des différences dans les méthodes d'extraction, de dosage et d'expression des résultats (**Garcia *et al.* , 1985; Ramirez, 1988 ; Clifford *et al.*,1991**).

L'extraction a pour but de faire diffuser les composés phénoliques présents dans cette matière végétale dans la phase liquide (**Escribano Baillon-Buelga, 2003**). En accord avec de nombreux auteurs travaillant sur différents substrats (**Mokhtarpour *et al.*, 2014 ; Dragovic-Uzelac *et al.*, 2012 ; Durling *et al.*, 2007 ; Turkmen *et al.* , 2006** ), nous avons relevé des différences de teneurs en fonction aussi bien du substrat que du solvant. Nos données traduiraient des différences aussi bien de nature que de solubilité des composés dosés.

### IV.2.Evaluation de l'activité antibactérienne :

Nos avons mis en évidence un pouvoir inhibiteur de chacun des extraits testés, le comportement des différentes souches étudiées varie selon la partie de la plante, le solvant utilisé et la concentration d'extrait, d'autres part les quatre souches réagissent différemment.

De telles observations sont rapportées par différents auteurs qui ont travaillé sur diverses souches bactériennes en présence de divers extraits de plantes (**Pareima, 2007 ; Zaidi *et al.* , 2007**).

La sensibilité d'*E. Coli* et *S. aureus* aux extraits de *Ceratonia siliqua L.* est en accord avec les données bibliographiques. En effet les extraits méthanoliques de *Ceratonia siliqua L.*

présentent une forte activité vis-à-vis de cette espèce (**Bejan et Tuba, 2002; Ben hsouna et al., 2011 ; Ibrahim et al, 2013**).

Cependant, plusieurs études ont montré que cette espèce peut également s'avérer très résistante à beaucoup d'extraits de plantes (**Tepe et al. , 2005; Zaid et Crow, 2005**). Ainsi selon **Uzun et al. (2004)**, 24 extraits éthanoliques de plantes médicinales se sont avérés non actifs vis à vis d'*E. Coli*. **Adamu et al. (2005)** ont montré également que l'extrait aqueux de *Pistacia lentiscus* L. Est plus actif contre *E. Coli* que l'extrait aqueux de *Selerocdrya birraca* L.

Les effets antimicrobiens d'extraits de plantes ont été rapportés par de nombreux auteurs. Il a été montré que l'activité antibactérienne des extraits de plantes est attribuée à leur composés phénoliques (**Van Der-Watti et Pretorius, 2001; Panizzi et al., 2002**). les extraits phénoliques de *Robus ulmifolius* L. et de *Satureja hortensis* L. ont montré une activité antimicrobienne à l'égard d'une large gamme de pathogènes tels que *Pseudomonas aerogenosa*, *P .carotovorum* et *Erwinia amylovora* (**Panizzi et al. ,2002; Sahin et al. , 2003**).

Le mécanisme par lequel les composés phénoliques inhibent les enzymes peut être expliqué par un changement de la structure de l'enzyme et ou une diminution de la disponibilité des substrats au niveau des sites actifs de l'enzyme (**Leinmiller et al. ,1991**). La synthèse de la paroi cellulaire est inhibée par la pénétration des tanins condensés à l'intérieur de la cellule bactérienne qui provoque des réactions avec un ou plusieurs composants intracellulaires (**Jones et al. , 1994**).

Chez les bactéries Gram négatives, la membrane externe constitue une barrière de perméabilité efficace; le LPS, grâce à ses charges négatives de surface, empêche la diffusion des molécules hydrophiles, et les porines excluent le passage des molécules hydrophobes de poids moléculaire élevés ( **Nikiado, 2003**). Les bactéries Gram positives sont moins protégées contre les agents antimicrobiens, le peptidoglycane n'entrave que la diffusion des molécules de poids moléculaire supérieur à 50000 Da (**Hogar et Kolter, 2003**).

Les résultats obtenus dans l'évaluation de l'activité antibactérienne montre que l'effet de *Ceratonia siliqua L.* sur la souche *Pca* est plus inhibiteur par rapport à celle de *Pcc*.

Nos résultats sont en accord avec les travaux ayant mis en évidence la sensibilité de *Pcc* aux extraits de plantes. **Lagha (2007)** a montré son inhibition par les extraits acétoniques et méthanoliques de *Pistacia lentiscus L.* (feuilles) et *Olea europaea L.* (feuilles et grignon). Et en accord avec les travaux obtenus par (**Amari, 2011**) qui a mis en évidence la sensibilité de *Pca* aux extraits de plante de *Ceratonia siliqua L.* et *Olea europaea*.



# Conclusion

### Conclusion

Nos données analytiques ont montré que la caroube est un fruit riche en divers composés phénoliques. Ces derniers sont inégalement répartis entre les différentes parties du fruit. La graine représente la partie la plus riche en ces métabolites secondaires.

L'effet antibactérien des extraits méthanoliques, ethanoliques et aqueux de *Ceratonia siliqua* L (gousse, pulpe et graine) a été testé *in vitro* sur deux souches pathogènes (*S. aureus* et *E. coli*) et deux souches phytopathogènes (*Pca* et *Pcc*). Les différents résultats enregistrés dans cette étude ont montré une sensibilité variable de ces quatre agents vis-à-vis extraits testés.

L'évaluation qualitative de l'effet antibactérien montre que tous les extraits hydro alcooliques et aqueux sont actifs sur toutes les souches bactériennes étudiées. Des zones d'inhibition de diamètres variables ont été observées à au moins une des concentrations testées.

En comparant la sensibilité des agents phytopathogènes et pathogènes étudiés (en termes de nombre de doses et d'extraits actifs), *Pca* a été l'espèce la plus sensible par rapport à *Pcc* et *S.aureus* et moins sensible par rapport à *E.coli*.

L'évaluation quantitative de l'activité antibactérienne des extraits, par la détermination de la CMI, a confirmé les résultats de l'évaluation qualitative. L'étude a montré d'une part que les extraits aqueux sont plus actifs que les extraits hydro alcooliques.

Les résultats de la présente étude méritent d'être affinés, il serait intéressant de :

- Tester l'activité de nos extraits sur d'autres espèces bactériennes pathogènes telles que : *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*,... etc.
- Purifier et identifier les principes actifs responsables de cette activité et de tester leur activité et toxicité *in vivo*, dans le but de mettre en place des traitements naturels de maladies infectieuses et phytopathogènes mieux tolérés et moins onéreux.

# Références bibliographiques

**A**

**Adamu H. M., Abayeha O. J., Aghoa M. O., Abdullahi A.I., Ubac A.,Dukkuc, H.U. et Wufema B.M. 2005.** An ethnobotanical survey of Bouchi State Herbal plants and their antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 99: 1-4.

**Amari S. (2012).** Fraction des extraits d'*Olea europaea L* et *Ceratonia siliqua L* par CCM et essais sur *Pectobacterium atrosepticum* .Memoire de magister .Université de Bejaia .

**B**

**Bae H. D., Til A. Mc Allister, Jay Yank, Cheng, and Muir A.D. (1993).** Effects of Condensed Tannins on Endoglucanase Activity and Filter Paper Digestion by *Fibrobacter succinogenes*. *Applied and environmental microbiology*, p. 2132-2138. 30.

**Bahri-Sahloul R., Ammar S., Fredj R. B., Saguem S., Grec S., Trotin F., et SKhiri F.H. 2009.**Poly phénol contents and antioxidant activities of extracts from flowers of two *crataegus azarolus L* . *Varieties Pakistan journal of Biological Sciences* 12 :660-668.

