

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane Mira de Bejaia (UAMB)
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de biologie physico-chimique

Mémoire

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

Filière : Biochimie

Option : Biochimie appliquée aux substances végétales bioactives

Fractionnement des extraits d'*Olea europaea* L et *Ceratonia siliqua* L par CCM et essais sur *Pectobacterium atrosepticum*

Présenté par
M^{lle} Amari salima

Devant le jury :

Présidente :	Dr. ZEBBOUDJ A.
Rapporteur :	Pr. Zaidi- YAHIAOUI R.
Co-Rapporteur :	Dr. ZAIDI F.
Examineurs :	Dr. BENABDESSELAM F. Dr. AISSAT K.

Année universitaire 2011/2012

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Nutrition-Alimentation, sous la Co-direction du Dr. Zaidi F. Je le remercie de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir accepté de me co-encadrer, je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour ses conseils, ses remarques, son aide très précieuse et surtout par sa disponibilité qui m'ont permis de préparer ce modeste mémoire de magister.

Je tiens particulièrement à remercier ma promotrice Pr. Zaidi-YAHIAOUI R., pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ma thèse, pour m'avoir fait confiance, m'avoir encouragé et conseillé tout en me laissant une grande liberté. Pour son soutien et sa grande générosité, qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude.

J'exprime mes sincères remerciements à M^{me} ZEBBOUDJ A. de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire et de juger ce travail.

J'adresse également mes remerciements à M^r AISSAT K et M^{me} BENABDESSELAM F, qui m'ont fait l'honneur de juger et d'examiner ce travail; qu'il me soit permis de leur exprimer toute ma gratitude.

Je tiens à remercier vivement le personnel de laboratoire de Biophysique, le personnels de laboratoire de (L3BC) et sans oublier de remercier chaleureusement l'ingénieur du laboratoire de mycologie.

Je suis heureuse de remercier tous mes collègues du laboratoire, je les remercie de leur amitié ainsi que tous mes collègues de la post-graduation en Biochimie appliquée aux substances végétale bioactives.

Mes remerciements les plus profonds ne seront pas complets sans citer mes parents qui m'ont toujours soutenue en toutes circonstances au cours de ces années d'études et de me permettre d'obtenir ce titre dans les meilleures conditions possibles.

Merci pour tous et celles qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre lors de mon travail, je les remercie du fond du cœur.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire :

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour

A ceux qui m'ont encouragée et soutenue dans mes moments les plus durs

Et ceux à qui je dois tant

A mes parents pour leur amour et leur support affectif

A ma famille et mes ami(es)

A votre bénédiction la plus sainte

Je présente mon travail

Salima

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Sommaire

Introduction 1

Synthèse bibliographique

I.1.Métabolites secondaires des plantes 3

I.1. Généralités 3

I. 2. Classification 4

I.2 .1.Les terpanoïdes..... 4

I.2.2. Les alcaloïdes..... 4

I .2.3.Les composés phénoliques..... 5

I. 3. Intérêt des métabolites secondaires..... 5

II. *Olea europaea* L..... 6

II.1.Généralités..... 6

II.2. Classification botanique 7

II. 3. Les sous espèces d'*Olea europaea* L 7

II.4. Caractères morphologiques et répartition géographiques 7

II.5. Composition chimique des feuilles..... 8

II.6. Intérêt thérapeutiques des feuilles d'olivier..... 10

II.6 .1.Activité antibactérienne..... 10

II. 6.2.Propriétés antioxydantes... .. 11

II. 6.3.Propriétés vasodilatatrice et hypertensive 12

II. 6.4.Activité antidiabétiques 12

II. 6.5.Propriétés anti-inflammatoires 13

II. 6.6.Propriétés antiulcérogène..... 12

II. 6.7.Activité anticancéreuse..... 13

II.6.8.Autres propriétés..... 14

III. *Ceratonia siliqua* L..... 14

III.1. Classification botanique..... 14

III.2.Caractères morphologiques et répartition géographiques 14

III.3.Composition chimique.....	15
III.4.Utilisations traditionnelles et propriétés pharmacologiques	16
IV. Erwinia pectinolytiques.....	18
IV.1 .Description des Erwinia pectinolytiques	18
IV. 2. Description des symptômes en conservation	18
IV. 3. Description des symptômes en végétation	19

Matériel et méthodes

V. Matériel végétal utilisé.....	21
V.1. Préparation du matériel végétal	21
V.1. 1. Collecte des échantillons.....	21
V.1. 2. Séchage	21
V.2. 3. Broyage.....	21
V. 2.Extraction des composés phénoliques	21
V. 2.1.Extraction à reflux.....	22
V. 2. 2. Extraction par macération.....	22
V.3. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes	22
V.3.1. Dosage des polyphénols totaux	22
V.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	23
V.4.Fractionnement par CCM des extraits	24
V. 5.Activité antibactérienne des extraits et des fractions chromatographiques.....	27
VI. Etude statistique.....	28

Résultats et discussion

VII.1. Teneurs en composés phénoliques	29
VII.1. Teneurs en phénols totaux solubles	29
VII .1. Teneurs en flavonoïdes.....	29
VII .1.Analyse des chromatogrammes par CCM	33
VII .1.1.Analyse de fractions obtenues dans les feuilles d'olivier	37
VII .1.2.Analyse de fractions obtenues dans les feuilles, graines et pulpes de <i>C .siliqua</i> L	40
VII . 3. Activité antibactérienne	41

VII.3.1. Activité antibactérienne des extraits bruts.....	41
VII.3.2. Activité antibactérienne des fractions.....	42
VII.3.3. Activité antibactérienne comparées des extraits et fractions.....	45
Conclusion.....	49
Références bibliographiques	51
Annexes	

Liste des abréviations

COX 3 : Cyclooxygénase 3

DMSO: Diméthyle Sulfoxyde

Eq AG: Equivalent Acide Gallique

Eq Q: Equivalent Quercétine

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

LOX 5: 5-Lipoxygénase

MS: Matière sèche

Pca: *Pectobacterium carotovorum* ssp .*atrosepticum*

Pcc : *Pectobacterium carotovorum* ssp . *carotovorum*

TSH : Tyroid Stimulating Hormon

UFC: Unité Formant Coloni

HIV-1 : Virus d'immunodéficience humaine

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Structure chimique d'oleuropeine hétérosidique	8
2	Pourriture molle et humide causée par <i>Pectobacterium</i> sp	19
3	Symptôme de jambe noire, variant de pourritures humides brun foncé à noire de la base des tiges à des nécroses plus ou moins sèches et/ou tiges creusés	20
4	Protocole de dosage des composés phénoliques	23
	Teneurs en phénols totaux (mg Eq AG /g d'échantillon)	30
6	Teneurs en flavonoïdes (mg Eq Q /g d'échantillon)	31
7	Effet antibactérien des feuilles de <i>C.silvica</i> L et <i>O.europaea</i> L	42
8	Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques	43
9	Evaluation de l'activité antibactérienne des fractions chromatographiques	45

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	Page
I	Principaux composés identifiés dans les feuilles d' <i>O. europaea</i> L	9
II	Propriété traditionnelles et pharmacologiques de <i>C.siliquea</i> L	17
III	Systèmes d'élution testés (essais préliminaires)	25
IV	Fractionnement par CCM des extraits	34
V	Données sur les fractions chromatographiques testées	44

Introduction

Introduction

Les plantes produisent une vaste et diversifiée gamme de composés organiques, appelées métabolites secondaires, qui sont souvent différemment répartis entre groupes taxonomiques limités dans le règne végétal. Leurs fonctions, dont beaucoup restent inconnus, sont entrain d'être élucidées avec une fréquence croissante.

Les produits naturels ou biopesticides issus des extraits de plantes ont un usage reconnu depuis l'Antiquité et font actuellement l'objet d'un regain d'intérêt croissant dans le monde entier du fait, notamment de l'écotoxicité des pesticides de synthèse. Outre leur sélectivité remarquable envers leur cible, ils présentent l'avantage d'être biodégradables. En mettant en place une stratégie efficace qui vise à limiter au maximum l'utilisation des produits phytosanitaires, toutes les composantes de l'écosystème en bénéficient.

L'Algérie, compte une flore appartenant à plusieurs familles botaniques plantes médicinales d'environ 3000 espèces à plusieurs familles botaniques. Parmi celles-ci, *Olea europaea* L ou olivier et *Ceratonia siliqua* ou caroubier, L sont deux plantes prometteuses utilisés par les populations locales comme remède traditionnel pour le traitement de diverses pathologies (anti-inflammatoires, antidiabétiques, anti-oxydantes et antibactériennes). Les différentes propriétés biologiques, notamment antibactérienne de ces plantes sont essentiellement dues à leur richesse en composés phénoliques. Ces différents composés sont également connus pour leur intérêt dans la physiologie végétale comme des composés de défense de la plante contre les attaques des microorganismes, champignon et virus.

Les principaux composés phénoliques de l'olivier sont les alcools phénoliques, comme l'hydroxytyrosol et tyrosol, secoiridoides comme l'oleuropéine, et les dérivés de l'acide hydro cinnamique comme le verbascoside et l'acide caféique. L'oleuropéine étant le constituant majeur phénolique des extraits de feuille d'olivier, environ 19% (p / p), doté d'une gamme d'activités biologiques. Les feuilles et fruits du caroubier contiennent également des composées phénoliques (2 à 20% de M.S). La richesse de ces plantes en composés connus pour leur intérêt dans la physiologie végétale comme des composés de défense de la plante pourrait être exploitée et utilisée en phytoprotection contre les microorganismes.

L'activité antibactérienne des extraits phénoliques de ces deux plantes médicinales est déjà mise en évidence à l'égard des bactéries pathogènes à l'homme, inclus les bactéries Gram positifs et négatifs (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,...etc) et antifongique vis-

à-vis de *Candida albicans* (Aziz *et al.*, 1998 ; Tassou *et al.*., 2002) . Mais peu de travaux ont eu pour objectif d'étudier leur effet en phytopathologie; en effet les travaux menés précédemment sur le potentiel antimicrobien des extraits aqueux de feuilles d'olivier et les extraits de fruit et de feuilles de caroubier ont montré que ces derniers seraient efficaces à l'égard de *Pectobacterium carotovorum* ssp *atrosepticum* et *Pectobacterium carotovorum* ssp *carotovorum* inféodés à la pomme de terre (Lagha, 2007 ; Yahiaoui-Zaidi *et al.* 2007 ; Bechar ,2008 ; Kharfallah –Cheikh Amar, 2011) .

L'objectif de ce travail s'inscrit dans ce contexte puisque nous souhaitons valoriser et utiliser les produits d'*Olea europaea* et *Ceratonia siliqua* pour la préparation d'un extrait végétal naturel qui sera utilisé comme biopesticides pour limiter la croissance des bactéries pectinolytiques et diminuer les dégâts causés par ces dernières sur la pomme de terre.

Pour traiter les différents aspects du sujet, nous avons structuré ce document comme suit :

un premier chapitre portera sur une revue de la littérature donnant un aperçu sur la biosynthèse des principales catégories de produits végétaux naturels, en insistant sur les origines de leur diversité structurale, ainsi que leurs fonctions physiologiques, leurs propriétés biologiques, et les applications biotechnologiques potentielles.

Le second chapitre portera sur l'extraction, le dosage et le fractionnement des constituants d'*Olea europaea* L (feuilles) et *Ceratonia siliqua* L (feuilles, pulpe et graine du fruit) suivi d'une évaluation de l'efficacité biologique de quelques fractions majoritaires vis-à-vis de *Pectobacterium* ssp. *atrosepticum*.

Synthèse bibliographiques

I. Métabolites secondaires des plantes

I.1. Généralités

Les plantes produisent un assortiment vaste et diversifié de composés organiques, appelées métabolites secondaires. Bien connu pour la complexité de leur structure chimique et des voies de biosynthèse des produits naturels, ils sont considérés comme biologiquement négligeables et ont historiquement reçu peu d'attention de la plupart des biologistes végétaux. Les chimistes organiques, cependant, ont longtemps été intéressés par ces composés phytochimiques et ont étudié leurs propriétés chimiques abondamment depuis les années 1850.

Les études sur les produits naturels ont stimulé le développement des techniques de séparation, les approches spectroscopiques d'élucidation de la structure et les méthodes de synthèse qui constituent maintenant le fondement de la chimie organique moderne.

La reconnaissance des propriétés biologiques d'une myriade de produits naturels a favorisé l'orientation actuelle dans ce domaine, à savoir, la recherche de nouveaux médicaments, antibiotiques, insecticides et d'herbicides. L'effet biologique des produits naturels a provoqué une réévaluation des rôles possibles que jouent ces composés dans les plantes, en particulier dans le contexte des interactions écologiques.

Plusieurs de ces composés ont été démontré pour avoir une grande signification dans la protection contre les herbivores et les infections microbiennes, comme attractifs pour les pollinisateurs et les graines de dispersion des animaux, et comme agents allélopathiques (allélochimiques qui influencent la concurrence entre les espèces végétales) (Rodney *et al.* , 2000).

Même la lignine, le polymère structurel essentiel et substance organique la plus abondante dans les plantes, est considérée comme un produit naturel plutôt qu'un métabolite principal (Rodney *et al.* , 2000).

Dans ce chapitre, nous donnerons un aperçu sur les principales catégories de produits végétaux naturels, en insistant sur les origines de leur diversité structurelle, leur biosynthèse ainsi que sur leurs fonctions physiologiques, et les applications biotechnologiques potentielles.

I.2.Classification

Les métabolites secondaires végétaux dépassent actuellement 100 000 substances identifiées et appartiennent à trois classes chimiques principales : les terpanoïdes (groupe de lipides), les alcaloïdes (dérivés des acides aminés) et les composés phénoliques (dérivés de glucides).

I.2.1.Les terpanoïdes

Les terpanoïdes représentent la classe la plus structurellement variée des produits végétaux naturels. Le nom terpanoïdes, ou terpéniques, découle du fait que les premiers membres de la classe ont été isolés à partir de la térébenthine ("terpentin" en allemand). Tous les terpanoïdes sont dérivés par fusion répétitive des unités ramifiée à cinq carbones basées sur le squelette d'isopentane. Ces monomères sont généralement appelées unités isoprène, car la décomposition thermique de nombreuses substances terpanoïdes produit un alcène qui est un isoprène gazeux et parce que les conditions chimiques appropriées peuvent conduire à une polymérisation de l'isoprène générant de nombreux squelettes terpanoïdes (Dorman et Deans, 2000 ; Burt, 2004). Les terpanoïdes qui découlent de trois unités d'isoprène contiennent 15 atomes de carbone et sont connus comme les sesquiterpènes (demi-terpènes). Comme les monoterpènes, beaucoup de sesquiterpènes sont présents dans les huiles essentielles (Bagamboula *et al.* , 2004 ; De Billerbeck *et al.* , 2004).

En plus, de nombreux sesquiterpénoïdes agissent en tant que phytoalexines, composés antibiotiques produits par des plantes en réponse au défi microbien, et comme antiappétents qui découragent les herbivores opportunistes (Bouaoun *et al.* , 2007) .

I.2.2. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont une des classes des métabolites secondaires les plus importants des plantes. Le terme alcaloïdes ou « alkaly-like » (al kaly = la soude ; like = qui a l'apparence) a été proposé pour la première fois par le pharmacien Meissner en 1818. C'est en 1896 que Meyer présenta la première définition explicite des alcaloïdes (Hesse, 2002).

Les alcaloïdes sont bien connus pour leur propriétés antibactériennes (Almomani *et al.* ,2007 ; Delso *et al.* ,2010) , mais les mécanismes exactes responsable de leurs actions antibactériennes sont loin d'être entièrement compris (Souza *et al.* , 2004) ; Généralement les alcaloïdes peuvent inhiber la biosynthèse des protéines et perturbent la stabilité membranaire

(Wink , 1998) et peuvent également interagir avec la membrane cytoplasmique bactérienne et avec l'ADN (Jenning et Ridler, 1983 ; Philipson , 1987) .

I.2.3. Les Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires les plus importants des plantes impliqués dans divers processus, tels que la croissance, la lignification, la pigmentation, la pollinisation et la résistance vis-à-vis des pathogènes, les prédateurs et les stress environnementaux (Duthie *et al.* , 2003). Ils sont exploités en phytothérapie et suscitent beaucoup d'intérêt par leur potentiel anti-bactérien. Il regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaires, tels que les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tannins .

Chimiquement, ils présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un noyau benzénique, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH), libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside. Leur origine biosynthétique est proche, ils dérivent principalement de l'acide shikimique (Hannebelle *et al.* , 2004).

I.3. Intérêt des métabolites secondaires

Comme les bactéries possèdent des stratégies communes pour la colonisation et l'infection des végétaux, les plantes peuvent synthétiser un grand nombre de molécules organiques complexes qui n'interviennent pas dans le métabolisme énergétique et carboné. Ces substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi-synthèse (Bahorun , 1997).

Ces substances peuvent être également utilisées comme régulateurs du fonctionnement cellulaire et développent des mécanismes de défense pour lutter contre les infections par différents agents phytopathogènes, ou en réponse aux éliciteurs abiotiques (Hammerschmidt, 1999 ; Macheix *et al.* , 2005). Il s'en suit une stimulation de la synthèse de *novo* d'un mélange complexe des métabolites secondaires ou les phytoalexines (Harbone et Willims ,2000) ; en

induisant l'activation et l'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans leur biosynthèse (Hoffmann, 2003).

Nombreux chercheurs ont testé l'activité antibactérienne des extraits bruts de plantes ainsi que de leurs substances pures sur de nombreuses souches bactériennes pathogènes (Simoes *et al.* , 2009). Ces études ont montré que l'activité antibactérienne des métabolites secondaires est liée à la diversité de leur structure chimique (Gibbon , 2004). En effet, le niveau de synthèse des composés phytochimiques de défense augmente fortement après les infections de plante (Tegos *et al.* , 2002). Vu la diversité et la variabilité des métabolites secondaires issus de plantes, une étude détaillée sera consacrée uniquement pour l'olivier et le caroubier qui font l'objet de notre étude.

II. *Olea europaea* L

II.1- Généralités

L'olivier est cultivé depuis près de 3500 ans, le nom scientifique de l'arbre *olea* vient d'un mot grec qui signifie «huile». L'olivier est une plante qui a accompagné le développement de la civilisation méditerranéenne, il est connu pour sa longue durée de vie (en moyenne 500 ans), cet arbre caractéristique des pays tempérés et tropicaux fait partie des arbres les plus anciennement cultivés (Ryan *et al.* , 2002).

L'olivier constitue dans la plupart des pays du bassin méditerranéen la principale essence fruitière, tant par le nombre d'arbres cultivés que par l'importance sociale et économique de sa culture et son rôle environnemental rapporté par (Brhadda *et al.* , 2003).

Les marqueurs moléculaires rendent possibles l'étude de la structure génétique des cultivars, des flux géniques et des relations entre la forme cultivée et sauvage. L'analyse de la diversité actuelle de la sous espèce «europaea » d'*Olea europaea* permet de déterminer les mécanismes qui ont conduit à cette diversité. Des études archéobiologiques et génétique des populations d'oléastres et des variétés d'olivier montrent que la domestication s'est produite indépendamment dans plusieurs régions du bassin méditerranéen, et c'est très probablement réalisée sur une longue période (Breton, 2006).

II.2. Classification botanique

Selon Cronquist. (1981), la classification botanique de l'espèce *Olea europaea* L est :

Règne : Plantae

Embranchement : Magnoliophyta

Sous-embranchement : Magnoliophytina

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Asleridae

Ordre : Scrophulariales

Famille : Oleaceae

Genre : *Olea*

Espèce : *Olea europaea* L.

Nom français: Olivier

Nom local: chajaret azzeitoun

II.3- Les sous espèces d'*Olea europaea*:

L'olivier pour des raisons culturelles (tradition, paysage) et économiques (huiles et olives) représente un très bon exemple de biodiversité, il forme dans la sous espèce «europaea» d'*Olea europaea* un ensemble complexe de formes cultivées. Dans certaines régions il coexiste avec une ou plusieurs des 5 sous espèces: **Laperrinie**, **Maroccana**, **Cerasiformis**, **Guanchica** et **Cuspidata**. Ces sous espèces elles sont proches morphologiquement (Villemur et Dosba , 1997).

II.4. Caractères morphologiques et répartition géographiques

L'olivier, est l'un des arbres fruitiers, qui fait partie de la famille des oléacées, cultivé depuis l'antiquité et compte de nombreuses variétés (Breton , 2006). Il s'agit d'une espèce d'*Olea europaea* L, commune des régions méditerranéennes et couvre 8 millions d'hectares (presque 98% de la récolte mondiale) (Pereira *et al* ., 2007). Il est cultivé dans beaucoup d'autres pays, comme les Etats Unies (Californie), Australie, la Chine, l'Afrique du sud, ainsi que dans d'autres régions chaudes et subtropicales (Altinyay *et al* ., 2006). Sa taille peut atteindre 10 m. Ses tiges, portent des feuilles, opposées, subsessiles, entières et coriaces, ont une face supérieure gris verts et une face inférieure blanchâtre Les rameaux portent à leurs extrémités de petites fleurs blanc verdâtre, déposées en grappes et à fruits verts ovoïdes devenant noirs à maturité (Bruneton, 1999).

