République **A**lgérienne **D**émocratique et **P**opulaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderahmane Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Magister

En **Biologie**

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Activité antibactérienne des fractions chromatographiques des extraits phénoliques de Pistacia lentiscus

Présenté par:
M^{elle} BAKLI Sabrina

Devant le jury:

Président: M^{r} BENALLAOUA S.	(Pr., Université de Bejaia)
Promoteur: M^{r} ATMANI D.	(Pr., Université de Bejaia)
Invitée: M^{elle} AYOUNI K.	(M.A.A., Université de Bejaia)
Examinateurs: M^{r} KECHA M.	(M.C.A, Université de Bejaia)
M^{r} TOUATI A.	(M.C.A, Université de Bejaia)

Année 2009-2010

Remerciements

Au terme de ce modeste travail je tiens à remercier DIEU tout puissant de m'avoir donné le courage et la patience de réaliser ce travail.

C'est dans ce mémoire que toutes celles et tous ceux qui se sont penchés un tant soit peu sur ce travail trouveront mon message de profonde sympathie et de gratitude.

J'ai eu la chance d'effectuer ce travail de recherche dans le laboratoire de biochimie de l'Université de Béjaïa, sous la direction respective de Monsieur le professeur ATMANI Djebbar et M^{elle} AYOUNI karima.

Tout d'abord, je remercie sincèrement Monsieur le professeur ATMANI D., qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail tout au long de sa réalisation. Ses compétences, ses précieux conseils, et ses grandes qualités scientifiques et humaines ont constitué un support permanent à ma réflexion, sa disponibilité et sa gentillesse à mon égard ont contribué au bon déroulement de ce travail de recherche dans son laboratoire. J'ai trouvé en lui un directeur toujours disponible et ouvert.

Je veux exprimer ici ma vive reconnaissance à M^{elle} AYOUNI k. pour son dévouement incomparable, son Co-encadrement sans faille et pour ses nombreux avis éclairés durant nos entrevues. C'est grâce à sa bienveillance que j'ai pu réaliser ce travail. J'ai pu constamment bénéficier de ses suggestions et de ses encouragements.

Mes plus vifs remerciements vont aussi au Professeur BENALLAOUA. S., pour avoir bien voulu examiner ce mémoire et m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Qu'il reçoive l'expression de ma vive gratitude.

Je suis très sensible à l'honneur que me font M^{r}. Dr. M. KECHA et M^{r}. Dr. A. Touati, de l'Université de Béjaïa, en acceptant d'être les examinateurs de

ce travail. Je les remercie vivement pour cette marque d'intérêt et notamment de me faire l'honneur de participer à ce jury.

Je remercie les enseignants Mr. BEKDOUCHE et Mr. SAHNOUNE, qui nous ont fait profiter de leurs conseils en statistiques et l'enseignante Melle Bendali

Je ne saurai oublier tous mes collègues et camarades Microbiologistes et Biochimistes. J'ai apprécié leur amitié de tout instant et surtout la bonne ambiance au sein du laboratoire. Merci également à toute l'équipe de laboratoire, pour leur accueil chaleureux et amical et leurs qualités humaines et scientifiques : Mme ATMANI D., Melle BERBOUCHA M., Mme DEBBACHE N., Mme OUEHMED H., Melle LOUNIS H. et Melle CHAHER N.

J'exprime mes vifs remerciements aux membres du corps technique de la faculté de biologie techniciens et ingénieurs de laboratoire dont je citerai, Mr AMROUCHE pour son aide.

Il est évident que je ne peux oublier de remercier ma famille, notamment mes parents et mes frères, qui ont toujours été d'un grand secours moral en toutes situations.

Enfin, mes remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de prés ou de loin à la réalisation de ce travail ou qui m'ont encouragé et soutenu à tout moment

Je dédie ce travail
A mes très chers parents
A toute la famille
Et à tous mes ami(e)s.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

Chapitre I: Synthèse Bibliographique

I.1 Phytothérapie et plantes médicinales..... 2

I.1.1. Principes actifs des plantes médicinales..... 3

I.1.2. Activités biologiques des plantes médicinales..... 3

I.1.3. Activité antibactérienne des plantes médicinales..... 3

I.2. Métabolites secondaires (Principes actifs) et l'activité antibactérienne..... 4

I.2.1. Alcaloïdes..... 4

I.2.2. Huiles essentielles..... 7

I.2.3. Polyphénols……..... 9

I.2.3.1. Structure et classification des composés phénoliques..... 10

I.2.3.2. Propriétés des composés phénoliques..... 12

I.2.3.3. Composés phénoliques et l'activité antibactérienne..... 13

I.2.3.3.1. Acides phénoliques..... 14

I.2.3.3.2. Quinones..... 16

I.2.3.3.3. Coumarines..... 17

I.2.3.3.4. Flavonoïdes..... 19

I.2.3.3.5. Tannins..... 25

I.2.3.4. Caractérisation de l'activité antibactérienne par des méthodes chromatographiques..... 29

Chapitre II: Matériel et Méthodes

II.1. Matériel végétal..... 34

II.1.1. Récolte du matériel végétal et identification..... 34

II.1.2. Traitement des échantillons..... 34

II.2. Extraction..... 35

II.3. Dosage des composés phénoliques..... 36

II.3.1. Dosage des phénols totaux..... 36

II.3.2. Dosage des tannins..... 37

II.3.3. Dosage des flavonoïdes..... 37

II.4. Etude chromatographique des extraits de *P. lentiscus*..... 38

II.4.1. Chromatographie sur colonne..... 38

II.4.1.1. Préparation de la colonne..... 38

II.4.1.2. Dépôt des extraits et élution..... 39

II.4.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)..... 39

II.4.2.1. Préparation des plaques..... 40

II.4.2.2. Développement des plaques..... 40

II.4.2.3. Caractérisation post-chromatographique des composés de la plante..... 41

II.5. Étude de l'activité antibactérienne des extraits de *P. lentiscus*..... 41

II.5.1. Souches bactériennes..... 41

II.5.2. Repiquage des souches bactériennes..... 42

II.5.3. Préparation de l'inoculum bactérien..... 42

II.5.4. Détermination de l'effet antibactérien (aromatogramme)..... 43

II.5.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)..... 44

II.5.6. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)..... 45

II.6. Cinétique de croissance de *S. aureus* en milieu liquide en présence d'extrait aqueux d'hexane de *P. lentiscus*..... 45

II.7. Analyse statistique des données..... 46

Chapitre III: Résultats et Discussions

III.1. Extraction des composés phénoliques..... 47

III.2. Dosage des composés phénoliques..... 50

III.2.1. Dosage des phénols totaux..... 51

III.2.2. Dosage des tannins..... 52

III.2.3. Dosage des flavonoïdes..... 53

III.3. Activité antibactérienne des extraits et des fractions chromatographiques de *P.lentiscus*..... 54

III.3.1. Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *S. aureus* (ATCC6538)..... 58

III.3.2. Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *B. subtilis* (ATCC6633)..... 64

III.3.3. Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *L. innocua* (CLIP74915)..... 69

III.3.4. Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *P. aeruginosa* (ATCC27853)..... 73

III.3.5. Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *E. coli* (NAR)..... 78

III.3.6. Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *K. pneumoniae* (E_{47})..... 83

III.4. Cinétique de croissance de *S. aureus* en milieu liquide..... 92

III.5. Chromatographie sur couche mince (CCM)..... 94

III.5.1. Chromatographie sur couche mince de l'extrait aqueux chloroforme et ses fractions chromatographiques actives..... 96

III.5.2. Chromatographie sur couche mince de l'extrait aqueux hexane et ses fractions chromatographiques actives..... 99

Conclusion et perspectives..... 103

Références bibliographiques..... 106

Liste des abréviations			
ADN	Acide désoxyribo-nucléique	**E.N.S**	Ecole Normale Supérieure
ARN	Acide ribonucléique	**Eq**	Equivalent
ATCC	American type culture collection	**Gyr**	Gyrase
ATP	Adénosine triphosphate	**HPLC**	Hight-Performance Liquid Chromatography
AG	Acide gallique	**IR**	Infrarouge
AT	Acide tannique	***K. pneumoniae***	*Klebsiella pneumoniae*
BSA	Sérum albumine bovine	***L. innocua***	*Listeria innocua*
B. subtilis	*Bacillus subtilis*	**LMA**	Laboratoire de Microbiologie Appliquée
Cat	Catéchine	**MRSA**	Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*
CCM	Chromatographie sur couche mince	**NADPH**	Nicotinamide-Adénosine dinucléotide phosphate
CFA-SFM	Comité français de l'antibiogramme de la société française de microbiologie	**NAR**	Nalidixic acid resistant
Fab I, G	Bacterial Fatty Acid I, G	**OMS**	Organisation mondiale de la santé
CLIP	*Collection Listeria Institut Pasteur*	***P.aeruginosa***	*Pseudomonas aeruginosa*
CMB	Concentration minimale bactéricide	***P. lentiscus***	*Pistacia lentiscus*
CMI	Concentration minimale inhibitrice	**PCA**	Plate Count Agar
ECg	Epicatéchine gallate	**PEs**	pyrocatechol eqivalents
E. coli	*Escherichia coli*	**PLP**	Protéines Liant la Pénicilline
EGC	Epigallocatéchine	**Rf**	Rapport frontal
EGCg	Epigallocatéchine gallate	**RMN**	Résonnance Magnétique Nucléaire
EMB	Eosine au bleu de méthylène	***S. aureus***	*Staphylococcus aureus*
FAS-I, II	Fatty acid synthase I, II	**UFC**	unités formant colonies
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry	**UV**	Ultra violet

Liste des figures

Figure 01.	Structure de la morphine	4
Figure 02.	Structure de la berbérine	5
Figure 03.	Structure de la sceptrine	7
Figure 04.	Structures des composés phénoliques simples. A) acide benzoïque. B) acide cinnamique	14
Figure 05.	Structure de la *p*-quinone et de la *O*-quinone	16
Figure 06.	Structure de base des coumarines et d'une umbelliférone	17
Figure 07.	Exemples de furocoumarines: psoralène **(A)** angélicine **(B)**	18
Figure 08.	Structure de base des flavonoïdes avec la numérotation systématique	19
Figure 09.	Structure générale des isoflavones (Genisteine) **(A)**, des chalcones **(B)** des aurones **(C)** des anthocyanes **(D)**	20
Figure 10.	Micrographie de *Escherichia coli* sous Microscope Électronique à balayage (A) non traité (B) traité avec 10.000µg/ml TPP pendant 12 heures	24
Figure 11.	Structure de l'acide gallique, de l'acide ellagique et d'un tannin hydrolysable (gallotannins)	26
Figure 12.	Structure de la catéchine et d'un tannin condensé (proanthocyanidine)	26
Figure 13.	Photographie du matériel végétal	34
Figure 14.	Schéma récapitulatif des étapes de la procédure d'extraction	36
Figure 15.	**A)** Montage pour effectuer la chromatographie sur colonne. **B)** photographie du dispositif de la chromatographie sur colonne	39
Figure 16.	Montage pour effectuer une chromatographie sur couche mince	40
Figure 17.	Teneurs en phénols totaux des différents extraits de *P. lentiscus*	51
Figure 18.	Teneurs en tannins des différents extraits de *P. lentiscus*	52
Figure 19.	Teneurs en flavonoïdes des différents extraits de *P. lentiscus*	53
Figure 20.	Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *S. aureus*	62
Figure 21.	Activité antibactérienne des fractions de l'extrait éthanolique des fruits sur *S. aureus*	64

Figure 22.	Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *B. subtilis*	68
Figure 23.	Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *L. innocua*	72
Figure 24.	Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *P. aeruginosa*	76
Figure 25.	Activité des extraits des fruits de *P. lentiscus* sur *P. aeruginosa*	78
Figure 26.	Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *E. coli*	81
Figure 27.	Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *K. pneumoniae*	85
Figure 28.	Courbe de croissance de *S. aureus* en absence (—◆—) et en présence de l'extrait (—■—) ou la fraction (—▲—)	92
Figure 29.	Chromatogramme de l'extrait aqueux du chloroforme de feuilles de *P. lentiscus*, de fractions issues du fractionnement sur colonne et de quelques standards, à la lumière du jour avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H2O)	96
Figure 30.	Chromatogramme de l'extrait aqueux du chloroforme de feuilles de *P. lentiscus*, de fractions issues du fractionnement sur colonne et de quelques standards, révélés par la vanilline sulfurique avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H2O)	97
Figure 31.	Chromatogramme de l'extrait aqueux d'hexane de feuilles de *P. lentiscus*, de fractions issues du fractionnement sur colonne et de quelques standards, à la lumière du jour avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H_2O)	99
Figure 32.	Chromatogramme de l'extrait aqueux d'hexane de feuilles de *P. lentiscus*, de fractions issues du fractionnement sur colonne et de quelques standards, révélés par la vanilline sulfurique avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H_2O)	100
Figure 33.	Courbe d'étalonnage avec la catéchine pour le dosage des phénols totaux	**Annexe I**
Figure 34.	Courbe d'étalonnage avec la rutine pour le dosage des flavonoïdes	**Annexe I**
Figure 35.	Courbe d'étalonnage avec l'acide tannique pour le dosage des tannins	**Annexe I**
Figure 36.	Voies de biosynthèse des différentes classes de composés phénoliques	**Annexe III**
Figure 37.	Témoin négatif sur *S. aureus, B. subtilis, P. aeroginosa, L. innocua, E. coli* et *K. pneumoniae*	**Annexe IV**
Figure 38.	Activité des composés phénoliques purs sur *S. aureus, B. subtilis, P. aeroginosa, L. innocua, E. coli* et *K. pneumoniae* à différentes concentrations.	**Annexe IV**
Figure 39.	Activité des antibiotiques sur S. *aureus, B. subtilis, P. aeroginosa, L. innocua, E. coli* et *K. pneumoniae*.	**Annexe IV**

Liste des tableaux

Tableau I.	Classification des composés phénoliques	11
Tableau II.	Références et origine des souches bactériennes utilisées	42
Tableau III.	Taux d'extraction des extraits de feuilles et de fruits de *P. lentiscus*	49
Tableau IV.	Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des extraits et fractions chromatographiques de feuilles	56
Tableau V.	Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des extraits et fractions chromatographiques de fruits	57
Tableau VI.	Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des standards	57
Tableau VII.	Activité des extraits et des fractions chromatographiques des feuilles et du fruit de *P. lentiscus* sur *S. aureus* (ATCC6538)	61
Tableau VIII.	Activité des extraits et des fractions chromatographiques des feuilles et du fruit de *P. lentiscus* sur *B. subtilis* (ATCC6633)	67
Tableau IX.	Activité des extraits et des fractions chromatographiques des feuilles et du fruit de *P. lentiscus* sur *L. innocua* (CLIP74915)	71
Tableau X.	Activité des extraits et des fractions chromatographiques des feuilles et du fruit de *P. lentiscus* sur *P. aeruginosa* (ATCC27853)	75
Tableau XI.	Activité des extraits et des fractions chromatographiques de feuilles et du fruit de *P. lentiscus* sur *E. coli* (NAR)	80
Tableau XII.	Activité des extraits et des fractions chromatographiques de feuilles et du fruit de *P. lentiscus* sur *K .pneumoniae* (E_{47})	84
Tableau XIII.	Caractéristiques des taches de l'extrait aqueux du chloroforme et ses fractions chromatographiques	98
Tableau XIV.	Caractéristiques des taches de l'extrait aqueux d'hexane et ses fractions chromatographiques	101
Tableau XV.	Quelques caractères bactériologiques et pouvoir pathogène des souches bactériennes étudiées	Annexe II
Tableau XVI.	Diamètres des zones édités par le CFA-SFM, 2007	Annexe II
L'étude statistique des résultats des diamètres des zones d'inhibition		Annexe V

Tableau XVIIa.	Activité des extraits et des fractions chromatographiques de feuilles de *P. lentiscus* sur *S.aureus* (ATCC 6538)	Annexe V
Tableau XVIIb.	Activité des extraits et des fractions chromatographiques du fruits de *P. lentiscus* sur *S. aureus* (ATCC 6538)	Annexe V
Tableau XVIIIa.	Activité des extraits et des fractions chromatographiques de feuilles de *P. lentiscus* sur *B. subtilis* (ATCC 6633)	Annexe V
Tableau XVIIIb.	Activité des extraits et des fractions chromatographiques du fruits de *P. lentiscus* sur *B. subtilis* (ATCC 6633)	Annexe V
Tableau XIX.	Activité des extraits et des fractions chromatographiques de feuilles de *P. lentiscus* sur *L. innocua* (CLIP 74915)	Annexe V
Tableau XX.	Activité des extraits et des fractions chromatographiques de feuilles de *P. lentiscus* sur *P. aeruginosa* (ATCC27853)	Annexe V
Tableau XXI.	Activité des extraits et des fractions chromatographiques de feuilles de *P. lentiscus* sur *E. coli* (NAR)	Annexe V
Tableau XXII.	Activité des extraits et des fractions chromatographiques de feuilles de *P. lentiscus* sur *K .pneumoniae* (E_{47})	Annexe V

Introduction

L’utilisation des plantes médicinales s’inscrit dans le mouvement le plus large du développement de la médecine traditionnelle vue leurs nombreuses propriétés, et leur capacité à produire une variété de substances intéressantes, dont les antimicrobiens (Robard, 2004).

Durant cette dernière décennie, le recours à la médecine traditionnelle a connu un regain d’attention et un intérêt croissant dans le monde médical (Ju *et al*., 2004) car l'efficacité des médicaments, tels que les antibiotiques, considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves, décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leurs résistent de plus en plus (Larousse, 2001 ; de Billerbeck, 2007), d’où l’importance d’orienter les recherches vers de nouvelles voies, notamment les végétaux qui ont toujours constitué une source d’inspiration de nouveaux médicaments. D’ailleurs, plus de 6000 antibiotiques d’origine végétale ont été découverts (Keita *et al.,* 2004).

Plusieurs espèces végétales sont connues depuis longtemps pour leurs effets antimicrobiens. De ce fait, les plantes aromatiques et médicinales constituent une richesse naturelle très importante dont la valorisation demande une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur (Ouraïni *et al.,* 2007).

En Afrique, la médecine traditionnelle constitue le support fondamental pour la pratique de la médicine dans les zones rurales. L’usage des extraits de plantes contenant des constituants bioactifs est devenu une approche très importante dans la médecine préventive (Keita *et al.,* 2004). En effet, l'OMS (2002) estime que, pour se soigner, 80% de la population africaine recourt toujours à la médecine traditionnelle, pour laquelle la majeure partie des thérapies implique l'exploitation des principes actifs des plantes médicinales. Ces espèces végétales d'aussi grande importance pour la santé des populations méritent d'être étudiées scientifiquement pour leur meilleure utilisation (Biyiti *et al.,* 2004).

L'objectif de ce travail est l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits et des fractions chromatographiques de *Pistacia lentiscus.*

Synthèse bibliographique

I.1. Phytothérapie et plantes médicinales

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires. L'étude des activités biologiques des extraits de plantes est d'un grand intérêt ; en effet, les plantes constituent une source de substances naturelles ayant un grand potentiel d'application contre les insectes et d'autres parasites des plantes et du monde animal (Abdelwahed *et al.*, 2007 ; Bouzouita *et al.*, 2008).

Les plantes de façon générale et aromatiques en particulier, se caractérisent par deux types de métabolismes: le métabolisme primaire fournit les constituants de base et le métabolisme secondaire produit des métabolites en faibles quantités, mais dont les applications dans différents domaines, en particulier à intérêts pharmaceutique et cosmétique, voir nutritionnel, sont de la plus grande importance. Les huiles essentielles, les alcaloïdes et les composés phénoliques font partie de ce deuxième groupe de métabolites (Farah et Abdelhafid, 2008).

Les propriétés médicales des plantes médicinales dépendent de la présence d'agents bioactifs variés et appartenant à différentes classes chimiques. Elles sont considérées comme un véritable réservoir de molécules irremplaçables (Okigbo et Ajalie, 2005 ; Őzçelik *et al.*, 2005 ; Ouraïni *et al.*, 2005 ; Kumaraswamy *et al.*, 2008).

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) définit la médecine traditionnelle comme une médecine comprenant «diverses pratiques, approches, connaissances et croyances sanitaires intégrant des médicaments à base de plantes, d'animaux et/ou de minéraux, des traitements spirituels, des techniques manuelles et exercices, appliqués seuls ou en association afin de maintenir le bien-être et traiter, diagnostiquer ou prévenir la maladie» (Robard, 2004).

I.1.1. Principes actifs des plantes médicinales

Les métabolites secondaires sont des composés appartenant à des groupes chimiques extrêmement divers. Chacun de ces groupes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activité en biologie humaine (Bruneton, 1999). Ils représentent généralement moins de 10% des métabolites totaux de la plante, issus généralement de précurseurs tels que les sucres, l'acétyle CoA, les nucléotides et les acides aminés (Kintzios et Barberaki, 2004).

I.1.2. Activités biologiques des plantes médicinales

Les plantes médicinales ont montré à travers plusieurs études des activités biologiques très importantes pour l'organisme, à savoir l'activité antioxydant (Tepe *et al*., 2006 ; Wong et kitts, 2006 ; Albayrak *et al.,* 2010 ; Kong *et al.,* 2010b), anti-inflammatoire (De Bruyne *et al.,* 1999 ; Eldeen *et al.,* 2005 ; Ranilla *et al.,* 2010), anti-ulcère (De Bruyne *et al.,* 1999)**,** anti-cancer (Le marchand, 2002 ; Shang *et al.,* 2010 ; Kong *et al.,* 2010b), anti-parasitaire (Lopez *et al.*, 2001 ; Atindehou *et al.,* 2004), anti-fongique (Navarro-Garcia *et al.,* 2003 ; Kordali *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.,* 2006 ; Naili *et al.,* 2010), anti-virale (Simdambiwe *et al.*,1999 ; Lopez *et al.*, 2001 ; Zovko Končić *et al.,* 2010) et antibactérienne (Basile *et al*., 1999 ; Cottiglia *et al*., 2001 ; Kunle *et al.,* 2003; Khattak *et al.,* 2005; Cushnie et Lamb, 2006; Punitha *et al.,* 2008; Castro-Vargas *et al.,* 2010 ; Khadri *et al.,* 2010).

I.1.3. Activité antibactérienne des plantes médicinales

Les plantes peuvent résister à l'attaque des parasites en utilisant plusieurs mécanismes de défense dont la synthèse de composés à activité antimicrobienne, appelés phytoalexines, qui appartiennent à une large gamme de produits de différentes classes chimiques incluant; les alcaloïdes, les huiles essentielles et les composés phénoliques (Wang *et al.,* 2008).

Les plantes médicinales sont connues pour leur propriété de produire certains composés chimiques naturellement toxiques pour les bactéries (Basile *et al.,* 1999; Rauha, 2001). De nombreux chercheurs ont testé l'activité antibactérienne des extraits de plantes médicinales ainsi que des substances pures d'origine végétale sur de nombreuses souches bactériennes pathogènes pour l'Homme (Basile *et al*., 1999; Cottiglia *et al*., 2001 ; Kunle

et al., 2003 ; Khattak *et al.,* 2005 ; Cushnie et Lamb, 2006 ; Jimoh *et al.,* 2010 ; Quílez *et al.,* 2010).

La plupart des études effectuées pour la mise en évidence ou pour la confirmation de l'activité antibactérienne des extraits de plantes médicinales ont été suivie par des études de caractérisation des substances bioactives. On attribue, généralement, à l'activité antibactérienne de la plante plusieurs principes actifs tel que les huiles essentielles (Navarro *et al.*, 1996; Delaquis *et al.*, 2002; Tepe *et al.*, 2006 ; de León *et al.,* 2010), les alcaloïdes (Cowan, 1999; Pennachio *et al.*, 2005 ; Nenaah, 2010) et les composés phénoliques (Navarro *et al.*, 1996 ; Cowan, 1999; Rauha, 2001 ; Nostro *et al.*, 2000 ; Voravuthikunchai et *al.*, 2005 ; Cushnie et Lamb, 2006 ; Zhang *et al.,* 2010).

I.2. Métabolites secondaires et activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des métabolites secondaires est étroitement liée à la diversité de leur structure chimique (Orhan *et al.,* 2007).

I.2.1. Alcaloïdes

Ce sont des composés azotés hétérocycliques, structurellement diversifiés ; ils s'étendent de simples structures aux plus complexes, dont la plupart dérivent des acides aminés (Bandaranayake, 2002 ; Kita et Uemura, 2006 ; Marasco et Schmidt-Dannert, 2007). Le premier alcaloïde utilisé dans le domaine médical était la morphine, isolée en 1805 de l'opium «*Paver somniferum*». Le mot morphine (Fig.01) vient du grec Morpheus, ce qui signifie 'le Dieu des rêves'. La codéine et l'héroïne sont les deux dérivés toxiques de la morphine (Samy et Gopalakrishnakone, 2008). En effet, ces alcaloïdes ont attiré une attention considérable due à leurs propriétés médicinales et toxiques. Ils sont en règle générale, insolubles dans l'eau, mais solubles dans certains solvants tels que l'alcool, l'éther, le chloroforme,…etc (Onslow, 1920).

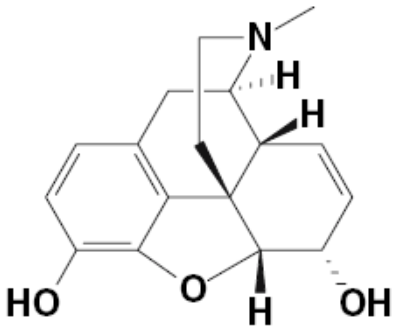
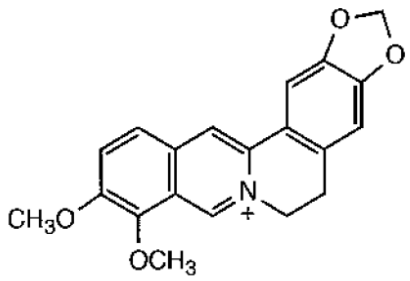


Figure 01. Structure de la morphine (Dembitsky, 2008)

Plus de 18.000 alcaloïdes différents ont été découverts dans plus de 300 familles de plantes, micro-organismes, mycètes, invertébrés marins, insectes et d'autres organismes (Kita et Uemura, 2006). La position de l'atome d'azote dans le cycle de carbone varie avec différents alcaloïdes et avec différentes familles de plantes, micro-organismes, et/ou invertébrés. En fait, c'est la position précise de l'atome d'azote qui affecte les propriétés biologiques de ces alcaloïdes (Dembitsky, 2005).