**Bahorun T. (1997).** Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research Council. Thèse de Doctorat de l'université de l'Ile Maurice. pp: 83-94

**Balasundrum N., Sundrum K. et Samman S. 2006.** Phenolic compounds in plants and agindustrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99 (1): 191-203.

**Bijan K, Tuba M.2002).** Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Ceratonia siliqua L*. Extracts. *Turk J Biol*; 26: 197-200.

**Bektas M.,Malak A. T.,Yumer A.S.,Korkmaz M. et Ozkan A.(2003).** Turkish University Students' Nutritional Habits Regarding Cancer Prevention and Healthy Lifestyles. *Asian Pacific Journal of Preventio*. Vol 11.

**Ben Hsouna A, Trigui M, Ben Mansour R, Jarraya RM, Damak M, Jaoua S.(2011).** Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat. *Int J Food Microbiol* ; 148: 66-72.

**Bezanger-Beauquesne L., M. Pinkas., M. Torck et F. Trotin. (1990).** Plantes médicinales des régions tempérées. 2<sup>ème</sup> édition. Maloine. Paris. pp:183-184.

**Bin Shan, Yi-Zhong Cai, Brooks, Harold Corke, 2007.** The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, p.2-7.

**Bonjar S.G.H. 2004 b.** Antibacterial screening of plants used in Iranian folkloric medicine. *Fitoterapia*, 75: 231-235.

**Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H., Marzouk B. 2008.** Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa L.* shoots and roots. *Comptes Rendus Biologies* 331:48-55.

**Bratt K. (2000).** Secondary plant metabolites as defence against herbivores and oxidative stress. Synthesis, isolation and biological evaluation. *Acta Univ. Ups, comprehensive summaries of Uppsala Dissertations from the faculty of Science and Technology*.

Doctoral thesis.

**Bruneton J. 1999.** Pharmacognosie phytochimie: plantes médicinales. Ed. Lavoisier: 76.

**Bruneton J. (2001).** Plantes toxiques. *Tec et Doc.* (Paris, France). p : 551.

### C

**Carr A.C., et Frei B. 1999.** Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *American Journal for Clinical Nutrition*. 69 :1086-1107.

**Carsson C.F et Riley T.V, 1995.** Antimicrobial of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of applied bacteriology* vol 78,787-789.

**Celiktas O .Y.,Hames Kocabas E.E., Bedir E., Vardar Sukan F.,Ozek T.et Baser K.H. (2007).**Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis* ,depending on location seasonal variations .Food Chem .100 :553-559.

**Chira K., J-H.Suh. C.Saucier et P.L Teissedre (2008).** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*. **6**: 75–82.

**Clifford ,M.,Colmenares,N.,Ramirez-Martinez,J.,Adams,M.,M.,de Meneses,H.,1991.** Effect of different chemecal treatements on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp.Animal Feed Science and Technology 99:195-204.

**Cowan, M. M., (1999).** Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol 12 N°4: 564-571.

**Cushnie. T.P. T, Andrew J. Lamb (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26, 343–356.

**Cremer A et Gaudin O., 1995.**Cite par Lemette J.F,Freney J,Revordy ME,1995 anticipation et désinfection Ed E.S.K.

## D

**Desphande S., Cheryan M. et Salunkhe D.K. 1986.**Tannins analysis of food products. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 24: 401-449

**Dewick PM.(1995).** The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat. Prod. Rev.* 12 :579-607

**Dragović-Uzelac V.,Garfulić I.E., Jukić M.,Penić M.,et Dent M.2012.**The Influence of Microwave Assisted Extraction on the Isolation of Sage(*Salvia officinalis* L.) polyphenols.*Food Technology and Biotechnology*.50(3)377-383.

**Durling E.N.,Owen J.C.,Johh B .G.,Rosmary F.W.,Kevin A.,Yeap L.F.,et Nigel B.P.2007.**Extraction of phenolic and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixture.*Food Chemistry*.101:1417-1424.

**E**

**Edeas M. (2007).** Phamacognosie : Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phétothérapie*. 5, 264-270.

**Elias, L., 1979.** Effect of different Chemecal treatements on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. *Animal Feed Science and Technology* 99:195-204.

**Erlund I. (2002).** Chemical analyses and pharmacokinetics of flavonoids quercetin, hespertin and naringenin in humans. Department of health and functional capacity, national public hearth institute, University of Helsinki (Finlande). Pp1-92.

**Escribano-Bailon M T., et Santos-Buegla C.2003.** Polyphénol extraction from foods. In : "method in polyphénols analysis". Royal Society of Chemistry.-1-16.

**F**

**Ferguson L. R. (2001).** Role of polyphenols in genomic stability. *Mutation research*. **475:** 89-111.

**Fleeger JL, Flipse IJ (1964).** Metabolism of bovine semen XIII. Malonic acid metabolism by bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, 47 (5): 535-8.

**Freudenberg K. 1920.** Mourir le der de Chemie natuürlichen Gerbstoffe. Springer Verlag, Berlin.19-35.

**Frutos. P, Raso. M , Gonzalo Helves, A-R. Mantecon, Perez.V, F. Giraldez. J (2004) .** Is there any detrimental effect when a chestnut hydrolysable tannin extract is included in the diet of finishing lambs, *Anim. Ares*, 53 127–136.

**J**

**Jenfiles J, Purtion N, Andrien F, 1991.** Effet des huiles essential extrait de differentes especes végetal revue de l'agri. *Landbouwidschrift*, vol 41,1106-1019.

**Jurd L., King A. D., Mihara K. et Stanley W. L. 1971.** Antimicrobial Properties of Natural Phenols and Related Compounds. *Applied Microbiology*: 507-510.

**Jones. G. A. Mc Allister T. A. Muir A. D and Cheng. K.-J (1994).** Effects of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) Condensed Tannins on Growth and Proteolysis by Four Strains of Rumania Bacteriat. *Applied and Environmental Microbiology*. p. 1374-1378.

**Jerone J., Perry T. et Salex L.. 2004.** *Microbiologie: cours et questions de révision*. Ed. DUNOD, Paris: 143.

### H

**Haddouchi F. Lazounih .Ahammer K.A.Carson C.F.et Rilley T.V. (1999).**Antimicrobial activity of essential oils and other plant extract .*journal of applied microbiology*,86,985-990.

**Hagerman A. E. et Butter L. G. 1981.** The specificity of proanthocyanidine-proteine interaction. *Journal of biological Chemistry*, 9(256): 4494-4497.

**Hagerman A. E., et Butler L. G., (1978).** Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins *Journal Agriculture and Food Chemistry*. 26(4) :809-812.

**Hagerman A. E.2002.** Tannin chemistry. *Tannin Handbook*.86 :104-105.

**Handa S. S.2008.**An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants .In : *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* . United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology Trieste Italy. 21-54.

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

**Haslam, E (1974).** Polyphenol-Protein Interactions. *Biochem. J.* 139, 285-288.

**Heller R, R. Esnault, C. Lance (1998).** *Physiologie végétale. 1 Nutrition*. 6<sup>e</sup> édition de l'Abrégé Dunod, Paris, pages : 285-290.

**Himujima M,Kubo , I 1992 cite Par Muroi H, kubo A, Kubo I.1993.** Antimicrobial activity of Cashew appele flavor compounds *J.Agric food Chem* Vol 41,1106-1109.