II.5. Composition chimique des feuilles

La Composition chimique des feuilles varie en fonction de nombreux facteurs (variétés, conditions climatiques, époque et prélèvement). Généralement, la matière sèche des feuilles vertes se situe autour de 50 à 58%, celle des feuilles sèches autour de 90%. La teneur en matières azotées totales des feuilles varie de 9 à 13%, elles ont moins de cellulose et hémicellulose et plus de lignine (Nefzaoui, 1987).

Le tableau I résume les principaux métabolites secondaires présents dans les feuilles d'oliviers, parmi lesquels: les flavonoïdes (lutéoline, quercétine...), les secoiridoides (oleuropeine, lughstroside...) et les acides phénols tels que l'acide caféique, les acides p-coumarique et chlorogénique (Ryan et *al.* , 2002 ; Yaseen-Khan et *al.* , 2007).

Le composé le plus abondant dans les extraits méthanoliques et éthanoliques des feuilles d'olivier est l'oleuropeine, qui en représente jusqu'à un 19% du poids sec dont la structure est présentée dans la figure1 (Winkhausen et *al.* , 2005). Ce dernier est un groupe spécifique de coumarine, produit par le métabolisme secondaire des terpènes, il est considéré comme un précurseur de la synthèse des alcaloïdes indoliques (Solar-Rivas et *al.* , 2000 ; Tripoli et *al.* , 2005).

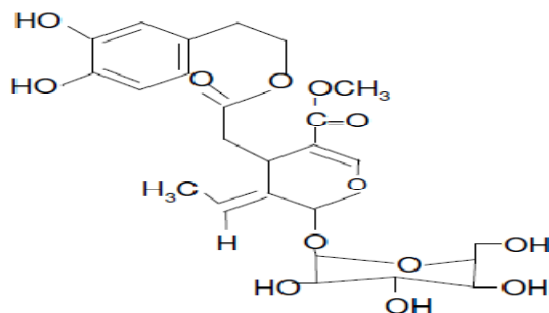


Figure.1: Structure chimique de l'oleuropeine hétérosidique

D'autres constituants ont été aussi identifiés dans les feuilles d'olivier, il s'agit des dérivés de l'oleuropeine, des flavonoïdes, des acides phénoliques et des triterpènes tel que l'acide oléanolique, l'acide ursolique, l'uvaol et le méthyl maslinate (Sanchez et *al.* , 2007), ainsi que des glycosides de l'apigénol et de lutéolol (Bruneton, 1999), et des tannins (Martin-Garcia et *al.*, 2003 ; Chebbi et *al.* , 2011).

Tableau I: Principaux composés phénoliques, secoiridoides et triterpènes, identifiés dans les feuilles d'*O. europaea* L.

Classe	Composés	Référence
Acides phénoliques	Acide caféique, Acide p-coumarique, Acide chlorogénique, Acide vanillique, Verbascoside, Vanilline	Rayan et Roberds , 1998 ; Mc donold <i>et al</i> ., 2001 ; Ghedira,2008 ; Dekanski <i>et al</i> .,2009
Flavonoides hétérosidiques	Lutéoline 7-O glucoside, Lutéoline 7-O-glucoside, Lutéoline 4'-O-glucoside Lutéoline 7-O-rutinoside, Apigénine-7-O-glucoside, Hespéridine, Rutine Anthocyanidine , Cyanidine 3-O-glucoside), Diosmétine-7-glucoside	Benavente-Garcia <i>et al</i> ., 2000 ; Bianco <i>et Uccella</i> ,2000 ;Ryan <i>et al</i> .,2000.
Flavonoides aglycones	Apigénine, Lutéoline, Quercétine, Kaempferol, Hesperitine, Anthocyanine (Cyanidine), Chalcone, Myricétine, Diosmétine, Catéchine	
Triterpènes	Acide oléanolique, acide maslinique, acide hydroxy-oléanolique	Bisignano <i>et al</i> ., 2001 ; Somova <i>et al.</i> , 2003 ;
Sécoiridoides Ou iridoides	Oleuropeine, acide élénolique, demethyloleuropeines hydroxytyrosol, 11-diméthyle- oleuropéoside, ligustroside, oleuroside, oléacine	Briante <i>et al</i> ., 2002 ; Briante <i>et al</i> ., 2004 ; Ghedira, 2008

II.6- Intérêt thérapeutiques des feuilles d'olivier:

Dans l'antiquité les feuilles d'olivier étaient déjà utilisées pour soigner les blessures cutanées, l'ancienne médecine grecque à l'origine de la médecine occidentale connaissait déjà ses vertus antiseptiques et anti-infectieuse. Avec l'avènement de la médecine clinique moderne, cet extraordinaire remède naturel tomba malheureusement en désuétude comme la plupart des traitements d'origine naturelle; Depuis quelques dizaines d'années ces derniers sont utilisés de nouveau car les antibiotiques ne sont plus considérés comme les tous puissants remèdes qu'ils étaient censés être. Les principales études menées sur les feuilles d'olivier concernent principalement les propriétés d'un de leur constituant: oleuropeine. Ces essais confirment les effets d'extrait d'olivier sur les infections virales, fongiques et bactériennes (Baycin *et al.* , 2007).

Des évidences suggèrent que boire une infusion de feuille d'olivier a été une méthode employée depuis plusieurs siècles par les cultures du Moyen Orient pour traiter les troubles tels que la toux, les gorges sensibles, les cystites et les fièvres (Yasseen Khan *et al.* ,2007). De plus, les feuilles d'oliviers étaient utilisées en cataplasme pour traiter les brûlures, les éruptions, et les autres problèmes de peaux. En 1854, Handbury publie un article relatant les vertus d'une décoction de feuilles d'oliviers qui réduisait la fièvre due aux maladies sévères (Petkov et Manolov , 1972). L'olivier est doté de nombreuses propriétés biologiques et thérapeutiques.

II.6.1. Activité antimicrobienne:

Les essais *in vitro* ont montré que les extraits des feuilles d'*O.europaea* L sont très efficaces contre un grand nombre de bactéries qui parasitent le système digestif, les voies respiratoires et divers organes incluant, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* ,*Klebsiella pneumonia* et *Escherichia coli* et *Bacillus cereus* (Bisignano *et al.* , 1999 ; Caturla *et al.* , 2005) Plusieurs secoiiridoides de cette espèce, semblent contribuer à l'activité antimicrobienne ; l' hydroxytyrosol et l'oleuropeine par exemple, se sont révélé efficaces contre les bactéries, champignons et virus (Juven *et al.* , 1972 ; Bisignano *et al.* , 1999 ; Saavedra *et al.* , 2010).

L'extrait de feuilles d'olivier peut avoir un rôle de régulation de la composition de la flore gastrique en réduisant sélectivement les niveaux des *Helicobacter pylori* et *C.jejuni*, les métabolites de biophénols peuvent avoir une meilleure activité antibactérienne que les composant non métabolisés, signifiant que les essais *in vitro* peuvent sous-estimer l'activité totale (Sudjana *et al.* , 2009).

En 1968, des recherches publiées par la société américaine de microbiologie indiquent que les composants actifs de l'oleuropeine, l'acide élénol et l'enolate de calcium inhibent la croissance des différents virus (Zaher *et al* 2007 ; Micol *et al* ., 2005 ; Bao *et al* .,2007 ; Yamada *et al* .,2009) . D'autres études ont montré que l'extrait de feuilles d'olivier a un potentiel d'activité antivirale contre les virus d'hépatite, rotavirus, les rhinovirus bovine et les paravovirus canine (Fredreckson, 2000). En outre, ce deux composés majoritaires des feuilles d'olivier agissent en inhibant aussi bien la fusion entre les deux membranes, la membrane cellulaire et celui du virus HIV-1, comme ils peuvent inhiber également l'activité de l'intégrase de ce virus (Lee-Huang *et al.*, 2003 ; Lee-Huang *et al* ., 2007 a et b).

L'activité antifongique.in vitro a été mise en évidence en présence de composés phénoliques, aglycone de quercétine et de lutéoline, rutine, oleuropeine, et tyrosine par simple observation microscopique. En effet, ces composés phénoliques affectent la croissance, morphologie et l'ultrastructure des mycètes: tels que *Phytophthora mégasperma*, *Drechsler* et *cylindrocarpon destructans* (Baidez, 2007). D'autres études ont montré que ces composés peuvent réduire la production de toxines d'*Aspergillus flavus* (Delrio *et al* ., 2000) . Par ailleurs les travaux menés par Korukluoglu *et al* , (2007) avec les extrais aqueux de feuilles d'olivier et 7 composés phénoliques (l'acide 4-hydroxybenzoïque, acide vanillique, acide p-coumarique, tyrosol, acide caféique, acide syringique et oleuropéine) montré un effet spectaculaire sur 10 souches fongiques .

II.6.2. Propriété antioxydante

Les extraits des feuilles d'olivier, jouent un rôle important dans la prévention des maladies cardiovasculaires, particulièrement l'artériosclérose et l'hypocholestérolémie, comme ils diminuent l'oxydation des LDL et en inhibant la peroxydation des lipides plasmatiques (Bennani-Kabchi *et al* ., 1999). Ces effets, sont dus aux propriétés antioxydantes d'oleuropeine et d'hydroxytyrosol, qui possèdent une forte activité antioxydante, et une excellente activité scavenger de l'oxygène actif (Andrikopoulos *et al.*, 2002 ; Bouaziz *et al* ., 2008 ; Jamaia *et al* ., 2008 ; Lee *et al* ., 2009 ; Hayes *et al* ., 2009 ; Bulotta *et al* ., 2011 ; Fleming *et al* .,2011). L'acide caféique à été également rapporté pour avoir une activité scavenger de l'anion superoxide (Chimi *et al.*, 1995). Des recherches montrent que les composants polyphénoliques du régime méditerranéen empêchent les événements biochimiques qui sont mis en cause dans

la maladie athérogène, de ce fait proposant un nouveau lien entre le régime méditerranéen et la prévention de la maladie coronarienne (Visioli et Galli, 1998).

II.6.3. Propriété vasodilatatrice et hypertensive

Il a été démontré sur des rats (*per os*), qu'une décoction de feuilles d'olivier, augmente le débit sanguin au niveau coronarien, et inhibe ainsi l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Hansen *et al.*.,1996); cette activité est attribuée essentiellement à l'oleuropeine, aux tritérpènes (acide oléanolique) et aux produits d'hydrolyse enzymatique des secoiridoides (Zarzuelo *et al.*., 1991 ; Khayyal *et al.*., 2002 ; Perrinjaquet -Moccetti *et al.*.,2008). Des études cliniques ont montré qu'un traitement par des infusions de feuilles d'olivier entraîne une stabilisation de la tension artérielle chez des sujets présentant une hypertension modérée (Haris ,2010).

II.6.4. Activité antidiabétique

L'activité hypoglycémique des feuilles d'olivier a été mise en évidence chez des lapins diabétiques. En effet, l'extrait éthanolique de feuilles d'olivier administré à ces lapins induit la diminution du taux de glucose du sang (Al-Azzawie et Alhamdani , 2006).

L'effet hypoglycémiant est du à la présence d'euloropeine, qui pourrait agir soit en stimulant l'utilisation périphérique du glucose soit en favorisant la libération d'insuline induite par les cellules β (Fahri *et al.*., 1994).

Un autre composé, l'acide olealonique possède également une action antidiabétique puissante, il agit sur l'enzyme α -glucosidase, cette enzyme hydrolyse les disaccharides et oligosaccharides en glucose. Les inhibiteurs de cette enzyme retarderaient la digestion d'hydrate de carbone et entraîneraient une réduction du taux d'adsorption du glucose et par conséquent la glycémie. L'inhibition de α -glucosidase est de ce fait considérée importante dans la gestion du diabète non-insulino dépendant (Shaiq ali *et al.*., 2002).

II.6.5. Activité anti-inflammatoire

L'oleuropeine et l'un de ses dérivés des catéchol hydroxytyrosol, empêchent la génération du leukotriène B₄ impliqué dans un éventail de voies pro-inflammatoires aussi bien que la production d'eicosanoïde (Petroni *et al.*, 1995).

La lutéoline est également un composé clé, qui a montré l'activité anti-inflammatoire chez certains types d'animaux, et des effets antiallergiques. L'apigénine est présente aussi dans les feuilles en empêchant les médiateurs inflammatoires : tels que l'oxyde nitrique et la prostaglandine E₂ (Braun, 2005).

Les tritérpènes (acide ursolique et acide oléanolique) sont des puissants agents anti-inflammatoires capables d'inhiber l'élastase leucocytaire humaine ainsi que l'activité de la COX-2 et LOX-5 (Honda *et al.*, 2000).

II.6.6. Activité antiulcérogène:

Les flavonoïdes présents dans les feuilles d'olivier jouent un rôle protecteur de la muqueuse gastrique contre divers agents ulcérogènes. Une activité anti-ulcérogène de la quercétine a été également mise en évidence chez un rat dont l'ulcère gastrique a été induit par l'éthanol. Les effets cytoprotecteurs de la quercétine sont dus à un complexe impliquant la stimulation de la prostaglandine et l'inhibition de la production de leukotriènes via la production du mucus (Ghedira, 2005).

II.6.7. Activité anticancéreuse:

L'activité anticancéreuse des extraits de feuilles d'olivier est due à la présence de quercétine qui inhiberait la croissance cellulaire en inhibant certaines phases du cycle cellulaire et en bloquant les sites récepteurs des hormones. La multiplication cellulaire peut être inhibée également par d'autres mécanismes, à savoir : la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression des gènes et la réduction des radicaux libres (Marfak, 2003).

D'autres études ont montré que l'oleuropeine, l'hydroxytyrosol, l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique possèdent également une activité anticancéreuse efficace, directement en perturbant les filaments d'actine. L'oleuropeine empêche la prolifération, la migration des cellules tumorales, leur réplication, leur mobilité et leur invasion. (Hamdi et Castellon, 2005 ; Fernando *et al.*, 2009 ; Bouallaoui *et al.*, 2011). Alors

que l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique peuvent bloquer la nitrosation des amines soit par réduction du nitrite en oxyde nitrique, soit par formation de dérivés C-nitroso en agissant non seulement in vitro, mais également in vivo. Ces composés possèdent des activités antioxydantes et antiradicalaires (Bossokpi, 2003).

II.6.8. Autres propriétés

D'autres vertus ont été démontrées pour cette espèce. Les feuilles d'olivier améliorent tout particulièrement le Système Immunitaire grâce à ses puissants constituants qui neutralisent sans endommager les bactéries non pathogènes. Elles ont une activité sur la thyroïde. Une étude récente a montré que l'extrait de feuilles d'olivier diminue le taux de TSH sanguin avec une augmentation de la T3 probablement due à une stimulation de la 5'-diodinase qui convertit la T4 en T3 (Al-Quarawie et al., 2002).

L'olivier fait d'ailleurs partie de plusieurs pharmacopées locales (Dekanskl et al., 2009). Il joue également un rôle important au niveau nutritionnel. Les utilisations thérapeutiques des différents organes d'*Olea europaea* L sont répertoriées dans (Annexe IV).

III. *Ceratonia siliqua* L

III.1. Classification botanique

Selon Cronquist. (1981), la classification de *Ceratonia siliqua* L. est donnée comme suit :

Règne : végétal

Embranchement : Spermaphytes

S /embranchement : Angiospermes

Sous classe : Rosidae

Ordre : Fabals

Genre : *Ceratonia*

Famille : Fabacées

S/ famille : Césalpiniacées

Nom binominal : *Ceratonia siliqua*

Nom français: Caroubier

Nom local: Kharroub

III.2.Caractères morphologiques et répartition géographiques

Le mot caroubier dérive du mot caroube « Alkharoub », et il est connu sous le nom scientifique *Ceratonia siliqua* L, qui désigne en latin une silique ou gousse, c'est est un arbre qui appartient à la famille des légumineuses qui peut atteindre 7 à 20 m de hauteur (Rajeb , 1995).

Les feuilles de caroubier de 10 à 20 cm de hauteur, persistantes, composées (4 à 10 folioles glabres), luisantes sur la face dorsale, plus clair et mates sur la face ventrale, paripennées et légèrement échancrées au sommet.(Bruneton , 1999) .Ses fleurs sont très petites, constituées d'un calice pourpre, dépourvu de corolle et bisexuées (Battle et Tous , 1997).

Les fruits de caroubier sont des gousses indéhiscentes, aux bords irréguliers, de formes allongées, rectilignes ou courbées, 10 à 20 cm de longueur, 1,5 à 2 cm de largeur et de 1 à 1,5 d'épaisseur. La gousse est composée de trois parties, l'épicarpe, le mésocarpe constituant la pulpe et les graines, elle est séparée à l'intérieur par des cloisons pulpeuses transversales et renferme de 4 à 16 graines. Le développement des fruits est lent et nécessite généralement entre 9 à 10 mois pour arriver à maturité et donner un fruit brun foncé à noir (Rejeb et Lauguet , 1991) .

III.3. Composition chimique

Les deux constituants principaux du caroube sont la pulpe (l'épicarpe et le mésocarpe) 90% et 10%graines (Owen *et al.*, 2003). Les graines de fruits contiennent près de 90 % de gallactomananes, elles sont pauvres en lipides (0 ,4- 0,8%de la masse sèche) et en protéines (2,7-3%), renferme 40-50% de sucre soluble, des cyclitols (surtout de pinitol) et des tannins condensés(20%) (Bruneton, 1999).

Les composés phénoliques présents dans la pulpe de caroube se groupent en acides phénoliques, en effet, les gosses mures sont très riches en acides galliques sous différentes formes ;acide gallique sous forme libre, gallocatéchine , gallocatéchine gallate et galloctannins ; d'autres acides phénoliques sont également présents , citons les acides p-coumariques, benzoïque, 4-hydroxy benzoïque, acide protocatéchique, féruliques et syringiques , (Owen *et al.* , 2003 ; Fadel *et al.* , 2011). En plus, l'extrait de caroube contient également des flavonols sous forme glucoside (quercétine-myricétine et kaempferol) (Owen *et al.*, 2003).

Les tannins condensés sont présents en quantité abondante dans le fruit et les feuilles de *Ceratonia siliqua L* en comparaison avec les tannins hydrolysables représentés par les éllagitannins et les gallotannins (Corsi *et al.*, 2002), en effet, une gosse de caroube contient, en moyenne, 19 mg de polyphénols totaux par gramme de matière fraîche, 2,75 mg / g de tannins hydrolysable (Avallone *et al.* , 1997).

Les résultats confirmés par Corsi et ses collègues, (2002) et Jacob et Saeed ,(2006), affirment que les feuilles de *Ceratonia siliqua L* contiennent une quantité importante d'acide gallique et en flavonoïdes tel que épigallocatechine-3-O-gallate, épicatechine-3-gallate et myricetine par rapport aux extraits de la caroube. En plus des molécules citées précédemment, les travaux menés par Eldahsan, (2010) ont montré que les feuilles de *C .siliqua L* contiennent d'autres composés flavonoidiques hétérosidiques tel que l'isoquercétine, l'afzeline et la quercitrine et des flavonoïdes aglycones tel que le kaempférol et la quercétine.

III.4.Utilisations traditionnelles et propriétés biologiques

Ceratonia siliqua L est parmi les espèces qui possèdent des propriétés thérapeutiques et diététiques importantes (Ait chitt *et al.* , 2007) . Elle se présente également comme une essence forestière et arboricole. Il est d'une grande importance économique, écologique et sociale. Son utilisation est multiple et résumée dans le tableau II (Konaté , 2007).

Tableau II : Propriété traditionnelles et pharmacologiques de *C. siliqua* L

Organe	Partie utilisés	Propriétés traditionnelles et biologiques	Référence
Fruit	Pulpe	Traitement des troubles fonctionnelles digestifs, traitement des diarrhées légères, abaissement du cholestérol sanguin et hépatique, otation la sensation de fain dans les régimes amaigrissantes, traitement de l'insuffisance rénale chronique et l'affection de la branche, traitement de la tuberculose pulmonaire Traitement de la gastrite, l'entérite, les angines, les rhumes et le cancer	Rejeb , 1995 Zunft <i>et al</i> ., 2001 Klenow , 2008 Klenow , 2009
	Graine	Traitement symptomiques des diarrhées du nourrisson et du jeune enfant Activité antioxydante	Bruneton, 1999
	Feuilles	-Diabète -Activité anti-microbienne, -Activité cytotoxique -Activité antioxydante -Activité anticancéreuse -Peroxydation des lipides	Kivçak <i>et al</i> ., 2002 ; Kumzawa <i>et al</i> ., 2002 ; Geuendel <i>et al</i> ., 2006 ; Kaileh <i>et al</i> ., 2007 ; Custódio <i>et al</i> ., 2009 ; Elhajaji <i>et al</i> ., 2010 ; Nagib <i>et al</i> ., 2010 ; Ben Hsouna <i>et al</i> ., 2011 a) ; Custódio <i>et al</i> ., 2011 a b)

IV. Erwinia pectinolytiques

IV.1. Description des *Erwinia* pectinolytiques

Ce sont des bactéries gram-négatives, non sporulées, en bâtonnet droit de 0.5 à 1.0 par 1.0 à 3.0 μm . Les cellules sont mobiles et possèdent 1 à 6 flagelles péritriches. Elles peuvent se présenter seules ou par paires ou quelquefois en courtes chaînes. Elles se caractérisent par un métabolisme fermentatif, le type respiratoire est aéro-anaérobie-facultatif, oxydase négative, catalase positive et réduisent le nitrate en nitrite. La température optimale de croissance se situe entre 27 et 30 à 32°C (Molina et Harrison, 1977 ; Pérombelon et Kelman, 1987 ; Janse et Ruissen, 1988 ; De Boer 1994). La température maximale varie de 32 à 42°C. Ces bactéries possèdent une forte activité pectinolytique due à la production d'enzymes pectinolytiques.