Ils sont extrêmement toxiques bien qu'ils aient un effet thérapeutique marqué à faible dose (Bruneton, 1999). Des alcaloïdes purs, isolés de plantes et leurs dérivés synthétiques sont utilisés en tant qu'agents universels pour leurs effets analgésiques, antispasmodiques et bactéricides (Ciocan et Băra, 2007).

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'effet antibactérien des alcaloïdes (Al-Momani *et al.,* 2007; El-Seedi *et al.,* 2007 ; Delso *et al.,* 2010 ; Nenaah, 2010 ; Yu *et al.,* 2010). Orhan *et al.,* (2007) ont rapporté que tous les types d'alcaloïde semblent être plus actifs contre les bactéries Gram$^-$ que les bactéries Gram$^+$. Une forte activité antibactérienne de la berbérine (Fig. 02) a été rapportée contre *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Staphylococcus aureus, Salmonella typhi, Enterococcus sp.* et *Serratia marcescens,* montrant une meilleure activité que la streptomycine à 50µg/ml par la méthode de diffusion sur disque (Orhan *et al.,* 2007). Par ailleurs, l'activité antimicrobienne de la berbérine est principalement attribuée à son pouvoir de se lier à l'ADN (Stermitz *et al.,* 2000; Gómez-Galera *et al.,* 2007).



berberine

Figure 02. Structure de la berbérine (Stermitz *et al.,* 2000)

Les extraits alcaloïdes de pyrrolizidine (*Heliotropium subulatum*) ont exercé une activité antimicrobienne contre des espèces bactériennes et fongiques (Samy et Gopalakrishnakone, 2008). Il a été montré que les alcaloïdes inhibent spécifiquement la topoisomérase II avec une IC50 de 59,1 µM sans affecter l'activité de la topoisomérase I (Martinez-Luis *et al.,* 2007 ; Samy et Gopalakrishnakone, 2008). Le fractionnement de l'extrait méthanolique de *Samanea samana* a mené à l'isolement d'une fraction active qui a enregistré une activité antibactérienne fortement significative *in vitro* avec des CMIs de 3 à 11 µg/ml contre les bactéries pathogènes pour l'Homme (3 µg/ml pour *Staphylococcus aureus*). Cette fraction active a été confirmée comme étant un alcaloïde (Raghavendra *et al.,* 2008).

Les résultats obtenus par Souza *et al.* (2004) ont indiqué que la fraction alcaloïde des écorces de tige de *Himatanthus lancifolius* est active contre quelques microorganismes pathogènes pour l'Homme : c'est le cas de *Staphylococcus aureus* comprenant les souches multirésistantes (MRSA) et *Staphylococcus epidermidis, Enterococcus faecalis, Escherichia coli* et *Acinetobacter baumanii* et quelques pathogènes des animaux tel que *Staphylococcus aureus* canine. Cette activité a été attribuée à la présence des alcaloïdes indoliques (Souza *et al.,* 2004). Les alcaloïdes totaux de l'écorce de tige de *Xylopia frutescens* présentent une modeste activité antibactérienne vis-à-vis de souches de staphylocoques, de streptocoques et de *Bacillus subtilis,* mais aucune activité antifongique n'a été rapportée (Leboeuf *et al.,* 1982).

La sceptrine (Fig.03) a été rapportée pour avoir une activité antibactérienne (*Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis et Pseudomonas aeruginosa*) et antifongique (*Candida albicans*). Elle a démontré un effet bactériostatique plutôt qu'un effet bactéricide vis-à-vis de *E. coli* et induit la formation des sphéroplastes. Elle a un effet sur la paroi de *E. coli,* démontré par un dégagement d'un matériel contenant de l'acide diaminopimélique de haut poids moléculaire. Il a été suggéré que la sceptrine perturbe la membrane de la cellule et provoque la fuite du potassium (K^+) suivi d'une lyse des cellules procaryotes. La formation des sphéroplastes peut refléter un effet sur la paroi cellulaire, qui se produit suite à des dommages membranaires (Dembitsky, 2008).

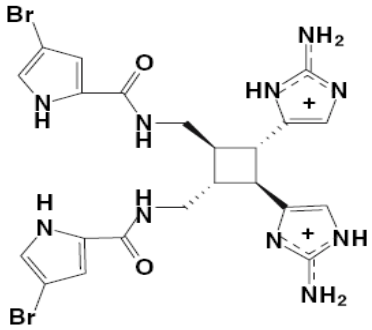


Figure 03: Structure de la sceptrine (Dembitsky, 2008)

I.2.2. Huiles essentielles

Dans la nature, les huiles essentielles (HE) sont produites par des plantes comestibles, médicinales ; elles jouent un rôle important dans leur protection comme agents antibactériens, antiviraux, antifongiques, insecticides et contre des herbivores par la réduction de leur appétit pour de telles plantes. Elles peuvent également attirer quelques insectes pour favoriser la dispersion des graines de pollen ou repousser d'autres (Bakkali *et al.,* 2008).

Les HE, connues aussi sous le nom d'huiles volatiles ou éthérées sont des mélanges complexes de composants oxygénés et des hydrocarbures de formule générale $(C_5H_8)_n$. Ces composés aromatiques sont généralement extraits par distillation ou par solvants, à partir de différentes parties d'une plante ; les feuilles, les fleurs, la tige, les graines, les racines et l'écorce (Burt, 2004 ; Schulz *et al.,* 2004 ; Dembitsky, 2006 ; Bouaoun *et al.,* 2007 ; Vagionas *et al.,* 2007 ; Bakkali *et al.,* 2008 ; Batish *et al.,* 2008 ; Benchaar *et al.,* 2008 ; Brenes et Roura, 2010).

L'utilisation des vertus antimicrobiennes des HE ne date pas d'aujourd'hui. Plusieurs manuscrits très anciens décrivaient déjà de nombreuses recettes à base de plantes et d'huiles aromatiques que les prêtres et les médecins employaient. L'utilisation des HE est liée à leurs différentes activités biologiques reconnues (Kanko *et al.,* 2004) et elle s'effectue sur des bases scientifiques et rationnelles dans le but de mettre au point de nouveaux produits à divers usages médical et cosmétique. En effet, dans la littérature, plusieurs travaux de recherche ont prouvé leurs propriétés aromatisante, antimicrobienne, antivirale, insecticide et leur toxicité réduite (Benjilali *et al.,* 1986 ; Bassole *et al.,* 2001 ; Batish *et al.,* 2008 ; Bourkhiss *et al.,* 2007 ; Satrani *et al.,* 2007 ; El Ajjouri *et al.,* 2008 ;

Kaloustian *et al.,* 2008 ; Farah et Abdelhafid, 2008). D'ailleurs, les HE font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative aux traitements des maladies infectieuses d'origine bactérienne et fongique (de Billerbeck, 2007 ; Lefevre *et al.,* 2008).

La complexité chimique des HE empêche la reconnaissance de la part des germes pathogènes et diminue ainsi le risque de développement de résistance. Elles augmentent la capacité défensive de l'organisme en rééquilibrant la flore intestinale et les fonctions déficientes, voire une activité immunostimulante (de Billerbeck, 2007).

Les HE sont très riches en composés à spécificité intrinsèque qui définissent leurs caractéristiques, exigeant certaines précautions d'emploi. C'est par la synergie moléculaire des huiles essentielles véritables, c'est-à-dire non reconstituées synthétiquement, que la toxicité de ces molécules s'avère toute relative car les effets des uns compensent et équilibrent les effets des autres (Hilan *et al.,* 2009). En effet, certaines études ont montré que l'activité antimicrobienne des HE peut être supérieure à celle de ses composés majoritaires testés séparément. Cette dominance d'activité des essences sur celle d'un composant majoritaire confirme bien l'effet de synergie que pourrait apporter les composants minoritaires à l'activité des HE (Amarti *et al.,* 2008).

Etant donné que les HE comportent un grand nombre de composants, il est possible que leur activité antibactérienne ne soit pas due à un mode d'action spécifique mais implique plusieurs cibles dans la cellule bactérienne (Carson *et al.,* 2002 ; Burt, 2004 ; Fisher et Phillips, 2008).

Généralement, les HE exercent leur effet antimicrobien au niveau de la membrane cytoplasmique par altération de sa structure ainsi que sa fonction , interférant de ce fait avec la perméabilité membranaire en provoquant la fuite intracellulaire de K^+ qui est souvent un signe précoce du dommage et le plus souvent suivi par la fuite des constituants cytoplasmiques (Cowan, 1999; Benchaar *et al.,* 2008). La perte de la perméabilité différentielle de la membrane cytoplasmique est fréquemment identifiée comme cause de la mort cellulaire.

D'autres événements qui pourraient mener au dysfonctionnement membranaire, suivi de la rupture incluant la dissipation des deux composants de la force motrice de protons dans la cellule (le gradient de pH et le potentiel électrique) sont : soit des changements de transport ionique, ou dépolarisation par des changements des structures membranaires, qui interférent avec le système de la synthèse d'ATP par inhibition d'enzymes empêchant l'utilisation de substrat pour générer de l'énergie (Holley et Patel, 2005).

Les HE ont une affinité élevée pour les lipides membranaires des cellules bactériennes qui est due à leur nature hydrophobe et leurs propriétés antibactériennes sont évidemment associées à leur caractère lipophile (Lee *et al.*, 2004 ; Benchaar *et al.*, 2008 ; de León *et al.*, 2010). Burt (2004) a suggéré que les bactéries $Gram^+$ semblent être plus susceptibles aux composés des HE des plantes que les bactéries $Gram^-$. Ceci peut être du à la présence d'une membrane externe chez les bactéries $Gram^-$ qui entoure la paroi et agit en tant que barrière de perméabilité, limitant l'accès des composés hydrophobes (Benchaar *et al.*, 2008 ; Bamoniri *et al.*, 2010 ; de León *et al.*, 2010 ; Oroojalian *et al.*, 2010 ; Tajkarimi *et al.*, 2010).

I.2.3. Polyphénols

Le terme polyphénol a été introduit en 1980, en remplacement du terme ancien de tannin végétal, et a été défini comme suit: «Composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3 000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines» (Chira *et al.*, 2008).

Les polyphénols constituent le groupe de métabolites le plus large et le plus répandu du règne végétal et font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (Martin et Andriantsitohaina, 2002). Ils appartiennent à leur métabolisme secondaire et participent à leur défense contre les agressions environnementales. Ce sont des phytomicronutriments et généralement des pigments responsables des teintes automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et fruits (jaune, orange, rouge) (Ghedira, 2005; Edeas, 2007).

I.2.3.1. Structure et classification des composés phénoliques

Plus de 8000 structures phénoliques sont connues, allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins (Martin et Andriantsitohaina, 2002 ; Lugasi *et al*., 2003 ; Cheynier, 2005 ; Balasundram *et al.,* 2006 ; Porat *et al.,* 2006 ; Chira *et al.,* 2008). Ces molécules présentent un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH), libres ou engagés dans une autre fonction éther, ester, hétéroside (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Bruneton, 1999 ; Kevin *et al*., 1999 ; Robards *et al*., 1999 ; Hennebelle *et al*., 2004 ; Balasundram *et al.,* 2006 ; Chira *et al.,* 2008). Ils sont synthétisés à partir de deux voies biosynthétiques (Martin et Andriantsitohaina, 2002 ; Chira *et al.,* 2008):

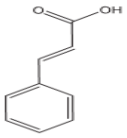
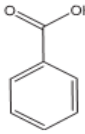
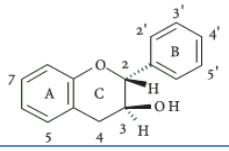
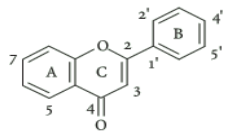
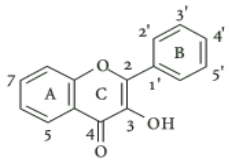
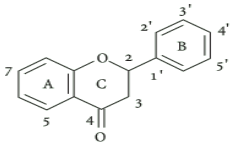
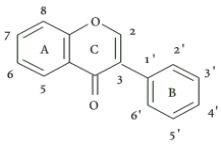
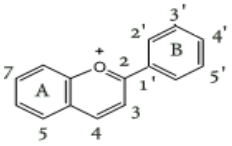
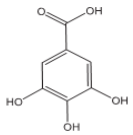
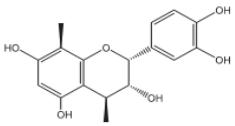
- La voie la plus courante est celle de l'acide shikimique, qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples (Richter, 1993).

- La voie des polyacétates, qui est à l'origine des poly β-cétoesters (polyacétates) participe d'une manière secondaire à leur biosynthèse (Guignard, 1996).

De plus, la diversité structurale des composés phénoliques, due à cette double origine bio-synthétique est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

Les polyphénols sont classés, selon leur structure en trois catégories principales: les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins (Tableau I) (Balasundram *et al.*, 2006 ; Edeas, 2007).

Tableau I. Classification des composés phénoliques

Classes de composés		*Structure générale*	*Exemples de composés*	*Substituants*	*Références*
Acides phénoliques	***Acide cinnamique***		Acide caféique	3, 4-OH	Galati et O'Brien, 2004
			Acide sinapique	4-OH, 3, 5-OCH_3	Robards *et al*., 1999
	Acide benzoïque		Acide gallique	3, 4, 5-OH	Anandjiwala *et al.*, 2007; Yoshimura *et al.*, 2008
			Acide salicylique	2-OH	Vermerris et Nicholson, 2006
Flavonoïdes	***Flavanols***		Catéchine	5, 7, 3', 4'-OH	Gramza et Korczak, 2005
			Epigallocatéchine	5, 7, 3', 4', 5'-OH	Bennick, 2002
	Flavones		Apigénine	5, 7, 4'-OH	Porat et *al*., 2006
			Lutéoline	5, 7, 3', 4'-OH	Robards *et al*., 1999
	Flavonols		Kaempférol	5, 7, 4'-OH	Manach *et al*., 2004
			Quercétine	5, 7, 3', 4'-OH	Seeram *et al.*, 2006
	Flavanones		Hespéritine	5, 7, 3'-OH, 4'-OCH_3	Narayana *et al.*, 2001
			Naringine	5, 4'-OH, 7-RHG	Ghedira, 2005
	Isoflavones		Biochanin A	5, 7-OH, 4'-OCH_3	Pietta, 2000
			Génistéine	5, 7, 4'-OH	Robards *et al*., 1999
	Anthocyanidine		Apigénidine	5, 7, 4'-OH	Heim *et al.*, 2002
			Malvidine	3, 5, 7, 4'-OH, 3', 5'-OCH_3	Cheynier, 2005
Tannins	***Hydro-lysables***		Gallotannin	L'unité structurale de base est l'acide gallique	Bennick, 2002; Balasundram *et al.*, 2006
			Ellagitannin		
	Condensés		Proanthocyanidine	L'unité structurale de base est la catéchine	Khanbabaee et Ree, 2001; Balasundram *et al.*, 2006

RHG : Rhamnose-Glucose ; **OH** : groupement Hydroxyle ; **OCH_3** : groupement Méthyle

I.2.3.2. Propriétés des composés phénoliques

La grande diversité structurale des composés phénoliques est responsable d'une grande variété de propriétés physico-chimiques et d'activités biologiques**.**

I.2.3.2.1. Propriétés physicochimiques des composés phénoliques

Les polyphénols sont solubles dans les solvants polaires tels que le méthanol, l'éthanol et l'eau. Cependant cette solubilité varie d'une classe de composés à une autre, selon leur nature chimique, la polarité des solvants utilisés, les substitutions (méthylation ou glycosylation) sur les groupements hydroxyles, ainsi que leur degré de polymérisation et leur interaction avec d'autres composés, qui peuvent mener à la formation des complexes insolubles (Naczk et Shahidi, 2004 ; Macheix *et al*., 2005 ; Naczk et Shahidi, 2006).

Tous les composés phénoliques des végétaux absorbent dans l'UV, alors que ceux responsables de la coloration des organes végétaux (fleurs, fruits…) absorbent dans le visible tel que les anthocyanes, flavonols, chalcones et aurones. Leurs spectres d'absorption résultent en général de la présence combinée des cycles benzéniques, des groupements hydroxyles et les différentes doubles liaisons portées par ces molécules (Tsao et Deng, 2004; Naczk et Shahidi, 2006).

En outre, les composés phénoliques simples ont un maximum d'absorption entre 220 et 280 nm, les flavonoïdes présentent deux gammes d'absorption importantes ; une de 320 à 385 nm, représentant l'absorption du cycle B et l'autre de 250 à 285 nm représentant l'absorption du cycle A. Cette absorption est affectée par la nature du solvant utilisé et le pH de la solution. Par ailleurs, la possibilité d'interférence par les substances qui absorbent dans l'UV, telles que les protéines, les acides nucléiques et les acides aminés devrait être considérée (Robards *et al.,* 1999 ; Naczk et Shahidi, 2006 ; Zhou *et al.,* 2009).

I.2.3.2.2. Propriétés biologiques des composés phénoliques

I.2.3.2.2.1. Propriétés biologiques des composés phénoliques dans la plante

Les composés phénoliques sont synthétisés par les plantes, pendant leur développement normal et en réponse à certaines conditions de stress, telles que les radiations UV et l'infection par des phytopathogènes (Heim *et al.,* 2002 ; Dembitsky, 2005 ; Naczk et Shahidi, 2006).

L'intégration du métabolisme phénolique dans le programme général du développement d'un organe végétal pose en elle-même la question d'un rôle éventuel de ces substances. Il a été montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques: la croissance cellulaire, la différenciation organogène, la dormance des bourgeons, la floraison, la tubérisation. Ils sont impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures et aboutissent à la formation au niveau de la blessure d'un tissu cicatriciel résistant aux infections. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des micro-organismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (Bahorun, 1997).

I.2.3.2.2.2. Propriétés pharmacologiques des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont actuellement l'objet de nombreuses études car ils sont reconnus pour leurs différentes activités biologiques (Trabelsi *et al.,* 2010) et ils ont été rapportés pour des propriétés pharmacologiques intéressantes et variées, à savoir leurs propriétés anti-inflammatoires (Vergé *et al.,* 1999 ; Narayana *et al.,* 2001 ; Nijveldt *et al.,* 2001 ; Ismail *et al.,* 2010), anticancéreuse (Derbel et Ghedira, 2005 ; Zhang *et al.,* 2010), anti-athérosclérose (Halliwell, 2008), anti-agrégation plaquettaire (Vergé *et al.,* 1999 ; Martin et Andriantsitohaina, 2002), anti-allergique (Zhao *et al.,* 2005 ; Cevallos-Casals et Cisneros-Zevallos, 2010), inhibitrice d'enzymes (Pietta, 2000 ; Manthey *et al.,* 2001), antioxydants et anti-radicalaires (Pincemail *et al.,* 2002 ; Roginsky et Lissi, 2005 ; Djeridane *et al.,* 2006 ; Rahman *et al.,* 2006 ; Ismail *et al.,* 2010 ; Troszyńska *et al.,* 2010), antivirale (Nijveldt *et al.,* 2001 ; Narayana *et al.,* 2001 ; Cevallos-Casals et Cisneros-Zevallos, 2010), antifongique (Harborne et Williams, 2000) et antibactérienne (Bahorun, 1997 ; Cowan, 1999 ; Harborne et Williams, 2000 ; Raj Narayana *et al.,* 2001 ; Dembitsky, 2005 ; Kuete *et al.,* 2010).

I.2.3.3. Composés phénoliques et l'activité antibactérienne

L'activité de ces substances vis-à-vis des microorganismes peut s'exercer selon des modalités extrêmement diverses. Certaines exercent leur activité en oxydant ou en dénaturant les protéines bactériennes (Schiota *et al.,* 2004), d'autres ont un pouvoir plus spécifique en altérant les structures membranaires ou en inactivant des composés ou des fonctions essentielles de la cellule (Awadh-Ali *et al.,* 2001 ; Eldeen *et al.,* 2005 ; Song *et al.,* 2007). De ce fait, ils sont bactéricides ou bactériostatiques selon les concentrations (De Bruyne *et al.,* 1999 ; Alcaráz *et al.,* 2000).

En dehors de l'influence du caractère lipophile de la molécule, l'activité antibactérienne des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes, dépend essentiellement de la longueur, la ramification et la position de la chaîne de substitution liée au noyau phénolique, mais aussi à la nature des substituants et le degré d'encombrement du noyau phénolique (Basile *et al.*, 1999 ; Alcaráz *et al.*, 2000).

I.2.3.3.1. Acides phénoliques

Ils sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique, dérivés des acides benzoïques (C6-C1) ou des acides cinnamiques (C6-C3). D'après Cai *et al.* (2006), les acides phénoliques peuvent être subdivisés en:

- Acides hydroxybenzoiques: *ils* présentent une structure en C6-C1, composée d'un noyau benzénique sur lequel vient s'attacher une chaine aliphatique à un carbone. Le principal composé est l'acide gallique (Cheynier, 2005 ; Chira *et al.*, 2008).
- Acides hydroxycinnamiques: Leur squelette de base est un noyau benzénique avec une chaine aliphatique à trois carbones (C6-C3) avec un ou plusieurs groupements OH, souvent estérifiés en ester d'alcool aliphatique (Cheynier, 2005 ; Chira *et al.*, 2008).

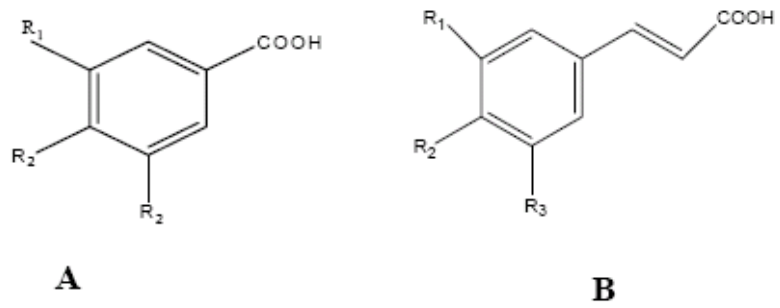


Figure 04. Structures des composés phénoliques simples.
A) acide benzoïque. B) acide cinnamique.

- **Activité antibactérienne et le mode d'action des acides phénols**

Les plantes médicinales contenant des acides phénols se sont avérées efficaces contre les bactéries (Samy et Gopalakrishnakone, 2008). Les acides phénoliques (acide cinnamique, acide coumarique, acide caféique et acide férulique) ont montré une bonne activité contre les bactéries Gram$^+$ et seulement une faible activité contre les bactéries Gram$^-$ (*Escherichia coli* et *Salmonella enterica*) à de forte concentration (Rodríguez-Vaquero *et al.*, 2007a).

Ces variations de sensibilités vis-à-vis des composés phénoliques purs peuvent refléter les différences au niveau structurale de la surface des cellules entre les bactéries $Gram^+$ et $Gram^-$ (Puupponen-Pimiä *et al.,* 2005a).

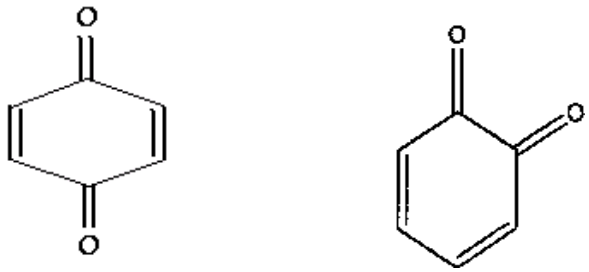
Les composés phénoliques purs et les différentes concentrations de trois variétés de vin ont été évalués pour leur effet sur la croissance des bactéries $Gram^+$, *Listeria monocytogenes*. L'acide caféique, dérivé de l'acide hydroxycinnamique, était le plus puissant inhibiteur de sa croissance (Puupponen-Pimiä *et al.,* 2005a). Les acides hydroxycinnamiques, dû à leur chaine latérale propanoïque, sont beaucoup moins polaire que les acides hydroxybenzoïques correspondants, une propriété qui pourrait faciliter le transport de ces molécules à travers la membrane cellulaire (Puupponen-Pimiä *et al.,* 2005a ; Rodríguez-Vaquero *et al.,* 2007a,b).

Dans une étude menée par Chanwitheesuk *et al.* (2007), l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique de *Caesalpinia mimosoides* est attribuée à la présence d'une substance antimicrobienne active, l'acide gallique, qui a montré une activité contre *Salmonella typhi* et *Staphylococcus aureus* avec des valeurs de CMI de 2,5 et 1,25 mg/ml, respectivement. L'hydrophobicité partiel de l'acide gallique lui permet d'agir efficacement ; en effet, il a perméabilisé les souches de *Salmonella* par déstabilisation de leur membrane externe, en chélatant les cations bivalents (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005b).

Il a été démontré que la position et le nombre de groupements OH des acides phénols sont déterminants pour leur activité antibactérienne et proportionnel à leur toxicité (Kuete *et al.,* 2007). De plus, les phénols hautement oxydés tels que les acides cinnamique et caféique sont les plus toxiques (Cowan, 1999). L'acide gallique et l'acide protocatéchique ont trois et deux groupements hydroxyles dans leurs structures, respectivement, alors que l'acide vanillique a un seul groupement hydroxyle, et un groupement méthoxy. Le faible effet inhibiteur de l'acide vanillique comparativement au acides gallique et protocatéchique pourrait être dû à cette substitution (Rodríguez-Vaquero *et al.,* 2007b).

I.2.3.3.2. Quinones

Ce sont des cycles aromatiques avec deux substitutions cétones (Fig.05) (Cowan, 1999; Ciocan et Bara, 2007), issus de l'oxydation de dérivés aromatiques, caractérisés par un motif *para*-quinones ou éventuellement par un motif *ortho*-quinones (Bruneton, 1999).