**Hsu C. K., Chang C. T., Lu H.Y et Chung Y.C. (2007).** Inhibitory effects of the water extracts of *lavandula* sp. On mushroom tryosinase activity. Food chemistry. Article in press.

### I

**Ibrahim A, Rehab M,, Desoukey S,Ahmed Abd-Lateff1,3 and Mohamed Salah Kamel1, 2013.** Bacterial Growth Inhibitory Effect of *Ceratonia siliqua* L. Plant Extracts Alone and in Combination with Some Antimicrobial Agents *Journal of Advanced Biotechnology and Bioengineering, 1*, 3-13

### G

**Garcia,O.B.,Castillo,J.,Lorente,J.,Ortuno,A.,Del Rio, JA., 1985.** Isolation of polyphénols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. Biochemecal Engineering Research Laboratory (BERL), Departament of Chmical Engineering ,Izmir Institute of Technology.p.3.

**Gayon, P.R. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Ed DUNOD. Paris. p1, pages 153-245.

**Ghedira K. 2005.** Les flavonoides : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Pharmaconosie*, 10 : 16-22.

**Guerin-fauble V. Carret G. (1999).** L'antibiogramme, principe méthodologie, intérêt et limites. Journées nationales GTV.

**Guignard, J-L. (2000).** Biochimie végétale. 2<sup>e</sup> édition Dunod, Paris, pages : 155-162 et 171.

### K

**Kablan B.J., Adiko M.et Abrogoua D.P.( 2008).** Evaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de *Kalanchoe crenata* et de *Manotes Longiflora* utilisées dans les ophtalmies en Cote d'Ivoire. *Phytothérapie* 6 :282-288.

**Kintzios S. E., et Barberaki M. G. (2004).** Plant that fight cancer. *CRC Press* (Washington,

Etats Units). pp: 16-18.

**Krief S. (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal.. Muséum National d'Histoire Naturelle CNRS. Thèse de doctorat.

### L

**Lagha s. 2007.** Effet des extraits de plantes (*Pistacies Lentiscus L.* et *Olea europaea L.*) et d'un coproduit (grignon d'olive) sur la croissance de Pcc sur *Solanum tuberosum L.* mémoire de Magister Université de Béjaia.

**Lapornik B., Prosek M., et Wondra A.G. 2005.** Comparaison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time . Journal of Food Engineering. 71 :214-447.

**Leinmuller E. , Steingass H., Menke K.H. 1991.** Tannins in Ruminant feed stuff Institute of Animal Nutrition, University of Hohenheim (Germany) .

**Louis S. (2004).** Diversité structurale et activités biologiques des albumines entomotoxiques de type 1b des graines de légumineuses. These de doctorat. (Lyon, France). pp: 28-29.

**Lugasi, A ; Hovari, J ; Sagi, K.V ; et Biro, L. (2003).** The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. *Acta. Biologica Szegediensis* 1-4: 119-125.

### M

**Macheix J.J., Fleurier A. et Sarni-Manchado P., 2006.** Les composés phénoliques dans la plante .Structure, biosynthèse, réparation et rôles. In les polyphénols en agroalimentaire. Ed. TEC et DOC, pp2-10

**Maillard J.-Y (2002).** Bacterial target sites for biocide action. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement, 92, 16S–27S.

**Mamadou B. 2002.** Action pharmacologiques des tannins. Thèse de doctorat en pharmacie de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar. 57.

**Mann C.M. Markham J.L.(1998).** A new method for determining minimum inhibitory concentration of essential oils Journal of applied microbiology. 538-544.

**Mathabe M. C., Nikolova R. V., Lall N. et Nyazema N.Z. 2006.** Antibacterial activity, of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo province, South African *Journal of Ethnopharmacology*, 105: 286-293.

**Mc Donnell G and A (1999).** Denver Russell. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan., p. 147–179.

**Medié-Sarié M., Jasprica I., Smolčić-bubalo A., et Mornar A. (2004).** Optimisation of Chromatography Conditions in thin layer for Inflammation, Heart Disease, and phenolic Acids. *Croatica Chemica Acta*. **77**. 673-751.

**Meyer A ,Deiana J,Leclercq ,1989.** Cour de microbiologie general nouveau programme Ed Doin

**Mokhtarpour A.,Naserian A. A.,Valizadeh R., Danesh Mesgaran M.,et Pourmollane F.2014.**Extraction of phenolic Compounds and Tannins from Pistachio by- products. *Annual Research and Review in Biology*.4(8):1330-1338.

**Mole S., et Waterman P. G.1987.** A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies II . Techniques for biochemically defining tannins *Oecologia*. 72 :148-156.

**Moroh J.L Bahli C. Dje K.Loukou Y G. Gued-guina F.(2008).** Study of the antibacterial activity of *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) acetate exact (ACE) on in-vitro growth of *Escherichia coli* strains. *Bulletin de la Société Royale des sciences de Liège*, Vol. 77 :44-61.

**Mouhssen L. (2004).** Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother. Res*. **18**.pp: 435-448.

## N

**Negrão R et Faria A. (2009).** Natural polyphenols as anti-oxidant, antiinflammatory and anti-angiogenic agents in the metabolic syndrome. p: 147-180.

**Nikaido H. 1994.** Prevention of drug access to bacterial targets-permeability barriers and active efflux. *Science*, 264 : 382-388.

**Nohynek L.J. (2006).**Berry Phenolics :antimicrobial Proprieties and Mecanisms of Action Against Sever Human Pathologens Nutrition . *Food and Chemistry*. 46 :1801 -1807 .

O

**O'Donovan, L. and Brooker, J. D. (2001).** Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiology*, 147, 1025–1033.

**Oomah B. D. Corbé A. Balasubramanian P. 2010.** Antioxidant and anti-inflammatory activite of bean (*phaseolus vulgaris*L.) hulls. *J Agric Food Chem*58 ,822568230.

**Owen R.W., Haubner R., Hull W.E., Erben G., Spiegelhalder B. et Bartscha H., 2003.** Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food and Chemical Toxicology* Vol. 41, p.1727–1738

**Ozaki Masakuni ,Masato Matsuda,Yoshifumi Tomii, Kiyoshi Kimure, Kenji Kazuno, Masahiko Kitano, Masahiro Kise , Kazuo Shibata, Masako Otsuki and Takeshi Nishino (1991).** In Vitro Antibacterial Activity of a New Quinolone, NM394. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 2490-2495.

P

**Panizzi , M., and Defraigne, J.O. (2002).** Intracellular free iron content of rat liver tissue after coldischemia. *Transplant Proc*, 34 (3): 759-61.

**Parry E.J. (1922).** The chemistry of essential oils and artificial perfumes. Edition Scott, Greenwood and Sons (Londres, Angleterre).

R

**Rahman I., Biswas S. K. et Kirkham P. A. 2006.** Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols . *Biochemical Pharmacology*. 72 :1439– 1452

**Ramirez, J., 1988.** Effect of different chemical treatments on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. *Animal Feed Science and Technology* 99:195-204.

**Rauha J-P. (2001).** The search for biological activity in Finnish plant extracts. *Faculty of Science of the University of Helsinki*.P:1-72.