Face aux évolutions et aux différents changements qui ont eu lieu dans la nomenclature, les *Erwinia* pectinolytiques ont changé de dénomination.

- L'espèce: *E. carotovora* appartient au genre *Pectobacterium* et la sous espèce *carotovororum atrosepticum* est déplacé au rang de l'espèce (*P. atrosepticum*) (Gardan *et al.*, 2003)

- Et l'espèce *E. chrysanthemi* au genre *Dickeya* (Samson *et al.*, 2005)

P. atrosepticum est l'agent responsable de dégâts économiquement importants sur la pomme de terre dans les régions tempérées (Mollina et Harrison, 1977; Pérombelon et Kelman 1987), en raison de son fort pouvoir macérateur du tubercule. Elle se développe préférentiellement entre 15 et 25°C (Pérombelon et Kelman, 1987). *Pca* est généralement considérée comme inféodée à la pomme de terre (Pérombelon et Kelman, 1987) bien que quelques souches aient été également isolées de tomate (Barzic *et al.*, 1976; De Boer *et al.*, 1987), de choux chinois (De Boer et Khalmen, 1975) et plus récemment de poivron (Stommel *et al.*, 1996; Hadas *et al.*, 2001).

IV. 2.Description des symptômes en conservation

Les bactéries des genres *Dickeya* et *Pectobacterium*, provoquent des symptômes associés à des maladies de la pomme caractérisées par les pourritures aériennes et pourritures molles (Figure 2). Ces maladies ont une forte incidence économique, car elles sont particulièrement nuisibles au rendement et à la qualité de la pomme de terre. Pour la production de plants certifiés, la présence de ces bactéries constitue un facteur extrêmement limitant.



Figure.2 : Pourriture molle et humide causée par *Pectobacterium* sp. (Helias, 2008)

La pourriture molle est l'unique symptôme observé au cours de la conservation des tubercules de pomme de terre, dont le développement dépend de la température d'incubation. Cependant, à côté des *Erwinia*, d'autres bactéries pectinolytiques (*Clostridium* et *Bacillus* sp) ainsi que des champignons *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Verticillium dahliae*) peuvent aussi contribuer à ce type de symptômes (Pérombelon et Kelman , 1987).

Sur tubercule, la pourriture molle commence à partir du stolon et se développe jusqu'à sa désintégration totale. La capacité de germination du tubercule est altérée. La pourriture peut également se développer à partir des lenticelles hébergeant le pathogène (Lapwood et Hering, 1968; Pérombelon, 1974; Scott *et al.*, 1996) ou à partir des blessures du tubercule envahies par le pathogène (De Boer et Kelman 1975; De Boer 1994). Un excès d'eau dans le sol ou une humidité excessive durant la conservation, peut, en favorisant la multiplication des bactéries latentes et leur expression, entraîner des pourritures lenticellaires (De Boer 1994).

IV. 3.Description des symptômes en végétation

Le symptôme le plus typique en végétation est l'apparition de la jambe noire, caractérisée par une pourriture noire plus ou moins humide de la base de la tige, due au développement des bactéries (Figure 3). Elle est causée par *P. atrosepticum*, bien que certains auteurs rapportent que les symptômes de jambe noire pourraient dans certaines conditions, être également causés par *Dickeya*. (Lumb *et al.*, 1986) et *P. carotovorum* (Mollina et Harrison , 1977). Le facteur le plus important qui favorise le développement de la jambe noire, est le niveau d'eau de précipitation et/ou d'irrigation qui entraîne les conditions

anaérobies dans les tubercules mères, favorisant la multiplication des bactéries et l'apparition de la pourriture et par la suite de la jambe noire (Pérombelon *et al.* ,1989; Pérombelon , 2002).

Dans certains cas, les tubercules de semences infectés peuvent disparaître sans production de plants. L'invasion des tiges par les *Erwinia*, juste après leur émergence, peut entraîner la pourriture et la mort de la plante entière (Pérombelon , 1992). La maladie peut donc se caractériser par des pieds manquants (Harrison et Neilson , 1981; Jaggi *et al.* , 1991).

Contrairement à la jambe noire, Les pourritures aériennes de la tige (Shekhawat *et al.*, 1976), caractérisées par une lésion brune ou noire de la tige, se développent à partir d'inoculum transmis par l'air ou l'eau, Cette contamination se fait à travers des blessures de la tige portant une infection latente et ne survient qu'en condition humide. (Grahams et Harper , 1966 ; Pérombelon , 2002).

Maladie sournoise, la jambe noire peut échapper aux contrôles des filières de certification. Les symptômes typiques de jambe noire sont généralement causés par *Pectobacterium atrosepticum* (*Pca*), qui affectionne un climat frais (20–25 °C) et humide. *Pectobacterium carotovorum carotovorum* (*Pcc*) joue un rôle moins important dans l'apparition de la jambe noire dans les climats tempérés bien que les travaux récents d'Eiss *et al.* (2008) ont prouvé que l'infection des tubercules par des souches virulentes de *Pcc* engendre bien une jambe noire. Il n'existe pas de mesures de lutte directe contre ces bactéries. La prévention met en œuvre des mesures dont le but est de rendre la vie dure aux bactéries, en diminuant le niveau de l'inoculum et la transmission de la maladie.



Figure .3 : Symptôme de jambe noire, variant de pourritures humides brun foncé à noire de la base des tiges à des nécroses plus ou moins sèches et/ou tiges creusés (Helias, 2008).

Matériel et Méthodes

V. Matériel végétal

V.1. Préparation du matériel végétal

V.1.1. Collecte des échantillons

Les feuilles et fruits (pulpe et graine) de *Ceratonia siliqua* L et les feuilles d'*Olea europaea* L (variétés "Aimel" et "Chamlal") sont utilisés comme matériel végétal.

Les feuilles et le fruit de *Ceratonia siliqua* L proviennent de la région de Tizinbradma (Kherrata, Wilaya de Bejaia). La collecte a été faite au début de septembre 2009.

Les feuilles d'*O. europaea* L ont été récoltées au début de mars 2010 dans la ferme pilote A. Mira (Tazmalt), wilaya de Béjaia.

V.1.2.Séchage

Les feuilles de chacune des plantes et le fruit de *Ceratonia siliqua* L, préalablement nettoyés (élimination la poussière et autres particules indésirables), ont subi un séchage à l'air libre, dans un endroit sec, ventilé et ombragé .Les fruits de *Ceratonia siliqua* L ont fait l'objet d'une séparation manuelle entre pulpes et graines.

V.1.3.Broyage

Tous les substrats végétaux ont été broyés pour obtenir une poudre de 0,5 mm de diamètre des particules. Les graines du fruit de *Ceratonia siliqua* L ont été d'abord concassées puis écrasées à l'aide d'un mortier traditionnel.

Les poudres ainsi obtenues sont conservées dans des bocaux en verre, fermés hermétiquement et stockés à l'abri de la lumière.

Les échantillons utilisés dans notre étude sont les suivants : les feuilles d'*O.europaea* L (variétés "Aimel" et "Chamlal"), les feuilles et de *C.siliqua* L, les pulpes et graines de *C.siliqua* L.

V.2.Extraction des composés phénoliques

Deux protocoles d'extraction (solide/liquide) ont été utilisés : Le protocole d'extraction à reflux décrit par la monographie de la pharmacopée européenne (2008) et la méthode d'extraction par macération décrite par Mazza *et al*, (1999).

V.2 .1. Extraction à reflux

5 g de poudre sont extraites avec 50 ml de méthanol absolu dans un ballon à col rodé de 50 ml ; l'ensemble est chauffé à reflux pendant 15 min. Après refroidissement, Les extraits sont ensuite filtrés.

V.2 .2. Extraction par macération

La deuxième méthode d'extraction repose sur la méthode décrite par par Mazza *et al.* (1999) et rapportée par (Oomah *et al*, 2005 ;Oomah *et al*, 2006), nous avons utilisé de l'acétone 92% et le méthanol 92% comme solvants.

250 mg de la poudre de chaque échantillons ont été extraits avec 10 ml de solvant (acétone ou méthanol 92%), pendant 2h sous agitation et à température ambiante. Après filtration, les filtrats sont récupérés dans des cristallisoirs, puis séchés à température ambiante sous hotte ; les extraits sec obtenus ont été repris dans un mélange éthanol-eau (80 /20) et serviront d'extraits bruts pour le dosage des phénols totaux et des flavonoïdes.

V. 3. Dosage des composés phénoliques

V. 3.1.Dosage des phénols totaux

La quantité de polyphénols totaux solubles est déterminée selon la méthode de Singleton et Rossi (1965) .

- **Principe**

La réaction est basée sur la réduction du mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et de l'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) du réactif de Folin Ciocalteu, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu de Tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) dans une solution alcaline (Ribéreau-Gayon, 1968). La coloration bleue produite est proportionnelle au taux de composés phénoliques qui sont dosés spectrophotométriquement à 760nm .

- **Mode opératoire**

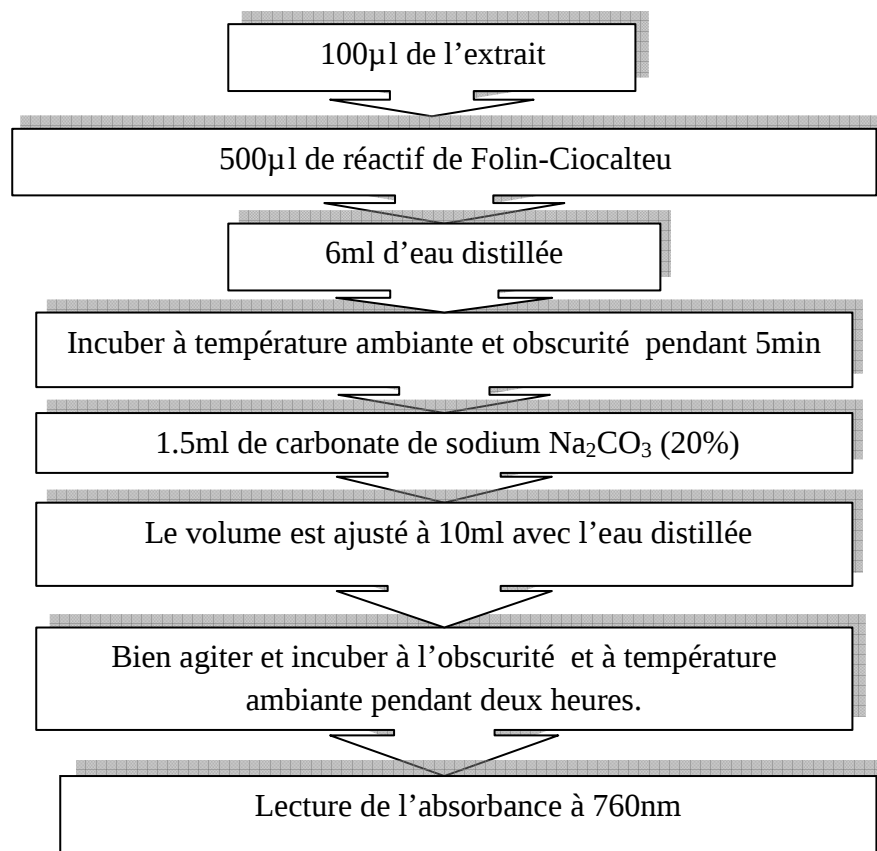


Figure.4: Protocole de dosage des composés phénoliques (Singleton *et al.*, 1965)

Les résultats sont rapportés à une courbe d'étalonnage (annexe I) préparée de la même manière que l'extrait avec de l'acide gallique utilisé comme standard.

Les mesures sont réalisées en triple ; la teneur de l'extrait en polyphénols totaux est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg Eq AG/ g d'échantillon).

V.3.2.Dosage des flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes sont déterminées selon la méthode de Bahorun *et al* (1996).

- **Principe**

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5, susceptible de donner en présence de chlorure d'aluminium un complexe jaunâtre par

chélation de l'ion Al^{3+} . La coloration jaune est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes dans l'extrait.

- **Mode opératoire**

1ml d'extrait est mélangé avec 1ml d'une solution méthanolique de chlorure d'aluminium hydrate (2%). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est mesurée à 430 nm.

La concentration en flavonoïdes est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage préparée de la même manière que l'extrait, en utilisant la quercétine comme standard (annexe I). La teneur moyenne en flavonoïdes est exprimée en mg équivalent de quercétine par gramme (mg Eq Q/ g d'échantillon).

V.4.Fractionnement par CCM des extraits

Seuls les extraits méthanoliques obtenus par la méthode à reflux ont fait l'objet d'un fractionnement. En raison de la différence des teneurs en composés phénoliques et flavonoïdes obtenus à l'issue de deux extractions. En effet, l'extraction à reflux a mis en évidence une quantité plus importante sur les deux substrats.

- **Principe**

Le principal but de cette CCM est la séparation et la récolte de différentes fractions présentes dans l'extrait préparé. Chaque constituant migre à une vitesse qui lui est spécifique et caractéristique à la substance qui détermine son rapport frontal (R_f).

Lorsque la plaque sur laquelle est déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. Chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front de solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption.

- **Supports utilisés**

Des plaques en verre (20 cm sur 20cm) sont préalablement nettoyées au méthanol afin d'éliminer toute substance étrangère susceptible d'être présente. Le gel de silice (40%) est répandue uniformément sur les plaques en verre à l'aide d'un étaleur pour avoir une épaisseur

de 1mm . Les plaques sont séchées à l'air libre , puis activées dans une étuve réglée à 110°C pendant 30 minutes. Les dépôts sont effectués en bas de la plaque à 1,5 cm du bord. Les différents dépôts sont espacés de 1cm en laissant 2cm aux deux extrémités

- **Systèmes d'élution utilisés**

100 ml d'éluant sont versés dans la cuve chromatographique couverte afin que l'atmosphère de la cuve reste saturée en vapeur d'éluant, préparé 2h à l'avance.

9 systèmes d'élution (Tableau III) ont été testés afin de choisir le système le plus adéquat pour la séparation des composés bioactifs des extraits des deux plantes médicinales.

Tableau III : Systèmes d'élution testés (essais préliminaires)

Systèmes d'élution	références
Chloroforme-Méthanol-Acide acétique-Eau (100-15-0,5-0,3)	Benhammou <i>et al.</i> , 2008
Dichlorométhane-Méthanol-eau (85-15-1,5)	<i>Pharmacopée européenne</i> 2008
Dichlorométhane-Acide acétique-Eau (50-45-15)	Guinot <i>et al.</i> , 2008
Ethyle acétate-Méthanol-Eau (100-16,5-13,5)	Fawole <i>et al.</i> , 2009
Ethyle acétate-Méthanol-eau (79 :11 :10)	De Mejia <i>et al</i> 2006
Chloroforme-Méthanol-Acide acétique -Eau (60 :30 :8 :6)	Long <i>et al.</i> , 2009
Ethyle acétate-Méthanol-Acide formique-Eau (100-13,5-2,5-10)	Plazonic <i>et al.</i> , 2009
Ethyle acétate-Acide formique-Acide acétique-eau (51-11-11-27)	De Mejia <i>et al</i> 2006
EA-Dichlorométhane –Acide formique-Acide acétique-Eau (100-25-10-10-11)	Plazonic <i>et al.</i> , 2009

A l'issus de ces essais préliminaires nous avons retenu le mélange Dichlorométhane-Méthanol-Eau (85 :15 :1,5) pour les feuilles d'*O.europaea* L et Ethyle acétate-Dichlorométhane-Acide acétique-Acide formique-Eau (100 :25 :10 :10:11) pour les feuilles, les graines et les pulpes de *C.siliqua* L.

- **Dépôt de l'échantillon**

20 µl de chaque extrait sont déposés à l'aide d'une micropipette en évitant l'étalement du produit ; en parallèle, des standards : rutine, quercétine, acide caféique, acide gallique et acide tannique (10 ul à raison de 5mg/ml) ont été déposés.

- **Développement et élution**

Les plaques chargées d'échantillons sont séchées à l'air libre et déposées dans la cuve qui est fermée immédiatement à l'aide d'un couvercle adhésif. Lorsque l'élution atteint presque le bord supérieur à 1cm, les plaques sont retirées de la cuve et le front du solvant est marqué à l'aide d'un crayon. Après séchage à l'air libre, la révélation des taches est d'abord réalisée sous la lumière UV à nm. le Rf correspondant à chaque tache est calculé.

$$\text{Le rapport frontal (Rf)} = h / H$$

Tel que :

h: Distance parcourue par le constituant

H: Distance parcourue par le solvant

- **Révélation chimique**

Cette révélation consiste à pulvériser la plaque une fois séchée avec une solution de vanilline sulfurique (0,1 g de vanilline + 28 ml de méthanol+ 1 ml d'acide sulfurique). La vanilline permet de détecter les différentes fractions (identifiées par leurs couleurs) après passage des plaques à l'étuve (110°C 10 à 15 mn) .

- **Récupération des fractions chromatographiques**

Les différentes taches correspondantes aux différentes fractions ont été délimitées et récupérées en même temps que la silice à l'aide d'une spatule. Une quantité de méthanol absolue (deux fois le volume de la silice grattée) est ajoutée à ce mélange (fraction + gel de silice) et l'ensemble est agité pendant 15 minutes à la température ambiante. Le surnageant correspondant à la fraction souhaitée est séparé de la silice par centrifugation (4600 tours par mn pendant 15 mn) et conservé à 4°C.

V.5. Activité antibactérienne des extraits et fractions chromatographiques

- **Principe**

La méthode repose sur la diffusion de l'extrait à partir des disques chargés et déposés sur le milieu solide, préalablementensemencés 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 grande est la sensibilité de la souche bactérienne testée vis-à-vis de l'extrait étudié.

- **Mode opératoire**

L'activité antibactérienne des extraits méthanoliques à reflux et leurs différentes fractions chromatographiques a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque décrite par Falleh et al. (2008).

La souche de *Pectobacterium carotovorum* ssp. *atrosepticum* utilisée provient de la Collection Française des Bactéries Phytopathogènes (CFBP) d'Angers, France. Elle est conservée dans le milieu levure Peptone (LPA).

La suspension bactérienne a été préparée à partir d'une culture pure de 18 h à 24h sur milieu King B. Quelques colonies ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine et mises en suspension dans 9ml d'eau distillée stérile. Cette suspension bactérienne est ajustée (ajout de la culture bactérienne ou ajout de l'eau physiologique) jusqu'à obtention d'une densité de 10^8 UFC/ml, correspondant à une DO de 0,1 à 600 nm (Soberon et al., 2006). une dilution décimale (1/100) a été réalisée dans l'eau distillée stérile pour avoir un *inoculum* de 10^6 UFC/ml.

Les surnageants des fractions récupérées sont concentrés sous vide jusqu'à évaporation totale du méthanol et les résidus secs obtenus sont ensuite solubilisés dans 1ml de DMSO stérile. Les extraits méthanoliques sont également solubilisés dans le DMSO stérile à raison de 100 mg/ml. Tous les extraits et les fractions ainsi préparés sont conservés à 4°C.

Le milieu Mueller Hinton (MH) préalablement stérilisé est coulé en boîtes de pétri sur une épaisseur de 4 mm. Après solidification, 1 ml de la suspension bactérienne estensemencée par inondation et l'excès était éliminé à l'aide d'une micropipette. 20 µl d'extraits méthanoliques à reflux ont été déposés sur des disques de papier watman de 6 mm

de diamètre .Quant aux volumes déposés par les fractions, ils varient de 13,6 à 77 μ l afin d'obtenir 1mg/disque, le DMSO stérile est utilisé comme contrôle négatif.

Après 18 à 24 heures d'incubation à l'étuve (28°C), le diamètre des zones d'inhibition auteurs des disques est mesuré au moyen d'un pied à coulisse. Chaque test à été effectué trois fois.

VI. Etude statistique

Le traitement statistique des résultats est effectué par une analyse de variance «ANOVA» et comparaison de moyennes à l'aide du logiciel STATISTIX 7, Les différences sont significatives à ($p < 0,05$).

Résultats et discussion

VII. Résultats et discussions

VII.1.Teneur en composés phénoliques

VII.1.1.Teneur en phénols totaux solubles

Les résultats (figure 5) montrent une grande variabilité de teneur en phénols totaux solubles de nos échantillons liée au substrat végétal lui-même, à la technique d'extraction et au solvant utilisé : 28,7 à 220,7mg Eq AG/g échantillon pour les feuilles de *C.siliqua* L, 18 à 104 pour les feuilles d'*O.europaea* L, 2,5 à 10,9 pour les gaines et 0,25 à 1,06 pour les pulpes de *C.siliqua* L.

Quelque soit la technique et le solvant d'extraction utilisés, les feuilles de *C.siliqua* L s'avèrent significativement ($P<0,05$) plus riches en phénols totaux solubles que les feuilles d'olivier (220,7 contre 85 et 104 respectivement pour Chamlal et Aimel). Les graines et pulpes de caroubier sont les moins riches en phénols totaux solubles.