***p*-quinone** ***O*-quinone**

Figure 05. Structure de la *p*-quinone et de la *O*-quinone (Bruneton, 1999 ; Cowan, 1999)

- **Activité antibactérienne et le mode d'action des quinones**

La littérature rapporte la toxicité des quinones pour les microorganismes pathogènes (Beattie *et al.,* 2010 ; Yu *et al.,* 2010), par leur propriété de tannage et d'alkylation des protéines (Dietrich et Pour-Nikfardjam, 2009). En effet, une anthraquinone de *Cassia italica*, un arbre pakistanais, a été rapporté pour avoir un effet bactériostatique contre *Bacillus anthracis, Corynebacterium pseudodiphthericum*, et *Pseudomonas aeruginosa* et bactéricide pour *Pseudomonas pseudomalliae* (Cowan, 1999). L'anthraquinone de *Cassia occidentalis* présente une activité antibactérienne contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Yadav *et al.*, 2009).

Les quinones peuvent se complexer irréversiblement avec les acides aminés nucléophiles des protéines, menant souvent à l'inactivation de ses protéines et la perte de leurs fonctions. Pour cette raison, les effets antimicrobiens des quinones sont élevés et les cibles probables dans la cellule microbienne ; les adhésines exposées en surface, les polypeptides de la paroi cellulaire et les enzymes membranaires. Les quinones peuvent également rendre des substrats indisponibles aux micro-organismes (Cowan, 1999).

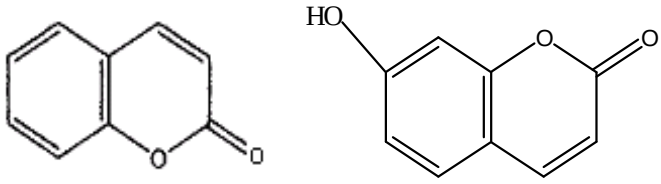
L'effet bactéricide des extraits de plantes n'a pas été entièrement compris ; on croit que les composés actifs exercent des effets toxiques directs sur les microorganismes pathogènes (Nikitina *et al.,* 2007). Dans le cas des phénols, cependant, les effets chimiques et biologiques sont connus pour être dus au système redox ; phénol/semiquinone/ quinone ayant comme conséquence la formation d'une quinone plus active et d'un radical

intermédiaire semiquinone qui constitue la molécule de base responsable des effets chimiques et biologiques des composés phénoliques. Les quinones peuvent former des complexes et font intervenir des réactions chimiques variées (Nikitina *et al.*, 2007). Pour cette raison, les polyphénols et les produits de leur oxydation ont des propriétés inhibitrices d'enzyme (Nikitina *et al.*, 2007).

Les hydroquinones et les quinones provenant d'éponge *Ircinia spinulosa* ont été examinées pour leur activité antibactérienne. Par conséquent, des études sur la relation structure-activité ont indiqué que la longueur optimale de la chaîne latérale des composés à activité antibactérienne devrait être de 5-15 atomes de carbone, suggérant que l'activité maximale contre *Staphylococcus aureus* dépend du nombre d'atomes de carbone dans la chaîne hydrophobe, des configurations des groupes fonctionnels et des doubles liaisons (Orhan *et al.*, 2007).

I.2.3.3.3. Coumarines

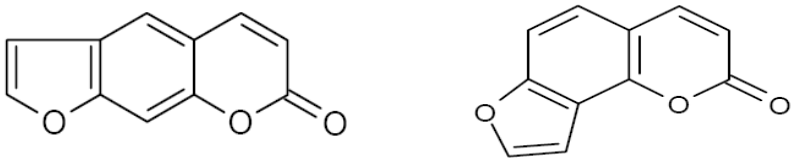
Les coumarines sont issues du métaolisme de la phénylalanine via un acide cinnamique, l'acide 4-coumarique (Bruneton, 1999). Ils possèdent un hétérocycle oxygéné à six atomes de carbone, accolé à un noyau benzoique, et qui dérivent des acides cinnamiques par cyclisation interne de leurs chaines latérales (Fig.06) (Ribereau-Gayon, 1968). Toutes les coumarines sont substituées en C-7 par un hydroxyle. La 7-hydroxycoumarine, connue sous le nom d'umbelliférone, est le précurseur des coumarines 6,7-di- et 6,7,8-trihydroxylées (Bruneton, 1999).



Coumarine **Umbelliférone**

Figure 06. Structure de base des coumarines et d'une umbelliférone (Bruneton, 1999)

Les furocoumarines (appelées encore furanocoumarines) constituent une famille de composés synthétisés par certaines espèces de végétaux supérieurs. Ces molécules sont caractérisées par un squelette de base formé d'un noyau coumarine, sur lequel est condensé un noyau furane. Selon la position de ce dernier, on distingue les furocoumarines linéaires dérivant de la molécule de psoralène, des furocoumarines angulaires, basées sur la structure de l'angélicine (Fig.07) (Gravot, 2002).



(A) **(B)**

Figure 07. Exemples de furocoumarines: psoralène **(A)** angélicine **(B)** (Gravot, 2002)

- **Activité antibactérienne et le mode d'action des coumarines**

Les propriétés antimicrobiennes et antivirales de plusieurs coumarines ont été rapportées (Wong et Kitts, 2006 ; Kuete *et al.*, 2007 ; Samy et Gopalakrishnakone, 2008 ; Kong *et al.*, 2010a). L'association de l'acide hydroxycinnamique aux coumarines semble avoir une activité inhibitrice des bactéries $Gram^+$. Selon Cottiglia *et al.* (2001), quelques composés appartenant à cette classe montrent une activité vis-à-vis de *Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Bacillus lentus, Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa.*

Kuete *et al.* (2007) ont conclu, d'après une étude sur la relation structure-activité des coumarines, que le cycle supplémentaire «furo» augmente l'activité antimicrobienne des coumarines. De ce fait les coumarines à trois cycles ont une meilleure activité antibactérienne que celles à deux cycles (Kuete *et al.*, 2007)**.**

Il a été rapporté que les furocoumarines interagissent avec l'ADN et interrompent sa réplication (Wong et Kitts, 2006). La photoréactivation des furocoumarines (psoralènes) contenues dans les plantes par les rayonnements UV présente des activités mutagènes ou même létales sur des micro-organismes fongiques ou bactériens. L'activation des furocoumarines linéaires conduit tout d'abord à des réactions de cycloadditions sur les carbones C-3, C-4 et/ou C-4', C-5' avec les bases pyrimidiques de l'ADN ou de l'ARN ; ainsi, ils peuvent alors établir des liaisons croisées entre les paires de bases des acides nucléiques (Bruneton, 1999). La duplication des brins d'ADN ainsi que la traduction des ARN sont alors bloquées. L'activation des dérivés du psoralène conduit également à des cycloadditions sur des acides gras insaturés membranaires (Gravot, 2002). L'intercalation des psoralènes dans l'ADN est importante dans leurs effets photobiologiques (Dembitsky, 2008).

I.2.3.3.4. Flavonoïdes

les flavonoïdes constituent le groupes le plus important des polyphénols (Orzechowski *et al.,* 2002). Considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux (Bruneton, 1999 ; Guignad, 2000), ils sont omniprésents dans tous les organes de la plante et sont, par conséquent, une partie intégrante de l'alimentation humaine (Barbosa, 2007).

Ils sont caractérisés par un squelette carboné de type diphényl 1, 3-propane, qui comprend 15 atomes de carbone répartis en deux cycles benzéniques notés A et B, reliés entre eux par la structure chromane à trois carbones (structure en C6-C3-C6). Le pont en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former l'hétérocycle oxygéné C (Fig.08) (Peterson et Dwyer, 1998 ; Bruneton, 1999 ; Pietta, 2000 ; Tsao et Deng, 2004 ; D'Archivio *et al.,* 2007). Ils ont une origine biosynthétique mixte dont le cycle A dérive de la voie poly-acétate, tandis que les cycles B et C dérivent de la voie shikimate (Pietta, 2000).

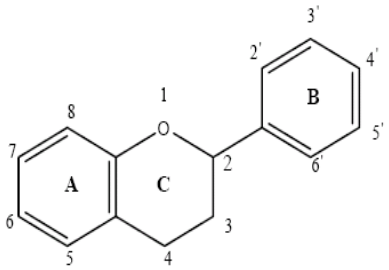


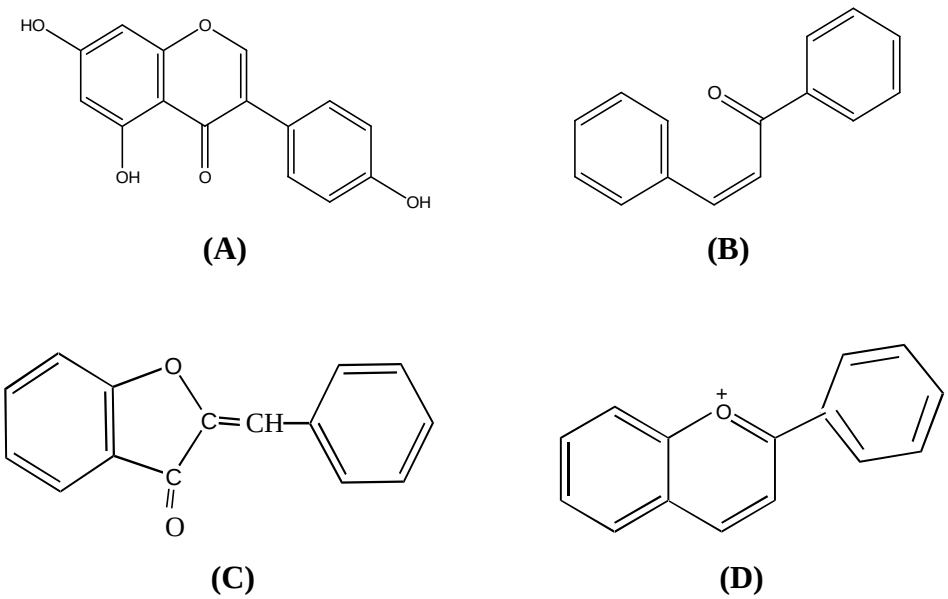
Figure 08. Structure de base des flavonoïdes avec la numérotation systématique (Tapiero *et al.,* 2002; Macheix *et al*., 2006)

Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du noyau pyranique central (hétérocycle pyrane, cycle C), alors que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par la substitution des cycles A et B (Pietta, 2000 ; Tapiero *et al.,* 2002 ; Schmitt-Schillig *et al.,* 2005 ; Balasundram *et al.,* 2006).

Pour la plupart des flavonoïdes, la chaîne aliphatique propane est incluse dans l'hétérocycle pyrane. Toutefois, il existe d'autres molécules pour lesquelles la chaîne propane, qui relie les deux cycles A et B, présente des squelettes différents, à savoir : les chalcones (ouverture du noyau pyranique central) (Alcaráz *et al.,* 2000 ; Hijova, 2006) et les aurones (le noyau central se présente sous forme d'un hétérocycle oxygéné à cinq chaînons) (Fig.09).

Les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement hydroxyle en position C3 de l'hétérocycle oxygéné (Havsteen, 2002). Par contre, les flavanols se différencient des flavanones par la présence de la fonction 3-hydroxy et l'absence de la fonction 4-oxo. Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont à l'origine des polymères appelés proanthocyanidols ou tannins condensés.

Les isoflavones proviennent d'une transposition du noyau aromatique du carbone C2 vers le carbone C3 (Raj Narayana *et al.,* 2001). Les anthocyanidines se caractérisent par la présence d'un ion pyrylium sur le noyau C dans un milieu acide (Manach *et al.*, 2005).



(A) **(B)**

(C) **(D)**

Figure 09. Structure générale des isoflavones (Genisteine) **(A)** (Havsteen, 2002), des chalcones **(B)** (Skerget *et al.*, 2005) des aurones **(C)** (Havsteen, 2002) des anthocyanes **(D)** (Havsteen, 2002)

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en position 3, 5, 7, 3', 4', 5'et/ou 6'. Un ou plusieurs de ces groupements hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, phénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes peuvent être présents sous forme *C*-ou *O*-glycosylés. Les formes libres sont appelés les génines ou aglycones (Bruneton, 1999 ; Matkowski, 2008).

- **Activité antibactérienne et le mode d'action des flavonoïdes**

Une des fonctions incontestées des flavonoïdes et des polyphénols est leur rôle protecteur des plantes contre l'invasion microbienne. Ceci n'implique pas seulement leur présence dans les plantes en tant qu'agents constitutifs mais également leur accumulation

comme phytoalexines en réponse à l'attaque microbienne (Harborne et Williams, 2000 ; Peer et Murphy, 2006 ; Orhan *et al.,* 2007).

La littérature rapporte que les flavonoïdes ont des cibles cellulaires multiples et peuvent viser différents composants et fonctions dans la cellule bactérienne (Rodríguez-Vaquero *et al.,* 2007b ; Boban *et al.,* 2010). Cushnie et Lamb (2005a) ont rapporté que les mécanismes antibactériens de plusieurs flavonoïdes pourraient être attribués à l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques, l'inhibition de la fonction de la membrane cytoplasmique ou l'inhibition du métabolisme énergétique.

Les flavonoïdes sont des substances antibactériennes efficaces contre une large gamme de micro-organismes (Basile *et al.,* 1999 ; Ghedira, 2005 ; Al-Momani *et al.,* 2007 ; González-Segovia *et al.,* 2008 ; Orhan *et al.,* 2010). Leur activité est probablement due à leur capacité à se complexer avec les protéines extracellulaires et solubles et à se complexer avec la paroi bactérienne. Les flavonoïdes les plus lipophiles peuvent également perturber les membranes bactériennes (Cowan, 1999). Plusieurs études ont rapporté l'effet inhibiteur de certaines anthocyanines sur les bactéries (Lev-Yadun et Gould, 2009) et de la quercétine contre *Helicobacter pylori in vitro* (González-Segovia *et al.,* 2008).

La rutine, forme glycosyle de la quercétine, est la plus active des flavonoïdes avec une activité anti-listeria (Rodríguez-Vaquero *et al.,* 2007b). Les flavones sont de forts inhibiteurs des bactéries $Gram^-$, alors que les flavonoïdes contenant deux ou trois groupements hydroxyles sur le cycle A et B sont plus actifs contre les bactéries $Gram^+$ (Orhan *et al.*, 2007). Rauha *et al.* (2000) ont rapporté que la quercétine et la naringenine sont actives contre *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Bacillus subtilis, Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Le degré d'hydroxylation pourrait affecter l'activité antibactérienne des composés phénoliques purs. La myricétine; flavonol (trois groupements hydroxyle sur le cycle B) était le seul composé qui a montré des effets inhibiteurs important sur la croissance des bactéries lactiques provenant de l'appareil gastro-intestinal humain, aussi bien que pour *Enterococcus faecalis* et *Bifidobacterium,* par contre, les salmonelles n'ont pas été affectées (Puupponen-Pimiä *et al.,* 2005a). De ce fait, le nombre de groupements hydroxyle sur le cycle B des

flavonols et des flavones semble être associé à l'activité antibactérienne (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005a).

Il est évident qu'une relation structure-activité existe entre divers flavonoïdes et leurs activités antimicrobiennes dans la plupart des cas (Orhan *et al.*, 2007). Une étude comparative avec d'autres flavonoïdes a indiqué que la structure de base d'un flavonoïde avec un groupement hydroxyle libre en position 3, une double liaison entre 2 et 3, un groupement cétonique en position 4 et une structure qui permet au proton du groupement hydroxyle en position 3 de se tautomériser en un composé 3-céto sont essentiels pour l'activité anti-mutagénique des flavonols (Ong et Khoo, 1997). D'autre part, l'activité antibactérienne de l'EGC et de l'EGCg a été liée à la présence de résidus galloyls dans leur structure (Taguri *et al.*, 2006).

Les résultats de l'étude de Tsuchiya et ses collaborateurs (1996) ont indiqué que 2', 4'- ou 2', 6'-dihydroxylation du cycle B et 5, 7-dihydroxylation du cycle A dans la structure du flavanone étaient importantes pour l'activité anti-MRSA. Alcaráz *et al.* (2000) ont également rapporté l'importance du groupement hydroxyle en position 5 des flavanones et des flavones contre cette même souche. De plus, ils affirment que les chalcones sont plus efficaces contre ses souches que les flavanones et les flavones, et que le groupement hydroxyle en position 2' est important pour leur activité antistaphylocoque. Yamamoto et Ogawa (2002) ont rapporté que l'activité antibactérienne de la lutéoline contre *Porphyromonas gingivalis* (provoque des parodontites) est due à la présence du groupement OH en position 3' du cycle B. La substitution aux positions 6 ou 8 avec un groupe aliphatique à longue chaîne augmente l'effet anti-MRSA. Stapleton et ses collaborateurs ont démontré que la substitution avec les chaînes C8 et C10 augmente l'activité des flavonoïdes appartenant à la classe des flavane-3-ol (Stapleton *et al.*, 2004). En revanche, les substitutions par des groupements méthoxy diminuent largement l'activité antibactérienne des flavonoïdes (Alcaráz *et al.*, 2000).

L'action des flavonoïdes sur la membrane cellulaire a été largement étudiée (Ikigai *et al.*, 1993 ; Tsuchiya et Iinuma, 2000 ; Caturla *et al.* 2003 ; Cushnie et Lamb, 2005b ; Poklar Ulrih *et al.*, 2010). En effet, il a été démontré par Sato et ses collaborateurs que les chalcones 2, 4, 2'-trihydroxy-5'-méthylchalcone peuvent induire la fuite de substances qui absorbent à 260 nm chez *S. mutans*. Ces auteurs ont proposé que le 2, 4, 2'-trihydroxy-5'-

méthylchalcone exerce son effet antibactérien en modifiant la perméabilité de la membrane cellulaire et en perturbant sa fonction (Sato *et al.,* 1997).

Haraguchi et ses collaborateurs ont étudié le mode d'action antibactérien de deux rétrochalcones (licochalcone A et C) des racines du *Glycyrrhiza inflata* doués d'une activité inhibitrice contre les $Gram^+$. Les licochalcones se sont avérés de forts inhibiteurs de la consommation de l'oxygène chez les souches susceptibles, en plus ils ont démontré que les licochalcones A et C inhibent effectivement la NADH-cytochrome *c* réductase, mais pas le cytochrome *c* oxydase, NADH-CoQ réductase et NADH-FMN oxydoréductase. Donc ils ont suggéré que le site d'inhibition de ces rétrochalcones est entre le CoQ et le cytochrome c dans la chaîne du transport d'électrons de la chaine respiratoire bactérienne (Haraguchi *et al.,* 1998).

Mirzoeva et ses collaborateurs ont conclu que les flavonoïdes de propolis provoquent une augmentation de la perméabilité de la membrane bactérienne interne et une dissipation du potentiel membranaire (Mirzoeva *et al.,* 1997). Le gradient électrochimique des protons de part et d'autre de la membrane est essentiel pour que les bactéries maintiennent la capacité de synthèse d'ATP et le transport membranaire (Cushnie et Lamb, 2005a). Ces auteurs ont suggéré que l'effet du propolis sur la perméabilité membranaire et le potentiel membranaire peut contribuer énormément à son activité antibactérienne et peut diminuer la résistance des cellules à d'autres agents antibactériens, ce qui pourrait expliquer l'effet synergique qui se produit entre le propolis et d'autres antibiotiques (Stepanovic *et al.,* 2003).

Les polyphénols de thé (TPP) extraits du thé vert coréen (*Camellia sinensis*) a montré un effet bactéricide dose-dépendant sur *E. coli*. L'analyse des acides gras de la membrane cellulaire des cultures de *E. coli* traitées avec TPP a mis en évidence des changements uniquement au niveau des acides gras saturés et insaturés, tandis que l'analyse au microscope électronique à balayage a révélé la présence des perforations et des formes triangulaires irrégulières avec des surfaces froissées (rugueuses) des cellules traitées avec les TPP (Fig.10) (Cho *et al.,* 2007).

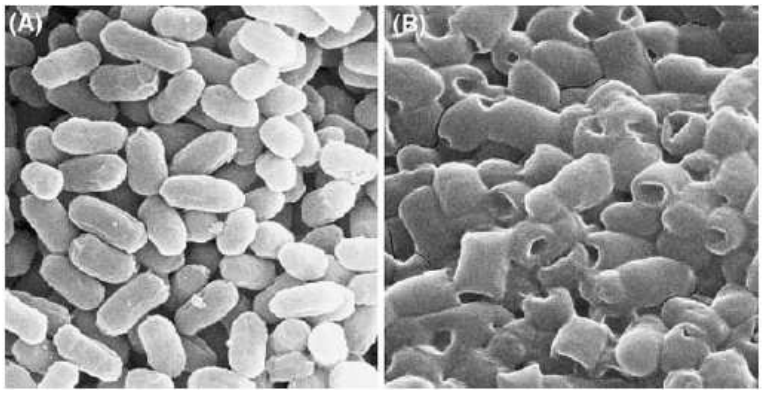


Figure 10. Micrographie de *Escherichia coli* sous Microscope Électronique à balayage (A) non traité (B) traité avec 10.000 µg/ml TPP pendant 12 heures

Zhang et Rock (2004) ont montré que l'EGCg est un puissant inhibiteur de β-ketoacyl-ACP reductase (FabG) et de *trans*-2-enoyl-ACP reductase (FabI), enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras de type II de *E. coli*. EGCg inhibe les deux enzymes de façon compétitive en se liant sur le site de fixation du cofacteur NADPH. L'EGCg inhibe aussi le complexe enzyme-cofacteur (FabG-NADPH) pour empêcher la liaison du substrat (Zhang *et al.,* 2004). L'effet des flavonoïdes sur la biosynthèse des acides mycoliques a été confirmé par les travaux de Brown et ses collaborateurs qui ont observé l'inhibition de la croissance de *Mycobacterium bovis* par l'inhibition de l'activité des enzymes FAS-I et FAS-II impliquées dans leur synthèse (Brown *et al.,* 2007).

Sudano Roccaro *et al.* (2004) ont constaté que l'EGCg peut inverser la résistance à la tétracycline dans les isolats de *Staphylococcus*. Cette interaction synergique a été expliquée par l'inhibition de l'activité des pompes efflux de la tétracycline dans la cellule bactérienne, induisant une plus grande rétention intracellulaire de l'antibiotique. Zhao *et al.* (2001) ont étudié 25 isolats cliniques de MRSA et ont trouvé que l'EGCg et les β-lactamines se fixent sur le même site. Ils ont observé un effet synergique entre eux contre cette souche, en interférant avec l'intégrité de la paroi cellulaire à travers une liaison directe au peptidoglycane. L'inhibition de l'activité de la pénicillinase a été également utilisée pour expliquer la synergie observée entre ces catéchines et la pénicilline chez les bactéries $Gram^+$. Cependant, dans une autre étude Zhao *et al.* (2003) n'ont observé aucune restauration de l'activité antibactérienne par la combinaison des β-lactamines et de l'EGCg contre les $Gram^-$. Cela peut être lié à la localisation des β-lactamases chez ces bactéries.

L'activité antibactérienne des flavonoïdes a été attribuée à l'inhibition de la synthèse d'ADN (Shinozuka *et al.,* 1988) et d'ARN (Ong et Khoo, 1997) et autre macromolécules. De plus, les composés phénoliques avec plus de trois 3-OH sont doués d'une activité antibactérienne (Ani *et al.,* 2006).

Plaper et ses collaborateurs ont rapporté que la quercétine se lie à la sous-unité Gyr B de l'ADN gyrase de *E. coli* et inhibe ses activités ATPasiques (Plaper *et al.,* 2003). L'activité antibactérienne de la quercétine contre *E. coli* peut être au moins partiellement attribuée à l'inhibition de la d'ADN gyrase (Ohemeng *et al.,* 1993). Bernard et ses collaborateurs (1997) ont constaté que le flavonoïde glycosyle, la rutine, était un inhibiteur spécifique de la topoisomerase IV de *E. coli,* en inhibant son activité de décaténation. Mori et ses collaborateurs (1987) ont prouvé que la synthèse d'ADN a été fortement inhibée par des flavonoïdes (epigallocatechine) chez *Proteus vulgaris*, tandis que la synthèse d'ARN était la plus affectée chez *S. aureus*. Ces auteurs ont suggéré que 3', 4', 5'-trihydroxy libre du cycle B et 3-OH libre des flavonoïdes étaient nécessaire pour leur activité antibactérienne, ceci peut expliquer l'action inhibitrice sur la synthèse d'ADN et d'ARN.

I.2.3.3.5. Tannins

Ce sont des composés phénoliques qui constituent un groupe complexe hétérogène de polymères naturels de haut poids moléculaire. Ils ont la capacité à former des complexes réversibles et irréversibles avec les protéines principalement, polysaccharides (cellulose, hémicellulose, pectine, etc.), alcaloïdes, acides nucléiques et minéraux (Baxter *et al.,* 1997 ; Bennick, 2002 ; Frutos *et al.,* 2004 ; Han *et al.,* 2007). Les tannins sont divisés en deux groupes selon leur nature chimique et leur structure: les tannins condensés (tannins catéchiques) et hydrolysables (Luthar, 1992 ; Bennick, 2002 ; Makkar, 2003 ; Frutos *et al.,* 2004 ; Elizondo *et al.,* 2010).

I.2.3.3.5.1. Tannins hydrolysables

Ce sont des esters de glucose, c'est-à-dire un noyau central de glucose sur lequel se fixe, au moyen d'une liaison ester, des acides: l'acide gallique pour le groupe des gallotannins, l'acide hexahydroxydiphénique (ou ellagique) pour le groupe des ellagitannins**.** Ils sont de poids moléculaire de 500-3000 Da (Bennick, 2002 ; Frutos *et al.,* 2004 ; Waghorn, 2008). Ces tannins sont caractérisés par le fait qu'ils soient hydrolysés par les acides, les bases et les enzymes (tannase) en sucre et acides phénoliques (Guignard, 2000).