- Reed, J. D. (1995).** Nutritional Toxicology of Tannins and Related Polyphenols in Forage Legumes. *J. Anim. Sci.* 73:1516-1528
- Ribéreau- Gayon P. 1968.** Notion générale sur les composés phénoliques. In : les composés phénoliques des végétaux » .Ed .Dunod. 1-40.
- Richter G. 1993).** Métabolisme des végétaux. Physiologie et Biochimie. Ed. Presses Polytechniques et Universitaire Romandes, 322-323.
- Rob J. Aerts, Tom N. Barry, Warren C. McNabb (1999).** Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 75 1–12.
- Robert-Demuet S.(1995).** **Methodes des dilution** . in antibiotiques et antibiogramme. 131-137.montréal –Canada.sité par HELLAL ZOHRA .(2010).
- Rossi L., Mazzitelli S., Arciello M., Capo CR., Rotilio G. (2008).** Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease. from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease *Neurochem Res.* **33**: 2390–2400.
- Russell, R.,Franklin, H.,Epstein, M.D.(1999).** Atherosclerosis— an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*, **340** (2) : 115-126.
- Russell. A .D (2003).** Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Review*, Pages 794-803.

## S

- Sahin F., Karaman J., Gùlluce M., Ogutcu H., Sengul M., Adiguzel A., Ozturk S. et**
- Scalbert A. (1991).** Antimicrobial propriétés of tanins .*Phytochemistry* .30 :3875- 3883 .
- Skerget M. , Kotnik P. ;Hadolin M. , Hras A. : Simonic M. , et Knez Z.2005 .** Phenols proanthocyanidine . flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activity. *Food chemistry* .89 :191-19

### T

**Tepe B., Daferera D., Sokemen A., Sokemen M. et Polissiou M. 2005.** Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentos* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90: 333-340.

**Tucker S.C. 1992.** The developmental basis for sexual expression in *Ceratonia siliqua* (Leguminosae, Caesalpinioideae, Cassieae). *American Journal of Botanique*, 79(3): 318-327.

**Turkmen N., Sari F., et Velioglu Y.S. 2006.** Effects of extraction solvent on concentration and antioxidant activity of black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*. 99 (4):835-841.

### U

**Urquiaga et Leighton (2007).** Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Bio. Res.* pp: 1-13.

**Uzun E., Sariyara G., Adsersen A., Karakoc B., Otuk G., Oktayoglu E., Pirildar S., (2004).** Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species. *Journal of Ethnopharmacology*, 95: 287-296.

### V

**Van , Der., Watt, R.M. Pretorius. , 2001.** The mechanism of action of aspirin. In : les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes, CH-1015 Lausanne, p.155. ISBN 2-88074-625-6.

**Varel, V.H. and Hans-Joachim, Jung. G. (1986).** Influence of Forage Phenolics on Ruminant Fibrolytic Bacteria and In Vitro Fiber Degradation. *Applied Microbiology environmental*. p. 275-280.

**V-G.de Billerbeck1, C .Roques1 ,P.Vanière2,P.Marquier3.(2002).**activité antibactérienne et antifongique de produit à base d'huiles essentielles *HYGIENES volXN°3*. P248-250.

**Vercauteren J (1996).** Chez C. et Triaud J. Polyphenols 96, 18th international conference on polyphénols. INRA . PP: 32-33.

### Y

**Yi S., Zhu J., Fu L.I. et Li J.(2010).** Tea polyphénols inhibit *Pseudomonasaeruginosa* Through damage to the cell membrane. *International Journal of Food Microbiology.* 144 :111-117.

**Yong C. S., Landau J. M., Huang M. T. et Newmark H. L. 2001.** Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21: 381-406.

### Z

**Zaid M. A. et Crow J. S. A. 2007.** Biologically active traditional medicinal herbs from Balochistan , Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology*, 96: 331-334.

**Zaidi F., Hassissene N., Boubekour N., Bouaiche A., Bouabdellah A., Grongnet J.F., Bellal M.M. et Youyou A.2007.** Etude *in vitro* de facteurs limitant la valeur nutritive du grignon d'olive: effets des matières grasses et des métabolites secondaires.Liverstock Recherche for Rural Development. 20(3).

**Zimmer N. (1995).**Influence des tannins et leur interaction avec les protéines sur la valeur nutritive des aliments chez les ruminants. thèse doctorat, Ecole nationale Supérieure Agronomique de Montpellier .

# Annexes



**Annexe1 : Préparation des solutions**

<b>Solution</b>	<b>Préparation</b>
<b>Solution Méthanol 80%</b>	80 ml Méthanol 80% ajustement par l'eau distillée 1000ml
<b>Solution d'éthanol 80%</b>	80 ml éthanol 80% ajustement par l'eau distillée à 100ml
<b>Solution de réactif de folin dilué à 1/10</b>	10 ml Folin ciocalten pur ajustement par eau distillée à 100 ml
<b>Solution Carbonate de sodium</b>	Dissoudre 7,5 g $\text{Na}_2\text{CO}_3$ dans 100ml d'eau distillée pour avoir une solution de 7,5%.
<b>Solution Chlorure d'aluminium</b>	Elle prépare en dissolvant 17,5 g de poudre $\text{AlCl}_3$ dans 100ml de méthanol pur
<b>Solution de Chlorure ferrique</b>	Dissoudre 1,623g de $\text{FeCl}_3$ à 0,01M dans 1 litre d'HCl à 0,01 N.
<b>Solution de BSA</b>	12mg de BSA dans 12ml du tampon acétate.
<b>Vanilline</b>	Dissoudre 5,8g de vanilline dans 100ml méthanol.
<b>HCl 24%</b>	24 ml d'HCl concentré ajusté à 100ml méthanol.

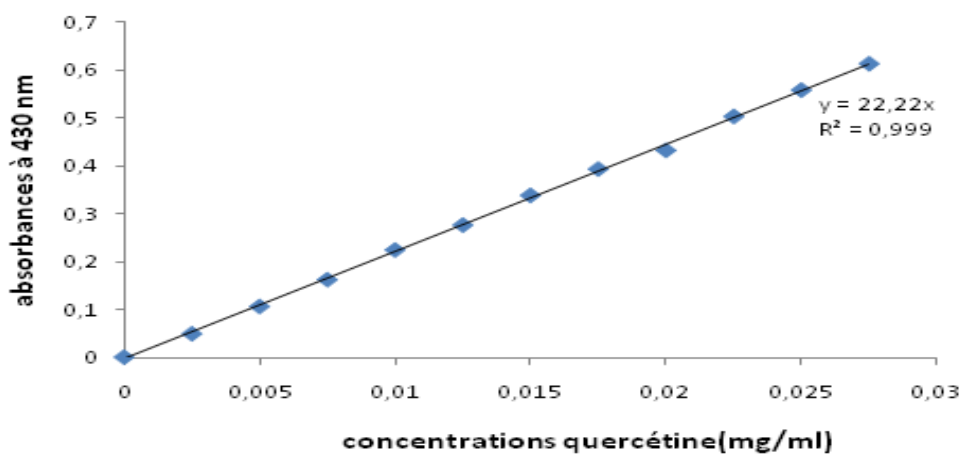
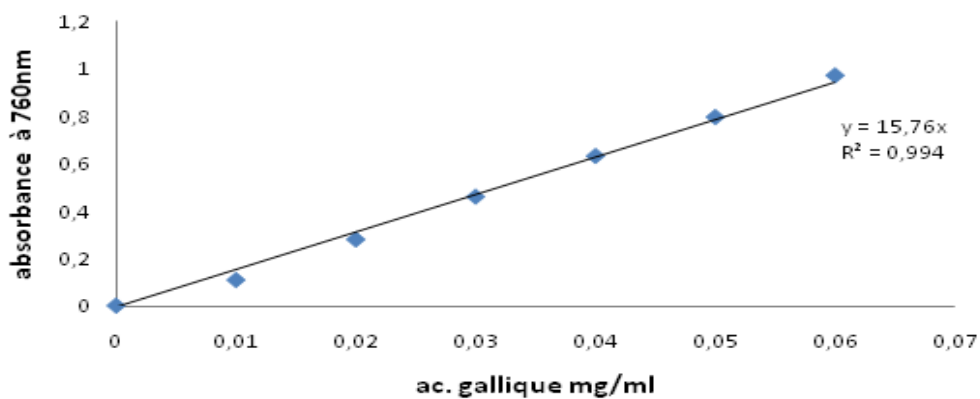
Annexe 2 :  
Courbe  
d'étalonnage

Figure2 : Dosage des flavanoides.