Quelque que soit l'échantillon considéré, l'utilisation du système à reflux avec du méthanol absolu comme solvant permet une extraction significativement plus élevée ($P<0,05$) des phénols totaux solubles que la technique de macération (méthanol ou acétone aqueux). Les teneurs sont en effet multipliées par 2.8 à 5.2 pour les feuilles d'olivier, par 3.5 à 7.7 pour les feuilles de *C .siliqua* L et par 1.7 à 4.4 pour pulpes et graines de caroube. De même nous notons chez *O.europaea* L, que la variété Aimel est significativement plus riche ($P<0,05$) en phénols totaux solubles que la variété Chamlal lorsque l'extraction méthanolique à reflux ou par macération (avec de l'acétone) est utilisée.

Pour la même technique d'extraction (macération), l'acétone aqueuse extrait plus de composés phénoliques que le méthanol aqueux. Les augmentations enregistrées varient de 59% à 63% pour *O .europaea* L et 121% à 180% pour *C .siliqua* L.

VII.1.2.Teneur en flavonoïdes

Pour les flavonoïdes (figure 6) , nous notons la même variabilité de teneur que pour les phénols totaux solubles : 0,10 à 3,73 mg Eq Q /g d'échantillon pour les extraits de feuilles d'*O.europaea* L, de feuilles et du fruit (pulpe et graine) de *C.siliqua* L.

Les teneurs les plus élevées en flavonoïdes ($P<0,05$) se retrouvent au niveau des extraits de feuilles de *C. siliqua* L (1,16 à 2,03 mg Eq Q/ g d'échantillon), suivi de près par les extraits des feuilles d' *O. europaea* L de la variété « Aimel » (1,01 à 1,93 mg Eq Q / g d'échantillon) et de la variété « Chamlal » qui varient de (0,81 à 1,54 mg Eq Q/ g d'échantillon). Les pulpes du fruit de *C. siliqua* L présentent des teneurs plus faibles (0,01 à 0,03 mg Eq Q/ g d'échantillon) que celles des graines (0,12 à 0,56 mg Eq Q/ g d'échantillon).

Pour la même espèce végétale, l'extraction à reflux s'accompagne d'une augmentation significative ($P<0.05$) des teneurs en flavonoïdes. Ces dernières sont multipliées par 1.5 à 3.2 pour *O.europaea* L, 1.8 à 3.2 pour les feuilles de caroubier et 2.3 à10 pour les graines et pulpes de caroube.

L'acétone s'est avéré également meilleur extracteur que le méthanol dans la technique d'extraction par macération. Les teneurs sont augmentées de 90% pour les feuilles d'*O.europaea* L contre 75% pour les feuilles de *C. siliqua* L; ce sont les graines et pulpes de caroube qui manifestent les plus fortes augmentations : les teneurs en flavonoïdes sont multipliées par 3 à 4.6.

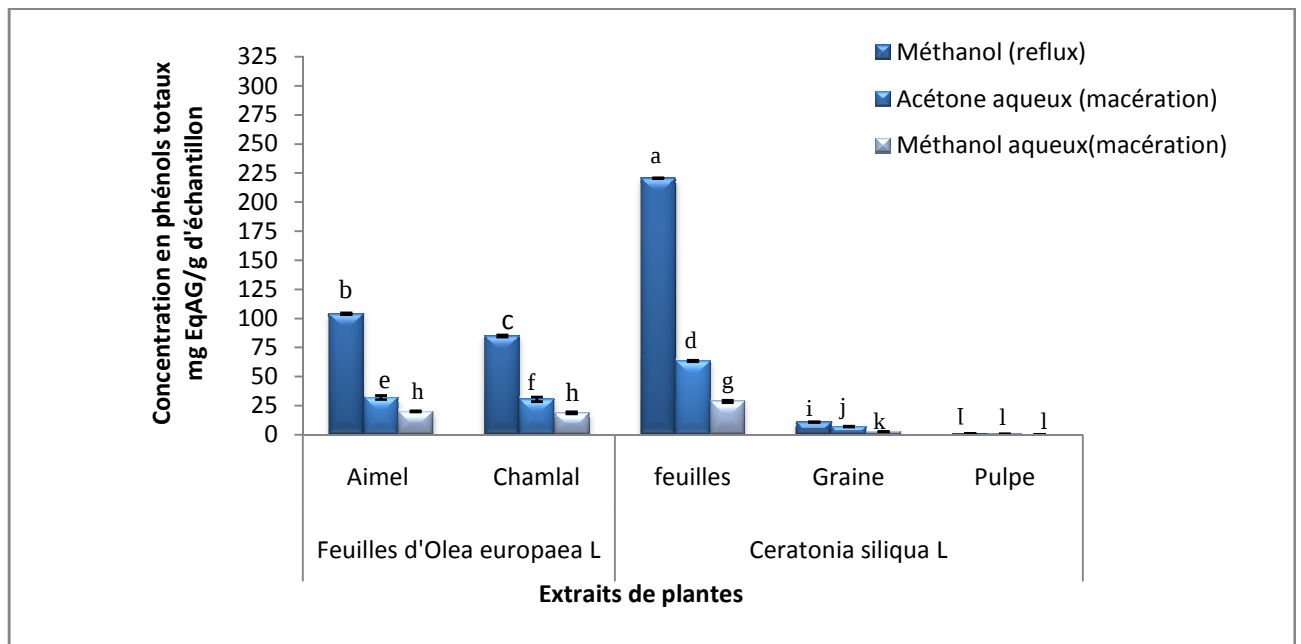


Figure 5. Teneurs en phénols totaux (mg Eq AG /g d'échantillon).

Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes entre elles ($P<0,05$).

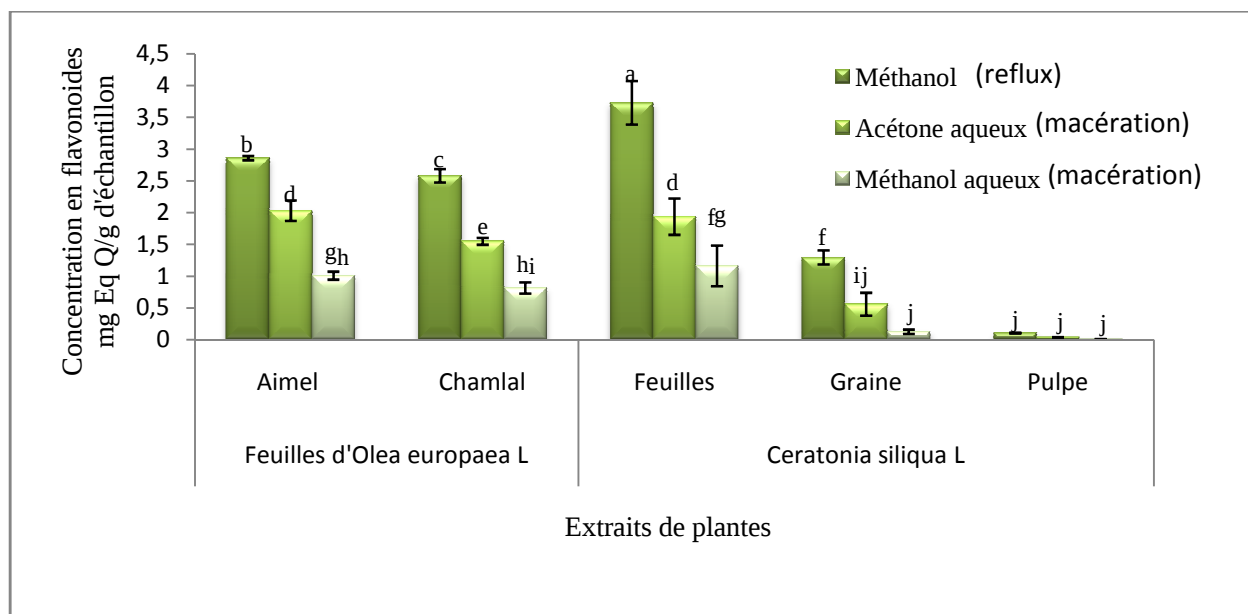


Figure 6. Teneurs en flavonoïdes (mg Eq Q /g d'échantillon)

Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes entre elles ($P < 0,05$).

Discussion

Les différents dosages réalisés confirment la présence de phénols totaux et flavonoïdes. La mise en évidence de telles substances est en accord avec les données de nombreux auteurs pour les feuilles d'olivier (Martin-Garcia *et al.*, 2003 ; Furneri *et al.*, 2004) et pour *C.siliqua* L (Avallone *et al.*, 1997 ; Kumazawa *et al.* , 2002 ; Makris et Kefalas , 2004 ; Silanicove *et al.* , 2006 ; Bastida *et al.*, 2009 ; Gohar *et al.*, 2009).

Les composés phénoliques se répartissent qualitativement et quantitativement avec de façon inégale tant chez les différentes espèces végétales qu'à l'échelle de la plante elle même (Macheix *et al.* , 2005). Globalement, nos données analytiques s'intègrent dans l'intervalle de données rapportées par la bibliographie.

Nos données pour les feuilles de *C.siliqua* L s'accordent avec ceux de Corsi *et al.* (2002), où les teneurs en phénols totaux des feuilles sont plus élevées que celle du fruit. De même, les teneurs enregistrées pour *O.europaea* L sont similaires à celles rapportés par différents auteurs (Skrget *et al.* , 2005 ; Lee *et al.*, 2009). La variabilité de teneurs en phénols totaux et flavonoïdes entre Chamlal et Aimel n'est pas étonnante. Des observations similaires sont notées par Boudhrioua *et al.* (2009) pour la variété *Chetoui* et *Zarrazi* .

Il est difficile de comparer nos données à celles de la bibliographie . Le contenu en composés phénoliques est sous très forte influence liée au végétal et aux conditions d'extraction (Shi *et al.*,2003 ; John *et al.*,2006 ; Contini *et al.* ,2008).

L'extraction n'est pas qu'une étape de transformation de la matière première végétale en un extrait ou un produit pur (Guerrero *et al.*, 1996). Son but est de faire diffuser les composés phénoliques présents dans cette matière végétale dans la phase liquide (Escribano-Baillon et Santos-Buelga , (2003). Ryan *et al.* (2002) notent que l'extraction des composés phénoliques de leur matrice naturelle est compliquée par leur diversité et leur sensibilité à l'oxydation et l'hydrolyse.

L'extraction solide-liquide est obtenue par diffusion des éléments chimiques de l'échantillon vers le solvant. La principale différence entre les deux systèmes utilisés réside dans le chauffage pour le système à reflux. L'action variable de la température est en effet rapportée par différents auteurs.

Les différences observées entre l'acétone-eau et méthanol-eau traduisent une sélectivité d'extraction pour ces deux solvants. Le solvant utilisé est en effet reconnu comme des principaux facteurs affectent la quantité et le taux des polyphénols extraits grâce à la polarité du solvant et la solubilité des composés phénoliques dans ce dernier (Tabart *et al.*, 2010).

Ce plus grand pouvoir extracteur de l'acétone est lié à sa capacité à lyser les membranes cellulaires et à libérer les composés en augmentant leur taux de diffusion et d'extraction (Robard, 2003) .

Le méthanol est le meilleur solvant pour extraire les catéchines. De par sa polarité est plus efficace pour extraire les phénols attachés à la matrice fibreuse (Tabert *et al.*, 2007). L'acétone est plus efficace pour extraire les composés anthocyaniques et les composés phénoliques liés à la matrice protéique .

VII.2. Analyse des chromatogrammes par CCM

L'analyse chromatographique des différents extraits a mis en évidence la présence de nombreux spots variables.

Le nombre de spots varie en fonction des échantillons testés et du système d'élution utilisé (Tableau IV), En effet, Ribéreau Gayon, (1965) a rapporté que les valeurs de Rf sont propres à chaque composé phénolique et système d'élution.

Ces spots se distinguent également entre eux par la valeur du rapport frontale (Rf) et leur coloration après révélation pour chacun des différents échantillons.

Pour les feuilles d'olivier, le nombre de spots fractionnés est variable en fonction du système d'élution utilisé. Il passe de 19 spots avec le système A à 9 spots avec le système B. Le premier système a également permis une très bonne séparation de nombreuses fractions contenues dans les extraits méthanoliques des feuilles d'olivier. Une analyse de l'ensemble des chromatogrammes nous a permis de séparer 19 composés de Rf différents ce qui correspond à environ 60% des fractions qui existent habituellement dans les feuilles d'olivier. En effet, le nombre totale de fractions différentes rapporté par de nombreux auteurs est d'environ 32 (Ryan et Roberd ,1998 ; Bianco et Ucella , 2000 ; Ryan *et al.*, 2000 ; Somova *et al.* , 2003 ; Bendini *et al.* , 2007).

Par ailleurs, en utilisant le deuxième système B, nous avons pu mettre en évidence une fraction de Rf 0,47 qui correspond au même Rf du standard utilisé qui est la rutine. Celle-ci n'a pas pu être mise en évidence en utilisant le premier système A.

Beaucoup d'autres fractions n'ont pas pu être mise en évidence par CCM. Les autres systèmes d'élution utilisés ne nous ont pas permis un bon fractionnement des extraits par conséquent ne peuvent pas nous renseigner davantage sur la présence d'autres spots.

Mis à part les systèmes A et B, les 7 autres systèmes n'étaient pas efficaces pour fractionner et mettre en évidence d'autres composés. En revanche, les deux systèmes utilisés précédemment (A et B) pour les feuilles d'olivier n'ont pas permis une bonne séparation des fractions contenues dans l'extrait de feuilles de caroubier

Tableau IV : Fractionnement par CCM des extraits

Fractionnement des extraits de feuilles de caroubier																											
(B)				(C)				(D)				(E)				(F)				(G)				(H)			
T	Rf	L J	R v	T	Rf	L J	R v	T	Rf	L J	R v	T	Rf	L J	R v	T	Rf	L J	R v	T	Rf	L J	R v	T	Rf	L J	R v
T ₀	0	Mf	Rf	T ₀	0	M	R	T ₀	0	Gf	Rf	T ₁	0,11	J	Mf	T ₁	0,7	G	G	T ₀	0	M	R	T ₁	0,11	J	Mf
T ₁	0,5	Jc	J	T ₁	0,4	I	Mc	T ₁	0,26	J	I	T ₂	0,19	J	M	T ₂	0,81	J	Jc	T ₁	0,25	I	M	T ₂	0,19	J	M
T ₂	0,59	J	J	T ₂	0,61	G	Mc	T ₂	0,28	Jf	J	T ₃	0,23	I	Mac	T ₃	0,88	J	Jc	T ₂	0,52	Jc	Jc	T ₃	0,23	G	Mac
T ₃	0,77	Jf	Ma	T ₃	0,63	J	Mf	T ₃	0,39	Jf	Jf	T ₄	0,44	I	Mac	T ₄	0,93	J	Jc	T ₃	0,66	Jf	Jf	T ₄	0,44	I	Mac
T ₄	0,89	Gc	I	T ₄	0,82	G	G	T ₄	0,51	Jf	Jc	T ₅	0,51	I	Bc	T ₅	0,97	G	G	T ₄	0,77	J	J	T ₅	0,51	I	Bc
T ₅	0,93	J	Vi					T ₅	0,74	Gc	I	T ₆	0,66	I	Vic					T ₅	0,87	I	G	T ₆	0,66	I	Vic
T ₆	0,94	V	G					T ₆	0,78	Gc	I	T ₇	0,73	Vc	G					T ₆	0,95	I	Ma	T ₇	0,73	Vc	G
								T ₇	0,8	Gf	G	T ₈	0,75	Vc	G					T ₇	0,98	V	G	T ₈	0,75	Vc	G
								T ₈	0,97	I	Vi	T ₉	0,91	I	Vi									T ₉	0,91	J	Vi
								T ₉	0,98	V	G	T ₁₀	0,96	V	G									T ₁₀	0,96	V	G

Systèmes d'élution : (A) Dichlorométhane-Méthanol-eau (85-15-1,5), (B) Ethyle acétate-Méthanol-Acide formique-Eau (100-13,5-2,5-10), (C) Dichlorométhane-Acide acétique-Eau (50-45-15), (D) Ethyle acétate-Dichlorométhane –Acide formique-Acide acétique-Eau(100-25-10-10-11), (E) Chloroforme-Méthanol-Acide acétique-Eau (100-15-0,5-0,3), (F) Ethyle acétate-Acide formique-Acide acétique-eau (51-11-11-27), (G) Chloroforme-Méthanol-Acide acétique -Eau (60 :30 :8 :6), (H) Ethyle acétate-Méthanol-Eau (100-16,5-13,5).

Couleur : (B) Bleu, (Bc) Bleu claire, (Bf) Bleu foncé, (I) invisible, (J) jaune, (Jc) jaune claire, (Jf) jaune foncé, (Jv) jaune verdâtre, (Jo) jaune orangé, (I) Invisible, (G) grise, (Gc) grise claire, (Gf) grise foncé, (Ma) mauve, (Mac) mauve claire, (M) marron, (Mc) marron claire, (Mf) marron foncé, (R) rouge, (Rc) rouge claire, (Rf) rouge foncé, (Vi) violet, (Vic) violet claire, (Vif) violet foncé, (V) vert, (Vc) vert clair. (T) Tache, (LJ) Couleur à la lumière du jour, (Rv) Couleur après révélation à la vanilline sulfurique.

Tableau IV (suite) : Fractionnement par CCM des extraits

Fractionnement des extraits de feuilles d'olivier																															
(A)				(B)				(C)				(D)				(E)				(F)				(G)				(H)			
T	Rf	L J	R v	T	Rf	L J	R v	T	Rf	L J	R v	T	Rf	L J	R v	T	Rf	L J	R v	T	Rf	L J	R v	T	Rf	L J	R v	T	Rf	L J	R v
T ₁	0,11	Jf	J	T ₁	0,42	J	I	T ₁	0,74	I	M	T ₁	0,04	Jc	J	T ₁	0,11	Jf	J	T ₁	0,7	J	Jf	T ₁	0,25	I	M	T ₁	0,56	I	Jc
T ₂	0,16	Jc	J	T ₂	0,47	J	J	T ₂	0,86	I	M	T ₂	0,39	Jo	J	T ₂	0,21	Jc	Jv	T ₂	0,8	J	J	T ₂	0,48	Jc	Jc	T ₂	0,63	I	Jv
T ₃	0,26	Jf	Jv	T ₃	0,49	I	G	T ₃	0,89	J	Mc	T ₃	0,48	J	Jv	T ₃	0,42	I	Ma				T ₃	0,63	Jf	Jo	T ₃	0,93	Jf	Vi	
T ₄	0,31	I	Gf	T ₄	0,59	J	Jv	T ₄	0,93	G	Mf	T ₄	0,67	I	M	T ₄	0,51	I	B				T ₄	0,7	Jc	Jc	T ₄	0,96	V	G	
T ₅	0,33	I	Ma	T ₅	0,64	I	Ma	T ₅	0,98	I	Vi	T ₅	0,82	I	G	T ₅	0,56	I	G				T ₅	0,98	V	G					
T ₆	0,37	Jc	Gc	T ₆	0,78	I	Vic	T ₆	0,97	I	Vi	T ₆	0,73	I	Bf																
T ₇	0,43	I	Ma	T ₇	0,84	M	B	T ₇	0,98	V	I	T ₇	0,83	J	Vi																
T ₈	0,46	I	B	T ₈	0,94	Jf	Vi	T ₈	0,96	Vf	G																				
T ₉	0,49	I	Gf	T ₉	0,97	V	G																								
T ₁₀	0,54	J	M B																												
T ₁₁	0,58	I	G																												
T ₁₂	0,6	I	G																												
T ₁₃	0,66	I	Gc																												
T ₁₄	0,73	Jf	Vif																												
T ₁₅	0,76	I	Vic																												
T ₁₆	0,79	I	Ma																												
T ₁₇	0,85	I	Bc																												
T ₁₈	0,91	I	Ma																												
T ₁₉	0,96	V	G																												

Tableau IV (suite) : Fractionnement par CCM des extraits

Fractionnement des extraits de graine de caroube																							
B				C				D				E				F				G			
T	Rf	L J	R v	T	Rf	L J	R v	T	Rf	L J	R v	T	Rf	L J	R v	T	Rf	L J	R v	T	Rf	L J	R v
T ₁	0,65	Jc	I	T ₁	0,4	I	Mc	T ₁	0,06	J	J	T ₁	0,19	J	Mf	T ₁	0,7	Jf	Jc	T ₁	0,06	I	Mc
T ₂	0,76	Jf	J	T ₂	0,93	Gf	M	T ₂	0,39	Jc	Jc	T ₂	0,23	G	Mc	T ₂	0,76	I	R	T ₂	0,16	I	Mc
T ₃	0,81	Jc	I	T ₃	0,98	I	Vi	T ₃	0,51	Jf	Jf	T ₃	0,44	I	Mac	T ₃	0,86	I	Jc	T ₃	0,25	Jc	Mf
T ₄	0,89	G	I					T ₄	0,59	Jc	Jc	T ₄	0,66	I	Mac					T ₄	0,52	J	I
T ₅	0,94	I	Vic					T ₅	0,77	J	I	T ₅	0,91	I	Mac					T ₅	0,77	Jf	Jf
								T ₆	0,8	Gc	G	T ₆	0,96	I	Vi					T ₆	0,79	I	Ma
								T ₇	0,84	I	Ma									T ₇	0,95	I	Ma
								T ₈	0,9	I	G									T ₈	0,98	I	Ma
								T ₉	0,96	I	Vi												
Fractionnement des extraits de pulpe de caroube																							
T ₁	0,89	G	I	T ₁	0,4	I	Mc	T ₁	0,49	G	I	T ₁	0,23	G	Mc	T ₁	0,33	I	Mf	T ₁	0,25	I	Mf
				T ₂	0,61	I	Mc	T ₂	0,8	Gc	G	T ₂	0,66	I	Mac	T ₂	0,51	I	Mc	T ₂	0,43	I	Mc
																T ₃	0,7	Gc	I	T ₃	0,95	I	Ma

Systèmes d'élution : (A) Dichlorométhane-Méthanol-eau (85-15-1,5) ,(B)Ethyle acétate-Méthanol-Acide formique-Eau (100-13,5-2,5-10) , (C)Dichlorométhane-Acide acétique-Eau (50-45-15),(D) Ethyle acétate-Dichlorométhane –Acide formique-Acide acétique-Eau(100-25-10-10-11) ,(E)Chloroforme-Méthanol-Acide acétique-Eau (100-15-0,5-0,3) , (F)Ethyle acétate-Acide formique-Acide acétique-eau (51-11-11-27), (G)Chloroforme-Méthanol-Acide acétique -Eau (60 :30 :8 :6),(H)Ethyle acétate-Méthanol-Eau (100-16,5-13,5) .