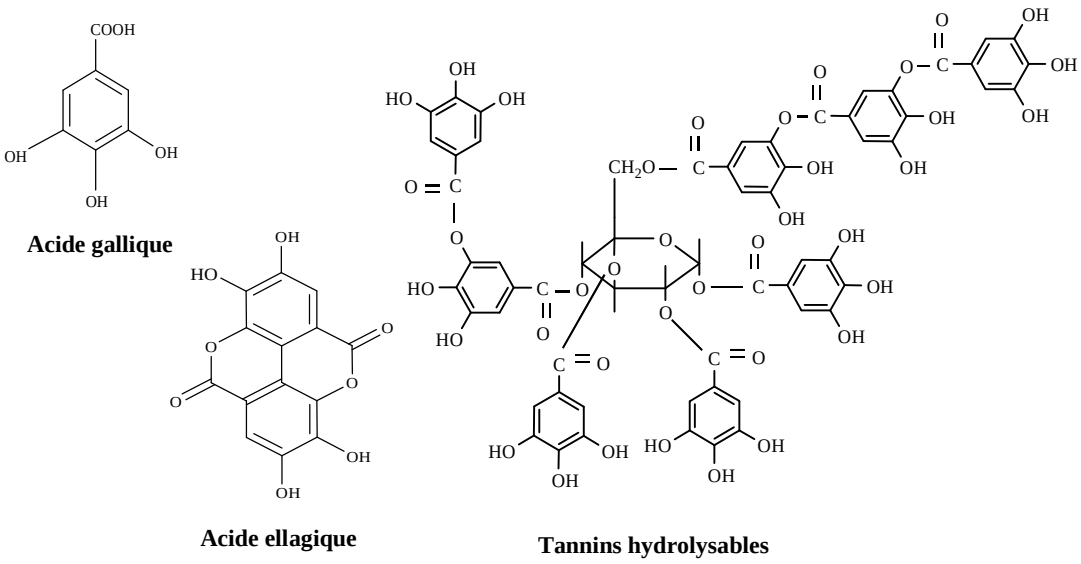


Figure 11. Structure de l'acide gallique, de l'acide ellagique et d'un tannin hydrolysable (gallotannins) (Naczk et Shahidi, 2004 ; Niemetz et Gross, 2005)

I.2.3.3.5.2. Tannins condensés

Les tannins condensés, ou proanthocyanidines, sont des polymères d'unités de flavan-3-ols (catéchines ou épicatéchine) et de flavan-3, 4-diols (leucoanthocyanidines), ou un mélange des deux. L'enchaînement des différentes unités constitutives se fait soit par liaisons C-C ou par liaisons C-O-C, conduisant à des structures de plus en plus complexes (Bruneton, 1999 ; Khanbabaee et Ree, 2001 ; Naczk et Shahidi, 2004 ; Cheynier, 2005 ; Xie et Dixon 2005 ; Waghorn, 2008). Le degré de polymérisation varie considérablement et des tannins condensés de poids moléculaire plus de 30,000 Da ont été décrits (Bennick, 2002). Ils peuvent être dépolymérisés avec l'acide fort à chaud, donnant comme produit le pigment anthocyanidine.

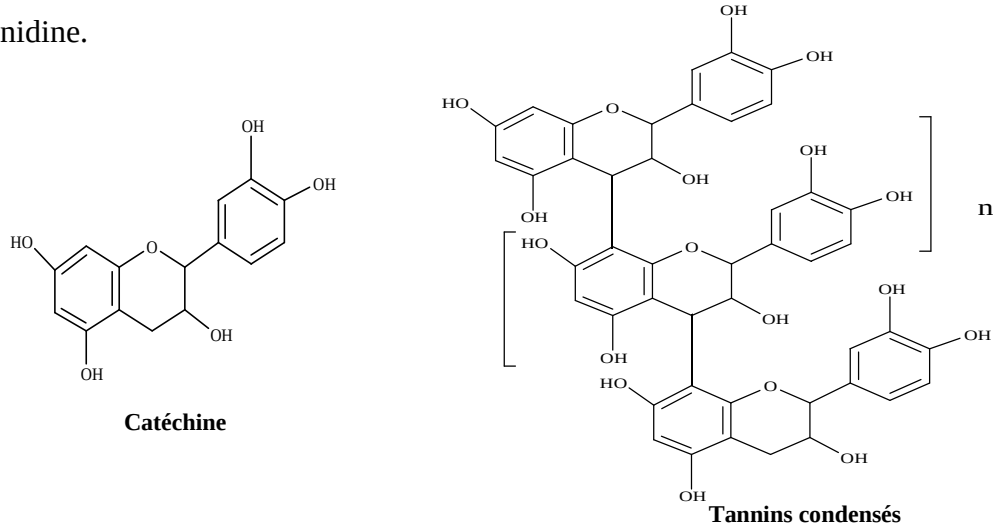


Figure 12. Structure de la catéchine et d'un tannin condensé (proanthocyanidine) (Naczk et Shahidi, 2004)

- **Activité antibactérienne et le mode d'action des tannins**

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'effet antibactérien des extraits de plantes riches en tannins (Luthar, 1992 ; Puupponen-Pimiä *et al.,* 2005a ; Al-Momani *et al.,* 2007 ; Briones-Nagata *et al.,* 2007 ; Cimolai et Cimolai, 2007 ; Liu *et al.,* 2008 ; Shuaibu *et al.,* 2008 ; Kim *et al.,* 2010).

Les plantes riches en tannins ont une nature astringente et sont utilisés dans le traitement des désordres intestinaux tels que les diarrhées et les dysenteries, de ce fait exhibant une activité antimicrobienne (Sharma *et al.,* 2009). Les tannins hydrolysables sont plus toxiques que les tannins condensés et leur toxicité est liée à leur taille moléculaire (Frutos *et al.,* 2004 ; Widsten *et al.,* 2010). Okuda (2005) a démontré l'effet inhibiteur de plusieurs tannins hydrolysables sur *Helicobacter pylori* (Okuda, 2005).

Taguri *et al.* (2006) ont déduit que la présence de 3, 4, 5-trihydroxyphenyle (groupement pyrogallole) est liée à une forte activité antibactérienne. Contrairement au gallotannins, les ellagitannins sont plus difficiles à être dégradés par les microorganismes à cause de leurs structures complexes (Scalbert, 1991; Min *et al*., 2008). Puupponen-Pimiä *et al.* (2005b) ont trouvé que *Candida albicans* et *Campylobacter jejuni* étaient seulement sensibles aux extraits de mûrier, de framboise et de fraise de toutes les baies, suggérant que les ellagitannins sont les principaux composés antimicrobiens qui sont à l'origine de cette activité.

La propriété astringente des tannins peut induire leur complexation avec les protéines (Akiyama *et al.,* 2001) par des interactions non spécifiques, telles que les liaisons hydrogènes et hydrophobes, aussi bien que par la formation de liaisons covalentes. Ainsi, leur mode d'action antimicrobien peut être lié à leur capacité à inactiver les adhésines microbiennes, les enzymes et les protéines du transport membranaire (Karou *et al.,* 2005 ; Samy et Gopalakrishnakone, 2008).

Les tannins empêchent les substrats à traverser la paroi cellulaire, en diminuant sa perméabilité par la formation des complexes avec les protéines de la paroi cellulaire. Ils sont également responsables des changements morphologiques de plusieurs espèces bactériennes (Goel *et al.,* 2005). Jones *et al.* (1994) cités par Buzzini *et al.* (2007) ont postulé que la capacité des tannins à lier les polymères extracellulaires des bactéries pourrait être

considérée à l'origine de l'activité observée. Néanmoins, malgré la formation des complexes avec des polymères extracellulaires, les proanthocyanidines pénètrent dans la cellule en concentration suffisante pour réagir avec un ou plusieurs composants internes et empêchent sélectivement la synthèse de la paroi cellulaire (Buzzini *et al.,* 2007).

La complexation des tannins aux ions métalliques dans l'environnement bactérien pourrait être aussi un mécanisme possible pour leurs propriétés antimicrobiennes (Buzzini *et al.,* 2007 ; Min *et al.,* 2008). Akiyama *et al.* (2001) ont rapporté que l'acide tannique a une grande capacité à lier le fer et peut fonctionner comme un sidérophore (Akiyama *et al.*, 2001 ; Widsten *et al.,* 2010). Ainsi, l'épuisement en métal peut affecter l'activité des métalloenzymes des cellules microbiennes et la séquestration des minéraux (cuivre, cobalt et fer) peut influencer leurs réactions métaboliques (Scalbert, 1991; Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005a). L'inhibition de la croissance des bactéries intestinales (*B. fragilis, C. perfringens, E. coli* et *E. cloacae*) par l'acide tannique est probablement liée à sa capacité élevée à lier le fer (Zaidi–Yahiaoui *et al.,* 2008).

La diminution de l'activité enzymatique en contact des composés phénoliques est liée à leur liaison avec les sites actifs des enzymes ou à la précipitation des protéines enzymatiques, de ce fait les empêchant d'atteindre leur substrats (Zaidi–Yahiaoui *et al.,* 2008). Goel *et al.* (2005) ont suggéré que le changement conformationnel des enzymes en présence des tannins peut être une raison pour leur inhibition. La position (s) et le nombre de groupements hydroxyle (OH) dans les tannins semble être associé à leur toxicité relative aux micro-organismes, qui est proportionnelle au degré d'hydroxylation (Min *et al.,* 2008).

L'activité antimicrobienne peut être aussi liée à l'antiadhérence des bactéries aux cellules épithéliales, qui est une étape préalable à la colonisation et à l'infection de la plupart des microorganismes pathogènes (Puupponen-Pimiä *et al.,* 2005a ; Puupponen-Pimiä *et al.,* 2005b ; Dietrich et Pour-Nikfardjam, 2009). En effet, Cimolai et Cimolai (2007) ont montré que les proanthocyanidines de la canneberge ont une action antiadhésive sur *E. coli* (Cimolai et Cimolai, 2007) et sur *Helicobacter pylori* (Burger *et al.,* 2002).

Akiyama *et al.* (2001) ont examiné l'action antibactérienne de plusieurs tannins sur la coagulation du plasma par *S. aureus*. Ils ont suggéré que le mécanisme d'action antibactérien passe par l'inhibition de la formation des fibrines par *S. aureus*. Ils ont observé que l'acide

tannique a inhibé la croissance de toutes les 15 bactéries testées, mais l'acide gallique et l'acide ellagique n'ont inhibé aucune d'entre elles. De ce fait, ils ont conclu que la liaison ester entre l'acide gallique et le glucose (pour former l'acide tannique) était importante pour le potentiel antimicrobien de ces composés (Akiyama *et al.,* 2001 ; Widsten *et al.,* 2010).

I.2.3.4. Caractérisation de l'activité antibactérienne par des méthodes chromatographiques

Les études menées sur les plantes médicinales sont pour la plupart basées sur les informations fournies par les tradipraticiens au cours des enquêtes ethnobotaniques. Ces plantes font d'abord l'objet d'une étude botanique pour l'identification taxonomique. Des extraits de ces plantes sont ensuite préparés à l'aide de différents solvants et soumis à une série de tests biologiques et pharmacologiques en vue de déceler l'une ou l'autre activité biologique. Les plantes ayant révélé une activité particulièrement intéressante font l'objet d'une étude phytochimique incluant l'isolement, la purification et l'identification structurale des principes actifs doués de cette activité biologique initialement détectée. L'isolement des principes actifs est généralement réalisé à l'aide des différentes méthodes d'extraction et de purification; la chromatographie sur colonne et sur couche mince (Nostro *et al.,* 2000 ; Dohou *et al.,* 2004 ; Vogel *et al.,* 2005 ; Kablan *et al.,* 2008 ; Sharma *et al.,* 2009). La détermination des structures chimiques se fait par les diverses techniques de la spectrométrie: infrarouge (IR), ultraviolet (UV), chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) (Proestos *et al.,* 2008), de la résonance magnétique nucléaire (RMN) et chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Nasser *et al.,* 2006; Cho *et al.,* 2007).

La chromatographie sur papier (PC), la chromatographie sur colonne ouverte (CC) et la chromatographie sur couche mince (CCM) sont utilisées comme outils de séparation et de fractionnement des extraits de plantes contenant les composés phénoliques (Naczk et Shahidi, 2004; Naczk et Shahidi, 2006).

La CCM est une technique simple et peu coûteuse ; elle est particulièrement appropriée au contrôle des procédures d'isolement. Elle est très appropriée pour le criblage qualitatif des extraits et le contrôle des étapes de fractionnement par chromatographie sur colonne (Tsao et Deng, 2004; Willför *et al.,* 2005). La méthode d'analyse par bioautographie permet de localiser l'activité antimicrobienne sur un chromatogramme (Martini et Eloff,

1998); tandis que le fractionnement mène à l'isolement des composés bioactifs (Samy et Gopalakrishnakone, 2008). Les fractions isolées de la CCM peuvent être identifiées par GC-MS ou HPLC-MS.

Dans la plupart des cas la silice est utilisée en tant que phase stationnaire (Willför *et al.,* 2005; de Rijke *et al.,* 2006), mais sa résolution critique sur gel de silice est relativement pauvre et ne permet pas une séparation fiable, bien qu'elle soit parfois suffisante pour le criblage qualitatif (Vovk *et al.,* 2005).

La séparation par chromatographie gazeuse (GC) a été utilisée dans la majorité des cas dans l'analyse des composés des huiles essentielles des plantes. Diverses techniques de GC ont été utilisées pour la séparation et la quantification des composés phénoliques même dans le cas des mélanges complexes qui peuvent être identifiés par GC-MS d'une façon usuelle (Naczk et Shahidi, 2004; Willför *et al.,* 2005; Naczk et Shahidi, 2006). Néanmoins, son application est limitée en raison de la difficulté de séparation et purification à grande échelle (Tsao et Deng, 2004).

L'HPLC en phase normale a été adoptée par de nombreux chercheurs comme technique de choix pour la séparation, l'identification et la quantification des composés phénoliques (Naczk et Shahidi, 2006 ; Proestos *et al.,* 2006 ; Sun *et al.,* 2006 ; Achamlale *et al.,* 2009). En effet, l'HPLC en phase normale avec phase stationnaire à base de silice présente une grande sélectivité et permet de différencier les nombreuses formes des molécules, tel que les isomères (Cuvelier *et al.,* 2003).

L'introduction des colonnes en phase inverse a considérablement amélioré la séparation par HPLC de différentes classes de composés phénoliques (Whelan *et al.,* 2005 ; Willför *et al.,* 2005). L'HPLC couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) et même à la résonance magnétique nucléaire (HPLC-NMR) ont été communément utilisées pour la caractérisation structurale des composés phénoliques (Tsao et Deng, 2004 ; Gómez-Caravaca *et al.,* 2006). La spectrométrie de masse d'ionisation d'electrospray (ESIMS) a été utilisée pour la confirmation structurale de ces derniers (Cuvelier *et al.,* 2003 ; Naczk et Shahidi, 2004).

La CCM et la CC sont souvent utilisées en association dans le fractionnement et la séparation préliminaire des composés phytochimiques avant qu'ils soient séparés, quantifiés et identifiés par d'autres techniques de séparation à haute performance (Tsao et Deng, 2004). En effet, Svedström *et al.* (2006) ont identifié des polymères de procyanidines, les acides phénoliques carboxyliques et des flavonoïdes de l'aubépine (*Crataegus laevigata*) par HPLC après fractionnement par chromatographie sur colonne**.**

La combinaison de chromatographie sur colonne sur gel de silice, gel de Sephadex LH-20 et HPLC en phase inverse a permis de purifier différents composés des fractions obtenues de l'extrait phénolique brut du feuillage d'*Eucalyptus ovata* (Pass *et al.,* 1998). Aussi, L'analyse des composés phénoliques des feuilles de *Cynara cardunculus* par HPLC a montré que les principaux acides phénoliques sont l'acide synergique et trans-cinnamique, en plus de l'épicatéchine et quercétine en tant que flavonoïdes majoritaires qui pourraient être responsables de l'activité antibactérienne (Falleh *et al.,* 2008).

Les constituants chimiques des extraits de plusieurs plantes ont été analysés par chromatographie sur couche mince (CCM) ; les composés vibriocides ont été déterminés par bioautographie et ont été encore confirmés par HPLC (Sharma *et al.,* 2009). Ces dernières ont révélé la présence des tannins et d'acide gallique dans l'extrait éthanolique de *Syzygium cumini,* les tannins dans *Lawsonia inermis* et l'acide gallique dans *Terminalia bellerica,* responsables de l'activité vibriocide (Sharma *et al.,* 2009).

Les composés phénoliques des graines de cumin ont été extraits au moyen du méthanol 70%, acétone 70% et l'eau, puis séparés par HPLC et leurs structures élucidées par LC-MS (Ani *et al.,* 2006). Le profil des acides phénoliques et des flavonols dans le cumin amer sont l'acide gallique, l'acide protocatéchique, l'acide caféique, l'acide ellagique, l'acide férulique, la quercétine et le kaempférol (Ani *et al.,* 2006). L'extrait de cumin a inhibé de manière significative la croissance de *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* grâce à la présences des composés phénoliques (Ani *et al.,* 2006).

Après l'extraction de *Castanea sativa* avec une solution aqueuse d'acide sulfurique (pH 3.0), la fraction soluble dans l'acétate d'éthyle a été examinée pour son activité antibactérienne. L'extrait a exhibé des effets antibactériens prononcés contre sept des huit souches $Gram^+$ et $Gram^-$ utilisées (CMI de 64-256 µg/ml et CMB de 256-512 µg/ml). La

fraction active analysée par CCM et HPLC a montré la présence de la rutine, de l'hespéridine, de la quercétine, de l'apigénine, de la morine, de la naringine, de la galangine et du kaempférol. Des flavonoïdes standards correspondant ont été testés contre les mêmes souches bactériennes et l'activité la plus élevée a été montrée par la quercétine, la rutine et l'apigénine (Basile *et al.,* 2000).

- **Description bibliographique de la plante étudiée**

Le lentisque (*Pistacia lentiscus*) est une plante médicinale locale sur laquelle portera cette présente étude ; elle a été sélectionnée pour son usage traditionnel et ses différentes vertus thérapeutiques.

Pistacia lentiscus est un arbuste à feuilles persistantes de la famille des anacardiacées pouvant atteindre 3 à 4 m de hauteur, allant jusqu'à 6 à 7 m dans les conditions favorables (Reig-Armiñana *et al.,* 2004). Il se développe dans des régions arides et caractéristiques des pays méditerranéens (Castola *et al.,* 2000 ; Correia et Barradas, 2000 ; Inbar *et al.,* 2004 ; Paraschos *et al.,* 2007 ; Baumer *et al.,* 2008 ; Albaladejo *et al.,* 2008 ; Ostos *et al.,* 2008 ; Amhamdi *et al.,* 2009). Ses périodes de floraison et de fructification ont lieu pendant le printemps et l'automne, respectivement. En outre, les feuilles et les fruits du lentisque ont été utilisés dans différents domaines par les habitants ruraux des secteurs où il se développe d'une manière sauvage. Les composés volatils de différentes parties de cette plante; les feuilles, les fruits et le mastic ont été le sujet de plusieurs recherches (Fernăndez *et al.,* 2000).

Pistacia lentiscus L. var. *chia* est la source principale d'un exsudat résineux connu sous le nom de mastic, qui est fortement réputé dans le domaine de la médecine traditionnelle comme agent antimicrobien (Paraschos *et al.,* 2007). Il est utilisé contre la diarrhée et la tuberculose (Fernăndez *et al.,* 2000) et comme ingrédient de nourriture dans la région méditerranéenne. Il s'est avéré que le mastic tue la bactérie *Heliobacter pylori* responsable des ulcères (Dogan *et al.,* 2003 ; Loughlin *et al.,* 2003 ; Paraschos *et al.,* 2007 ; Kottakis *et al.,* 2008). Plusieurs espèces du genre *Pistacia* ont été chimiquement étudiées. Elles sont caractérisées principalement par des flavonoïdes et des flavonoïdes glycosylés. Il a été également rapporté que ces plantes contiennent des composés phénoliques, des triterpénoïdes (Tsoko *et al.,* 2007) et des tannins (Reig-Armiñana *et al.,* 2004).

L'arbre au mastic a été proposé en tant qu'espèce appropriée pour la restauration des secteurs semi-arides grâce à ses capacités d'adaptation à la sécheresse et sa résistance à la perturbation. Il a également des racines qui ont une capacité élevée de croissance et une plasticité à l'indisponibilité des nutriments et la faible disponibilité en eau (Caravaca *et al.*, 2002 ; Palacio *et al.,* 2005 ; Cortina *et al.*, 2008). En méditerranée, *Pistacia lentiscus*, a la capacité de se développer le long d'un gradient d'humidité et de température (Bandera *et al.*, 2008).

L'utilisation des fruits, écorce et feuilles du lentisque en médecine traditionnelle date des temps des grecs anciens. Ils sont utilisés dans le traitement d'eczéma, paralysie, diarrhée, infection de gorge, calcul rénal, asthme et douleurs gastriques, et en tant qu'un astringent, anti-inflammatoire, antipyrétique, antiulcéreux, antiviral et antibactérien (Barazani *et al.*, 2003 ; Kordali *et al.,* 2003 ; Duru *et al.,* 2003 ; Charef *et al.,* 2008). Le lentisque est également utilisé pour ses propriétés hypotensives (Kordali *et al.*, 2003 ; Ljubuncic *et al.*, 2005 ; Longo *et al.,* 2007 ; Topçu *et al.,* 2007 ; Charef *et al.,* 2008 ; Gardeli *et al.,* 2008 ; Hosseinzadeh *et al.,* 2008). Les fruits du lentisque donnent une huile de table riche en acides gras insaturés comme les acides oléique et linoléique. En Algérie, l'huile du fruit est utilisée par la population dans la médecine traditionnelle de différentes manières, en tant qu'agent anti-diarrhéique et également comme constituant des aliment du bétail (Charef *et al.,* 2008).

Matériel et Méthodes

II.1. Matériel végétal

II.1.1. Récolte du matériel végétal et identification

II.1.1.1. Préparation de la poudre végétale

La plante sélectionnée sur la base de son usage en médecine traditionnelle locale, a été collectée dans son habitat où elle se developpe d'une manière sauvage. Les feuilles et les fruits de *Pistacia lentiscus* ont été récoltés dans la forêt d'Azru n Bechar, Amizour, située à l'Est de Béjaïa.

Les feuilles ont été récoltées en Juillet et les fruits en Novembre 2008. La plante a été identifiée au niveau du laboratoire de botanique de la FSNV, Université de Béjaïa. Il s'agit bien de l'espèce *P. lentiscus* (Fig.13), appelée localement «Amadhagh».

A) les feuilles de *Pistacia lentiscus*. **B)** les fruits de *Pistacia lentiscus*.

Figure 13. Photographie du matériel végétal

II.1.2. Traitement des échantillons

II.1.2.1. Séchage

Aussitôt après la collecte du matériel végétal, les feuilles préalablement débarrassées de toutes poussières et toutes autres impuretés, ont été séchées à température ambiante et dans un endroit aéré et ombragé pendant plusieurs jours. Les fruits ont été séchés dans une étuve aérée à une température de 40°C.

II.1.2.2. Broyage et Tamisage

La réalisation de cette étape doit être minutieuse et non dénaturante pour permettre l'obtention d'une poudre végétale fine et homogène. La matière sèche obtenue a été broyée à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre et une pâte homogène

pour les feuilles et les fruits de *P. lentiscus*, respectivement. La poudre des feuilles de *P. lentiscus* obtenue a été tamisée avec des tamis à différentes granulométries (1mm, 125 et 63µm) et une poudre fine d'un calibre inferieur à 63µm a été récupérée. La poudre et la pâte des fruits ainsi obtenues ont été conservées à l'abri de la lumière.

II.2. Extraction

Afin d'extraire les principes actifs de la plante testée, une extraction de type solide/liquide (macération) a été utilisée, avec un solvant polaire, l'éthanol à 96%. Lors de l'extraction, il est important que les poudres ne soient pas exposées à la lumière directe, ni à des températures élevées car les polyphénols sont sensibles à la lumière ainsi qu'à des températures supérieures à 40°C. La méthode d'extraction choisie est celle de Chiang *et al.* (1994), avec quelques modifications (Fig. 14).

200 g de la poudre et de la pâte des deux parties de la plante ont été extraits avec de l'éthanol à 96% (1: 4, p/v) pendant 24h sous agitation à température ambiante et à l'abri de la lumière ; ensuite la suspension éthanolique a été transférée dans des éprouvettes et laissée décanter (12h), puis centrifugée et le surnageant a été récupéré dans des cristallisoirs, puis séché à température ambiante sous hotte.

L'extrait éthanolique a été repris dans un mélange d'acétate éthyle/eau (1: 3: 1, p/v/v) et laissé décanter (12h). Les phases organiques et aqueuses ont été séparées et laissées évaporer à l'air libre. Après évaporation totale du solvant, une partie de la phase organique de l'acétate d'éthyle a été reprise dans un mélange d'hexane/eau (1: 3: 1, p/v/v) et l'autre dans un mélange chloroforme/eau (1: 3: 1, p/v/v). Après 12h de décantation, les phases organiques et aqueuses ont été séparées pour subir une évaporation à l'air libre.

A chaque étape d'extraction, une petite quantité de l'extrait est retenue pour des tests ultérieurs d'activité antibactérienne et de dosage (phénols totaux, flavonoïdes et tannins).