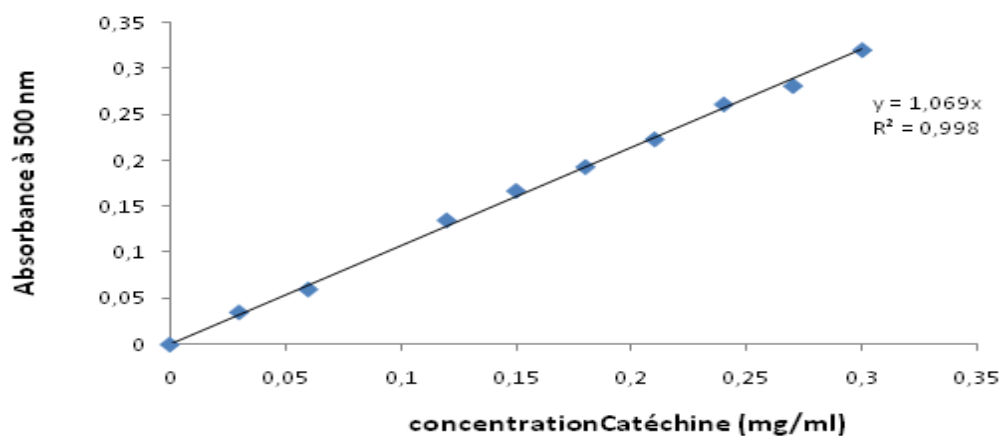


Figure3 : dosage des tanins condensés

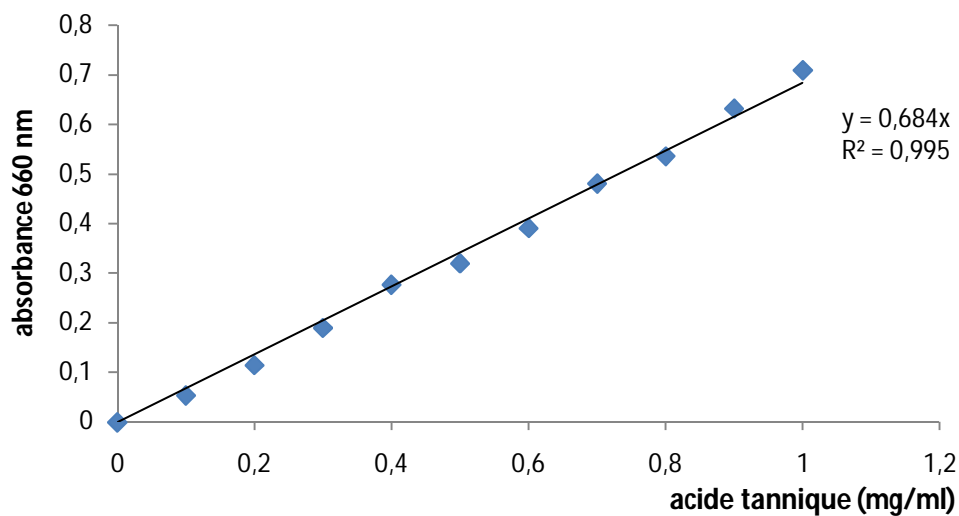


Figure4 : Dosage des tanins hydrolysables

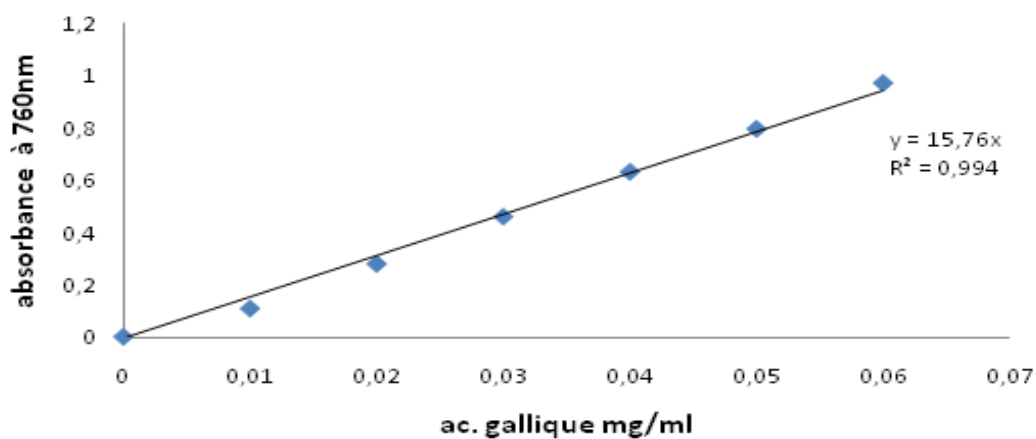


Figure : Courbe d'étalonnage des Tanins attache à la BSA.

### Annexe3 : Préparation des milieux Cultures

#### Milieu Mueller Hinton g /l (pH=7,3)

Infusion de viande de bœuf	300g
Hydrolysate de caseine	17,5g
Amidon	1,5g
Agar	17g
Eau distillée	1000ml

Ajoutation 15 mn à 121°C

**Milieu King B g /l (pH=7,2). (King et al 1954)**

Peptone	20g
Phosphate de K dibasique( $K_2HPO_4$ )	1,5g
Sulfate de Mg ( $MgSO_4,7H_2O$ )	1,5g
Agar	15g
Glycérol	10g
Eau distille	1000ml