Couleur : (B) bleu , (Bc) bleu claire, (Bf) bleu foncé ,(J) jaune ,(Jc) jaune claire ,(Jf) jaune foncé , (Jv) jaune verdâtre, (Jo)jaune orangé , (I) Invisible,(G) grise ,(Gc) grise claire, (Gf) grise foncé, (Ma) mauve ,(Mac) mauve claire , (M) marron, (Mc) marron claire, (Mf) marron foncé,(R) rouge ,(Rc) rouge claire ,(Rf) rouge foncé ,(Vi) violet , (Vic) violet claire,(Vif) violet foncé,(V) vert, (Vc) vert clair. . (T)Tache, (LJ) Couleur à la lumière du jour, (Rv) Couleur après révélation à la vanilline sulfurique.

Quant aux autres systèmes utilisés pour les feuilles de caroubier, le nombre de spots séparé passe de 4 avec le système C à 9 avec le système D et à 10 avec le système E. Cependant même si ce dernier met en évidence un spot supplémentaire, la majorité était invisible à la lumière du jour. Ce qui rend difficile leur récupération. Pour les graines le nombre de spot passe de 03 pour le système C à 09 pour le système D.

Le nombre de spots observé sur le chromatogramme de l'extrait méthanolique de la pulpe est de 1 en utilisant le système (B), de 2 avec les systèmes (D, C et E) et 3 spots avec les systèmes F et G.

Compte tenu des premiers résultats obtenus et après analyse des différents chromatogrammes obtenus en utilisant les 09 différents systèmes, nous avons opté pour le choix suivant :

Système A : Dichlorométhane-Méthanol-Eau (85- 15-1,5)

Système B : Ethyle acétate-Méthanol-Acide acétique-Acide formique (100-13,5-2,5-10)

Système C : Ethyle acétate-Dichlorométhane-Acide acétique-Acide formique-Eau (100-25-10-10-11)

VII.2.1. Analyse de fractions obtenues dans les feuilles d'olivier

Le système Dichlorométhane-Méthanol-Eau (85- 15-1,5) a permis de mettre en évidence un profil chromatographique dans lequel de nombreuses fractions ont été bien séparés. En comparant ce profil avec celui décrit dans la pharmacopée française, le spot n° 3 ayant un R_f de 0,26 et une couleur jaune verdâtre après révélation à la vanilline correspondrait à l'Oleuropeine qui selon de nombreux auteurs représente la fraction majoritaire des feuilles d'olivier (Tutour et Guedon, 1992 ; Pereira *et al.*, 2007 ; Atiok *et al.*, 2008 ; Lee *et al.*, 2009 ; Long *et al.*, 2010).

Les travaux menés par de nombreux chercheurs ont montré que l'oleuropeine est toujours considérée comme étant le composé majoritaire des extraits de différentes variétés de feuilles d'olivier ; 60-90 mg/g de MS selon Tutour et Guedon. (1992), 73% selon Pereira *et al.* (2007), (29%) selon Atiok *et al.* (2008) et 110 mg/g de MS selon Long *et al.* (2010).

Etant majoritaire et connue pour ses nombreuses propriétés antimicrobiennes, elle a été sélectionnée pour le test antibactérien.

Naturellement, la quantité élevée d'oleuropeine dans les feuilles d'olivier est influencée par des facteurs génétiques, des facteurs environnementaux, la répartition géographique et la maturation des feuilles (Ranalli *et al.*, 2006).

Même si le système G n'a pas été retenu pour la suite de travail, il nous a permis de mettre en évidence une fraction de Rf égale à 0,63. Cette fraction a été également mise en évidence par Long *et al.* (2010) en utilisant le même système qu'il a identifiée comme étant l'oleuropéine. Dans la même étude, ce système a également permis de mettre en évidence la présence de la verbascoside avec un Rf de 0,34 et une très faible intensité presque invisible qui n'apparaît malheureusement pas dans le profil que nous avons obtenu. L'absence de ce composé ou du moins, la non révélation de cette fraction pourrait s'expliquer par sa faible teneur comparée à l'oleuropeine. Probablement le dépôt effectué n'était pas suffisant pour permettre sa révélation.

Une autre fraction a été mise en évidence en utilisant le système B. Elle est caractérisée par une couleur jaune et un Rf 0,47 identique au standard utilisé qui est la rutine.

Ormis la rutine, toutes les autres molécules extraites des feuilles d'olivier sont séparées avec le système A. En plus de l'oleuropéine, un autre spot n°1 de Rf égale à 0,11 et de couleur jaunâtre est observé à la lumière du jour et après révélation. Elle pourrait appartenir à la famille des flavonoïdes (L'Huillier, 2007). Cette fraction est sélectionnée et grattée pour le test antibactérien. Une autre fraction de Rf (0,16) ayant les mêmes caractéristiques que la fraction citée a été également mise en évidence. Vu sa faible intensité, elle n'a pas fait l'objet d'une sélection pour le test antibactérien.

Les standards utilisés ne nous ont pas permis d'identifier les différentes fractions correspondantes aux flavonoïdes.

La majorité des flavonoïdes issus de feuilles d'olivier a été fractionné en utilisant HPLC. Il s'agit de (la lutéoline-7-O-glucoside, la lutéoline-7-O-rutinoside, l'apigénine-7-O-glucoside, la rutine, la lutéoline et l'apigénine) (Ficarra *et al.*, 1991 ; Bravente-Garcia *et al.*, 2000 ; Heimler *et al.*, 2002 ; Pereira *et al.* 2007 ; Hayes *et al.*, 2011).

Une troisième fraction n° 14 de Rf (0,73) caractérisée par une couleur jaune foncé à la lumière du jour et violette après révélation, caractéristiques des triterpènes comme décrit par (L'Huillier, 2007). . Etant différente des autres fractions, nous l'avons sélectionnée pour les tests antibactériens.

La présence des acides terpéniques tel que les acides masliniques dans les feuilles d'olivier à été rapporté par Guinda *et al.* (2006). D'autres composés terpéniques ont également été découvert dans les feuilles d'olivier tel que l'acide oléanolique, qui est présent sous forme libre et en proportion considérable, qui peut atteindre 3% de matière sèche de feuille (Albi *et al.*, 2001 ; Guinda ,2006). La présence des acides oléanolique et masliniques en surface des feuilles d'olivier, jouent un rôle de barrière physique qui sert à prévenir et éviter les microbes d'entrer à l'intérieur des feuilles d'olivier (Kubo *et al.* , 1985 ; Guinda ,2006).

La Fraction n°5 présente les mêmes caractéristiques de l'acide caféique (une fluorescence bleu claire sous la lampe UV, un RF égale à 0,33 et une couleur mauve après révélation), suggérant son appartenance à ce type de composé. La présence d'acide caféique dans les feuilles d'olivier à été déjà rapporté (Bravente-Garcia *et al.* , 2000 ; lee *et al.* , 2009) .Selon lee *et al.*(2009) , l'acide caféique représente 0,31 mg/100g de MS de feuilles d'olivier .

Beaucoup d'autres spots caractérisés par des couleurs allant de mauve et bleu après révélation avec des Rf différents sont également présents sur le même profil chromatographique. Selon la littérature peuvent correspondre à la classe des anthocyanidines aglycones ou glycosylés (Anderiambeloson *et al.*, 1998) .Le cyanidine et le cyanidine 3-O-glycoside sont parmi les anthocyanidines cités dans la littérature et qui sont présents dans les feuilles d'olivier.

Etant bien séparées, Ces trois fractions (n° 1, 3 et 14) ont été sélectionnées et ont fait l'objet pour le test antibactérien.

On peut suggérer que la richesse des feuilles d'olivier en composés phénoliques pourrait être exploitée dans la protection des cultures contre les agents phytopathogènes.

VII.2.2. Analyse de fractions obtenues dans les feuilles, graines et pulpes de *C. siliqua* L

Nous notons la présence des fractions communes au niveau des extraits méthanoliques de *C. siliqua* L (Feuilles, graines et pulpes du fruit). Leur profil est identique à celui de l'acide gallique et du dérivé issu de l'hydrolyse d'acide tannique avec le système D. En tenant compte de leur couleur grise à la lumière du jour et leur R_f (0,80) ; nous suggérons qu'elles pourraient correspondre à l'acide gallique. En effet, ce composé a été déjà mis en évidence par Avallone *et al.* (1997), Corsi *et al.* (2002), Owen *et al.* (2003), Ayes *et al.* (2007), Ortega *et al.* (2009) et Custódio *et al.* (2011) dans la pulpe du fruit et par Papagiannopoulos *et al.* (2004), Joslyn *et al.* (2006) et Klenow (2009) dans la caroube entière et par Ben Hsouna *et al.* (2011) et Eldahsen, 2010 dans les feuilles de caroubier. Etant présent dans les trois produits issus de *C. siliqua*, cette fraction a été sélectionnée pour le test antibactérien.

Selon Joslyn *et al.* (2006), l'acide gallique est présent en grandes quantités au niveau des gousses murs de *C. siliqua* L ; ce composé peut être le résultat d'hydrolyse enzymatique des tannins hydrolysables localisés au niveau des gousses vertes, qui sont connus pauvres en ce composé. Dans les feuilles ainsi que dans les gousses murs ; des dérivés de l'acide galliques sont également détectés tels que l'épigallocatechine-3-gallate, l'épicatéchine-3-gallate, 1,6-Di-O-galloyl-glucose, 1,2,6-tri-O-galloyl-glucose et 1,2,3,6-tétra-O-galloyl-glucose (Papagiannopoulos *et al.*, 2004 ; Ben Hsouna *et al.*, 2011) .

L'acide gallique est détecté dans les feuilles et pulpes de *C. siliqua* L comme étant le composé majoritaire, qui est présent sous trois formes libre, estérifié et glycosylé (Corsi *et al.*, 2002 ; Ayes *et al.*, 2007). Fadel *et al.* (2011a b) ont montré que les extraits des pulpes sont plus riches, qualitativement et quantitativement en acide phénolique simple et acide gallique comparé à ceux des graines. L'acide coumarique et l'acide gallique sont les acides phénoliques majoritaires identifiés aussi bien dans les extraits des pulpes que dans ceux des graines.

Une autre fraction de couleur identique à celle décrite précédemment mais de R_f égal à 0,49 a été mise en évidence dans l'extrait de pulpe du fruit de *C. siliqua* L. Selon le chromatogramme obtenu, elle pourrait correspondre aux dérivés d'hydrolyse de l'acide tannique par le système D. Ce dernier pourrait être probablement à l'origine de l'hydrolyse acide sur

l'acide tannique (Penta-galloylglucose). Ce composé a été aussi sélectionné pour le test antibactérien.

D'autres fractions n° 2 , 3 et 4 de Rf respectifs à (0,28 , 0,39 et 0,51) au niveau des feuilles de caroubier et des fractions n°1 , 2 , 3 et 4 de Rf respectifs à (0,06, 0,39, 0,51et 0,59) au niveau des graines de caroube ayant des couleur jaunâtre avant et après révélation ont été analysé. Elles semblent avoir les mêmes caractéristiques des flavonoïdes comme décrit par L'huillier. (2007). Les fractions de Rf de 0,39 et 0,51 sont présentes dans les graines et feuilles avec une intensité différente .Ces fractions ont fait l'objet d'une sélection pour un test antibactérien.

En plus de la richesse des extraits méthanoliques des feuilles et graines en flavonoïdes, elles contiennent également d'autres composés qui se sont révélés en taches de couleur violettes par la vanilline sulfurique (n° 8, Rf de 0,97) pour les feuilles et (n° 9, Rf de 0,96) pour les graines, ces dernières pourraient correspondre aux triterpènes, monoterpènes stéroïdes et caroténoïdes (Jork *et al.*, 1994 ; L'huillier, 2007) . Ceci montre la richesse de *C.siliqua* L en composés terpéniques confirmée récemment par Ben-Hsouna *et al.* (2011b) qui ont détecté la présence de différents huiles essentielles au niveau de la caroube entière et ils ont estimé d'environ 25 composés, tels que les monoterpènes (1,19%).

Une autre fraction F_0 est présente dans les feuilles de *C.siliqua* L de coloration rouge après révélation à la vanilline sulfurique. Etant donné que cette fraction n'a pas pu migrer, elle pourrait correspondre aux composés de haut poids moléculaire. Selon certains auteurs, la couleur observée est caractéristique des catéchines et tannins condensés (Andriambeloson *et al* ., 1998 ; Maoela *et al* .,2009).

VII.3. Effets des extraits et fractions sur *Pectobacterium atroseptica* (Pca)

VII.3.1. Activité antibactérienne des extraits bruts.

La figure 7 illustre l'effet des extraits bruts sur *Pca*. Nos résultats montrent qu'à la concentration de 100 mg/ml, tous les extraits méthanoliques testés présentent une activité antibactérienne à l'égard de *Pectobacterium carotovorum* ssp. *Atrosepticum*.

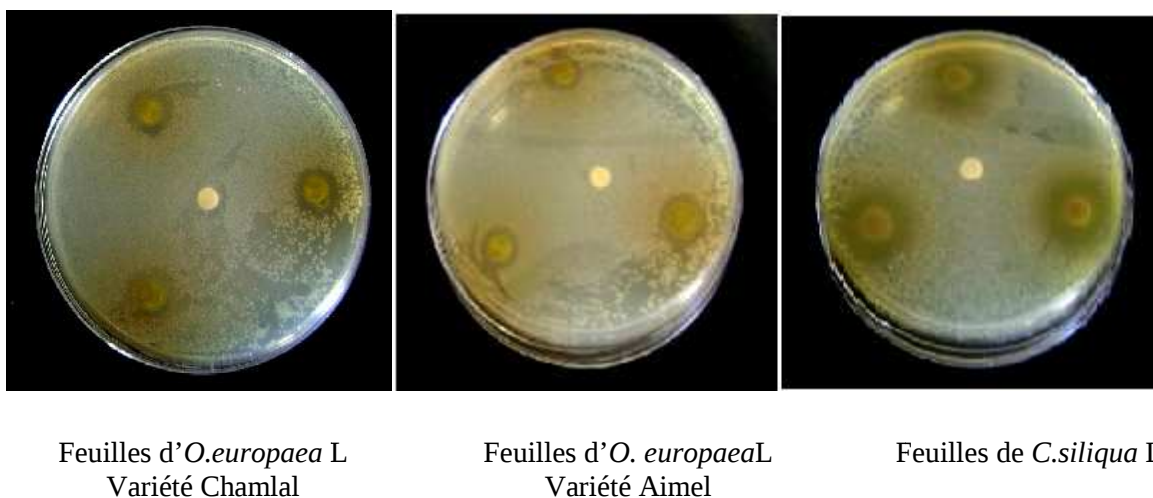


Figure .7 : Effet antibactérien des Feuilles de *Ceratonia siliqua* L et d'*Olea europaea* L

L'analyse statistique de nos résultats montre une variabilité significative ($P < 0,05$) de l'effet des extraits utilisés (Figure 8) et classe ces derniers en trois groupes :

-l'extrait de feuilles de *C. siliqua* L exerce le pouvoir antibactérien le plus puissant avec une zone d'inhibition de 22,47mm de diamètre.

- Les extraits d'*O. europaea* L (Aimel et Chamlal) ne manifestent pas de différence ($P > 0,05$) d'activité antibactérienne entre eux. les diamètres des zones d'inhibition sont de 12,41 et 12,34 mm respectivement.

- les extraits des pulpes et graines *C. siliqua* L affichent le plus faible pouvoir antibactérien (7,90 et 8,93 mm respectivement pour graines et pulpes).

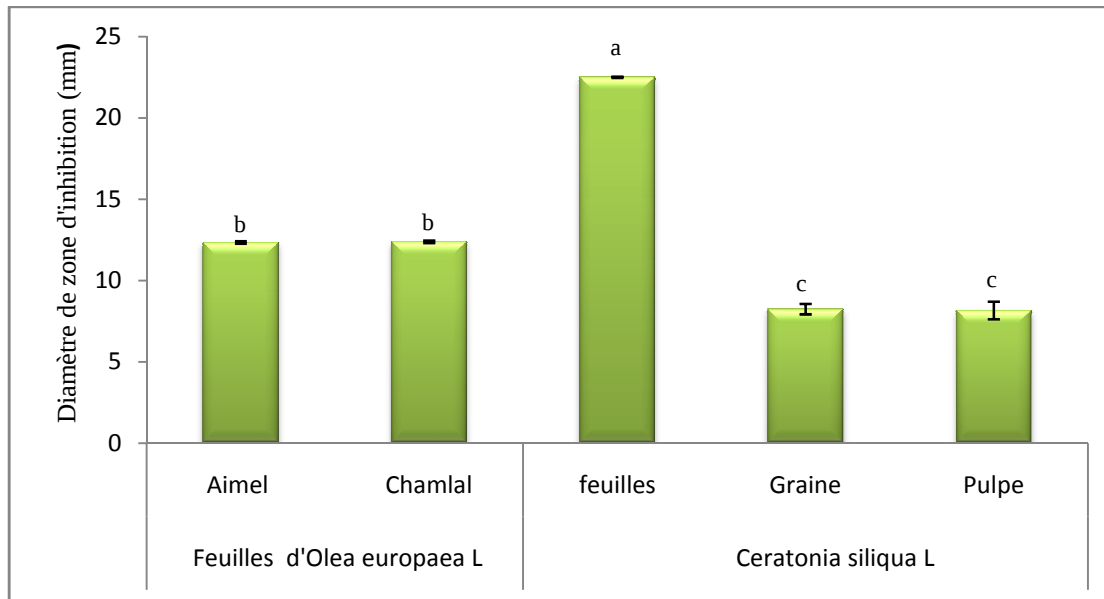


Figure 8. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques
Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes entre elles ($P < 0,05$).

VI.3.2. Activité antibactérienne des fractions

Les principales caractéristiques des différentes fractions testées sont résumées dans le tableau V

La sensibilité de la souche de *pectobacterium* (Figure 8) varie en fonction de la fraction chromatographique utilisée. Nos données expérimentales révèlent que deux fractions isolées d'extraits d'*O.europaea* L (F_1 et F_3) sont les moins actives : *Pca* s'est avérée résistante à F_1 et présente la plus faible sensibilité à F_3 .

Toutes les fractions issues de *C.siliqua* L manifestent un effet inhibiteur sur *Pca*. L'activité antibactérienne la plus marquée ($P < 0,05$) est observée pour les fractions F_7 ($\varnothing 16,74$ mm) et F_{10} ($\varnothing 13,72$ mm).