Pour chaque partie de la plante, le taux d'extraction a été déterminé suivant la formule :

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

P_0: Poids vide du cristallisoir ou boite de Pétri

P_1: Poids après évaporation

E: Poids de la poudre initiale ou extrait du départ

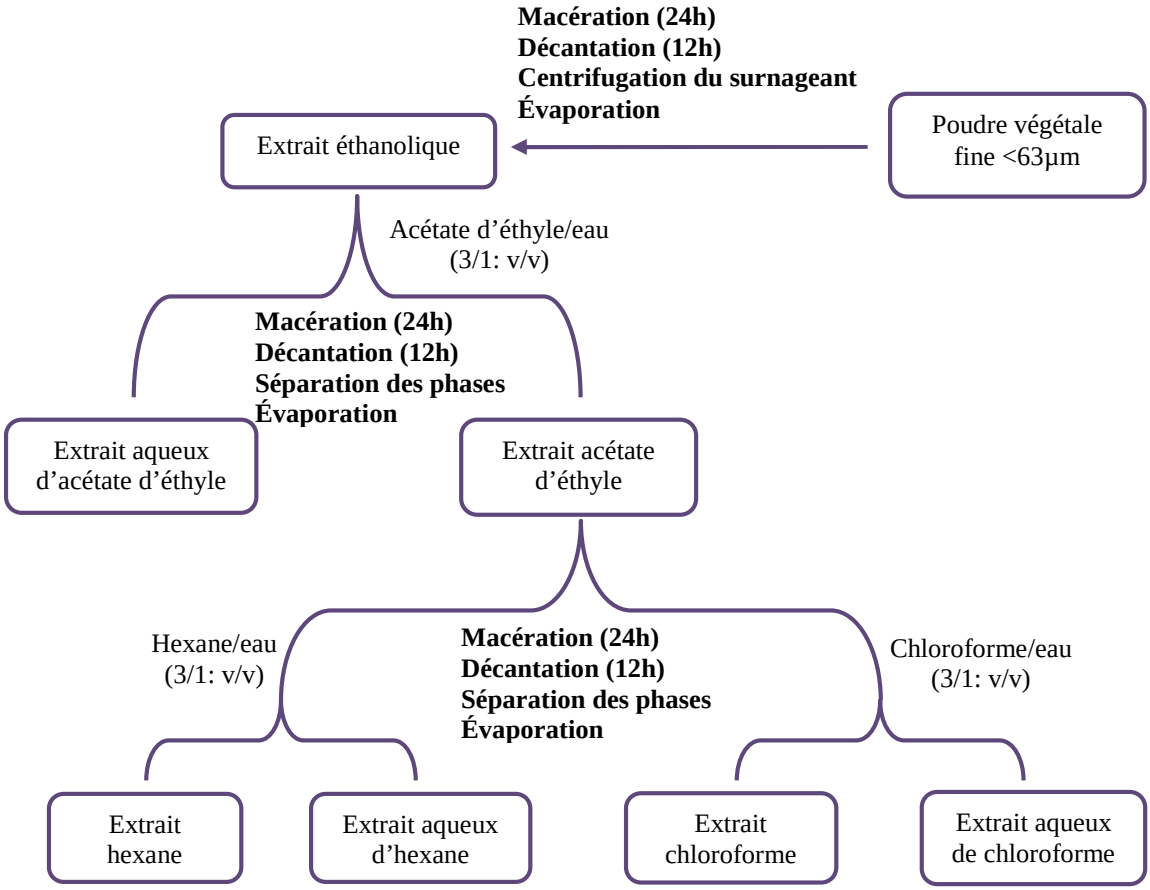


Figure 14. Schéma récapitulatif des étapes de la procédure d'extraction (Chiang *et al*., 1994)

II.3. Dosage des composés phénoliques

II.3.1. Dosage des phénols totaux

Le réactif de Folin-Ciocalteu, mélange de l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et de l'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_2O_{40}$), est réduit en présence de polyphénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}). L'intensité de la couleur bleue obtenue est proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans le milieu réactionnel (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Lapornik *et al.*, 2005).

La méthode de dosage des composés phénoliques totaux utilisée est celle de Folin Ciocalteu adaptée par Kähkönen *et al.* (1999) de la méthode de Folin, adoptée par Singleton *et al.* (1965). Elle consiste à mélanger 200µl d'extrait avec 1ml du réactif de Folin-Ciocalteu et 0,8ml de la solution de carbonate de sodium (7,5%). Le mélange est laissé à température ambiante pendant 30min et l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 765nm. Les teneurs des extraits en phénols totaux ont été déterminées en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue avec la catéchine (Annexe 01).

Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg Eq Cat/g d'extrait). Tous les essais ont été effectués trois fois.

II.3.2. Dosage des tannins

La teneur en tannins des extraits des deux parties de la plante a été déterminée par la méthode décrite par Hagerman et Butler (1978). Cette méthode mesure la quantité de tannins condensés ou hydrolysables qui précipitent la protéine standard BSA. Le précipité est dissout à pH élevé en présence du SDS et le complexe fer-phénols coloré obtenu est mesuré par spectrophotométrie à 510nm (Hagerman et Butler, 1978).

- **Préparation des solutions**

Tampon A : 0,20M d'acide acétique et 0,17M de NaCl, à pH4,9.
Solution de BSA : la BSA est préparée dans le tampon A à une concentration de 1mg/ml.
SDS/TEA : 5% de triéthanolamine et 1% de SDS.
Réactif de chlorure ferrique ($FeCl_3$) : 0,01M de $FeCl_3$ dans 0,01M de HCl.

Le dosage est réalisé en mélangeant 2ml de la solution BSA avec 1ml de la solution d'extrait. Ce mélange est incubé à 4°C/24h pour l'extrait de la plante et à température ambiante pendant 15min pour l'acide tannique destiné à la courbe d'étalonnage. Après centrifugation à 3000g/15min, le précipité a été récupéré et dissout dans 4ml de la solution SDS/TEA et additionné de 1ml du réactif de $FeCl_3$, le mélange a été agité immédiatement au vortex. Après 15min d'incubation, la lecture a été faite à 510nm contre un blanc de 1ml du chlorure ferrique avec 4ml du SDS/TEA. Le taux en tannins a été déterminé à partir d'une courbe d'étalonnage à l'acide tannique (Annexe 01). Tous les essais ont été répétés trois fois et la concentration en tannins est exprimée en mg équivalent d'acide tannique par gramme d'extrait (mg Eq AT/g d'extrait).

II.3.3. Dosage des flavonoïdes

L'analyse quantitative des flavonoïdes a été réalisée selon le protocole de Mimica-Dukié (1992) *in* Maksimović *et al.* (2004). La réaction est basée sur la capacité de ces composés à former des complexes de couleur jaunâtre avec le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$). La préparation de ce réactif a été réalisée par la dissolution de 133mg d'$AlCl_3$ et 400mg d'acétate de sodium dans 100ml d'eau distillée.

Pour 2ml de la solution d'extrait, 1ml du réactif d'$AlCl_3$ a été ajouté. L'absorbance a été effectuée à 430nm contre un blanc contenant 2ml de la solution d'extrait et 1ml d'eau distillée. Une courbe d'étalonnage a été réalisée avec la rutine (Annexe 01) et les teneurs en flavonoïdes ont été exprimées en mg équivalent rutine par gramme d'extrait (mg Eq Rut/g d'extrait). Tous les essais ont été effectués trois fois.

II.4. Etude chromatographique des extraits de *P. lentiscus*

Les méthodes chromatographiques sont largement utilisées pour l'identification et la séparation des constituants chimiques des mélanges complexes (Tsao et Deng, 2004). La chromatographie est une technique de séparation basée sur des principes d'adsorption entre une phase stationnaire solide et une phase mobile liquide. La phase mobile se déplace sur la phase stationnaire par capillarité ou sous l'effet de la gravité.

Les techniques chromatographiques peuvent être classées selon le mécanisme de séparation qu'elles mettent en jeu et les propriétés de la phase stationnaire. En effet plusieurs types de chromatographies existent tels que la chromatographie sur papier, sur couche mince et sur colonne (Browning, 1971 ; Sine, 2003).

II.4.1. Chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne (Fig.15) est basée également sur les phénomènes d'adsorption. Elle permet de séparer pratiquement tous les mélanges possibles dont la masse peut atteindre plusieurs grammes. Cependant, il suffit de trouver les bonnes conditions (phase stationnaire et phase mobile) (Browning, 1971 ; Sine, 2003 ; Gunawan *et al.*, 2008).

La chromatographie d'adsorption a été réalisée comme étape de fractionnement des extraits de *P. lentiscus ;* elle a été effectuée sur gel de silice 60 (63-200 µm) préparé dans du chloroforme.

II.4.1.1. Préparation de la colonne

La colonne étant verticale (2,5cm-12cm), un mélange homogénéisé de la silice et du chloroforme est versé lentement dans la colonne pour que l'adsorbant qui se dépose progressivement forme une couche homogène de 10 à 13cm de hauteur. Le robinet de la colonne est alors ouvert et le solvant s'écoule lentement pour favoriser le tassement de l'adsorbant car le remplissage doit être le plus homogène possible et exempt de bulles d'air.

II.4.1.2. Dépôt des extraits et élution

1ml de chacun des échantillons à fractionner, en solution à une concentration de 50mg/ml de méthanol, a été déposé soigneusement au sommet de la colonne à l'aide d'une micropipette. Le fractionnement des extraits résulte de l'écoulement continu de l'éluant, traversant la colonne par gravité et l'accroissement progressif de sa polarité entraine les molécules à des vitesses variables, selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant.

L'élution a été réalisée successivement par le chloroforme, acétate d'éthyle/méthanol (1/1: v/v), méthanol/eau (4/1: v/v), et enfin eau/acide acétique (1/0,04: v/v) pour les extraits organiques et par chloroforme/acétate d'éthyle (9/1: v/v) , acétate d'éthyle/méthanol (1/1: v/v), méthanol/eau (4/1: v/v) et enfin eau/acide acétique (1/0,04: v/v) pour les extraits aqueux.

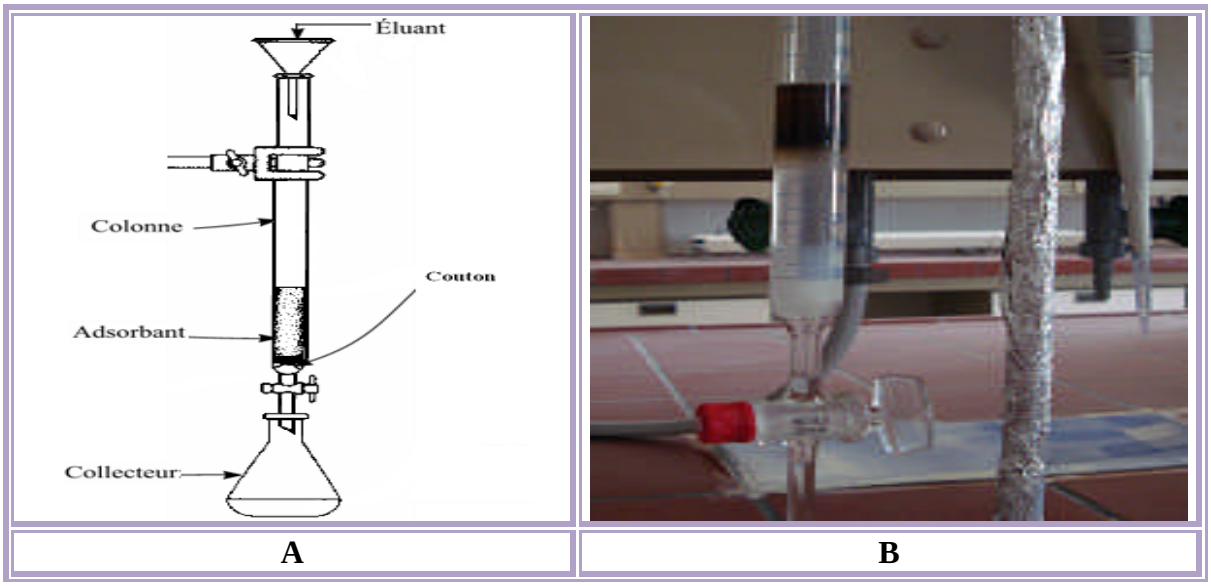


Figure 15. A) Montage pour effectuer la chromatographie sur colonne. **B)** photographie du dispositif de la chromatographie sur colonne.

Les quatre fractions recueillies, séchées, ont fait l'objet d'une évaluation de l'activité antibactérienne, à des concentrations de 0,1 ; 0,5 et 1mg/disque et d'une analyse par CCM, en utilisant un système de solvants approprié.

II.4.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les extraits végétaux ont été analysés par CCM sur gel de silice. Le système éluant utilisé a été choisi dans la littérature et adapté en fonction des composés à séparer. La CCM permet de vérifier la présence des produits suivis. Elle sépare les composés organiques de faibles poids moléculaires, selon leur polarité (Sharma *et al.*, 2009). Elle est

basée sur la formation de liaisons momentanées entre les espèces chimiques des extraits et la phase fixe. La façon dont chaque espèce chimique migre dépend de sa solubilité dans la phase mobile (éluant) et de son adsorption sur la phase fixe (gel). La séparation est basée sur la différence de vitesse de déplacement des espèces chimiques sur la phase stationnaire (Browning, 1971; Sine, 2003).

II.4.2.1. Préparation des plaques

La chromatographie sur couche mince est effectuée sur des plaques en verre (20x20cm) pré-étalées d'une couche de gel de silice (Silica gel 60 F_{254} avec indicateur fluorescent) d'une épaisseur de 0,5mm, séchées et réactivées à 110°C pendant 30min, puis tracées pour limiter une distance de migration des extraits et des fractions de 14cm. Les solutions correspondent à la concentration de 10mg/ml (M/V) pour les extraits aqueux et organiques et 5mg/ml (M/V) pour les composés purs utilisés comme référence. 10µl de chaque solution ont été déposés à environ 2cm du bord inférieur de la plaque en verre (Browning, 1971).

II.4.2.2. Développement des plaques

Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre préalablement saturées avec l'éluant approprié (Vovk *et al.*, 2005), l'échantillon est entraîné par une phase mobile à travers la phase stationnaire. La plaque est placée en position légèrement inclinée dans une cuve chromatographique de telle sorte qu'elle soit immergée à environ 0,5cm dans la phase mobile (Fig.16). Cette phase mobile est constituée d'un mélange de solvants acétate d'éthyle: acide formique: acide acétique: eau (100:11:11: 26) (Ćetković *et al.*, 2003 ; Malbaša *et al.*, 2004; Maleš *et al.*, 2006).

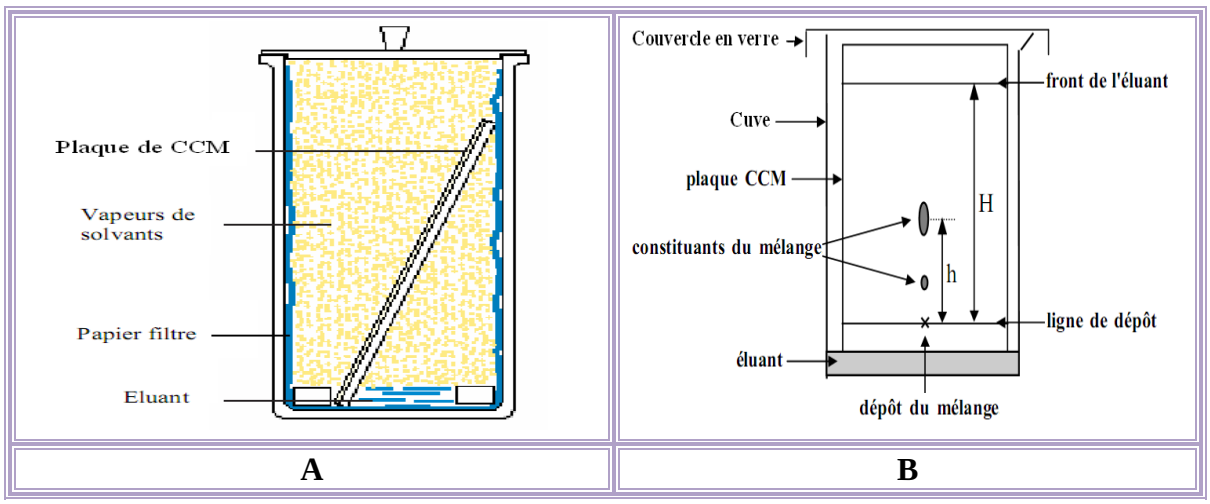


Figure 16. A) Montage pour effectuer une chromatographie sur couche mince,
B) Schéma représentatif du dispositif de la chromatographie sur couche mince.

II.4.2.3. Révélation post-chromatographique des composés de la plante

L'identification des constituants isolés se fait selon différentes méthodes, soit directement si les substances sont colorées, soit à l'aide de révélateurs ou fluorescence si elles sont incolores, afin de les transformer en taches colorées (Bruneton, 1999).

Les plaques ont été observées à la lumière du jour et sous une lampe UV (254nm) ; ensuite elles ont été révélées par un réactif de détection relativement polyvalent qui est la vanilline sulfurique, préparée selon la méthode de Stahl (1969) *in* Eloff *et al.* (2005). Après pulvérisation du révélateur, la plaque de CCM a été chauffée à 105°C jusqu'au développement optimal de la couleur (Eloff *et al.*, 2005). Plusieurs colorations apparaissent en fonction du type de composés. Enfin cette analyse est accompagnée du calcul des rapports frontaux (R_f) en comparaison avec ceux des standards.

Le regroupement final des fractions a été effectué sur la base de l'analyse des profils CCM obtenus (Nasser *et al.*, 2006). Chaque substance a été identifiée par sa fluorescence sous UV, par sa couleur après révélation à la vanilline, et par son rapport frontal dans un système de solvant précis noté R_f et défini par:

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par le constituant}}{\text{distance parcourue par l'éluant}} = \frac{h}{H}$$

II.5. Étude de l'activité antibactérienne des extraits de *P. lentiscus*

L'étude de cette activité a consisté à tester les effets antibactériens des extraits et les caractériser par la détermination de leurs concentrations minimales inhibitrices (CMI) et leurs concentrations minimales bactéricides (CMB), ainsi que pour leurs fractions chromatographiques. Pour cela, nous avons utilisé les méthodes de diffusion sur disque et de dilution en milieu solide.

II.5.1. Souches bactériennes

Les tests antibactériens ont été effectués sur des germes couramment responsables de diverses pathologies (Annexe 02). Les microorganismes étudiés et leurs références sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau II. Références et origine des souches bactériennes utilisées

	souches		référence	origine
Gram$^+$	Cocci	*Staphylococcus aureus*	**ATCC 6538**	SAIDAL- Antibiotical Medea
	Bacille	*Bacillus subtilis* *Listeria innocua*	**ATCC 6633** **CLIP 74915**	SAIDAL- Antibiotical Medea Institut Pasteur Paris
Gram$^-$	Bacille	*Escherichia coli* *Klebsiella pneumoniae* *Pseudomonas aeruginosa*	**NAR** (Nalidixic Acid resistant) **E_{47}** (résistante au céfotaxime) **ATCC 27853**	LMA Béjaia LMA Béjaia Institut Pasteur Alger

Les trois souches bactériennes sont des lots de «American Type Culture Collection » ATCC; toutes les souches sont entretenues par repiquage sur leurs milieux sélectifs.

II.5.2. Repiquage des souches bactériennes

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures, afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées qui ont servi à préparer l'inoculum bactérien.

II.5.3. Préparation de l'inoculum bactérien

La densité de l'inoculum bactérien est un élément primordial et elle doit être ajustée à l'aide d'un photomètre ou par comparaison avec un étalon d'opacité ou étalon de turbidité. L'étalon recommandé est celui de Mc Farland, car l'activité de tout agent antimicrobien est dépendante de la densité de la suspension cellulaire de la souche cible utilisée.

L'inoculum est préparé à partir d'une culture pure de 18h/37°C sur milieu d'isolement. Quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques ont été prélevées à l'aide d'une pipette pasteur, puis mises en suspension dans 9ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.

Une suspension bactérienne dite suspension dense a été obtenue, son opacité doit être équivalente à une densité optique de 0,5 à différentes longueurs d'ondes selon les maximum d'absorbance de chaque suspension bactérienne (spectrophotomètre Shimadzu UVmini.1240). Ensuite une série de dilutions décimales est réalisée dans de l'eau

physiologique stérile (10^{-1} à 10^{-9}), afin de réaliser le dénombrement sur gélose PCA. L'inoculum est standardisé à 10^{8}UFC/ml pour toutes les souches utilisées.

L'activité antibactérienne des extraits et des différentes fractions chromatographiques a été évaluée en utilisant la méthode de diffusion sur disque, selon Bauer *et al.* (1966) in Alzoreky et Nakahara (2003).

II.5.4. Détermination de l'effet antibactérien (aromatogramme)

L'aromatogramme est basé sur la technique utilisée en bactériologie médicale appelé antibiogramme (de Billerbeck, 2007 ; Kaloustian *et al.*, 2008). Le principe de cette méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide, dans une boîte de Pétri, à partir d'un point précis, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme.

L'effet de la substance antimicrobienne sur la cible a été évalué par la mesure d'une zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.

- **Description de la méthode**

La gélose Mueller-Hinton (MH) en surfusion, coulée en boites de Pétri sur une épaisseur de 4mm**.** Après solidification, une suspension bactérienne à la concentration standardisée est ensemencée à l'aide d'un écouvillon stérile, préalablement trempé dans cette suspension bactérienne, et déchargé au maximum, sur la totalité de la surface gélosé en stries serrés.

L'opération a été répétée deux à trois fois, en tournant la boite à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Des disques de 6mm de diamètre, découpés du papier Wattman n° 01, stérilisés et imprégnés de 20µl de solution méthanolique d'extraits et de fractions chromatographiques (Ali-Emmanuel *et al.*, 2002), afin d'obtenir des concentrations de 0,02 ; 0,1 ; 0,2 ; 1 et 2mg/disque et de 0,1 ; 0,5 et 1mg/disque pour les extraits et les fractions chromatographiques respectivement, ont été déposés stérilement sur la gélose.

Dans les mêmes conditions, des disques imprégnés du méthanol sont utilisés comme témoin négatif et six antibiotiques ont été testés en antibiogramme standard, dont deux β-lactamines (Pénicilline 6µg, Ampicilline 10µg), phénicole (Chloramphénicol 30µg), aminoside (Gentamicine 15µg), glycopeptide (Vancomycine 30µg), fluoroquinolone (Ofloxacine 5µg)**,** réputés actifs sur les souches étudiées, sont utilisés comme témoins positifs. Chaque test a été effectué trois fois. La lecture a été faite après la diffusion des extraits et des fractions chromatographiques à 4°C/3h (Ali *et al.*, 2001) et après 24 heures d'incubation à 37°C.

Les solutions d'extrait et de fractions ainsi que les solutions standards (acide gallique, acide caféique, acide tannique, catéchine, quercétine) servant pour les tests ont été conservées à 4°C durant la période des tests (Mathabe *et al.*, 2006; Trabelsi *et al.*, 2010).

L'activité antibactérienne des extraits et des fractions est observée par la présence d'une zone d'inhibition autour du disque imprégné d'extrait ou de fraction. Pour l'antibiogramme standard, l'interprétation a été faite suivant les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie et les résultats sont exprimés en millimètre (Tableau XVI en Annexe 02).

II.5.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus faible concentration de la substance antibactérienne inhibant toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24h (Martini et Eloff, 1998). Le principe de la méthode consiste à diluer directement la substance antibactérienne à tester dans le milieu de culture gélosé et à inoculer ce milieu avec les microorganismes.
En diluant différentes concentrations de la substance antibactérienne à tester, on peut définir la valeur la plus faible à laquelle la croissance des microorganismes n'est pas observable, et donc une inhibition de la croissance. Cette méthode permet donc d'évaluer qualitativement et surtout quantitativement l'activité antibactérienne d'une substance.

- **Préparation des géloses à différentes concentrations des extraits**

Une solution d'extrait a été préparée dans du méthanol à une concentration de 10mg/ml qui a servi pour la préparation des géloses Mueller-Hinton à des concentrations de 1; 0,9 ; 0,8 ; 0,7 ; 0,6 ; 0,5 ; 0,4 ; 0,3 ; 0,2 et 0,1mg/ml.

La technique consiste à réaliser des dilutions dans un milieu de culture gélosé préalablement fondu et maintenu en surfusion à 45°C - 50°C (Okusa *et al.,* 2007). L'ensemencement a été réalisé par spot, à l'aide d'un inoculateur (micropipette), de 10µl d'un inoculum de 10^7UFC/ml de chacune des souches à la surface de la gélose (Alzoreky et Nakahara, 2003). La lecture des résultats se fait après 24h d'incubation à 37°C par observation ou inhibition de la croissance du microorganisme testé par rapport à la croissance sur une boîte témoin sans extrait. Les essais ont été effectués en trois répliques et les résultats sont exprimés en mg/ml.

II.5.6. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La CMB est la concentration de la substance antibactérienne permettant d'obtenir, après 18 à 24h d'incubation à 37˚C, 0,1 % de germes, c'est-à-dire une bactérie pour 1000 de l'inoculum initial (Rodríguez-Vaquero *et al.,* 2010). On ensemence dans des tubes contenant du bouillon nutritif la série de boites commençant à partir de celle qui a déterminée la CMI par dilution en milieu gélosé. La concentration minimale bactéricide correspond à la plus petite concentration de la substance antibactérienne pour laquelle aucune sub-croissance n'est observée. La lecture est faite par comparaison de la croissance bactérienne après incubation à 37˚C pendant 18h-24h.

II.6. Cinétique de croissance de *S. aureus* en milieu liquide en présence d'extrait aqueux d'hexane de *P. lentiscus* et de sa fraction (F_2) (Sousa *et al.,* 2006)

L'étude du pouvoir antibactérien *in vitro* de l'extrait aqueux d'hexane et de sa fraction (F_2) la plus active à l'égard de la souche *S. aureus* est effectuée par suivis de l'évolution de la croissance de cette dernière dans du bouillon nutritif stérile. Ces extraits sont dissous dans le bouillon nutritif pour avoir une concentration de 0,4mg/ml, ensuite un volume de la suspension bactérienne de *S. aureus* préparée à partir d'une culture jeune de18h est dilué dans le bouillon contenant l'extrait et/ou la fraction (F_2) de manière à obtenir une suspension de 10^7UFC/ml.

La culture est incubée à 37°C sous agitation, et le dénombrement est effectué toute les 2h pendant 24h-48h. Le suivi de la croissance bactérienne est basé sur le dénombrement par comptage des colonies sur gélose PCA additionnée de 7,5% NaCl.

La croissance de la souche cible en présence des extraits est comparée à sa croissance en culture sans extrait : la souche est ensemencée seule dans le bouillon nutritif stérile et incubée à 37°C et le dénombrement est effectué après chaque intervalle de temps.

II.7. Analyse statistique des données

Toutes les expériences ont été réalisées une fois avec trois répliques de chaque concentration en extrait ou en fraction chromatographique (sauf pour les valeurs des CMI et CMB).

Les donnés sont traitées de façon statistique par des analyses de variances (ANOVA à deux facteurs : les extraits et/ou fractions chromatographiques et leurs concentrations), à l'aide du logiciel (Statistica 5.5). Toutes les analyses sont réalisées au seuil de signification de 5% ($P<0.05$).