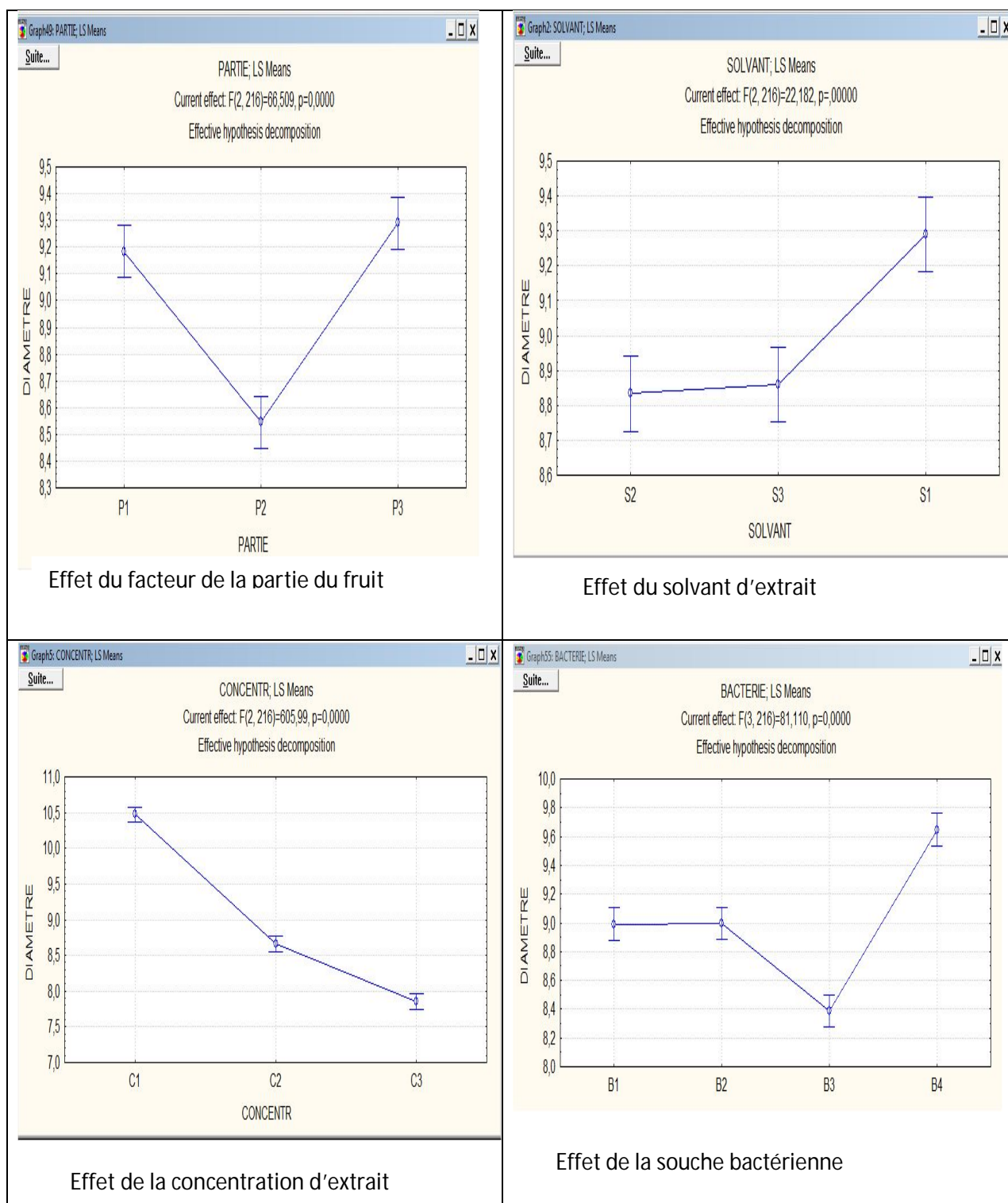
Ajustations 20 mn à 120°C

**Bouillon nutritive g /l (pH=7,2)**

Extrait de viande	5g
Peptone de tryptique	10g
NaCl ou KCl	5g

Ajustations 20 mn à 120°C

## Annexe 4 :Activité antibactérienne :



P1 : gousse  
 S1 :EtOH

P2 : pulpe  
 S2 :MeOH

P3 : Graine  
 S3 :eau distille

C1 : concentration 100mg/ml

C2 :50mg/ml

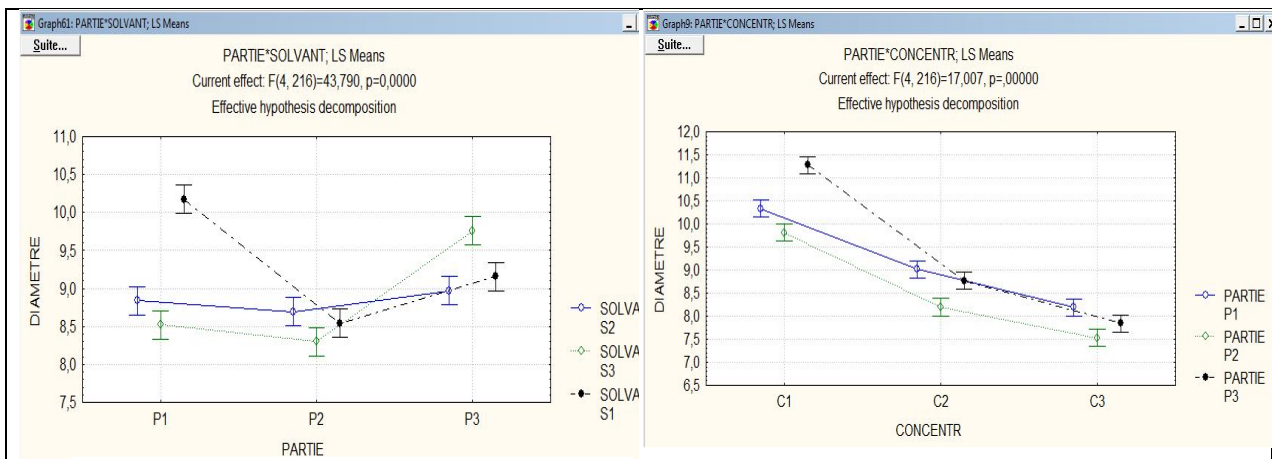
C3 :33,33mg /ml

B1 : *S.aureus*

B2 : *E. coli*