Tableau V : Données sur les fractions chromatographiques testées

Fractions	Eluant	Echantillon	Partie utilisée	Rf	Couleur à la lumière du jour	Révélation à la vanilline sulfurique	Composé possible
F ₁	Dichlorométhane-Méthanol-Eau (85-15-1,5)	<i>Olea europaea</i> L	Feuilles	0,11	Jaune foncé	Jaune	Flavonoides
F ₂				0,26	Jaune foncé	Jaune orangé	Oleuropéine
F ₃				0,73	Jaune foncé	Violet foncé	Triterpènes
F ₄	Ethyle acétate-Dichlorométhane-Acide formique-Acide acétique-Eau (100-25-10-10-11)	<i>Ceratonia siliqua</i> L	Graine	0,06	Jaune	Jaune	Flavonoides
F ₅			Feuilles	0,28	Jaune foncé	Jaune	Flavonoides
F ₆			Feuilles	0,39	Jaune foncé	Jaune foncé	Flavonoides
F ₇			Graine	0,39	Jaune claire	Jaune claire	Flavonoides
F ₈			Pulpe	0,49	Grise	Invisible	Dérivé d'acide tannique
F ₉			Feuilles	0,51	Jaune foncé	Jaune claire	Flavonoides
F ₁₀			Graine	0,51	Jaune foncé	Jaune foncé	Flavonoides
F ₁₁			Graine	0,59	Jaune claire	Jaune claire	Flavonoides
F ₁₂			Feuilles	0,8	Grise foncé	Grise	Acide gallique
F ₁₃			Graine	0,8	Grise claire	Grise	Acide gallique
F ₁₄			Pulpe	0,8	Grise claire	Grise	Acide gallique

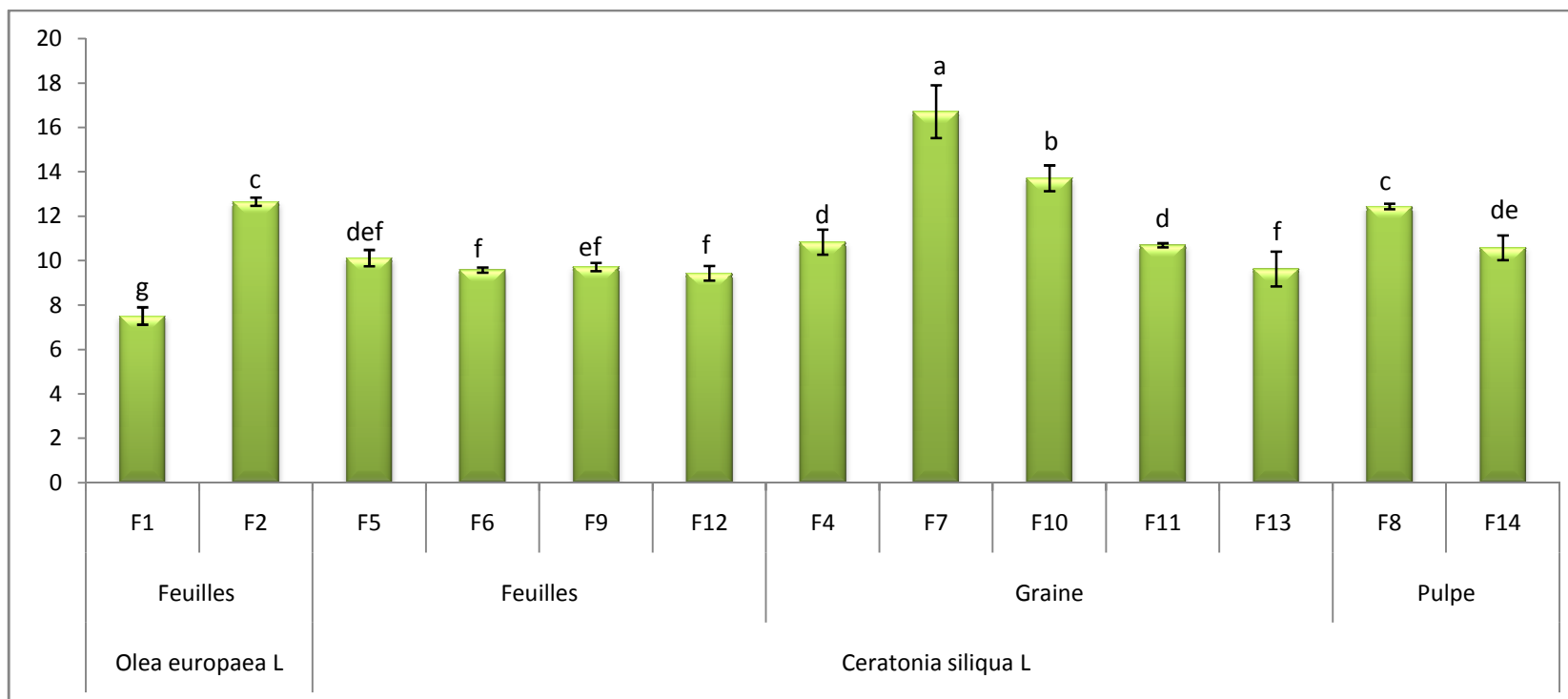


Figure 9 : Evaluation d'activité antibactérienne des fractions chromatographiques
Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes entre elles ($P < 0,05$).

L'analyse statistique de nos données montre des similitudes d'activité ($P>0,05$) de fractions d'origine diverses. Cette similitude est observée entre F_2 (feuilles d'*O.europaea*) et F_8 (pulpe de caroube) avec des diamètres de 12,66 et 12,45 mm, respectivement. De même, F_4 et F_{12} (graine de caroube), F_{14} (pulpe de caroube) et F_5 (feuilles de *C.siliqua*) manifestent la même activité ($P>0,05$). vis-à-vis de *Pca* ; le diamètre de la zone d'inhibition varie de 10,12 à 10,84 mm.

Il en est de même pour les fractions de feuilles de *C. siliqua* L (F_5, F_6, F_9 et F_{12}) et de graines (F_{13}) avec un diamètre de zone d'inhibition de 9,44 à 10,12 mm ($P>0,05$).

Un quatrième groupe de fraction (F_5, F_9 et F_{14}) manifeste une plus faible activité (9,72 à 10,59 mm).

VII.3.3. Activités antibactériennes comparées des extraits et fractions.

La comparaison de l'activité des extraits bruts avec les fractions correspondantes révèle les différences de comportement de *Pca* en présence de substances issues de *C. siliqua* L.

Les extraits bruts de feuilles de *C.siliqua* L sont deux fois plus actifs que chacune des fractions testées (F_5, F_6, F_9 et F_{12}) alors que l'action des fractions de pulpe de caroube (F_8 et F_{14}) est plus marquée que l'extrait brut correspondant. Il en est de même pour les différentes fractions des graines (F_4, F_7, F_{10}, F_{11} et F_{13}).

Discussion

Les différents résultats de l'antibiogramme traduisent une activité antibactérienne des différents extraits vis-à-vis de *Pca*. L'expression d'une telle activité antibactérienne des extraits testés s'accorde avec les données de nombreux auteurs pour *Olea europaea* L (Aziz *et al.* , 1998 ; Furneriet *al.* , 2004 ; Mossop , 2006 ; Chebaibi *et al.*, 2007 ; Pereira *et al.* , 2007 ; Lee et Lee , 2010 ; Djenane *et al.*, 2012) et *Ceratonia siliqua* L (Henis *et al.*, 1965 ; Tagari *et al.*, 1965 ; Tassou *et al.*, 1997 ; Kivaçk *et al.*, 2002) .

Ces chercheurs attribuent ce potentiel bioactif aux métabolites secondaires (dont les composés phénoliques) présents dans ces plantes et solubilisés par le solvant utilisé. Nous avons mis en évidence la présence de composés phénoliques dans chacun des cinq extraits testés et le potentiel antimicrobien de la majorité des composés identifiés dans les extraits d'*O .europaea* L et *C.siliqua* L est connu et largement rapporté par la bibliographie.

Les composés phénolique peuvent provoquer des dommage au niveau de la membrane des cellules bactériennes (Juven *et al.*, 1972) L'activité antibactérienne des flavonoïdes peut être expliquée par le mécanisme de toxicité vis-à-vis des microorganismes qui se fait soit par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires ou les enzymes , la chélation des ions métalliques, inhibition du métabolisme bactérien, la séquestration de substances nécessaires à la croissance des bactéries (Karou *et al.*, 2005).

La sensibilité de *Pca* varie avec le type d'extrait utilisé. L'extrait de feuilles de caroubier affiche l'effet inhibiteur le plus marquée comparativement aux extraits de feuilles d'olivier (Aimel et Chamlal) ; la plus faible activité est relevée avec les extraits de graine et pulpe de caroube. Une telle sensibilité variable est relevée pour *Pcc* par Lagha (2007), Bechar (2008) pour *Pca* et Moussa *et al.* (2010). Nous avons noté que l'activité antibactérienne de nos extraits est d'autant plus marquée que leur teneur en composés phénoliques est plus élevée.

La nature des composés présents dans les extraits pourrait influencer sur l'activité antibactérienne de ces derniers. En effet, les travaux de différents chercheurs (Skerget *et al.*, 2005 ; Ayes *et al.* , 2007 ; Ortega *et al.*, 2009 ; Eldahsan ,2010 ; Hayes *et al.* , 2010) ont montré de grandes différences dans la nature des composés phénoliques présents chez *O.europaea* L et *C.siliqua* L . Une différence d'action synergique de ces composés présents dans les extraits participerait à la variabilité de la sensibilité de *Pca* aux extraits testés. Comme le notent Pereira *et al.* (2007) et Lee et Lee (2010), un extrait peut être plus efficace que l'un de ses constituants pris isolément et la propriété bioactive de chaque composé peut changer en présence d'autres composés de l'extrait. Cette hypothèse se vérifie dans le présent travail si nous comparions entre eux les antibiogrammes des extraits et fractions chromatographiques.

Chez *C .siliqua* L, les extraits bruts de feuilles manifestent une activité antibactérienne nettement plus élevée que celle notée avec chacune des quatre fractions testées ; pour les graines et pulpes de caroube , ce sont par contre les fractions isolées qui affichent une activité plus élevée que les extraits correspondants.

Chez *O.europaea* L, l'activité de l'extrait brut est comparable à celle de la fraction F₂ et supérieure à celle de F₁ ; la fraction F₃ ne manifeste aucun effet. Nos résultats s'accordent avec les données rapportées par différents chercheurs. Aziz *et al.* (1998), Pereira *et al.* (2007) et

Henis *et al.* (1965) ont montré que différentes fractions isolées de divers extraits manifestent des différences d'activité antibactérienne vis-à-vis des mêmes souches bactériennes. Les travaux de Yahiaoui-Zaidi *et al.* (2007), Lagha (2007) et Bechar (2008) ont montré une variabilité de comportement de *Pca* et *Pcc* en présence d'acide gallique et acide tannique. Nos données sont en accord avec les résultats de recherche de Puupponen *et al.* (2001) et Lee et Lee (2010). Ces derniers notent que l'oleuropeine (principal composé phénolique des feuilles d'olivier) a montré une plus forte activité antibactérienne que l'acide caféique alors que la rutine et la vanilline n'exercent aucun effet.

Nos résultats sur CCM confirment cette hypothèse : la fraction F₂ étant l'oleuropeine et la fraction F₁ un flavonoïde.

Les substances isolées des extraits de graine de caroube (F₇ et F₁₀) et de pulpe (F₈) ont manifesté un pouvoir antibactérien plus élevé que l'extrait brut correspondant. En absence d'une identification plus précise des flavonoïdes présents dans chacune des fractions, il est difficile de comparer nos données à celles de la bibliographie. Nos données analytiques suggèrent que les différents flavonoïdes révélés par CCM exercent chacun une activité microbienne propre vis-à-vis de *Pca*. Cette hypothèse est en accord avec les observations de Vander Watt et Pretorius (2001), Yi *et al.* (2008) et Fausto *et al.* (2009).

Les tests sur CCM nous ont permis de mettre en évidence la présence chez *C. siliqua* L d'acide gallique (F₁₂, F₁₃ et F₁₄), d'un dérivé d'acide tannique (F₈) et de 7 flavonoïdes (F₄, F₅, F₆, F₇, F₉, F₁₀ et F₁₁). Si le dérivé d'acide tannique est relevé uniquement chez la pulpe de caroube, l'acide gallique est retrouvé dans chacun de 3 substrats (feuilles, pulpes et graines) de *C. siliqua* L avec une activité antibactérienne globalement similaire. Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces différences :

1- En accord avec les observations de différents auteurs, il s'agirait de molécules distinctes avec une activité antibactérienne propre à chacune d'elles.

2- En absence de dosages quantitatifs de ces molécules, les variabilités d'effets pourraient traduire des apports différents en ces molécules. Il est connu en effet que l'activité anti microbienne des métabolites secondaires dépend des concentrations utilisées.

Un effet combiné de ces deux hypothèses expliquerait les similitudes d'actions entre fractions.

Conclusion et perspective

Conclusion

Les plantes restent toujours une source de principes actifs connus pour leurs propriétés thérapeutiques et phytosanitaires. Le présent travail a porté sur l'évaluation du pouvoir antibactérien d'une part d'extrait de plantes (*Olea europaea* L et *Ceratonia siliqua* L) vis-à-vis de *Pca* et d'autre part de fractions de ces mêmes extraits isolées par CCM .

L'évaluation du contenu en phénols totaux et flavonoïdes dans nos substrats végétaux révèle leur présence en quantités importantes ; leurs teneurs varient en fonction de l'origine végétale et du solvant utilisé. D'autre part les feuilles de *C.siliqua* L sont plus riches en composés phénoliques que les feuilles d'*O.europaea* L, pulpes et graines de caroube.

Les analyses qualitatives effectuées par la chromatographie sur couche mince, ont montré la présence d'une multitude de variétés de composés dans les différents extraits d'*O.europaea* L et *C.siliqua* L. Après plusieurs essais, nous avons retenu 3 systèmes d'élution. Le système Ethyle acétate –Dichlorométhane-Acide acétique- Acide formique –Eau (100-25-10-10-11) nous a permis de récupérer les fractions majoritaires des produits de *C.siliqua* L et le système Dichlorométhane-Méthanol-Eau (85-15-1,5) nous a permis de récupérer celles des feuilles d'*O.europaea* L et le système Ethyle –acétate-Méthanol-Acide acétique-Eau (100-13,3-2,5-10) a permis de mettre en évidence la présence de la rutine dans les extraits de feuilles d'olivier.

Les résultats de l'activité antibactérienne enregistrés dans cette étude révèlent la sensibilité variable de l'agent phytopathogène *Pectobacterium carotovorum ssp. atrosepticum* aux extraits testés et fractions chromatographiques isolées par CCM. L'effet antibactérien le plus prononcé est observé avec les fractions issues des graines du fruit (F₇ et F₁₀), des feuilles d'*O.europaea* L (F₂) et des pulpes du fruit (F₈).

Ces résultats témoignent de l'efficacité des extraits de plantes testés vis à vis de *Pectobacterium atrosepticum* qui est probablement due à leur richesse en composés phénoliques. Ainsi diverses applications des produits d'*O. europaea* L et de *C. siliqua* L dans la protection des plantes contre les agents phytopathogènes peuvent être envisagées.

Il est nécessaire de poursuivre et approfondir ce travail de recherche par une identification et caractérisation approfondie des fractions isolées, ainsi que de leur potentiel antimicrobien. La recherche de nouvelles substances bioactives dans ces plantes mérite également une investigation pour une valorisation optimale des plantes utilisées.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Ait chitt M , Belmir M et Lazrak A. (2007). Production des plantes sélectionnées et greffées du Caroubier. Transfert de technologie en Agriculture. IAV Rabat : 1-4.

Al-Azzawie H F et Alhamdani M S. (2006). Hypoglycémie and antioxydant effect of oleuropein alloxan-diabetic rabbit. *Life science* **78**: 1371-1377.

Al- Quarawie A A, Al-Damegh M A et El-Moughy S A. (2002). Effect of freeze dried extract of *olea europaea* on the pituitary thyroid axis-in the rats. *Phytothérapie Research* **16**: 286-287.

Al-Momani W , Abu-Basha E, Janakat S , Nicholas R A J et Ayling R D. (2007). *In vitro* antimycoplasmal activity of six Jordanian medicinal plants against three *Mycoplasma* species. *Trop Anim Health Prod* **39**: 515–519.

Altinyay G et Leuvent Altun M. (2006). HPLC analysis of Oleuropein in *Olea europaea*. *Journal of Faculty of Pharmacy* **35** (1):1-11.

Andriambeloson E, Magnier C, le Haan-Archipoff G, Lobstein A, Anton R, Beretz A, Stoclet J C et Andriantsitohaina R. (1998). Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *American Society for Nutritional Sciences* **14**: 2324-2333.

Andrikopoulos N K, Antonopoulou S et Kaliora A C. (2002). Oleuropein inhibits LDL oxidation induced by cooking oil frying by-products and platelet aggregation induced by platelet-activating factor. *Lebensm Wiss Technol* **35**:479–484.

Atiok E, Bayçin D, Bayraktar O et Ülkü S. (2008). Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibrin. *Separation and Purification Technology* **62** : 342–348.

Avallone R , Plessi M , Baraldi M et Monzani A . (1997). Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins. *Journal of Food Composition and Analysis* **10**: 166-172.

Ayas F A ,Torun H, Ayas S,Correlia J, Alaiz M, Sanz C, Gruz J et Strnad M .(2007).Determination of chemical composition of Anatolian Carob pod *Ceratonia siliqua* L.):Sugars, amino, Et organic acids, minerals et phenolic compound . *Journal of Food Quality* **30**:1040–1055.

Aziz N, Farag S E, Mousa L A et Abo-Zaid M A. (1998). Effets antibactériens et antifongiques comparatifs de certains composants phénoliques. *Microbiology* **93**: 43-54.

Bagamboula C F, Uyttendaele M et Debevere J.(2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology* **21**: 33–42.

Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunet C, Dine T, Luyckx M, Vasseur J, Cazin M, Cazin J C et Pinkas M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from *Références bibliographiques*- 53 - hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim Forsch Drug Research* **46**: 1086 –1108.

Bao J, Zhang D W , Zhang J Z H, Lee Huang P , Lin Huang P, Lee-Huang S. (2007). Computational study of bindings of olive leaf extract (OLE) to HIV-1 fusion protein gp41. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **581**:2737–2742.

Barzic M R , Samson R et Trigalet A. (1976) . Pourriture bactérienne de la tomate cultivée en serre. *Annales de Phytopathologie*. **8**:237-240.

Battle I et Tous J. (1997). Carob tree (*Ceratonia siliqua* L.), Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Institute of Plant Genetics and Crops Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute. Rome **17**:1-79.

Bastida S, Sánchez-Muniz F J, Olivero R, Pérez-Olleros L, Ruiz-Roso B et Jiménez-Colmenero F. (2009). Antioxydant activity of Carob fruit extracts in cooked pork meat systems during chilled and frozen storage. *Food Chemistry* **116**: 748-754.

Baycin D, Altioek E, Ulku S et Bayraktar O. (2007) .Adsorption of olive leaf (*Olea europaea* L.) antioxidants on silk fibroin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 1227-1236.

Báydez A G, Gómez B P, Del Rio J A et Ortuño A. (2007). Antifungal capacity of major phenolic compounds of *Olea europaea* L. against *Phytophthora megasperma* Drechsler and *cylindrocarpon destructans* (Zinssm). *Scholten physiological and molecular plant pathology* **69**: 224-229.

Bechar S. (2008). Effet des de plantes (*Salvia officinalis* L. et *Olea europaea* sativa) et d'un co-produit (grignon d'olive) sur la croissance de *Pectobacterium carotovorum* ssp. *atrosepticum* sur *Solanum tuberosum* L. Thèse de magister.Université de Béjaia . 69 pages.

Ben hsouna A, Saoudi M, Trigui M, Jamoussi K, Boudawara T, Jaoua S et El-Feki A. (2011a). Characterization of bioactive compounds and ameliorative effects of *Ceratonia siliqua* leaf extrect against CCL4 induced hepatic oxidative damage and renal failure in rats. *Food and chemical Toxicology* **49**:3183-3191.

Ben Hsouna A, Trigui M, Ben Mansour R, Jarraya R M, Damak M et Jaoua S.(2011b) .Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in mincedbeef meat .*International Journal of Food Microbiology* **148** :66–72.

Benavente-Garcia O, Castillo B, Lorente J, Ortuño A et Del Rio J A. (2000). Antecedent activity of phenolic extracted from *olea europaea* L. leaves. *Food chemistry* **68**: 457-462.

- Benhammou N, Bekkara A F et Panovska T K. (2008).** Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2(2):22-28.
- Bennani-Kabchi N, Fdhil H, Cherrah Y, Kehel, El-Bouayadi F, Amarti A, Saidi M et Marquie G. (1999).** Effects of *Olea europaea* var. oleaster leave in hypercholesterolemic insulin resistant sand rats. *Thérapie* 54(6): 717-723.
- Bianco A et Uccella N. (2000).** Biophenolic components of olives. *Food Res* 33: 475–485.
- Bisignano G , Tomaino A , Lo Cascio R , Crisafi G, Ucella N et Saija A.(1999).** On the *in-vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 31 :971–974.
- Bisignano G, Lagana M G, Trombetta D, Arena S, Nostro A, Uccella N, Mazzanti G, Saija A.(2001).** In vitro antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. *FEMS Microbiology Letters* 198:9-13.
- Bouallagui Z, Han J, Isoda H et Sayadi S. (2011).** Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 49:179–184.
- Bouaziz M, Fki I, Jemai H, Ayadi M et Sayadi S. (2008).** Effect of storage on refined and husk olive oils composition: stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chemistry* 108:253–262.
- Boudhrioua N, Bahloul N, Ben Slimen I et Kechaou N. (2009).** Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves.*industrial crops and products* 29:412–419.
- Breton C. (2006) .**Reconstitution de l’histoire de l’olivier (*Olea europaea* subsp.*europaea* L) et de son processus de domestication en région méditerranéenne, étudiés sur des bases moléculaires.Thèse de doctorat.Université de Paul Cézanne Aix-Marseille 3).231p.
- Brhadda N, Abousalim A, Waladi loudiyi D E et Benali D. (2003).** Effet du milieu de culture sur le microbouturage de l'olivier (*olea europaea* L.) CV. Picholine marocaine. *Biotechnology of Agronomy Society Environment* 7: 177-182.
- Briante R, Francesco L C, Ferdinando F, Maurizio P et Roberto N. (2002).** Bioactive derivatives from oleuropein by a biotransformation on *Olea europaea* leaf extracts. *Journal of Biotechnology* 93:109–119.
- Benhammou N, Bekkara A F et Panovska T K. (2008).** Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2(2):22-28.