Résultats et Discussions

III.1. Extraction des composés phénoliques

Le séchage est le seul moyen de préserver le matériel végétal. En effet, un séchage à 40°C et à l'abri de la lumière pendant quelques jours a été effectué afin de dénaturer les enzymes, existantes dans le matériel végétal frais, susceptibles de provoquer des modifications des composés phénoliques (Ribereau-Gayon, 1968). À de basses températures (<4O°C), les enzymes peuvent encore fonctionner et à des températures au-dessus de 60°C le dommage des composés phénoliques par la chaleur peut se produire (Reed, 1995). Laleh *et al*. (2006) ont également étudié le rôle de la lumière sur la stabilité des anthocyanines des extraits de quatre espèces de *Berberis* et ont prouvé que l'exposition des pigments à la lumière accélère leur destruction. Ainsi, le temps, les conditions de conservation du matériel végétal et la partie extraite (Nawaz *et al.,* 2006) sont aussi des paramètres importants pour une meilleure extraction (Cacace et Mazza, 2003).

Les dimensions des particules de l'échantillon peuvent influencer l'extraction. En effet, la réduction de la taille des particules favorise l'extraction en augmentant la surface de contact entre le solide et le solvant (Pinelo *et al.*, 2005 ; Spigno *et al.*, 2007).

La composition chimique des plantes influence le choix du solvant adéquat, car les extraits phénoliques des matières végétales sont des mélanges diversifiés de composés contenus à des quantités variables. Par ailleurs, différents solvants ont été utilisés pour l'extraction des polyphénols des matières végétales tel que; l'eau, les mélanges aqueux de l'éthanol, le méthanol, l'acétate d'éthyle, le chloroforme et l'acétone (Turkmen *et al*., 2006 ; Park et Jhon, 2010). La méthode adoptée pour l'extraction des principes actifs de *P. lentiscus* (composés phénoliques) a été choisie pour sa sélectivité, visant l'optimisation de l'extraction de composés susceptibles d'avoir une activité antibactérienne. Plusieurs solvants de polarités distinctes ont été successivement utilisés dans les différentes étapes d'extraction.

En outre, pour une même plante, les différences variétales et les périodes de cueillette, notamment, influencent sa composition et ses teneurs en composés phénoliques (Tsao et Deng, 2004) ainsi que son activité (Akowuah *et al.*, 2005).

La solubilité des composés phénoliques est régie par leur nature, qui peut varier de simples substances aux composés fortement polymérisées (Cacace et Mazza, 2003) et par la polarité des solvants et la méthode utilisée (Goli *et al.,* 2004 ; Spigno *et al.,* 2007 ; Park et Jhon, 2010). Selon Cacace et Mazza (2001), la température peut influer l'extraction d'un composé donné en modifiant son coefficient de diffusion ou sa solubilité dans le solvant. Aussi, ils ont remarqué une diminution de la quantité d'anthocyanines extraites à des températures supérieures à 40°C qui peut être attribuée à leur dégradation à des températures élevées. Ces multiples paramètres à optimiser rendent difficile l'élaboration d'un procédé d'extraction approprié à tous les composés phénoliques des plantes (Naczk et Shahidi, 2006).

Le criblage des activités antimicrobiennes des plantes se fait après des extractions bruts aqueuses ou alcooliques qui peuvent être suivis de diverses méthodes d'extraction organiques (Nawaz *et al.,* 2006). Tous les composants antibactériens des plantes de structure aromatique ou composés organiques saturés, sont souvent obtenus par une extraction initiale par l'éthanol ou le méthanol (Cowan, 1999).

L'extraction à base d'alcool (éthanol et méthanol) est hautement sélective pour les composés phénoliques. Ribéreau-Gayon (1968) dénote, que le méthanol et l'éthanol, sont les deux solvants polaires les plus faciles à éliminer sous vide. Selon Cowan (1999) et Raghavan et Richards (2006), l'éthanol a été rapporté comme étant le solvant d'extraction des polyphénols et le moins toxique par rapport aux autres solvants organiques (acétone). En plus, Martini et Eloff (1998) ont rapporté son pouvoir extractant de composés des plantes à activité antibactérienne.

Les rendements d'extraction des différents solvants à partir des feuilles et des fruits obtenus par la méthode sélectionnée pour la présente étude sont rapportés dans le tableau suivant:

Tableau III. Taux d'extraction des extraits de feuilles et de fruits de *P. lentiscus*

Solvants	Taux d'extraction (%)	
	Feuilles	**Fruits**
Ethanol	**21,35**	3,6
Acétate d'éthyle/eau Phase organique Phase aqueuse	26,29 64,81	47,54 38,19
Chloroforme/eau Phase organique Phase aqueuse	20,49 34,57	66,28 1,16
Hexane/eau Phase organique Phase aqueuse	30,69 35,25	84 1,33

Les composés phénoliques de feuille et du fruit de *P.lentiscus* se sont solubilisés dans les solvants polaires et apolaires, en se répartissant entre phases aqueuses et organiques. Dans cette extraction des solvants de polarité différente ont été utilisés dont le plus polaire étant l'eau, l'éthanol suivi de l'acétate d'éthyle, le chloroforme et l'hexane qui est le plus apolaire, afin d'avoir une bonne répartition de tous les composés.

D'après les résultats du tableau précédent, le taux d'extraction est effectivement variable en fonction de la partie de la plante et du solvant utilisé. Le meilleur taux d'extraction à l'éthanol est obtenu avec les feuilles (21,35%), comparativement à celui des fruits (3,6%), indiquant la richesse des feuilles de *P. lentiscus* en composés phénoliques. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de Bahorun (1997), qui a obtenu au niveau des feuilles et boutons floraux de l'espèce *Crataegus monogyna,* un taux plus important en polyphénols par rapport aux autres parties de la plante. Les rendements d'extraction des feuilles de *P. lentiscus* se sont avérés deux fois moindres (21,35%) que celui de l'extrait méthanolique de la même plante rapporté par Gardeli *et al.* (2008), qui est de 61.1%.

Pour ce qui est de la deuxième et troisième étape de l'extraction, les taux les plus élevés ont été obtenus à partir des phases polaires, voir aqueuses pour les feuilles de *P. lentiscus,* contrairement aux extraits des fruits pour lesquels de faibles taux d'extraction ont été enregistrés, cela pourrait être du à la richesse de *P. lentiscus* en composés polaire et apolaire.

La majeure partie des composés de l'extrait éthanolique des feuilles de *P. lentiscus* se retrouvent dans l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle (64,81% de l'extrait éthanolique), ce qui signifie sa richesse en composés polaires. Par ailleurs, les composés des extraits organique et aqueux d'acétate d'éthyle des fruits sont répartis, presque équitablement, entre les deux phases. Les extraits aqueux du chloroforme et d'hexane n'ont pas été récupérés à partir des fruits, suite à l'épuisement des composés hydrosolubles par la phase aqueuse durant la deuxième phase, ce qui signifie leur richesse en composés apolaires. Quant aux feuilles de *P. lentiscus*, ses extraits sont obtenus à des taux presque similaires à ceux de leurs phases organiques correspondantes (tableau III).

Le résultat d'extraction des composés phénoliques concernant les feuilles de *P. lentiscus*, indique un taux élevé de ses composés. Ces résultats sont en corrélation avec ceux établis par Kordali *et al*. (2003), qui ont obtenu à partir de l'extrait éthanolique des feuilles de cette espèce le rendement le plus élevée de 16,59% par rapport à d'autres espèces appartenant à la même famille; *Pistacia vera* et *Pistacia terebinthus*, ce qui confirme sa richesse en ces composés.

D'après les résultats de cette étude la série d'extraction adoptée mène à un certain fractionnement des composés des parties de la plante étudiée et que le choix de l'éthanol comme premier solvant a permis l'extraction de composés polaires et apolaires, qui, suite aux autres extractions, se sont réparties selon leur polarité dans les différentes phases.

III.2. Dosage des composés phénoliques

L'étude quantitative des différents extraits bruts au moyen des dosages spectrophotométriques avait pour objectif la détermination de la teneur totale des phénols totaux, tannins et flavonoïdes.

Il n'existe pas de méthode qui donnera des résultats satisfaisants pour l'analyse quantitative parce que les propriétés chimiques sont impliqués dans la réactivité des polyphénols dans des analyses colorimétriques et (ou) de précipitation (Reed, 1995). Néanmoins, une estimation peut être obtenue par différentes méthodes.

III.2.1. Dosage des phénols totaux

Les résultats du dosage des phénols totaux des feuilles et fruits de *P. lentiscus* sont représentés dans la figure 17.

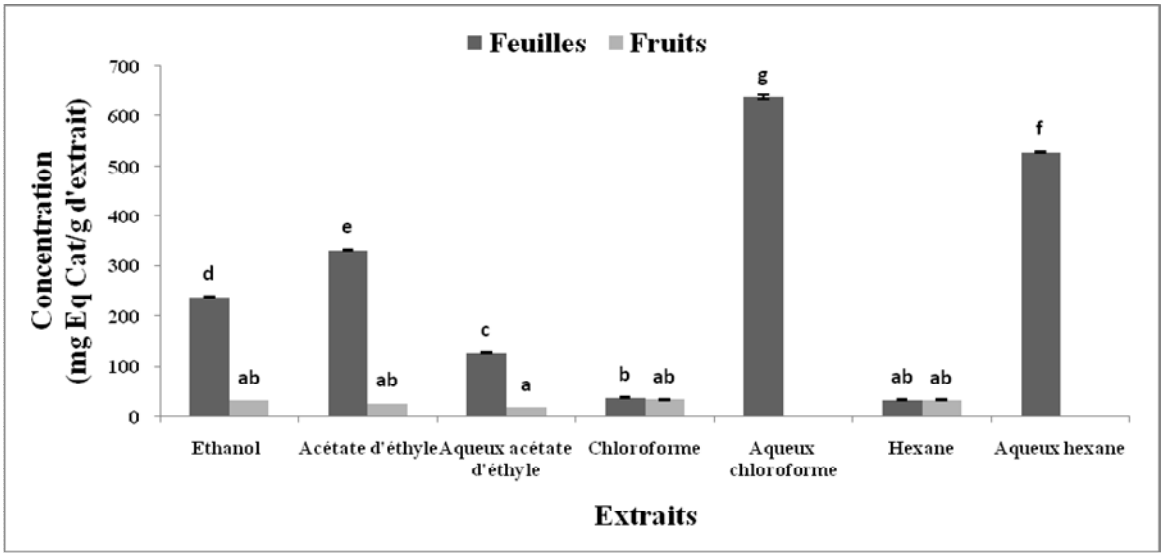


Figure 17. Teneurs en phénols totaux des différents extraits de *P. lentiscus*

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3)+l'écartype.
-Les valeurs désignées avec les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative (P<0,05).

Comme le montre la fig.17, tous les extraits de feuilles sont plus riches en phénols totaux par rapport à ceux des fruits (P<0,05). En effet, il a été prouvé que la répartition des composés phénoliques varie d'une partie à une autre au sein de la même plante (Macheix *et al*., 2005). Le contenu le plus élevé en phénols totaux est concentré essentiellement au niveau de l'extrait aqueux du chloroforme (637,58mg Eq Cat/g d'extrait), suivi des extraits aqueux d'hexane (527,51mg Eq Cat/g d'extrait), d'acétate d'éthyle (332,05mg Eq Cat/g d'extrait) et de l'éthanol (238,22mg Eq Cat/g d'extrait) des feuilles. Quant aux autres extraits, ils présentent une faible teneure en phénols totaux, avec un minimum de 17,93mg Eq Cat/g d'extrait pour l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle des fruits (P<0,05).

Majhenič *et al.* (2007) ont rapporté que, généralement, les quantités les plus élevées en composés phénoliques totaux dans les extraits de graines de Guarana ont été déterminées dans les extraits aqueux obtenus à température ambiante. Topçu *et al.* (2007) ont quantifié les phénols totaux des extraits de fruits de *P. terebinthus* et trouvent la présence de 61,05µg PEs/mg dans l'extrait méthanolique et un taux plus important (122,78µg PEs/mg) dans l'extrait acétonique, des teneurs supérieures à celles obtenus dans la présente étude avec les fruits de *P. lentiscus*. Gardeli *et al.* (2008) retrouvent au niveau des extraits méthanoliques des feuilles de *P. lentiscus* des quantités variables en phénols

totaux qui s'étendent de 483 à 588mg d'acide gallique/g de matière végétale, en fonction de la période de cueillette du matériel végétal.

Cette divergence de résultats est probablement tributaire, au matériel végétal utilisé dérivant de la grande diversité structurale des composés phénoliques. Elle peut être également liée aux phases végétatives **(**Gardeli *et al.*, 2008) et même aux facteurs abiotiques tels que le climat spécifique aux régions de provenance des échantillons, les facteurs géographiques comme l'altitude et la nature du sol (Brada *et al.*, 2007).

III.2.2. Dosage des tannins

Les résultats du dosage des tannins des feuilles et fruits de *P. lentiscus* sont représentés dans la figure 18.

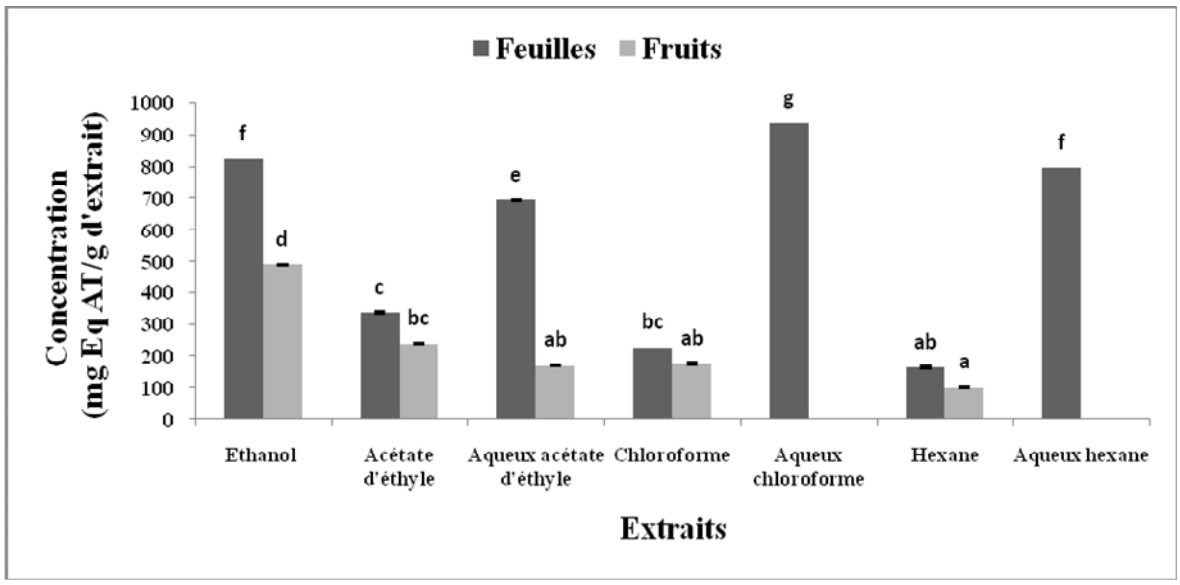


Figure 18. Teneurs en tannins des différents extraits de *P. lentiscus*

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3)+l'écartype.
-Les valeurs désignées avec les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative (P<0,05).

D'après ces résultats, seuls les extraits aqueux de feuilles ont présenté des taux élevés en tannins, à savoir l'extrait aqueux du chloroforme (937,22mg Eq AT/g d'extrait); les autres extraits de feuilles ont présenté des quantités moyennes avoisinant 700mg Eq AT/g d'extrait. Par contre, les quantités les plus faibles ont été enregistrées avec les extraits chloroforme (225,83mg Eq AT/g d'extrait) et hexane (164,16mg Eq AT/g d'extrait) de la même partie de la plante (P<0,05). Quant aux extraits des fruits, ils se sont avérés pauvres en tannins, ils y sont concentrés, surtout au niveau des extraits organiques (fig.18) avec les taux les plus élevés (P<0,05), tandis que les extraits aqueux sont marqués par les taux les

plus faibles. Ceci s'explique par l'insolubilité de ces composés, en particulier les tannins condensés à haut poids moléculaire dans les solutions aqueuses (Reed, 1995 ; Cheynier, 2005).

III.2.3. Dosage des flavonoïdes

Les résultats du dosage des flavonoïdes des extraits de feuilles et de fruits de *P. lentiscus*, sont représentés dans la figure 19.

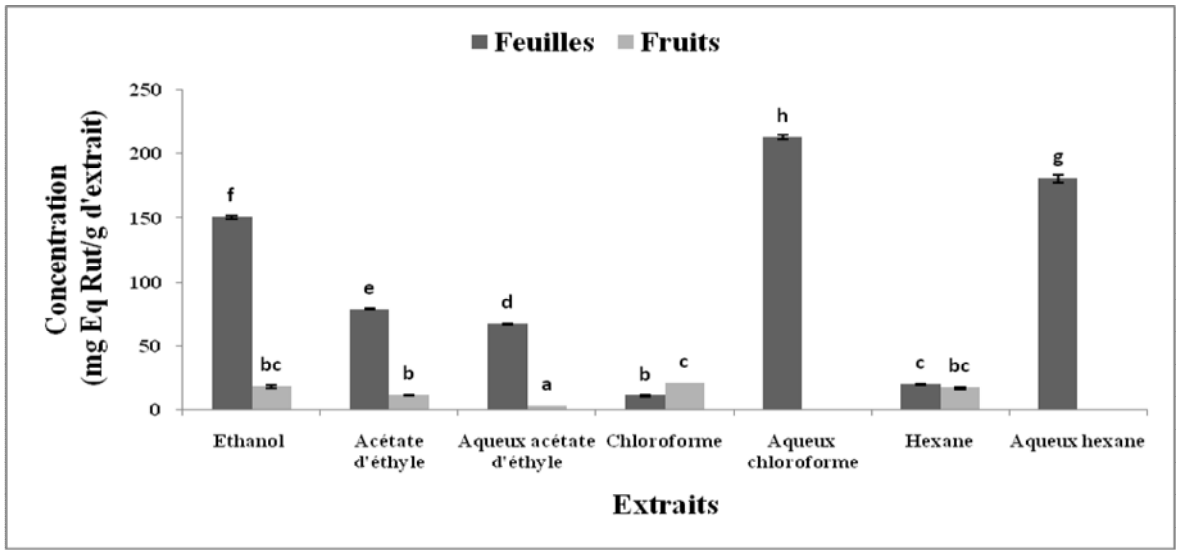


Figure 19. Teneurs en flavonoïdes des différents extraits de *P. lentiscus*

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3)+l'écartype.
-Les valeurs désignées avec les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative (P<0,05).

D'après les résultats de la Fig.19, le taux le plus élevé en flavonoïdes se trouve au niveau des extraits aqueux du chloroforme (212,36mg Eq Rut/g d'extrait) (P<0,05) et aqueux d'hexane (180,34mg Eq Rut/g d'extrait) des feuilles, suivi de près par l'extrait éthanol (150,05mg Eq Rut/g d'extrait). L'extrait aqueux d'acétate d'éthyle des fruits de *P. lentiscus* présente le taux le plus faible (2,30mg Eq Rut/g d'extrait). Ces résultats sont appuyés par des études antérieures réalisées par Topçu *et al.* (2007) sur des extraits méthanolique et acétonique du fruit de l'espèce *P. terebinthus*. De cette présente analyse, on déduit que les extraits des feuilles de *P. lentiscus* sont plutôt riches en flavonoïdes de différentes polarités, ce qui n'est pas le cas pour les extraits de fruits.

La divergence des résultats du dosage pourrait être attribuée à une répartition différente des composés phénoliques au sein de la même plante. Le contenu en composés phénoliques dépend fortement des différents organes de *P. lentiscus.* Ainsi les feuilles ont montré un contenu plus élevé en composés phénoliques que celui des fruits.

Le contenu en polyphénol des feuilles de *P. lentiscus* est plus élevé que celui de plusieurs espèces citées dans la littérature. Djeridane *et al.* (2006) ont constaté que cette abondance peut être liée aux conditions climatiques dures de l'habitat habituel (la température chaude, exposition solaire élevée, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols. En effet, le contenu phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (environnement et stockage) (Falleh *et al.,* 2008).

III.3. Activité antibactérienne des extraits et des fractions chromatographiques de *P. lentiscus*

Il a été rapporté que la méthode de diffusion sur disque et la mesure des CMI sont les plus utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne des substances naturelles des extraits des plantes médicinales (Gülçin *et al*., 2004 ; vanVuuren, 2008).

La méthode des disques est basée sur l'utilisation des disques comme réservoirs contenant la solution des substances à tester. Dans le cas des solutions avec une basse activité, une grande concentration ou volume est nécessaire; néanmoins la capacité des disques est limitée. C'est pourquoi certains extraits exhibent des zones d'inhibition incomplètes qui peuvent être attribuées à une résistance par déficience de dose d'extrait (Gülçin *et al*., 2004). La CMI est une méthode quantitative basée sur le principe du contact d'un microorganisme à une série de dilutions de la substance testée. Elle est couramment utilisée comme un critère admis pour la mesure de la susceptibilité des microorganismes aux inhibiteurs (vanVuuren, 2008).

La taille de l'inoculum est considéré comme étant la variable la plus importante dans les tests de sensibilité (Cushnie *et al.,* 2003). Elle a été ajustée à 10^8UFC/ml (10^7UFC/ml sur la boite), et ceci pour éviter d'éventuelles ambiguités dans l'interprétation des résultats car avec cette charge aucune zone d'inhibition n'a été observée avec le méthanol.

Tous les extraits et les fractions chromatographiques ont été testés contre les microorganismes Gram$^+$ (*S. aureus*, *B. subtilis* et *L. innocua*) et Gram$^-$ (*P. aeruginosa*, *E.coli* et *K. pneumoniae*), afin de déterminer leur potentiel bioactif. Pour cela, ils ont été dissous dans du méthanol dont la capacité à dissoudre tous les extraits polaires et apolaires a fait de lui le solvant du choix. Comme il peut par lui-même exercer un effet inhibiteur sur la croissance normale des souches bactériennes, un témoin sans extrait a été réalisé pour chaque souche et aucune activité inhibitrice du méthanol n'a été observée (Fig. annexe 04), suggérant que l'activité observée est le seul effet des extraits en question, comme rapporté par Meral et Karabay (2002) qui ont démontré que le méthanol pur ne présente aucun effet inhibiteur sur la croissance bactérienne.

Les résultats de l'activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *S. aureus, B. subtilis, L. innocua, P. aeruginosa, E. coli* et *K. pneumoniae,* sont rapportés successivement dans les tableaux VII, VIII, IX, X, XI et XII et leurs aspects sont illustrés dans les figures 20, 22, 23, 24, 26 et 27.

Les CMI et CMB des extraits et des fractions chromatographiques actifs, ainsi que celles des composés phénoliques purs ont été déterminées et les valeurs obtenues sont représentées dans les tableaux suivants:

Tableau IV. Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des extraits et des fractions chromatographiques des feuilles

Extraits	CMI et CMB en mg/ ml					
	S. aureus	***B.subtilis***	***P.aeruginosa***	***L innocua***	***E.coli***	***K.pneumoniae***
	CMI/CMB	CMI/CMB	CMI/CMB	CMI/CMB	CMI/CMB	CMI/CMB
Feuilles de *P. lentiscus*						
Ethanol	**0,4/>1**	**0,4/>1**	**0,2/0,4**	**NT**	**NT**	**NT**
F_1	0,4/0,9	0,4/>1	NT	NT	NT	NT
F_2	0,3/>1	0,3/>1	0,2/0,3	NT	NT	NT
F_3	NT	NT	NT	1/> 1	1/>1	0,8/>1
F_4	NT	NT	NT	>1/> 1	>1/>1	>1/>1
Acétate d'éthyle	**0,2/0,3**	**0,2/>1**	**≤0,1/0,3**	**0,3/0,5**	**NT**	**NT**
F_1	0,4/0,6	0,2/>1	0,2/0,4	NT	NT	NT
F_2	0,2/0,6	0,2/>1	≤0,1/0,2	NT	NT	0,7/0,9
F_3	NT	NT	NT	NT	NT	1/1
F_4	NT	NT	NT	NT	NT	>1/>1
Aq-acétate d'éthyle	**0,7/>1**	**NT**	**NT**	**NT**	**NT**	**NT**
F_1	NT	NT	NT	NT	NT	NT
F_2	0,9/>1	NT	NT	NT	NT	NT
F_3	0,8/>1	NT	NT	NT	NT	NT
F_4	>1/>1	NT	NT	NT	NT	NT
Chloroforme	**NT**	**NT**	**NT**	**NT**	**NT**	**NT**
F_1	NT	0,8/1	NT	NT	NT	NT
F_2	0,5/0,8	0,5/>1	NT	NT	NT	NT
F_3	0,8/>1	NT	NT	NT	NT	NT
F_4	>1/>1	NT	NT	NT	NT	NT
Aq-du chloroforme	**0,2/0,7**	**0,2/>1**	**≤0,1/0,3**	**0,3/0,5**	**0,4/0,5**	**0,6/0,7**
F_1	0,2/0,7	0,3/>1	≤0,1/0,3	0,3/0,5	0,4/0,5	0,5/0,6
F_2	0,2/0,8	0,3/>1	≤0,1/0,3	0,3/0,5	0,4/0,5	0,4/0,6
F_3	0,7/>1	0,7/>1	0,5/0,5	NT	>1/>1	0,9/>1
F_4	NT	NT	NT	NT	>1/>1	>1/>1
Hexane	**NT**	**NT**	**NT**	**NT**	**NT**	**NT**
F_1	>1/>1	NT	NT	NT	NT	NT
F_2	>1/>1	NT	NT	NT	NT	NT
F_3	NT	NT	NT	NT	NT	NT
F_4	NT	>1/>1	NT	NT	NT	NT
Aq-d'hexane	**0,2/0,7**	**0,2/>1**	**≤0,1/0,3**	**0,3/0,5**	**0,4/0,5**	**0,6/0,7**
F_1	0,2/0,6	0,3/>1	≤0,1/0,2	0,3/0,6	0,4/0,5	0,5/0,7
F_2	0,2/0,5	0,3/>1	≤0,1/0,2	NT	0,5/0,5	0,5/0,6
F_3	0,9/>1	0,9/>1	NT	NT	>1/>1	>1/>1
F_4	>1/>1	>1/>1	NT	NT	NT	NT

NT: Non testé

Tableau V. Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des extraits et des fractions chromatographiques des fruits

Extraits	CMI et CMB en mg/ ml					
	S. aureus	***B.subtilis***	***P.aeruginosa***	***L innocua***	***E.coli***	***K.pneumoniae***
	CMI/CMB	CMI/CMB	CMI/CMB	CMI/CMB	CMI/CMB	CMI/CMB
Fruits de *P. lentiscus*						
Ethanol	**>1/>1**	**0,8/>1**	**NT**	**NT**	**NT**	**NT**
F_1	>1/>1	0,9/>1	NT	NT	NT	NT
F_2	>1/>1	0,7/0,9	NT	NT	NT	NT
F_3	NT	NT	NT	NT	NT	NT
F_4	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Acétate d'éthyle	**1/>1**	**0,3/>1**	**NT**	**NT**	**NT**	**NT**
F_1	NT	NT	NT	NT	NT	NT
F_2	NT	NT	NT	NT	NT	NT
F_3	NT	NT	NT	NT	NT	NT
F_4	>1/>1	NT	NT	NT	NT	NT
Aq-acétate d'éthyle	**>1/>1**	**>1/>1**	**NT**	**NT**	**NT**	**NT**
F_1	1/>1	0,7/>1	NT	NT	NT	NT
F_2	NT	NT	NT	NT	NT	NT
F_3	NT	>1/>1	NT	NT	NT	NT
F_4	>1/>1	NT	NT	NT	NT	NT
Chloroforme	**1/1**	**0,5/>1**	**NT**	**NT**	**NT**	**NT**
F_1	1/>1	0,9/>1	NT	NT	NT	NT
F_2	1/>1	0,7/1	NT	NT	NT	NT
F_3	NT	NT	NT	NT	NT	NT
F_4	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Hexane	**1/>1**	**0,5/>1**	**NT**	**NT**	**NT**	**NT**
F_1	NT	0,8/0,8	NT	NT	NT	NT
F_2	>1/>1	0,6/>1	NT	NT	NT	NT
F_3	NT	NT	NT	NT	NT	NT
F_4	NT	NT	NT	NT	NT	NT

NT: Non testé

Tableau VI. Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des standards

Standards	CMI et CMB en mg/ml					
	S.aureus	***B.subtilis***	***P.aeruginosa***	***L.innocua***	***E.coli***	***K.pneumoniae***
	CMI/CMB	CMI/CMB	CMI/CMB	CMI/CMB	CMI/CMB	CMI/CMB
Acide tannique	0,2/0,5	≤0,1/>1	≤0,1/0,2	0,2/0,5	NT	NT
Acide gallique	≤0,1/0,2	0,4/>1	≤0,1/≤0,1	≤0,1/0,2	0,5/>1	0,4/>1
Acide caféique	0,2/0,4	0,4/>1	NT	NT	0,5/>1	0,5/>1
Catéchine	0,7/0,7	0,7/>1	NT	NT	0,7/0,8	0,7/>1
Quercétine	>1/>1	>1/>1	>1/>1	>1/>1	>1/>1	>1/>1

NT: Non testé

III.3.1. Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *S. aureus* (ATCC6538)

D'après les résultats montrés dans le tableau VII, pratiquement tous les extraits des feuilles ont montré une activité inhibitrice sur *S. aureus* dont la meilleure en terme de diamètre de la zone d'inhibition a été obtenue avec l'extrait organique d'acétate d'éthyle, à une concentration de 2mg/disque, avec des CMI (0,2mg/ml) et CMB (0,3mg/ml) intéressantes (Tableau IV).