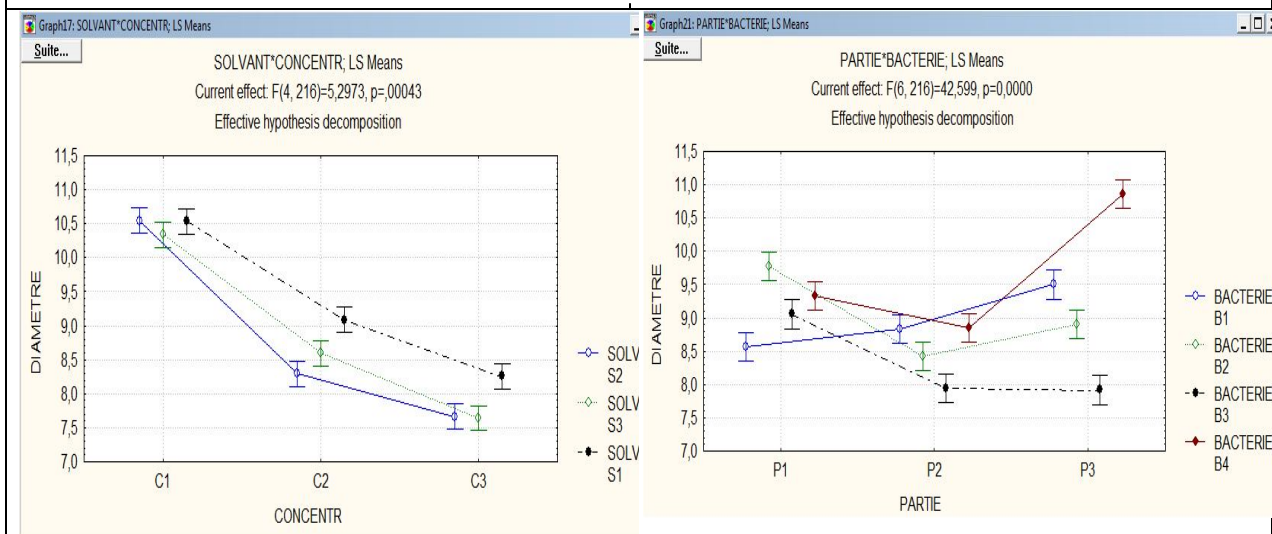
B3 : *Pcc*

B4 : *Pca*



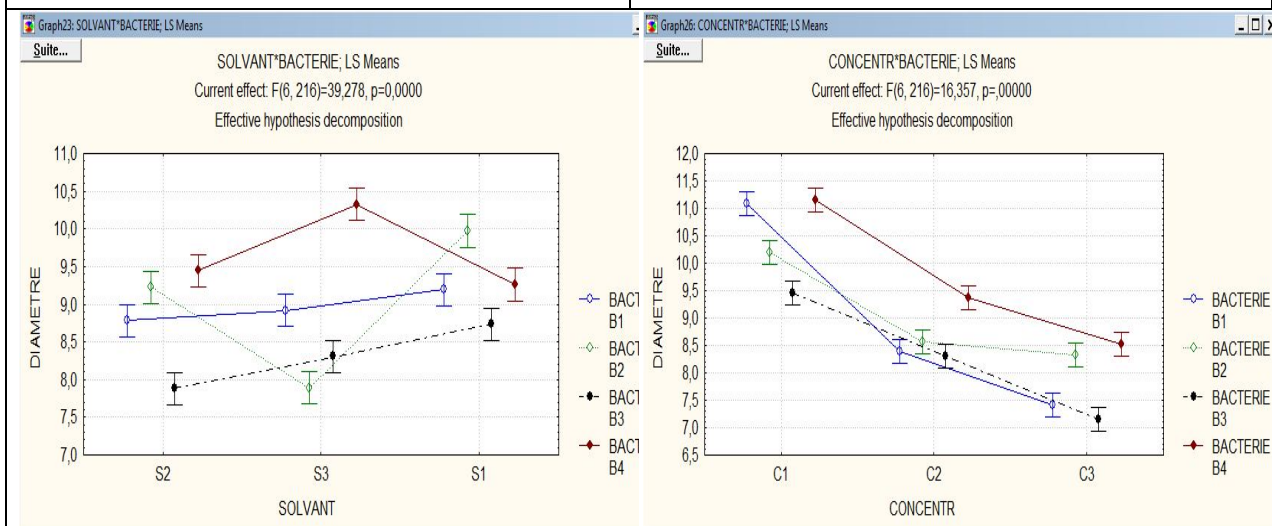
Effet de partie solvant

Effet de l'extrait partie- concentration



Effet du solvant -concentration

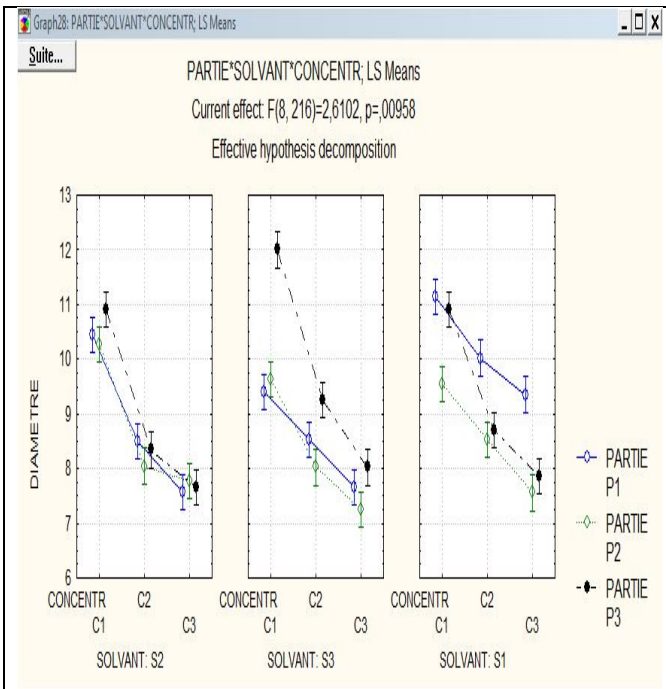
Effet de partie-Bactérie



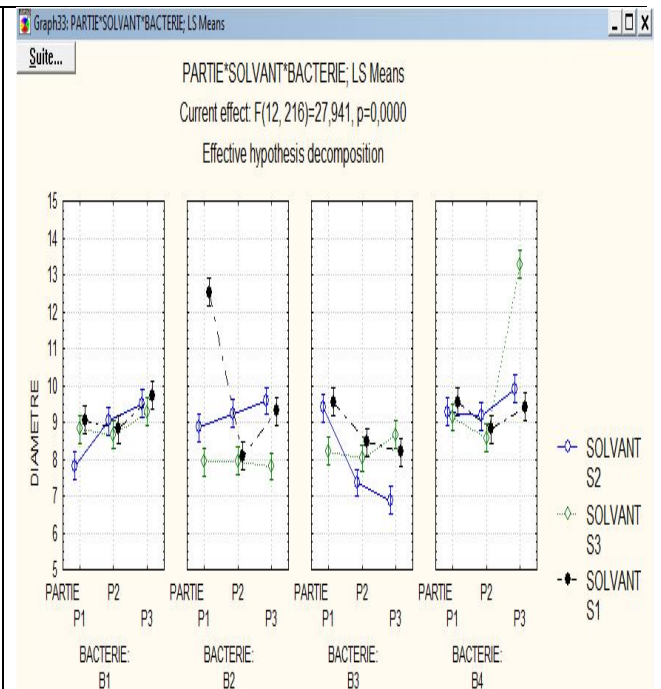
Effet du solvant-Bactérie

Effet de la concentration-Bactérie

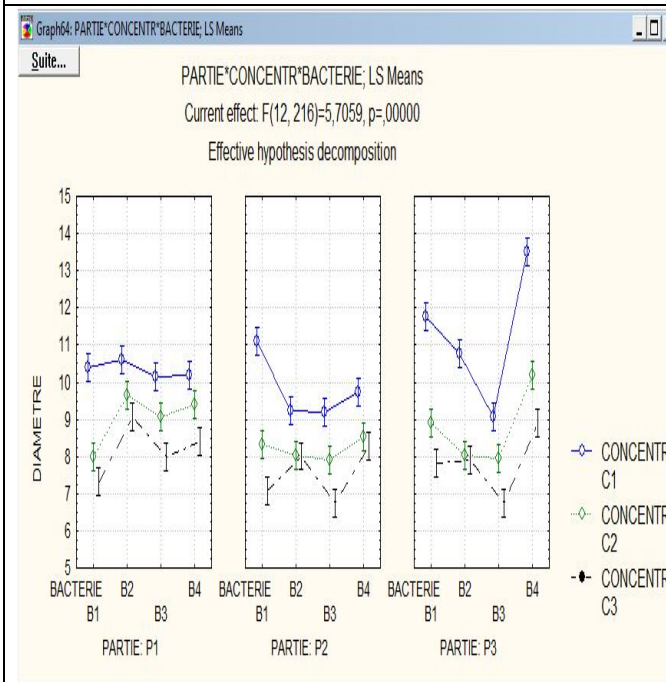
Effet de l'extrait des facteurs puis deux à deux