Briante R, Patumib M, Febbraro F et Nuccia R. (2004). Production of highly purified hydroxytyrosol from *olea europaea* leaf extracts biotransformed hyperthermophilic B-glucosidase. *Journal of biotechnology* **111**: 67-77.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie phytochimie. Plantes médicinales. Ed Tec et Doc. 1095 pages.

Bulotta S, Corradino R, Celano M, D'Agostino M, Maiuolo J, Oliverio M, Procopio M, Iannone M, Rotiroli D et Russo D. (2011). Antiproliferative and antioxidant effects on breast cancer cells of oleuropein and its semisynthetic peracetylated derivatives. *Food Chemistry* **127**:1609–1614.

Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology* **94**:223– 253.

Caturla N, Perez-Fons L, Estepa A et Micol V. (2005). Differential effects of oleuropein, a biophenol from *Olea europaea*, on anionic and zwitterionic phospholipid model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* **137**: 2–17.

Chebbi R M, Khemiss M, Dhidah M, Dellai A, Bouraoui A et Khemiss F. (2011). Chloroformic and Methanolic Extracts of *Olea europaea* L Leaves Present Anti-Inflammatory and Analgesic Activities. *International Scholarly Research Network Pharmacology* 1-5.

Chimi H, Morel G, Lescoat N, Pasdeloup P, Cillard J et Cillard D. (1995). Inhibition of iron toxicity in rat hepatocyte culture by natural phenolic compounds. *Toxicology In Vitro* **9**:695-702.

Contini M, Baccelloni S, Massantini R et Anelli G. (2008). Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. *Food Chemistry* **110** :659–669.

Corsi L, Avallone R, Cosenza F, Farina F, Baraldi C et Baraldi M. (2002). Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on hepatocellular carcinoma cell line. *Fitoterapia* **73**: 674-684.

Custódio L, Fernandes E, Escapa N, López-Avilés S, Fajardo A, Aligué, Alberício F, Romano A. (2009). Antioxidant activity and in vitro inhibition of tumor cell growth by leaf extracts from the carob tree (*Ceratonia siliqua*). *Pharmaceutical Biology* **47** :721-728.

Custódio L, Escapa AL, Fernandes E, Fajardo A, Aligué R, Alberício F, Neng N, JFlorêncio Nogueira J S et Romano A. (2011 a). In vitro cytotoxic effects and apoptosis induction by a methanol leaf extract of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) *Journal of Medicinal Plants* **5**:1987-1996.

Custódio L, Escapa A N, Fernandes E, Fajardo A, Aligué R, Alberício F, Neng N, Nogueira J M F, Romano A. (2011b). Phytochemical Profile, Antioxidant and Cytotoxic Activities of the Carob Tree (*Ceratonia siliqua* L.) Germ Flour Extracts. *Plant Foods Hum Nutr* **66**:78–84.

De Boer S H et Kelman A.(1975).Evaluation of procedures for detection of pectolytic *Erwinia spp.* on potato tubers. *American Potato Journal* **52**:117-123.

De Boer S H. (1994). Prospects for control of potato diseases caused by pectolytic erwinias. I Zehnder, G.W., Powelson, M.L., Jansson, R.K., and Raman, K.V. (Eds), APS Press, St Paul Minnesota 136-148.

De Mejia E G, Chandra S, Ramirez-Mares M V et Wang W. (2006).Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase by phenolic compound in *Ardisia compressa* extract and their effect on human colon cancer cells .*Food and Chemical Toxicology* **44**:1191-1203

Delrio J A, Arcas M C, Botira J M , Baidez AG , Fuster MD et Ortuno A. (2000). Involvement of phenolics compounds in the antifungal defense mechanisms of *Olea europaea* and Citrus sp. *Recent research and development in agricultural and food chemistry*. **4**: 41-331.

Delso I, Tejero T, Goti A et Merino P. (2010). Synthesis of D-arabinose-derived polyhydroxylated pyrrolidine, indolizidine and pyrrolizidine alkaloids. Total synthesis of hyacinthacine. *Tetrahedron* **66**: 1220–1227.

Dekanski D, Ristić S et Mitrović D M. (2009). Antioxidant effect of dry olive (*Olea europaea* L.) leaf extract on ethanol-induced gastric lesions in rats. *Mediterr J Nutr Metab* **2**:205–211.

Djenane D ,Yangüela J , Derriche F, Bouarab L et Roncales P . (2012). Extrait de feuilles d'olivier ; tests in vitro vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis et *Pseudomonas aeruginosa* ; application sur la viande de dinde. *Phytothérapie* 10–18 .d

Dorman H J D et Deans S G.(2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils .*Journal of Applied Microbiology* **88**: 308–316.

Duthie G G, Gardner P T et Kyle J A M. (2003). Plant polyphenols: are they the new magic bullet?.*Proceedings of the Nutrition Society* **62**: 599–603.

Eisse G, de Haan T C E M, Dekker-Nooren Gé W, van den Bovenkamp A G. C. L. Speksnijder P S, van der Zouwen J M et van der W. (2008). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates. *Eur J Plant Pathol* **122**:561–569.

El Hajaji H, Lachker N,Alaoui K, Cherrah Y, Farah A, Ennabili A, El Bali B et Lachkar M.(2010). Antioxydant proprieties and total phenolic content of three varieties of carob tree leaves from Morocco. *Records of Natural Products* **4**: 193-204.

Eldahshan O A. (2010).Isolation and structure elucidation of phenolic compounds of carob leaves grown in Egypt.*Current Research Journal of Biological Sciences* **3**:52-55.

Escribano-Bailon MT et Santos-Buegla C. (2003).Polyphenol extraction from foods.in method in polyphenols analysis. *Royal Society Of Chemistry* 1-16.

Fadel F, Fatouch S, Tahrouch S, Lahmar R, Benddou A et Hatimi A.(2011 a).The phenolic compound of *Ceratonia siliqua* L pulps et seeds (Les composés phénoliques des pulpes et des graines de *Ceratonia siliqua* L). *J Environ Sci* 2:285-292.

Fadel F, Tahrouch S,Elmadidi S,Benddou A A et Hatimi A B.(2011b).Etude morphométrique et physicochimique comparative du caroubier forstier et celui d'une plantation privée. *Biomatec-Echo* 4 :3-10 .

Falleh H, Ksouri R , Chaieb K , Karray-Bouraoui N , Trabelsi N , Boulaaba M et Abdelly C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C R Biologies* 331: 372-379.

Fausto J R C, Sobeida S C , Guadalupe B , Casimiroa , Alvaradoc C L, Alejandra R M et Blanca R C . (2009). Antibacterial compounds isolated from *Byrsonima craassifolia* . *Rev Latinoamer Quím* 37 :155 163.

Fawole O A , Ndhlala A R , Amoo S O, Finnie J F et Van Staden J.(2009). Anti-inflammatory and phytochemical properties of twelve medicinal plants used for treating gastro-intestinal ailments in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology* 123:237–243.

Fehri B, Mrad S, Aiache J M et Lamaison J L. (1994). Effects of *Olea europaea* L. extract on the rat isolated ileum and trachea. *Phytotherapy Research* 9:435-439.

Fernando J, Reyes-Zurita, Eva E, Rufino-Palomares, José A, Lupiáñez et Cascante M. (2009).Maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea* L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. *Cancer Letters* 273 44–54.

Ficarra P, Ficarra R, de Pasquale A, Monforte M T et Calabro M L. (1991). HPLC analysis of oleuropein and some flavonoids in leaf and bud of *Olea europaea* L. *Farmaco* 46:803–815.

Flemmig J, Kuchtab K, Arnholda J et Rauwald H W. (2011). *Olea europaea* leaf (Ph.Eur.) extract as well as several of its isolated phenolics inhibit the gout-related enzyme xanthine oxidase. *Phytomedicine* 18:561–566.

Fredrickson W R.(2000). Methode and Composition for Antiviral Therapy with olive leaves. *U.S. Patent* 6: 117-844.

Furneri PM, Piperno A, SajiaA et Bisignano G. (2004). Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 4892–4894.

Gardan L , Gouy C , Christen R et Samson R. (2003). Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53 :381–391.

Gibbons S. (2004). Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural Product Rep* 21 263-277.

Ghedira K. (2005). Les flavonoides : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* 162-169.

Ghedira K. (2008). L'olivier. *Phytothérapie* 6: 83–89.

Gohar A, Gedara S R et Baraka H N. (2009). New acylated flavonol glycoside from *Ceratonia siliqua* L. seeds. *Journal of Medicinal Plants Research* 3 (5): 424-428.

Grahams DC et Harper P C. (1966). Effect of inorganic fertilizers on the incidence of potato blackleg diseases. *European Potato Journal*. 9:141-145.

Gruendel S, Garcia A L , Otto B, Mueller C, Steiniger j, Weickert M O, Speth M , Katz N et Koebnick C. (2006). Carob Pulp Preparation Rich in Insoluble Dietary Fiber and Polyphenols Enhances Lipid Oxidation and Lowers Postprandial Acylated Ghrelin in Humans *.American Society for Nutrition* 136:1533-1538.

Guerrero M S, Torres J S et Nunez M J. (2008). Extraction of polyphenols from white distilled grape pomace: Optimization and modeling. *Bioresource Technology* 99: 1311–1318.

Guinda A. (2006). Use of solid residue from the olive industry. *Grasas Aceites* 57: 107-115.

Guinot P, Gargadennec A, Valette G, Fruchier A et Andary C. (2008). Primary Flavonoids in Marigold Dye: Extraction, Structure and Involvement in the Dyeing Process *Phytochemical Analysis* 19: 46–51.

Hadas R, Kritzman G, Gefen T et Manulis S.(2001). Detection, quantification and characterization of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* contaminating pepper seeds. *Plant Pathology* 50 :117-123.

Hamdi K et Castellon R. (2005) Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor.*Biochemical and Biophysical Research Communications* 334:769–778.

Hammerschmidt R. (1999). Phytoalexins: What have learned after 60 years?.. *Annual Review of phytopathology* 37: 285-306.

Hansen K, Adersen A, Brogger Christensen S . Rosendal Jensen , U. Nyman U. Wagner S (1996). Isolation of an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor from *Olea europaea* and *Olea lancea*. *Phytomedicine* 2: 319-325.

Harborne J B et Williams C A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992-a review.*Phytochemistry*, 55: 481-504.

Haris S A. (2010).Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects.*Scientia pharmaceutica* 78: 133–154.

Harrison M D et Neilson LW. (1981). Blackleg bacterial soft rot. In : Compendium of potato disease. W.J. Hoorer (Eds), *American Phytopathological Society*. St. Part. Mn.125pp.

Hayes J E, Stepanyan V, Allen P, O’Grady M N et Kerry J P. (2011). Effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on the quality and shelf-life stability of packaged raw minced beef patties . *Meat Science* **84**: 613–620.

Hayes J E , Allen P, Brunton N, O’Grady M N et Kerry J P. (2011). Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesame and ellagic acid. *Food Chemistry* **126**:948–955.

Heimler D, Pieroni A, Tattini M et Cimato A. (1992). Détermination of flavonoids, flavonoids glycosides and biflavonoids in *Olea europaea* L. Leaves. *Chromatographia* **33**:369-374.

Helias, 2008. Synthèse. Cahiers Agricultures **17** : 349-354 .

Henis T, Tagari H et Volcani R. (1965). Effect of Water Extracts of Carob Pods, Tannic Acid, and Their Derivatives on the Morphology and Growth of Microorganisms . *Applied and Environmental Microbiology* **12**: 204-209. d

Honda T, rounds B V, Bore L, Finlay H J, Favaloro F G, Wang Y, Sporn M B et Gribble G W. (2000). Synthétique oléanne and ursane triterpenoids with modified rings A and C: a serie of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse *macrophages*. *J Medical chemistry* **43**: 4233-4246.

Hennebelle T, Sahpaz S et Bailleul F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisation et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif *Phytothérapie* **1**: 3-6.

Hesse M. (2002) . Alkaloids, nature’s curse or blessing? *Verlag Helvetica Chimica Acta and Wiley* p: 239.

Hoffman L. (2003). Etude du métabolisme des phenylpropanoïdes : analyse de l’interaction de la caféoyl-Coenzyme A 3-O méthyltransférase (CCOAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d’une nouvelle acyltransférase, l’hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate/quinat hydroxycinnamoyl transférase (HCT). *Thèse de doctorat* .Université Louis Pasteur-Strasbourg, 143p.

Jacob Vet et Saeed M. (2006). Flavonoid content in leaf extracts of the fig *Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) and pistachio (*Pistacia lentiscus* L.). *Short Communication* **28**: 169-175.

Jaggi H R , Oberholzer et Winiger FA. (1991). Jambe noire et pourriture bactérienne de la pomme de terre provoquées par *Erwinia carotovora* . *Revue Suisse of Agriculture* **23**:341-348.

Janse J D et Ruissen M A. (1988). Characterisation and classification of *Erwinia chrysanthemi* strains from several hosts in the Netherlands. *Phytopathology* **78**:800-808.

Jemaia H, Bouaziza M, Fkia I, El Fekib A et Sayadi S. (2008). Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves . *Chemico-Biological Interactions* **176**:88–98.

Jenning BR et Ridler P J. (1999). Interaction of chromosomal stains with DNA an electrofluorescence study. *Biophysics structure mechanism* **10**:71-79.

John K M M, Vijayan D, Kumer R R et Premkumer R.(2006).Facteurs influençant l'efficacité de l'extraction de polyphénols de jeunes feuilles de thé. *Asian Journal of Plant Sciences* **1**:123-126.

Joslyn M A,Nishira H et Ito S. (2006).Leucoanthocyanins et composés phénoliques liés aux gousses de caroube (*Ceratonia siliqua*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **19**:543-550.

Juven B et Henys Y. (1972) .Etudes sur le mécanisme de l'action antimicrobienne de l'oleuropeine. *Journal of Applied Bacteriology* **35**: 559–567.

Kaileh M, Berghe W V, Boone E, Essawi T et Haegeman G.(2007).Screening of plantes médicinales palestiniennes pour l'activité anti-inflammatoire et cytotoxique. *Journal of Ethnopharmacology* **113** : 510–516.

Karou D , Dicko M H , Simporé J , Yameogo S , Sanon S et Traoré A S. (2005). Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Maîtrise des procédés en vue d'améliorer la qualité des aliments, utilisation des OGM, analyse des risques en agroalimentaire. 8-11.

Khayyal M T, El-Ghazaly MA , Abdallah DM , Nassar N N, Okpanyi S N et Kreuter MH. (2002). Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-NAME Hypertension in rats. *Arzneimittelforschung* **52**: 797-802.

Kivçak B , Mert T et Öztürk H T. (2002).Antimicrobienne et cytotoxique des extraits de *Ceratonia siliqua* L. *Turkish Journal of Botany* **26**: 197-200.

Klenow S, Glei M, Haber B, Owen R et Pool-Zobel B L. (2008). Carob fibre compounds modulate parameters of cell growth differently in human HT29 colon adenocarcinoma cells than in LT97 colon adenoma cells. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 1389–1397.

Klenow M G. (2009). New insight into the influence of carob extract and gallic acid on hemin induced modulation of HT29 cell growth parameters Stefanie. *Toxicology in Vitro* **23**:1055–1061.

Konaté K. (2007). Diversité phénotypique et moléculaire du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) et des bactéries endophytes qui lui sont associées. Thèse de doctorat. Université Mohammed V-Agdal.168 pages.

Kubo I, Matsamoto A et Takase I. (1985). A multichemical defence mechanism of bitter olive *Olea europaea* (oleaceae) is oleuropein a phytoalexin precursor. *Journal of chemical Ecology*. Volume 11.

Kumazawa S, Taniguchi M, Suzuki Y, Shimura M, Kwon M S et Nakayama T.(2002). Antioxydant Activity of Polyphenols in Carob Pods. *Journal Agricultural et Food Chemistry* **50** : 373–37.

Lagha S. (2007). Effet des extraits de plantes (*Pistacia lentiscus* L. et *Olea europaea sativa*) et d'un co-produit (grignon d'olive) sur la croissance de *Pectobacterium carotovorum* ssp *carotovorum* sur *Solanum tuberosum* L. Thèse de magister. Université de Béjaia. 73 pages.

Lapwood D H et Hering T F. (1968). Infection of tubers by common scab (*Streptomyces scabies*) during brief periods when the soil is drying. *European Potato Journal* **1**:177-187.

Lumb V M , Pérombelon M C M et Zutra D. (1986). Studies of a wilt disease of the potato plant in Israel caused by *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Pathology* **25**:196-202.

Le Tutour B et Guedon D. (1992).Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry* **31(4)**: 1173-1178.

L'huillier A. (2007). Contribution à l'étude phytochimique de quatres plantes malgaches : *Agauria salicifolia* hook.F *Tambourissa trichophylla* baker (monimiaceae) et *Embelia concinna* baker (myrsinaceae) .Thèse de doctorat.Université de Toulouse. 214 pages .

Lee O H ,Boo-Yong L, Junsoo L , Hee-Bong Lee , Jong-Youn Son , Cheon-Seok P, Kalidas S et Young-Cheul K.(2009). Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities *Bioresource Technology* **100**:6107–6113.

Lee O H et Lee B Y. (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology* **101**: 3751–3754.

Lee-Huang, Zhang SL, Huang PL, Chang Y et Huang PL.(2003).Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochem Biophys* **307** :1029-1037.

Lee-Huang S, Lin Huang P ,Zhang D , Lee J W , Bao J, Sun Y , Chang YT , Zhang J et Huang P L. (2007 a). Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part I. Integrase inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **354**: 872–878.

Lee-Huang S, Lin Huang P ,Zhang D , Lee JW, Bao J ,Sun Y,Chang Y T, Zhang J et Huang PL.(2007 b). Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part II. Integrase inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **354**: 879–884.

Long H S, Tilney PM et Wyk BEV (2010) .The ethnobotany and pharmacognosy of *Olea europaea* subsp. *africana* (Oleaceae) .*South African Journal of Botany* **76**:324–331.

Macheix J J, Fleuriet A et Jay-Allemand C. (2005). Nature et diversité des composés phénoliques. IN : les composés phénoliques des végétaux, un complexe de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes, CH-105 Lausanne. 1-31pages.

Makris D P et Kafalas P. (2004). Carob pods (*Ceratonia siliqua* L) as a source of polyphenolic antioxydant. *Food Technology and Biotechnology* **42**: 105-108.

Maoela M S, Arotiba G, Priscilla L B , Mabusela W T et Jahed N .(2009). Electroanalytical Determination of Catechin Flavonoid in Ethyl Acetate Extracts of Medicinal Plants . *International Journal of Electrochemical Science* 4 : 1497 – 1510.D

Marfak A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes, étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de LIMOGES. 180 pages.

Martin-Garcia A I, Moumen A,Yanez-Ruiz D R et Molina-Alcaide E. (2003). Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Animal Feed Science and Technology* 107: 61-74.

Mazza G, Fukumoto L, Delaquis P, Girard B et Ewert B. (1999). Anthocyanins, Phenolic, and color of cabernet franc, merlot, and pinot noir wines from british Columbia. *J.Agic.Food Chem* 47:4009-4017.

Mc Donald S, Prenzler P D, Antolovich M et Robards K. (2001). Phenolics content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry* 73: 73-82.

Micol V, Caturla N, Perez-Fons L, Mas V et Perez L.(2005). Espeta A.The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Research* 66:129-136.

Molina J J et Harrison M D. (1977) . The role of *Erwinia carotovora* in potato blackleg. I. Relationship of *E. carotovora* var. *carotovora* and *E. carotovora* var *atroseptica* to potato blackleg in Colorado. *American Potato Journal* 54:587-591.

Mossop W P. (2006). Bioactive extracts of *Olea europaea* L waste streams. Master thesis of technology Food .Massey University. 172 pages.D

Nagib K, Eldahshan O A et El-Katib W F. (2010).Promising antioxidant and cytotoxic activities of the aqueous ethanolic extract of carob leaves. *J Pharm Pharmacol* 4 :330-334.

Nefzaoui A. (1987).Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous-produits. *CIHEAM -option méditerranéennes* 1: 153-165.

Ortiga N, Macia A , Romero M P, Trullols E, Morello J R N,Anglès N et Motilva M .(2009).Rapid Determination of Phenolic Compounds and Alkaloids of Carob Flour by Improved Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 7239–7244.

Oomah B D, Cardador-Martinnez A et Loarca-Pina G. (2005).Phenolic and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L).*J Sci Food Agric* 85:935-942.

Oomah B D,Tiger N,Olson M,Balasubramanian P.(2006).Phenolic and oxidative activities in Narrow-Leafed Lupins (*Lupinus angustifolius* L).*Plant foods for Human Nutrition* 61:91-97.

Owen RW, Haubner R, Hull W E, Erbenr G, SpiegelhalderB et Bartsch H. (2003). Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food and Chemical Toxicology* **41**:1727–1738.

Plazonić A , Bucar F, Maleš Z , Mornar A, Nigović B et Kujundžić N.(2009). Identification and Quantification of Flavonoids and Phenolic Acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L.), Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Molecules* **14**: 2466-2490.