Les extraits éthanolique, aqueux du chloroforme, aqueux d'hexane et aqueux d'acétate d'éthyle des feuilles de *P. lentiscus* exhibent une activité élevée, avec des zones d'inhibition de 20,3 ; 21,8 ; 21,7 et 19,3mm (à 2mg/disque), respectivement. Avec des CMI/CMB de 0,4/>1; 0,2/0,7; 0,2/0,7; 0,7/>1mg/ml, respectivement. Pour ces mêmes extraits l'augmentation de la concentration s'est accompagnée d'une augmentation significative du diamètre de la zone d'inhibition, ce qui correspond à un effet dose dépendant ($P<0,05$). Des résultats similaires ont été obtenus par Ogueke et ses collaborateurs (2007). En testant l'activité de l'extrait éthanolique de *Euphorbia hirta* sur *S. aureus*, ils ont constaté que l'augmentation de la concentration dans le disque de 50 à 100mg/ml produit une différence significative du diamètre de la zone d'inhibition.

En terme de diamètre de la zone d'inhibition, l'extrait hexane des feuilles est le moins actif (8mm) avec des CMI et CMB élevées (supérieures à 1mg/ml), ce qui confirme le faible pouvoir antibactérien de cet extrait (Tableau IV).

Les valeurs des CMI et CMB des extraits aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane (0,2/0,7mg/ml) des feuilles sont plus intéressantes que celles de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle (0,7/>1mg/ml), ce qui signifie un gain d'activité, et prouve la sélectivité du procédé d'extraction adopté (Tableau IV).

Les extraits des fruits, quand à eux, ont donné des zones d'inhibition inférieures et/ou égales à 11,0mm aux concentrations testées ($P<0,05$). Seul l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle a montré un faible effet inhibiteur à partir de la concentration de 1mg/disque. Les valeurs des CMI et CMB sont ≥1mg/ml, nettement plus élevées que celles des extraits des feuilles (Tableau V).

Le fractionnement des extraits éthanolique et acétate d'éthyle, ainsi que l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle des feuilles, a permis de récupérer de faibles activités en terme de zones d'inhibition, indiquant probablement que l'activité initiale observée soit due à plusieurs composés agissant en synergie, contrairement aux extraits chloroforme et hexane qui, après fractionnement, ont montré une petite amélioration de l'activité au niveau de leurs fractions résultantes.

Les fractions issues des extraits aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane des feuilles se sont montrées plus actives que leur extraits correspondants sur cette souche ($P<0,05$), ce qui signifie que l'activité initiale observée avec leurs extraits n'est pas due à un effet synergique.

Les fractions F_1, F_2 et F_3 ont été les seules fractions actives issues du fractionnement de l'extrait aqueux chloroforme des feuilles, puisqu'elles ont montré un effet bactériostatique à 0,2 ; 0,2 et 0,7mg/ml et bactéricide à 0,7 ; 0,8 et >1mg/ml, respectivement. Le diamètre d'inhibition le plus large est obtenu avec la F_3, il est de 24,0mm à 0,1mg/disque. Dans le cas des fractions F_1 et F_3, l'augmentation de la charge du disque de 0,1 à 1mg/disque s'est accompagnée d'une réduction significative du diamètre de la zone d'inhibition de 20,7 à 15,7mm et de 24,0 à 16,0mm, respectivement ($P<0,05$), contrairement à la fraction F_2 pour qui l'augmentation de la charge du disque de 0,5 à 1mg/disque s'est accompagnée d'un élargissement significatif de la zone d'inhibition (9,8 à 15,5mm) ($P<0,05$).

Les fractions de l'extrait aqueux d'hexane se sont toutes montrées actives sur cette souche. Ceci pourrait être dû à la présence de plusieurs composés actifs de polarités différentes qui ont été récupérées dans différentes fractions. Les meilleures activités en terme de diamètre de la zone d'inhibition ont été obtenues avec la fraction F_2 de l'extrait aqueux d'hexane à la concentration de 1mg/disque avec un diamètre d'inhibition de 26,3mm avec une CMI de 0,2mg/ml et une CMB de 0,5mg/ml, suivi d'une zone d'inhibition de 25,0mm de la même fraction à 0,5mg/disque et de la fraction F_4 du même extrait à 1mg/disque. Pour les fractions F_1, F_2 et F_3 l'augmentation de la charge du disque s'accompagne d'une amélioration de l'activité. Pour la fraction F_4, on remarque toujours cette amélioration, en passant directement de la concentration de 0,1mg/disque (16,0mm) à 1mg/disque (25,0mm) et la disparition de la zone d'inhibition à 0,5mg/disque ($P<0,05$).

Les fractions des extraits des fruits ont donné des zones d'inhibition allant de 8,0 à 13,0mm, avec des CMI et des CMB ≥1mg/ml, ce qui confirme leur faible activité vis-à-vis de cette souche.

L'activité des extraits aqueux d'acétate d'éthyle, hexane et acétate d'éthyle des fruits a été retrouvée exclusivement au niveau des fractions F_1, F_2 et F_4 avec de faibles diamètres d'inhibition: 9,0mm (0,1mg/disque), 11,0mm (1mg/disque) et 8,2mm (0,1mg/disque), respectivement. Cependant, l'activité des extraits éthanol et chloroforme a été retrouvée dans les deux fractions apolaires F_1 et F_2 dont le meilleur diamètre est obtenu avec la fraction F_1 de l'extrait éthanol ; 13,0mm (1mg/disque) ($P<0,05$).

Les composés phénoliques purs testés ont présenté un effet significativement plus intéressant que les extraits de *P. lentiscus* vis-à-vis de cette souche ($P<0,05$). Le composé le plus actif est l'acide gallique avec des valeurs de CMI/CMB ≤0,1/0,2mg/ml (Tableau VI), et des zones d'inhibition allant de 10,0 à 32,7mm aux différentes concentrations testées ($P<0,05$). L'acide caféique et l'acide tannique, quant à eux, présentent des zones d'inhibition de 19,8 et 17,8mm (2mg/disque), avec des CMI de 0,2mg/ml et des CMB de 0,4 et 0,5mg/ml, respectivement. La plus faible activité a été enregistrée avec la catéchine (9,3mm) à 2mg/disque et aucune activité n'a été observée avec la quercétine ($P<0,05$). Contrairement aux résultats de la présente étude, d'autres auteurs ont rapporté la résistance de cette espèce (*S. aureus*) aux composés phénoliques purs comme l'acide gallique, l'acide caféique, l'acide vanillique, l'acide protocatéchique et la rutine à des concentrations de 1mg/ml. Ceci pourrait être expliqué par la taille de l'inoculum utilisé ($2,0 \times 10^9$UFC/ml) (Rodriguez-Vaquero *et al.*, 2007a).

Concernant les antibiogrammes réalisés dans les mêmes conditions expérimentales que les aromatogrammes, *S. aureus* était plus sensible à l'ofloxacine (32mm) comparativement aux autres antibiotiques testés. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par plusieurs auteurs Ali *et al.* (2001) ; Dall'Agnol *et al.* (2003) ; Okigbo et Ajalie (2005) ; Akinpelu *et al.* (2008) ; Ghosh *et al.* (2008), sur la sensibilité de cette espèce à plusieurs antibiotiques, tels que l'ofloxacine (31mm à 5µg/disque), la pénicilline G (14,5mm à 10µg/disque), l'ampicilline (22mm à 10µg/disque), la gentamycine (25mm à 10µg/disque), le chloramphénicol (30.61mm à 40µg/ml) et à l'acide nalidixique (35mm à 10µg/disque) (Mathabe *et al.*, 2006).

Tableau VII. Activité des extraits et des fractions chromatographiques des feuilles et des fruit de *P. lentiscus* sur *S. aureus* (ATCC6538)

Extraits	Diamètre des zones d'inhibitions (mm)																	
	Concentration des extraits (mg/disque)					Concentration des fractions chromatographiques (mg/disque)												
						F1:Chloroforme			F2:AcOEt/MeOH (1/1)			F3:MeOH/eau (4/1)			F4:Eau/A.ac (1/0,005)		
	0,02	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,1**	**0,5**	**1**	**0,1**	**0,5**	**1**	**0,1**	**0,5**	**1**	**0,1**	**0,5**	**1**
Feuilles de *P. lentiscus*																	
Eth	-/-	7,8±0,3	9,7±0,6	**19,8±0,3**	**20,3±0,6**	-/-	-/-	8,0±0,0	-/-	9,0±0,0	10,0±0,0	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
AcOEt	-/-	8,0±0,0	10,8±0,3	**22,7±0,6**	**23,7±0,6**	-/-	9,5±0,0	10,0±0,0	8,0±0,0	10,8±0,3	**12,2±0,3**	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq-AcOEt	-/-	-/-	-/-	**18,0±0,0**	**19,3±0,0**	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	9,0±0,0	8,0±0,0	-/-	-/-	8,5±0,0	-/-	-/-
Chl	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	10,0±0,0	8,0±0,0	-/-	-/-	-/-	10,2±0,3	8,0±0,0	-/-	-/-
Aq- Chl	-/-	-/-	**15,8±0,3**	**16,0±0,0**	**21,8±0,3**	**20,7±0,6**	**21,7±0,3**	**15,7±0,6**	-/-	9,8±0,3	**15,7±0,0**	**24,0±0,0**	**21,7±0,6**	**16,0±0,0**	-/-	-/-	-/-
Hex	-/-	-/-	-/-	8,0±0,0	8,0±0,0	8,2 ±0,3	8,3±0,3	-/-	-/-	9,2±0,3	10,0±0,0	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Hex	-/-	-/-	**17,0±0,0**	**17,8±0,3**	**21,7±0,6**	**19,2±0,3**	**21,0±0,0**	**22,2±0,3**	11,2±0,3	**25,0±0,0**	**26,3±0,6**	-/-	11,0±0,0	**21,0±0,0**	**16,0±0,0**	-/-	**25,0±0,0**
Fruits de *P. lentiscus*																	
Eth	7,0±0,0	8,0±0,0	8,0±0,0	9,7±0,6	**11,0±0,0**	8,0±0,0	**11,3±0,3**	**13,0±0,0**	**10,0±0,0**	**12,7±0,3**	**11,0±0,0**	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
AcOEt	8,0±0,0	7,7±0,6	8,0±0,0	8,3±0,6	**10,0±0,0**	-/-	-/-	-/-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	9,0±0,0	8,0±0,0	-/-
Aq-AcOEt	-/-	-/-	-/-	8,3±0,6	9,0±0,0	-/-	8,0±0,0	11,0±0,0	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Chl	8,0±0,0	8,0±0,0	8,0±0,0	9,0±0,0	9,0±0,0	-/-	-/-	8,0±0,0	8,2±0,3	-/-	-/-	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
Hex	7,7±0,6	8,0±0,0	8,0±0,0	9,0±0,0	9,0±0,0	-/-	-/-	-/-	8,2±0,3	-/-	-/-	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-

Composés phénoliques purs																					
Acide gallique						**Acide caféique**					**Acide tannique**					**Catéchine**				
0,02	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,02**	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,02**	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,02**	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**
10,0±0,0	16,7±0,6	20,3±0,6	30,3±0,6	32,7±0,6	-/-	-/-	-/-	18,0±0,0	19,8±0,3	-/-	-/-	10,7±0,6	15,7±0,6	17,8±0,3	-/-	-/-	-/-	7,0±0,0	9,3±0,3

Antibiotiques testés				
Pénicilline G (10µg)	**Ampicilline (10µg)**	**Gentamycine (15µg)**	**Vancomycine (30µg)**	**Chloramphénicol (30µg)**	**Ofloxacine (5µg)**
29,3±1,2	20,0±2,0	30,7±1,2	22,7±1,2	30,7±1,2	32,0±0,0

-/-: Pas de zone observée, NT: non testé ; Quercétine : pas d'activité ; AcOEt : acétate d'éthyle ; MeOH : méthanol ; A.ac : acide acétique

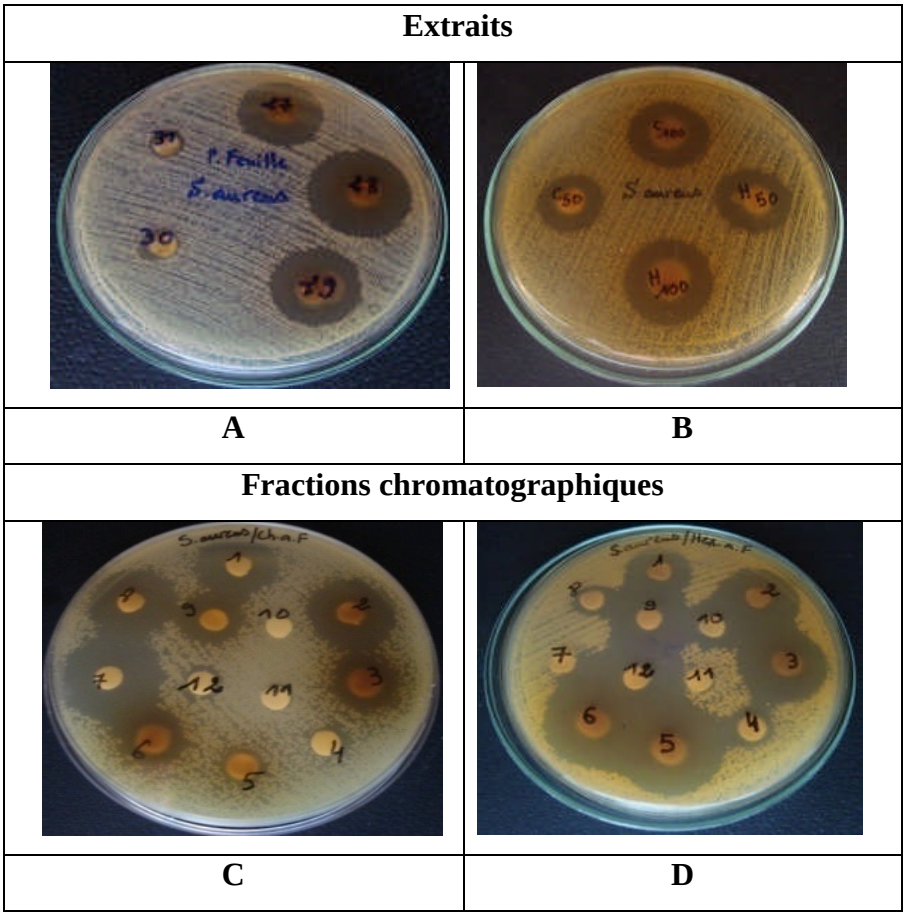


Figure 20. Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *S. aureus* **A)** Extraits bruts de feuilles de *P. lentiscus* à 2mg/disque, 27: extrait éthanol; 28: acétate d'éthyle; 29: aqueux d'acétate d'éthyle; 30: chloroforme; 31: hexane. **B)** Extraits aqueux du chloroforme et d'hexane des feuilles, C_{50}: aqueux chloroforme à 1mg/disque; C_{100}: aqueux chloroforme à 2mg/disque; H_{50}: aqueux chloroforme à 1mg/disque; H_{100}: aqueux chloroforme à 2mg/disque. **C)** Fractions de l'aqueux du chloroforme feuilles, **D)** Fractions de l'aqueux d'hexane feuilles, 1: F_1 (0,1mg/disque), 2: F_1 (0,5mg/disque), 3: F_1 (1mg/disque), 4: F_2 (0,1mg/disque), 5: F_2 (0,5mg/disque), 6: F_2 (1mg/disque), 7: F_3 (0,1mg/disque), 8: F_3 (0,5mg/disque), 9 : F_3 (1mg/disque), 10: F_4 (0,1mg/disque), 11: F_4 (0,5mg/disque), 12: F_4 (1mg/disque).

Les résultats obtenus dans cette étude concernant l'activité antibactérienne des extraits de *P. lentiscus* sur cette souche sont en accord avec ceux obtenus par Mathabe *et al.* (2006), qui ont rapporté la sensibilité de *S.aureus* (ATCC25923) aux extraits éthanoliques d'*Indigofera daleoides* (plante entière) et *Punica granatum* (racines) exhibant des CMI intéressantes de 0,039 et de 0,078 mg/ml, respectivement avec une même zone d'inhibition (29mm). Les extraits des feuilles de *Chromolaena odorata* et *Citrus aurantifolia* ont été testés par Okigbo et Ajalie (2005) sur cette souche. Les résultats ont montré que l'extrait le plus actif est celui de *Chromolaena odorata* (extrait éthanolique) avec une zone de 15,1mm et une CMI de 0,03125 mg/ml.

Les travaux menés par Ali *et al.* (2001) sur les différents extraits des feuilles de *Lawsonia inermis* et des graines de *Nigella sativa* concordent avec les résultats obtenus dans cette étude, indiquant que les extraits éthanolique et acétate d'éthyle des feuilles de *P.*

lentiscus possèdent une bonne activité antibactérienne vis-à-vis de cette souche avec des zones d'inhibition de 20,3 et 23,7mm, respectivement à 2mg/disque.

Plusieurs auteurs ont rapporté la sensibilité de la souche *S.aureus* aux extraits méthanoliques des plantes. Uddin *et al.* (2008) ont montré de petites zones d'inhibition de 9mm avec l'extrait de *Trema cannabina,* un effet largement faible par rapport aux extraits de la plante testée dans cette étude. Navarro *et al*. (1996) ont aussi testé l'extrait de l'écorce des fruits de *Punica granatum* de la famille des punicacées, sur plusieurs souches pathogènes, dont *S. aureus* (ATCC6538) qui a révélé une CMI de 0,62mg/ml plus intéressante que les CMI du fruit de *P. lentiscus*, alors que l'extrait du fruit de *Guazuma ulmifolia* de la famille des sterculiacées, a montré une CMI de 10mg/ml moins intéressante que celle retrouvée avec les extraits des fruits de *P. lentiscus*. McGaw *et al.* (2005), de leur part, ont étudié l'effet des extraits d'écorce de quelques plantes, appartenant à la famille des anacardiacées, où ils ont retrouvé une valeur de CMI de 0.2mg/ml. De même, Salva *et al*. (2004) ont déterminé une CMI de 0,38mg/ml avec l'extrait des branches d'*Astronium balansae* (anacardicées) contre cette souche.

Par ailleurs, Basile *et al.* (2000) ont rapporté la sensibilité de cette espèce à la fraction d'acétate d'éthyle de l'extrait aqueux de *Castanea sativa*, qui a exhibé une CMI intéressante de 0,064mg/ml et une CMB de 0,256mg/ml. Son inhibition par la fraction de l'extrait méthanolique des feuilles du *Callistemon rigidus* a été observée par Gomber et Saxena (2007), qui ont montré une activité dose dépendante contre vingt sept isolats de *S.aureus* multirésistants. De plus, l'évaluation des CMIs *in vitro* a donné des valeurs allant de 1.25 à 80µg/ml (Gomber et Saxena, 2007). Deux fractions de l'extrait méthanolique de tige de *Daphne gnidium* présentent des résultats plus importants que celui de son extrait brut (CMI: 0,5mg/ml) sur cette espèce, notamment la fraction contenant le 2,5,7,4'-tétrahydroxyisoflavanol, avec une CMI de 0,05mg/ml (Cottiglia *et al.*, 2001).

Des études ont démontré la résistance de cette espèce à beaucoup d'extraits de plantes. Ainsi, l'extrait méthanolique des fruits de *Capparis salicifolia* et *Capparis tweediana* (capparacées) n'ont aucun effet inhibiteur vis-à-vis de celle-ci (Salva *et al.,* 2004), ce qui est également en accord avec les résultats obtenus par Pesewu *et al*. (2008).

Il a été remarqué, avec l'espèce *S. aureus*, que les zones d'inhibition obtenues n'étaient pas similaires pour tous les extraits. Ainsi avec les fractions chromatographiques de l'extrait éthanolique des fruits de *P. lentiscus*, les zones observées montrent l'apparition d'un halo de croissance autours des disques (Fig.21).

Figure 21. Activité des fractions de l'extrait éthanolique des fruits sur *S. aureus*, 1: F_1 (0,1mg/disque), 2: F_1 (0,5mg/disque), 3: F_1 (1mg/disque), 4: F_2 (0,1mg/disque), 5: F_2 (0,5mg/disque), 6: F_2 (1mg/disque), 10: F_4 (0,1mg/disque), 11: F_4 (0,5mg/disque), 12: F_4 (1mg/disque).

L'aspect des zones d'inhibition peut être expliqué par le fait que les extraits de plantes sont des mélanges complexes de plusieurs composés avec des coefficients de diffusion différents et que la technique de diffusion repose sur le principe de la compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester**.** Donc probablement, les composés sans activité inhibitrice ont un faible pouvoir migratoire alors que ceux qui sont actifs migrent plus loin.

III.3.2. Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *B. subtilis* (ATCC6633)

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont rapportés dans le tableau VIII. La meilleure activité est présentée par les extraits acétate d'éthyle, aqueux chloroforme et aqueux d'hexane (CMI/CMB de 0,2/>1mg/ml) des feuilles (Tableau IV) et l'extrait acétate d'éthyle (CMI/CMB de 0,3/>1mg/ml) des fruits de *P. lentiscus* (Tableau V). Concernant les fractions chromatographiques des extraits des feuilles, les CMI sont comprises entre 0,2 et >1mg/ml et celles des fruits de 0,6 à >1mg/ml et les CMB sont supérieures ou égales à 1mg/ml.

Les extraits de feuilles sont seulement actifs aux concentrations de 1 et 2mg/disque et les diamètres d'inhibition les plus larges sont obtenus avec les extraits aqueux du chloroforme (15,0mm) et aqueux d'hexane (14,7mm) à 2mg/disque. Dans le cas de ces deux extraits l'augmentation de la charge du disque de 1 à 2 mg/disque s'est traduite par une augmentation significative des diamètres des zones d'inhibition, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Dall'Agnol *et al.* (2003), en testant l'activité des extraits méthanoliques des parties aériennes de *Hypericum ternum* et *Hypericum polyanthemum* sur *B. subtilis*, ces auteurs ont constaté que l'augmentation de la charge du disque de 100µg/ml à 200µg/ml, produit des différences dans les diamètres des zones d'inhibition. Par contre, les extraits des fruits sont actifs aux cinq concentrations testées et la plus grande zone d'inhibition (15,0mm) a été obtenue avec l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle à 0,02mg/disque.

Les zones d'inhibition varient de 8,0 à 15,0mm de diamètre pour les extraits des feuilles et des fruits, alors que les fractions des extraits des feuilles présentent des zones d'inhibition de 7,0 à 22,8mm et celles des fruits présentent de faibles diamètres. Donc, le fractionnement des extraits des feuilles a augmenté d'une manière significative l'activité inhibitrice ($P<0,05$).

La faible activité des extraits éthanolique et d'acétate d'éthyle des feuilles a été retrouvée au niveau des fractions les moins polaires avec des diamètres presque similaires à ceux de leurs extraits correspondants. A l'exception des extraits aqueux d'acétate d'éthyle et d'hexane, le fractionnement de l'extrait chloroforme a aboutit à de faibles activités au niveau des fractions apolaires F_1 (7,0mm) et F_2 (8,0mm) à 2mg/disque avec des CMI/CMB de 0,8/1 mg/ml et 0,5/>1mg/ml, respectivement.