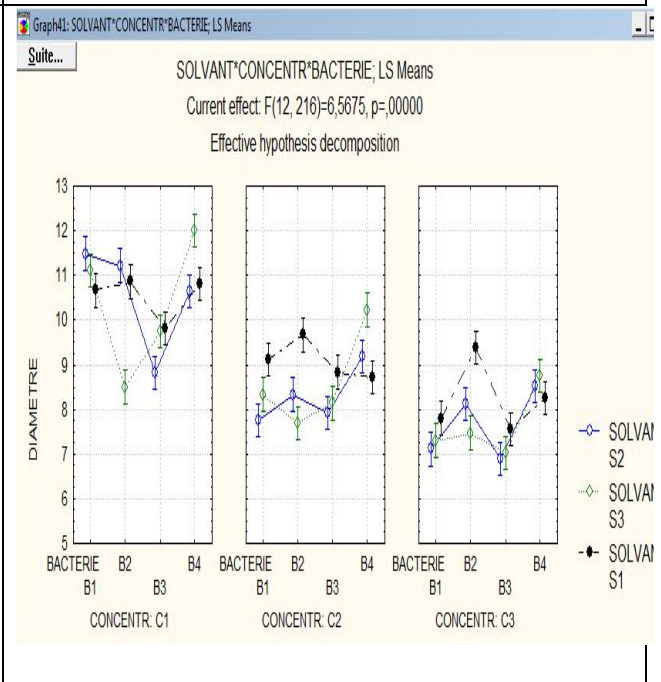
Effet de partie -solvant-concentration



Effet de partie -solvant-Bactérie

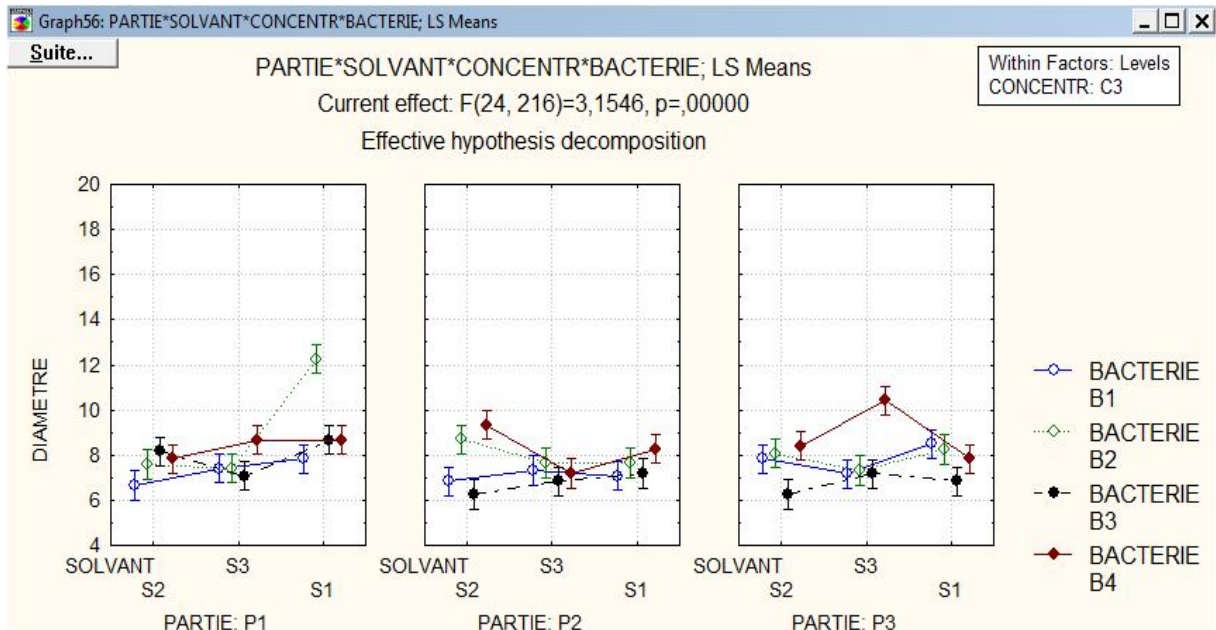


Effe de partie-concentration -Bactérie



Effet de la solvant-concentration-Bactérie

Effet de l'interaction des facteurs puis trois par trois



Effet de partie -solvant-concentration-Bactérie

Effet de l'interaction entre les quatre facteurs

Cell No.	PARTIE	SOLVANT	CONCENTR	BACTERIE	DIAMETRE Mean	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
83	P3	S2	C3	B3	6,25000	****									
47	P2	S2	C3	B3	6,25000	****									
9	P1	S2	C3	B1	6,66667	****	****								
59	P2	S3	C3	B3	6,83333	****	****	****							
45	P2	S2	C3	B1	6,83333	****	****	****							
107	P3	S1	C3	B3	6,83333	****	****	****							
5	P1	S2	C2	B1	6,91667	****	****	****							
79	P3	S2	C2	B3	7,08333	****	****	****	****						
23	P1	S3	C3	B3	7,08333	****	****	****	****						
69	P2	S1	C3	B1	7,08333	****	****	****	****						
93	P3	S3	C3	B1	7,16667		****	****	****	****					
95	P3	S3	C3	B3	7,16667		****	****	****	****					
71	P2	S1	C3	B3	7,19333		****	****	****	****	****				
60	P2	S3	C3	B4	7,19333		****	****	****	****	****				
57	P2	S3	C3	B1	7,33333		****	****	****	****	****	****			
94	P3	S3	C3	B2	7,33333		****	****	****	****	****	****	****		
75	P3	S2	C1	B3	7,33333		****	****	****	****	****	****	****		
43	P2	S2	C2	B3	7,36000		****	****	****	****	****	****	****	****	
21	P1	S3	C3	B1	7,41667		****	****	****	****	****	****	****	****	****
22	P1	S3	C3	B2	7,41667		****	****	****	****	****	****	****	****	****
90	P3	S3	C2	B2	7,41667		****	****	****	****	****	****	****	****	****
10	P1	S2	C3	B2	7,58333			****	****	****	****	****	****	****	****
58	P2	S3	C3	B2	7,66667			****	****	****	****	****	****	****	****
70	P2	S1	C3	B2	7,66667			****	****	****	****	****	****	****	****
54	P2	S3	C2	B2	7,66667			****	****	****	****	****	****	****	****
41	P2	S2	C2	B1	7,66667			****	****	****	****	****	****	****	****
108	P3	S1	C3	B4	7,83333			****	****	****	****	****	****	****	****
55	P2	S3	C2	B3	7,83333			****	****	****	****	****	****	****	****
33	P1	S1	C3	B1	7,83333			****	****	****	****	****	****	****	****
81	P3	S2	C3	B1	7,83333			****	****	****	****	****	****	****	****
12	P1	S2	C3	B4	7,83333			****	****	****	****	****	****	****	****
18	P1	S3	C2	B2	8,00000				****	****	****	****	****	****	****
82	P3	S2	C3	B2	8,08333					****	****	****	****	****	****
66	P2	S1	C2	B2	8,08333						****	****	****	****	****
11	P1	S2	C3	B3	8,16667							****	****	****	****
91	P3	S2	C3	B3	8,16667								****	****	****

Groupe homogène



## Résumé

L'activité antibactérienne des extraits méthanoliques, ethanologiques et aqueux des parties du fruit de *Ceratonia siliqua L* (gousse, pulpe et graine) a été testée et évaluée sur deux souches pathogènes (*S. aureus*, et *E. coli*) et deux souches phytopathogènes (*Pca* et *Pcc*).

Les résultats de l'évaluation qualitative de l'activité antibactérienne montrent que tous les extraits sont actifs vis à vis des souches testées. L'évaluation quantitative de l'activité antibactérienne montre d'une part, que l'extrait aqueux est plus actif que les extraits hydro alcooliques et d'autre part, *Pca* est l'espèce la plus sensible et *S.aureus* est l'espèce la plus résistante vis-à-vis des extraits testés.

**Mots clés:** *Ceratonia siliqua L*, Composés phénoliques, Activité antibactérienne, *S.aureus*, *E.coli*, *Pcc*, *Pca*.