Papagiannopoulos M, Wollseifen H R, Mellenthin A, Haber B et Galensa R. (2004). Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MS. *Journal of agricultural and food chemistry* **12**: 3784-3791.

Pharmacopée européenne. (2008). Monographie 6^{ème} édition : p 1878.

Phillipson J et O'Neill M. (1987). New leads to the treatment of protozoal infections based on natural product molecules. *Acta Pharm Nord* **1**:131-144.

Pereira A P, Ferreira I C F R, Marcelino F, Valentão P, Andrade P B, Seabra R, Estevinho L, Bento A et Pereira J A. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules* **12**: 1153-1162.

Pérombelon M C M . (1974). The role of the seed tuber in the contamination by *Erwinia carotovora* of potato crops in Scotland. *Potato Research* **17**:187-199.

Pérombelon M C M et Kelman A. (1987). Blackleg and other potato diseases caused by soft rot *erwinias*: a proposal for a revision of terminology. *Plant Disease* **71**:283-285.

Pérombelon M C M ,Lumb V M , Zutra D, Hyman L J et Burnett E M. (1989). Factors affecting potato blackleg development. In : Tjamos, EC, Beckman, CH, eds Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on the interaction of Genetic and Environmental Factors in the development of Vascular Wilt Diseases of Plants' 1988 , Cape Sounion, Greece. Berlin: Springer-Verlag, 421-431.

Pérombelon, M.C.M. 1992. Potato blackleg epidemiology, host pathogen interaction and control. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **98**: 135-146.

Pérombelon M C M. (2002). Potato disease caused by soft rot *erwinia*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology* **51**:1-12.

Perrinjaquet-Moccetti T, Busjahn A, Schmidlin C, Schmidt A, Bradl3 B et Aydogan1 C. (2008). Food Supplementation with an Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Extract Reduces Blood Pressure in Borderline Hypertensive Monozygotic Twins. *Phytotherapy research* **22**: 1239-1242.

Petkov V et Monolov P.(1972). Pharmacological analysis of the iridoid oleuropeine-*Arzneim-Forsch* **22**(9):1476-1486.

Petroni A, Blasevich M, Papini N, Salami M, Sala A et Galli C. (1995). Inhibition of leukocyte leukotriene *B4* production by an olive-oil derived phenol identified by mass-spectrometry. *Thromb Rec* **87**:315-22.

Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Meier C, Kähkönen M, Heinonen M, Hopia A, Oksman-Caldentey K M.(2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal Applied Microbiology* **90** : 494-507.

Ranalli A, Contento S, Lucera L, DI Febo M, Archegiant D et DR Fonzo V. (2006). Factor affecting the content of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 438-448.

Rejeb M N. (1995). Le caroubier en Tunisie : situation et perspectives d'amélioration. In Quel avenir pour l'amélioration des plantes ? Ed. AUPELF-UREF. Jhon ibbey Eurotext. Paris. 79-85.

Rejeb M N et Lauguet P. (1991). Modification de la conductance stomatique de diverse origines tunisiennes de caroubier (*Ceratonia siliqua* L) soumises à une contrainte hydriques prolongée. L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides . Ed Aupelf Uref Paris. 149-158 pages.

Ribéreau-Gayon P. (1968). Notions générales sur les composés phénoliques. In : Les composés phénoliques des végétaux. *Edition Dunod*, p : 12-27.

Robards K. (2003). Stratégie for the determination of bioactive phénols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A* **1000**: 657-691

Rodney C, Toni M K et Norman G L. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites) In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*; B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds. *American Society of Plant Physiologists*. 1250-1318 pages.

Ryan D et Robards K. (1998). Phenolic compounds in olives. *The Analyst* **123**: 31R-44R.

Ryan D, Antholovich M, Prenzler P D, Robard K et Lavee S.(2002). Biotransformation of phenolic compound in *olea europaea* L. *Scientia Horticulturyae* **92**: 147-176.

Saavedra M J, Borges A, Dias C, Aires A, Bennett R A, Eduardo S R et Simões M.(2010). Antimicrobial Activity of Phenolics and Glucosinolate Hydrolysis Products and their Synergy with Streptomycin against Pathogenic Bacteria. *Medicinal Chemistry* **6**: 174-183.

Samson R, Legendre J B, Christen R, Achouak et Gardan L. (2005). Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Brenner *et al.* 1973) Hauben *et al.* 1998 and Brenneri *paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species: *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**:1415–1427.

Sanchez A v N, Capote F P, Luque de Castro M D. (2007). Ultrasound-assisted extraction and silylation prior to gaschromatography–mass spectrometry for the characterization of the triterpenic fraction in olive leaves. *Journal of Chromatography A* **1165**:158–165.

Shaiq A M , Jahangir M , Ul Hussan S S et Iqbal Chondhary M.(2002). Inhibition of β -Glycosidase by oleanolic acid and its synthetic derivatives. *Phytochemistry* **60**: 295-299.

Silanikove N, Landau S, Or D, Kababya D, Bruckental I et Nitsan Z. (2006). Analytical approach and effects of condensed tannins in carob pods (*Ceratonia siliqua* L) on feed intake, digestive and metabolic responses of kids. *Livestock Science* **99**: 29– 38.

Simoes M, Richard N, Bennett b et Eduardo A S R. (2009). Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports* **26**:746–757.

Singleton V L et ROSS J A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Amer J Enol Vitic* **16** : 144 - 153.

Škerget M, Kotnik P, Hadolin M, Rizner –Hras A, Simonic M et Knez Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidantactivities. *Food Chemistry* **89**: 191-198.

Soberon A G R, Sgariglia M A, Sampietro D A, Quiroga E N et Vattuone M A. (2007). Antibacterial activity of plant extracts from northwestern. *Journal of Applied Microbiology* **102**:1450–1461.

Soler-Rivas C, Carlos-Espin J et Wichers H J. (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal Science of Food and Agriculture* **80**:1013–1023.

Somova L I, Shode F O, Ramnanan P et Nadara. (2003). Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxydant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, substances Africana leaver. *J Ethmopharmacol* PP: 1-7.

Souza W M , Stinghen A E M et Santos C A M. (2004). Antimicrobial activity of alkaloidal fraction from barks of *Himatanthus lancifolius*. *Fitoterapia* **75**: 750–753.

Stommel J R, Goth R W , Haynes K G et Kim S H. (1996). (*Capsicum annum*) sof rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Plant Disease* **80**:1109-1142.

Scott R I , Chard J M , Hocart M J , Lennard J H et Grahams DC. (1996). Penetration of potato tuber lenticels by bacteria in relation to biological control of blackleg disease. *Potato Research* **39**: 333-334.

Shekhawat G S , Nagaich B B , Rajpal et Kishore V. (1976). Bacterial soft rot : a newdisease of the potato. *Potato Reserch* **19**:241-247.

Shi J, Yu J, Pohorly J, Christopher Young J, Bryan M et Wu Y. (2003). Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal Food. *Agriculture and Environment* **2**: 42-47.

- Sudjana A N, D’Orazio C, Ryan V, Rasool N, Ng J, Islam N, Riley T V et Hammer K A. (2008).**Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents* **33**: 461-463.
- Tabert J , Kevers C, Sipel A, Pincemail J, Defraigne J-O et Dommes J. (2007).**Optimization of extraction of phenolic and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage .*Food Chemistry*. 105:1268-1275.
- Tagari H , Henis Y, Tamir T et Volcani R.(1965).**Effect of Carob Pod Extract on Cellulolysis, Proteolysis, Deamination, and Protein Biosynthesis in an Artificial Rumen. *Applied microbiology* Vol 13.
- Tassou C C, Drosinos E H et Nychas G J E. (1997).** Short Communication: Weak antimicrobial effect of carob (*Ceratonia siliqua*) extract against food-related bacteria in culture media and model food systems. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **13**: 479-481.
- Tegos G, Stermitz F R, Lomovskaya O et Lewis K. (2002).** Multidrug pump inhibitors uncover Remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **46** : 3133-3141.
- Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, DiMajo D, Giammanco S et LaGuardia M. (2005).**The phenolic composition of olive oil: structure, biological activity, and beneficial effects on human health .*Nutr Res Rev* 18:98–112.
- Van der Watt E et Pretorius J S.(2001).** Purification and identification of active antibacterial components in *Carpobrotus edulis* L. *Journal of Ethnopharmacology* **76** :87–91.
- Villemur P et Dosba F. (2000).** Évolution variétale et acquisition de la maîtrise des pratiques culturales. *Oléagineux Corps Gras Lipides* **5**: 351-355.
- Visioli F, Bellosta S et Galli C. (1998).** Oleuropein, the bitter principal of olive enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sciences* **62**: 541-546.
- Wink M, Schmeller T et Latz-Brüning B.(1998).**Mode of action of allelochemical alkaloids interaction with neuroreceptors, DNA, and other molecular targets .*Journal of chemical ecology* Volume 24.
- Winkelhausen E, Pospeich R et Laufenberg G. (2005).** Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia* **24**: 41-46
- Yamadaa K , Ogawaa H, Haraa A, Yoshidaa Y, Yonezawaa Y, Karibea K, Nghiaa VB, Yoshimurab H, Yamamotoc Y, Yamadac M, Nakamurac K et Kunitoshi I.(2009).** Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus. *Antiviral Research* **83**:35–44.

Yasseen Khan M d, Panchal S, Vyas N, Butani A et Kumar V. (2007). *Olea europaea: A Phyto-Pharmacological Review. Pharmacognosy Reviews* **1**:114-118.

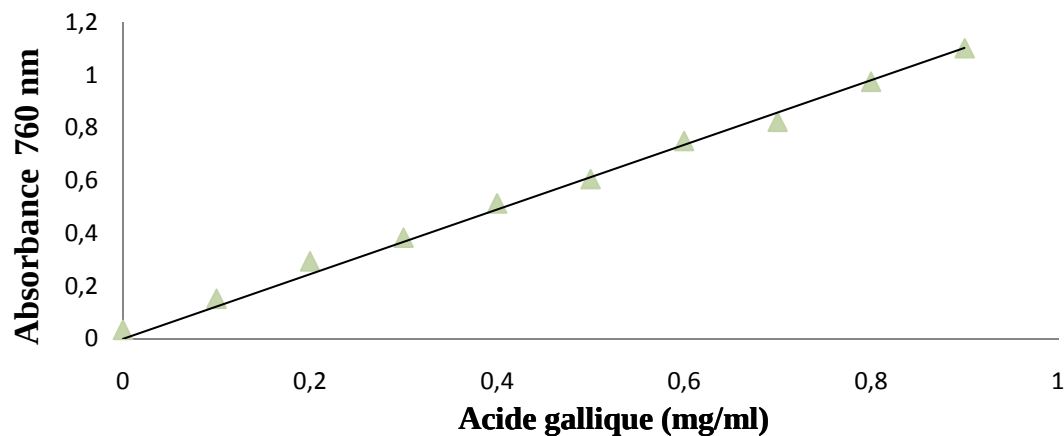
Yahiaoui- Zaidi R, Zaidi F et Lagha et Bechar S.(2007). Antimicrobial activity of olive cake and leaves phenolic extrect against soft rot of *Pectobacterium* on potato tubers. *African Potato Association Conference Proceedings* **7**: 259- 266.

Yi Z B, Yu Y, Liang Y Z et Bao Zeng.(2008). In vitro antioxidant and antimicrobial activities of theextract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids . *LWT* **41** :597–603 .

Zaher K S. (2007).In vitro studies on the antiviral effet of olive leaf against infectious laryngotracheitis virus. *Global Veterinaria* **1**:24-30.

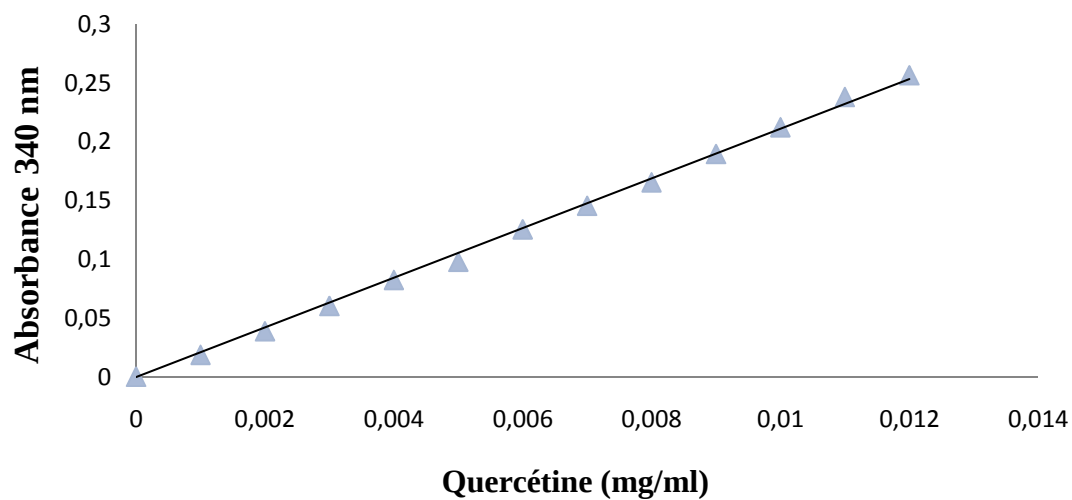
Zarzuelo A, Duarte J, Jime´nez J ,Gonzalez M et Utrilla MP. (1991). Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Med* **57**: 417-419.

Annexes

Annexe I : Courbes d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques.

$$Y = 1,2251 x, R^2 = 0,994$$

Courbe d'étalonnage pour le dosage des phénols totaux.



$$Y = 21,14x, R^2 = 0,998$$

Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.

Annexe II : Préparation des solutions et des milieux de culture

▪ Solution de Na_2CO_3 (20%)

La préparation se fait par dissolution de 20g de Na_2CO_3 dans 100ml d'eau distillée..

▪ Solution de AlCl_3 (2%)

2g de poudre de AlCl_3 anhydre ($\text{AlCl}_3\text{-H}_2\text{O}$) dans 100ml de méthanol.

Milieu King B	
Composition	Par litre
Peptone	20g
Phosphate de K dibasique (K_2HPO_4)	1,145g
Sulfate de Mg ($\text{Mg SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)	1,5g
Agar	15g
Glycérol	10ml
Eau distillée	1000ml

Milieu Levure Peptone Agar (LPA)	
Composition	Par litre
Peptone	5g
Extrait de levure	3g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

Annexe III Tableau : Classification et activité antibactérienne des composés phénoliques

Classes de composés		Structure générale	Exemple de composés	Substituant	Activité antibactérienne
Acides phénoliques	Acide cinnamique		Acide caféique	3,4-OH	- Membrane cellulaire -Hyperacidification du cytosol -Altération de la pompe ATP ase -Interaction avec les lipides et les protéines membranaires
			Acide sinapique	4-OH, 3,5-OCH ₃	
	Acide benzoïque		Acide gallique	3, 4,5-OH	
			Acide salicylique	2-OH	
Flavonoïdes	Flavanols		Catéchine	5,7, 3',4'-OH	- Membrane cellulaire -Interaction avec les lipides membranaire -Intéraction avec les protéines membranaires -Paroi cellulaire -Synthèse d'ADN -Métabolisme cellulaire -Inhibition d'ADN gyrase (topoisomérase II)
			Epigallocatechine	5,7, 3',4',5'-OH	
	Flavones		Apigénine,	5,7, 4'-OH	
			Lutéoline	5, 7,3' 4'-OH	
	Flavonols		Kaempférol	5, 7, 4'-OH	
			Quercétine	5, 7, 3', 4'-OH	
	Flavanones		Hespéritine	5, 7, 3'-OH, 4'-OCH ₃	
			Naringine	5, 4'-OH, 7-RHG	
	Iso flavones		Biochanine A	5, 7-OH, 4'-OCH ₃	
			Génistéine	5, 7, 4'-OH	
	Anrhocyanidine		Apigénidine	5, 7, 4'-OH	
			Malvidine	3, 5, 7, 4'-OH, 3', 5'-OCH ₃	
Tannins	Hydrolysables		Gallotannin	L'unité structurale de base est l'acide gallique	-Activité anti-adhérence -Inhibition des protéines fonctionnelles -Inhibition des enzymes -Séquestration des ions métalliques
			Ellagitannin		
	Condensés		Proanthocyanidine	L'unité structurale de base est la catéchine	

RHG : Rhamnose-Glucose ; OH : groupement Hydroxyle ; OCH₃ : groupement Méthyle

Annexe VI :Principales utilisations d'*O. europaea* L en médecine traditionnelle (Ross, 2005)

Organe	Propriétés/utilisation traditionnelles	Préparation et/ou mode d'administration	Pays
Feuilles	Hypertension, laxative	Décoction Orale	Iran
	Hypertension, diurétique, hyperglycémie	Orale	Brazil
	Traitement des dysenteries gastro-intestinales, diabète, analgésique	Orale	Espagne
	Hypotensive -inflammatoire	Infusion (Fe / sèches)	Italia
	Traitement des hémorroïdes	Rectale, en association avec les feuilles de thé de <i>Foeniculum vulgare</i>	Iles de canari
	Antiulcéreux	Cataplasme	Oman
	Constipation, les douleurs du foie, les oblitérations intestinales, tonique	Usage interne	Maroc
	Les formes légères de diabète, hypotensive	Orale	Tunisie
Fruit	Cholagogue, diurétique, hypotensive laxative, traitement des lithiases rénale et des obstructions intestinales		Oman et Italy
	Adoucir les membres fracturés, traitement des écorchures irrité, rhumatisme	Usage externe	
Fruits et graine	Les foulures ou les entorses au pied	Usage externe, poudre	Torque et Iran
	Otalgie, Émollient, adoucissant, prophylaxie pour les irritations causées par le bronzage et les piqures des insectes, antichute	Huiles, Usage externe	

Résumé

Deux plantes ont été choisies *Olea europaea* L et *Ceratonia siliqua* L, afin de quantifier les principaux groupes de composés phénoliques, suivi du fractionnement et leur analyse par chromatographie sur couche mince et de tester leur activités antibactériennes vis-à-vis *Pectobacterium atrosepticum*. Les résultats obtenus ont montré que les plantes étudiées renferment différentes catégories de composés phénoliques. Le fractionnement par CCM a permis de sélectionner 3 systèmes : Ethyle acétate-Dichlorométhane-Acide acétique-Acide formique-Eau (100-25-10-10-11) pour *C. siliqua* L (feuilles, graines et pulpes) et le système Dichlorométhane-Méthanol-Eau (85-15-1,5) pour les feuilles d'*O. europaea* L. La présence de la rutine dans les feuilles d'olivier a été mise en évidence en utilisant le système Ethyle acétate-Méthanol-Acide acétique –Eau (100-13,5-2,5-10). L'extrait méthanolique des substrats utilisés et leurs fractions majoritaires correspondantes sont habiles à inhiber la bactérie et cette inhibition varie selon la partie de la plante et la fraction.

Mots clés : *Olea europaea* L, *Ceratonia siliqua* L. composés phénoliques, CCM, *P. atrosepticum*

Abstract

Two plants have been chosen: *Olea europaea* L and *Ceratonia siliqua* L, in order to quantify the main groups of phenolic compounds, followed by fractionation and analysis by TLC and to test their antibacterial activities against *Pectobacterium atrosepticum*. The results obtained showed that the plants studied contain different categories of phenolic compounds. The fractionation by TLC allowed us to select three systems: Ethyl acetate Dichloromethane-Acetic acid-formic acid-water (100-25-10-10-11) for *C. Siliqua* L (leaves, seeds and pulp) and the system dichloromethane-methanol-water (85-15-1,5) for *O. europaea* L leaves. The presence of rutin in olive leaves has been demonstrated using the system Ethyl acetate-methanol-acetic acid-water (100-13,5-2,5-10). The methanol extract of substrates and their majority corresponding fractions are skilful to inhibit growth of bacteria and this inhibition varies depending to the part of the plant and the fraction.

Keywords: *Olea europaea* L, *Ceratonia siliqua* L. phenolic compound, TLC, *P. atrosepticum*

ملخص

هذا العمل يدخل في إطار البحث في الاعشاب الطبية المحلية وقد اختير نوعين *Olea europaea* و *Ceratonia siliqua* L بتحديد فعاليتها على لغرض ايجاد مجموعة العناصر الفينولية, تبعا بالفصل الكروماتوغرافي على قطع ملساء و تم تقييمها كبح النشاط البكتيري ضد *Pectobacterium atrosepticum*. اظهرت النتائج المحصل عليها ان الاعشاب تحتوي على فئات مختلفة من المركبات الفينولية. سمحت طريقة الفصل الكروماتوغرافي باختيار ثلاثة أنظمة EA-D-AA-AF-E بالنسبة لمنتجات الخروب ونظام DME بالنسبة لاوراق الزيتون, وقد ثبت وجود rutin في اوراق الزيتون باستخدام نظام EA-M-AA-E, اظهرت المستخلصات الميثانولية لهذه النباتات و العينات الكروماتوغرافية الموافقة لها فعاليتها على كبح نشاط هذه البكتيريا وهذا يختلف تبعا لجزء النبتة المستعملة و العينة.

الكلمات الأساسية

Olea europaea L , *Ceratonia siliqua* L , المركبات الفينولية , TLC , *P. atrosepticum*