Le fractionnement des extraits aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane des feuilles a permis l'amélioration de l'activité par la récupération de fractions plus actives avec des CMI qui varient de 0,3 à 0,9mg/ml et CMB >1mg/ml, contrairement aux fractions des fruits qui ont exhibé de faibles zones d'inhibition.

Des différences significatives sont notées entre les différents extraits et les composés phénoliques purs étudiés. L'acide caféique et l'acide tannique ont exhibé une activité importante contre *B. subtilis* avec 25,7 et 16,7mm de diamètre à 2mg/disque et

présentant des CMI 0,4 et ≤0,1mg/ml, respectivement et des CMB supérieures à 1mg/ml. Malgré une faible zone d'inhibition de 9,7mm à 2mg/disque, l'acide gallique a présenté une CMI intéressante de 0,4mg/ml et une CMB >1mg/ml (Tableau VI). Par ailleurs, la catéchine n'a révélé qu'une petite zone d'inhibition de 7,5mm de diamètre.

Les résultats de sensibilité de *B. subtilis* aux antibiotiques sont très importants et varient entre 28,0 et 42,0mm avec la vancomycine et la pénicilline G, respectivement (Tableau VIII).

Tableau VIII. Activité des extraits et des fractions chromatographiques des feuilles et des fruits de *P. lentiscus* sur *B. subtilis* (ATCC6633)

Extraits	Diamètre des zones d'inhibition (mm)																	
	Concentration des extraits (mg/disque)					Concentration des fractions chromatographiques (mg/disque)												
						F1:Chloroforme			F2:AcOEt/MeOH (1/1)			F3:MeOH/eau (4/1)			F4:Eau/A.ac (1/0,005)		
	0,02	0,1	0,2	1	2	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1
Feuilles de *P. lentiscus*																	
Eth	-/-	-/-	-/-	8,0±0,0	10,0±0,0	-/-	-/-	7,3±0,6	-/-	8,8±0,3	10,±0,6	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
AcOEt	-/-	-/-	-/-	**10,0±0,0**	**10,0±0,0**	-/-	8,5±0,0	9,0±0,0	-/-	9,7±0,6	**11,2±0,3**	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq-AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Chl	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	7,5±0,0	8,0±0,0	7,0±0,0	7,0±0,0	8,5±0,0	8,0±0,0	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Chl	-/-	-/-	-/-	**12,7±0,3**	**15,0±0,0**	**22,8±0,3**	**22,0±0,0**	**21,2±0,3**	**10,0±0,0**	**17,0±0,0**	**22,0±0,0**	-/-	**19,8±0,3**	**13,2±0,3**	-/-	-/-	-/-
Hex	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Hex	-/-	-/-	-/-	**12,5±0,5**	**14,7±0,6**	**18,0±0,0**	**19,8±0,3**	**13,0±0,0**	**10,0±0,0**	**17,0±0,0**	**20,0±0,0**	-/-	-/-	**14,0±0,0**	**11,0±0,0**	**11,5±0,0**	**16,3±0,3**
Fruits de *P. lentiscus*																	
Eth	8,3±0,6	8,0±0,0	8,0±00	**10,0±0,0**	**11,0±0,0**	8,5±0,0	7,0±0,0	7,0±0,0	7,5±0,0	7,0±0,0	7,0±0,0	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
AcOEt	8,0±0,0	8,0±0,0	8,0±00	**10,7±0,6**	**13,2±0,3**	-/-	-/-	-/-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
Aq-AcOEt	**15,0±0,0**	-/-	-/-	8,0±0,0	8,0±0,0	8,0±0,0	8,0±0,0	7,0±0,0	-/-	-/-	-/-	7,5±0,0	7,0±0,0	7,0±0,0	-/-	-/-	-/-
Chl	**10,0±0,0**	9,0±0,0	8,0±00	**10,0±0,0**	**11,0±0,0**	8,0±0,0	7,0±0,0	7,0±0,0	7.5±0,0	7.5±0,0	7.5±0,0	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
Hex	8,0±0,0	8,0±0,0	8,0±00	9,3±0,6	**10,0±0,0**	8,0±0,0	7,5±0,0	7,0±0,0	7,5±0,0	7,0±0,0	8,0±0,0	NT	NT	NT	9,0±0,0	7,5±0,0	7,0±0,0

Composés phénoliques purs																				
Acide gallique						**Acide caféique**					**Acide tannique**					**Catéchine**				
0,02	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,02**	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,02**	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,02**	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**
-/-	-/-	-/-	7,2±0,3	9,7±0,6	-/-	-/-	-/-	23,7±0,6	25,7±0,6	7,0±0,0	11,3±0,3	12,7±0,6	15,0±0,0	16,7±0,6	-/-	-/-	-/-	-/-	7,5±0,0

Antibiotiques testés				
Pénicilline G (10µg)	**Ampicilline (10µg)**	**Gentamycine (15µg)**	**Vancomycine (30µg)**	**Chloramphénicol (30µg)**	**Ofloxacine (5µg)**
42,0±2,0	35,3±2,3	34,0±0,0	28,0±0,0	34,7±1,2	36,7±1,2

-/-: Pas de zone observée, NT: non testé ; Quercétine : pas d'activité ; AcOEt : acétate d'éthyle ; MeOH : méthanol ; A.ac : acide acétique

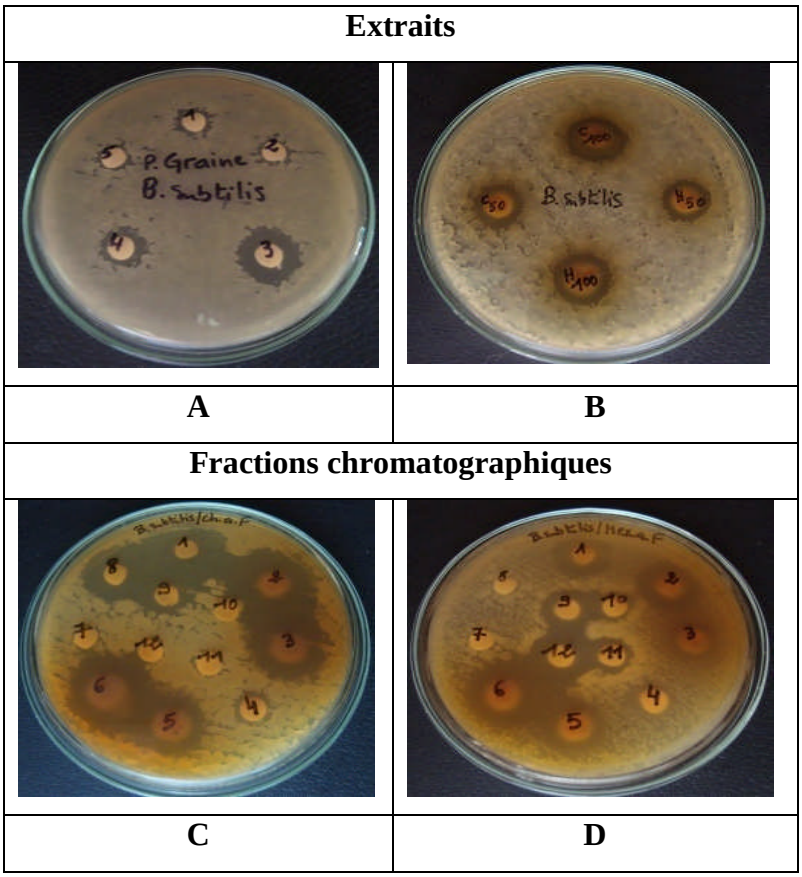


Figure 22. Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *B. subtilis* **A)** Extraits bruts de graines de *P. lentiscus* à 0,02mg/disque, 1: extrait éthanol; 2: acétate d'éthyle; 3: aqueux d'acétate d'éthyle; 4: chloroforme; 5: hexane. **B)** Extraits aqueux du chloroforme et d'hexane des feuilles, C_{50}: aqueux chloroforme à 1mg/disque; C_{100}: aqueux chloroforme à 2mg/disque; H_{50} : aqueux chloroforme à 1mg/disque; H_{100} : aqueux chloroforme à 2mg/disque. **C)** Fractions de l'aqueux du chloroforme feuilles, **D)** Fractions de l'aqueux d'hexane feuilles, 1: F_1 (0,1mg/disque), 2: F_1 (0,5mg/disque), 3: F_1 (1mg/disque), 4: F_2 (0,1mg/disque), 5: F_2 (0,5mg/disque), 6: F_2 (1mg/disque), 7: F_3 (0,1mg/disque), 8: F_3 (0,5mg/disque), 9: F_3 (1mg/disque), 10: F_4 (0,1mg/disque), 11: F_4 (0,5mg/disque), 12: F_4 (1mg/disque).

Les extraits éthanoliques des feuilles et des fruits de *P. lentiscus* sont plus actifs sur *B. subtilis* avec des CMI: 0,4 et 0,8mg/ml, respectivement, que neuf autres extraits éthanoliques des différentes plantes appartenant à différentes familles testées (CMI varient de 1 à 16mg/ml) par Kloucek *et al.* (2005). Kivrak *et al.* (2009) ont déterminé avec l'extrait éthanol de *Salvia potentillifolia* une CMI (0,0275mg/ml) plus intéressante que celle obtenue avec les extraits de *P. lentiscus* avec un diamètre d'inhibition de 20mm (Kivrak *et al.*, 2009).

Ghosh *et al.* (2008) ont démontré des zones d'inhibition de 22mm pour l'extrait méthanolique de feuilles du *Terminalia chebula* et l'extrait aqueux de fruit de *Terminalia bellerica* qui sont supérieures à celles des extraits bruts des feuilles et fruits de *P. lentiscus.* Aussi, Akinpelu *et al.* (2008) ont rapporté que l'extrait méthanolique (70%) de l'écorce de tige de *Afzelia africana* a révélé une CMI de 1.56mg/ml et une CMB de 6,25mg/ml. Les

mêmes extraits de feuilles de *Eucalyptus camaldulensis* et *Terminalia catappa* ont exhibé une activité contre *B. subtilis* à de faibles concentrations (CMI de 0,005mg/ml) (Babayi *et al.*, 2004).

Cependant, plusieurs études ont démontré que cette espèce peut également s'avérer très résistante à beaucoup d'extraits de plantes (Kukić *et al.*, 2008). Ainsi les extraits éthanolique, aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane des feuilles de *P. lentiscus* utilisés dans cette étude sont plus actifs que l'extrait chloroforme des feuilles d'*Euphorbia fusiformis* testé par Natarajan *et al.* (2005).

Les résultats de cette étude sont en accord avec les travaux ayant mis en évidence la sensibilité de *B. subtilis* à plusieurs antibiotiques, à savoir l'ofloxacine; 28mm à 10µg/disque, la gentamycine; 26mm à 10µg (Sahin *et al.*, 2003 ; Ghosh *et al.*, 2008) et le chloramphénicol; 14,73mm à 40µg/ml (Dall'Agnol *et al.*, 2003) et résiste à d'autres; la pénicilline G (10µg) et l'ampicilline (10µg) (Ghosh *et al.*, 2008).

III.3.3. Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *L. innocua* (CLIP74915)

Le tableau IX indique que seuls les extraits aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane des feuilles de *P. lentiscus* présentent des CMI et CMB très intéressantes sur *L. innocua*; CMI: 0,3mg/ml et CMB: 0,5mg/ml, avec les mêmes zones d'inhibition de 10,3mm à 1mg/disque et 14,7mm à 2mg/disque. Dans ce cas l'augmentation de la charge des disques de 1 à 2mg/disque s'est accompagnée d'un élargissement du diamètre des zones d'inhibition ($P<0,05$). Par contre, l'extrait acétate d'éthyle a exhibé une faible activité avec un faible diamètre de la zone d'inhibition (8,0mm à 1mg/disque et 9,0mm à 2mg/disque).

Les différentes fractions chromatographiques des extraits aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane des feuilles montrent des zones d'inhibition de faible diamètre alors que l'extrait acétate d'éthyle n'exhibe aucune activité après fractionnement ($P<0,05$). Leurs CMI varient de 0,3 à ≥1mg/ml et leurs CMB de 0,5 à >1mg/ml (Tableau IV).

Les CMI et CMB les plus intéressantes ont été obtenues avec les F_1 et F_2 de l'extrait aqueux du chloroforme avec les mêmes valeurs que l'extrait brut (CMI: 0,3mg/ml ; CMB: 0,5mg/ml), suivi de la F_1 de l'extrait aqueux d'hexane avec une CMI de 0,3mg/ml et CMB de 0,6mg/ml (Tableau IV).

Le fractionnement de l'extrait éthanolique des feuilles a permis de récupérer des fractions actives polaires: F_3 (8,0mm) et F_4 (10,0mm) à 0,5mg/disque ($P<0,05$), avec une CMI de 1 et >1mg/ml et une CMB >1mg/ml. Par contre, le fractionnement des extraits inactifs; aqueux d'acétate d'éthyle, chloroforme et hexane n'a révélé aucune fraction active, ce qui confirme la résistance de cette souche à ces extraits. La faible activité de l'extrait acétate d'éthyle a disparu après fractionnement, ce qui pourrait s'expliquer par la séparation des composants agissant probablement en synergie.

La souche *L. innocua* s'est montrée très résistante aux extraits et fractions des fruits de *P. lentiscus* aux cinq concentrations testées (Tableau IX).

L'analyse statistique révèle l'existence de différences significatives entre les extraits des feuilles et les standards actifs ($P<0,05$). L'acide gallique a montré de petites zones d'inhibition de 7,0 à 8,0mm avec des CMI/CMB $\leq$0,1/0,2mg/ml et l'acide tannique des zones de 10,0 à 12,0mm avec des CMI/CMB de 0,2/0,5mg/ml. Les acides phénoliques purs, tels que les acides hydroxycinnamiques, ont montré des activités bactéricide et bactériostatique contre plusieurs souches de *Listeria monocytogenes* (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005a).

Pour les antibiotiques utilisés dans les mêmes conditions, la plus forte activité a été obtenue avec l'ofloxacine (5µg), avec un diamètre de la zone d'inhibition de croissance de 38,0mm (Tableau IX).

Tableau IX. Activité des extraits et des fractions chromatographiques des feuilles et des fruits de *P. lentiscus* sur *L. innocua* (CLIP74915)

Extraits	Diamètre des zones d'inhibition (mm)																	
	Concentration des extraits (mg/disque)					Concentration des fractions chromatographiques (mg/disque)												
						F1:Chloroforme			F2:AcOEt/MeOH (1/1)			F3:MeOH/eau (4/1)			F4:Eau/A.ac (1/ 0,005)		
	0,02	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,1**	**0,5**	**1**	**0,1**	**0,5**	**1**	**0,1**	**0,5**	**1**	**0,1**	**0,5**	**1**
Feuilles de *P. lentiscus*																		
Eth	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	8,0±0,0	8,0±0,0	8,0±0,0	9,0±0,0	**10,0±0,0**	-/-
AcOEt	-/-	-/-	-/-	8,0±0,0	9,0±0,0	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq-AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Chl	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Chl	-/-	-/-	8,0±0,0	**10,3±0,6**	**14,7±0,6**	-/-	-/-	7,3±0,3	-/-	-/-	8,0±0,0	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Hex	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Hex	-/-	-/-	9,0±0,0	**10,3±0,6**	**14,7±0,6**	7,0±0,0	8,0±0,0	8,2±0,3	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Fruits de *P. lentiscus*																		
Eth	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
Aq-AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Chl	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
Hex	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-

Composés phénoliques purs																					
Acide gallique						**Acide caféique**					**Acide tannique**					**Catéchine**					
0,02	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**		**0,02**	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,02**	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,02**	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	
-/-	-/-	-/-	7,0±0,0	8,0±0,0		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	10,0±0,0	12,0±0,0	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	

Antibiotiques testés					
Pénicilline G (10µg)	**Ampicilline (10µg)**	**Gentamycine (15µg)**	**Vancomycine (30µg)**	**Chloramphénicol (30µg)**	**Ofloxacine (5µg)**
0,0±0,0	0,0±0,0	26,7±1,2	0,0±0,0	31,3±1,2	38,0±0,0

-/-: Pas de zone observée, NT: non testé ; Quercétine : pas d'activité ; AcOEt : acétate d'éthyle ; MeOH : méthanol ; A.ac : acide acétique

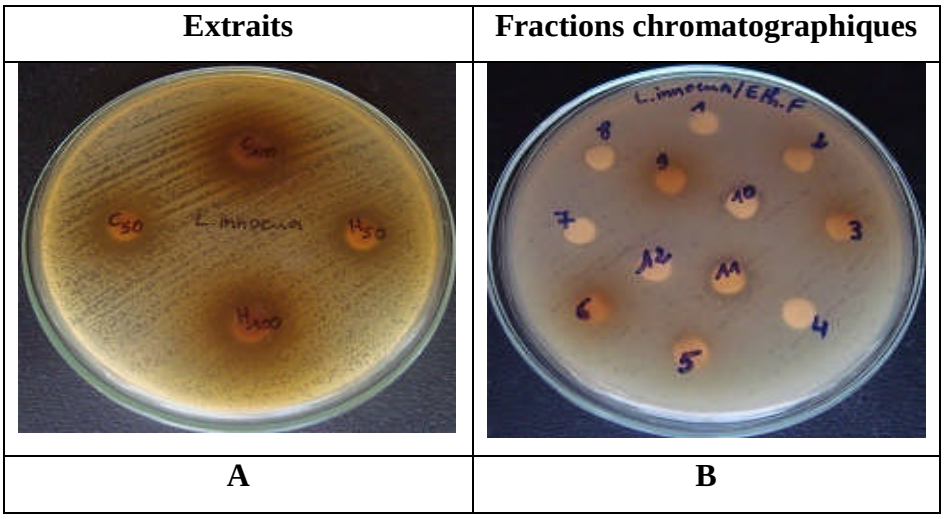


Figure 23. Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *L. innocua* **A)** Extraits aqueux du chloroforme et d'hexane des feuilles, C_{50}: aqueux chloroforme à 1mg/disque; C_{100}: aqueux chloroforme à 2mg/disque; H_{50} : aqueux chloroforme à 1mg/disque; H_{100}: aqueux chloroforme à 2mg/disque. **B)** Fractions de l'extrait éthanol des feuilles, 1: F_1 (0,1mg/disque), 2: F_1 (0,5mg/disque), 3: F_1 (1mg/disque), 4: F_2 (0,1mg/disque), 5: F_2 (0,5mg/disque), 6: F_2 (1mg/disque), 7: F_3 (0,1mg/disque), 8: F_3 (0,5mg/disque), 9: F_3 (1mg/disque), 10: F_4 (0,1mg/disque), 11: F_4 (0,5mg/disque), 12: F_4 (1mg/disque).

La bibliographie consultée rapporte la sensibilité de *Listeria monocytogenes* mais pas celle de *Listeria innocua* et du fait qu'elles possèdent le même profil de résistance, donc leur susceptibilité aux extraits de plantes est similaire.

La sensibilité de cette espèce aux extraits de *P. lentiscus* est en accord avec d'autres études. Proestos *et al.* (2006 ; 2008), ont trouvé que la souche *L. monocytogenes* (ScottA) est la plus sensible aux extraits méthanoliques des plantes testées (Proestos *et al*., 2006 ; Proestos *et al*., 2008). Özkan *et al.* (2007) ont montré l'inhibition de *L. monocytogenes* par les extraits méthanoliques de *Teucrium montbretii* subsp. *pamphylicum* (Lamiacées), dont l'augmentation de la concentration de l'extrait s'est traduite par une amélioration de l'activité. Aussi les extraits de la plante entière de *Lonicera caprifolium* et ceux des feuilles de *Phytolacca dodecandra* ont montré des zones de 14 et 15mm de diamètre, respectivement (Nostro *et al.*, 2000).

D'autres auteurs ont rapporté la sensibilité de cette espèce à l'extrait éthanol de *Melastoma candidum* avec des zones d'inhibition de 11 jusqu'à 15mm et des valeurs de CMI très intéressantes (0,08mg/ml) et des CMB moins intéressants (5,12mg/ml) que celles des extraits de *P. lentiscus* (Wang *et al.*, 2008).

Néanmoins, certaines recherches peuvent attester de l'inactivité des extraits de plantes sur l'espèce *L. monocytogenes.* Nostro et ses collaborateurs (2000) n'ont obtenu aucune zone d'inhibition avec les différents extraits des feuilles de *Hieracium pilosella* et *Plantago lanceolata*. Gülçin *et al.* (2004) ont montré la résistance de *L. monocytogenes*, par rapport aux extraits apolaires (acétone et chloroforme) de *Salvia sclarea* de la famille de labiatées (Gülçin *et al.*, 2004).

III.3.4. Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *P. aeruginosa* (ATCC27853)

D'après le tableau X, la plus grande activité observée est celle des extraits d'acétate d'éthyle, aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane à 2mg/disque, avec une CMI ≤0,1mg/ml, une CMB de 0,3mg/ml et des zones d'inhibition de 11,0 à 15,0mm; 11,7 à 15,7mm et 12,3 à 17,0mm, respectivement à des concentrations de 1mg/disque et de 2mg/disque ($P<0,05$). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Ogueke et ses collaborateurs (2007), qui ont observé une augmentation significative du diamètre d'inhibition avec l'augmentation de la concentration dans le disque lorsqu'ils ont testé l'extrait éthanolique de *Euphorbia hirta* à 150 et 200mg/ml contre *P. aeruginosa*. Par contre l'extrait éthanolique des feuilles a montré un faible diamètre de la zone d'inhibition; 9,3mm (1mg/disque) et 10,0mm (2mg/disque), respectivement avec une CMI et CMB intéressantes (0,2mg/ml et 0,4mg/ml) (Tableau IV).

L'extrait aqueux d'acétate d'éthyle et les extraits organiques (chloroforme et hexane) des feuilles ne montrent aucune activité vis-à-vis de *P. aeruginosa*. Des effets plus importants ont été observés avec les autres extraits de feuilles de *P. lentiscus.*

L'activité des fractions F_1 et F_2 de l'extrait aqueux d'hexane et la fraction F_2 de l'extrait acétate d'éthyle des feuilles est la même et elles ont présenté des CMI/CMB de ≤0,1/0,2mg/ml. Pour les fractions F_1 et F_2 de l'extrait aqueux du chloroforme les CMI/CMB sont de ≤0,1/0,3mg/ml et une zone d'inhibition très importante de 17,0mm pour la fraction F_1 à la concentration de 1mg/disque.

La fraction F_2 de l'extrait éthanolique des feuilles de *P. lentiscus* présente une CMI et CMB de 0,2 et 0,3mg/ml, alors que la fraction F_1 d'acétate d'éthyle a révélé une CMI de

0,2 mg/ml et une CMB de 0,4 mg/ml. Quant à la fraction F_3 de l'extrait aqueux du chloroforme, les CMI et CMB sont de 0,5 et 0,5 mg/ml, respectivement (Tableau IV).

L'activité des extraits bruts actifs des feuilles a été retrouvée au niveau des fractions les moins polaires F_1 et F_2. La fraction la plus active est la F_1 de l'extrait aqueux du chloroforme qui a montré un diamètre d'inhibition de 17,0mm à 1mg/disque, suivi de la F_2 de l'extrait aqueux d'hexane avec un diamètre de 15,0mm à 0,5 et 1mg/disque ($P<0,05$).

L'analyse statistique indique que l'effet inhibiteur des composés phénoliques purs testés diffère significativement ($P<0,05$) de celui des extraits des feuilles. *P. aeruginosa* s'est avérée sensible uniquement à l'acide tannique et à l'acide gallique avec des zones d'inhibition variables selon les concentrations testées, de 9,0 à 20,0mm et de 10,0 à 21,7mm de diamètre et des CMI/CMB de $\leq$0,1/0,2 et $\leq$0,1/$\leq$0,1mg/ml, respectivement. L'acide caféique, la quercétine et la catéchine n'ont montré aucune zone d'inhibition aux concentrations testées. Ces résultats ne concordent pas avec les travaux de Rodriguez-Vaquero et ses collaborateurs (2007a), qui ont mis en évidence la sensibilité de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) à l'acide caféique, la quercétine et surtout à la catéchine et sa résistance à l'acide gallique.

Tableau X. Activité des extraits et des fractions chromatographiques des feuilles et des fruits de *P. lentiscus* sur *P. aeruginosa* (ATCC27853)

Extraits	Diamètre des zones d'inhibition (mm)																	
	Concentration des extraits (mg/disque)					Concentration des fractions chromatographiques (mg/disque)												
						F1:Chloroforme			F2:AcOEt/MeOH (1/1)			F3:MeOH/eau (4/1)			F4:Eau/A.ac (1/ 0,005)		
	0,02	0,1	0,2	1	2	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1
Feuilles de *P. lentiscus*																		
Eth	-/-	-/-	-/-	9,3±0,6	**10,0±0,0**	-/-	-/-	-/-	-/-	8,2±0,3	**10,0±0,0**	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
AcOEt	-/-	-/-	-/-	**11,0±1,0**	**15,0±1,0**	-/-	-/-	9,0±0,0	-/-	**11,0±0,0**	**12,3±0,3**	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq-AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Chl	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Chl	-/-	-/-	-/-	**11,7±0,6**	**15,7±0,6**	**10,2±0,3**	**15,3±0,6**	**17,0±0,0**	-/-	**13,0±0,0**	**13,7±0,3**	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Hex	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Hex	-/-	-/-	8,0±0,0	**12,3±0,3**	**17,0±0,0**	**10,2±0,3**	**12,2±0,3**	**11,2±0,3**	-/-	**15,0±0,0**	**15,0±0,0**	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Fruits de *P. lentiscus*																		
Eth	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
Aq-AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Chl	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
Hex	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-

Composés phénoliques purs																				
Acide gallique					Acide caféique					Acide tannique					Catéchine				
0,02	0,1	0,2	1	2	0,02	0,1	0,2	1	2	0,02	0,1	0,2	1	2	0,02	0,1	0,2	1	2
-/-	-/-	10,0±0,0	19,8±0,3	21,7±0,6	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	9,0±0,0	13,7±0,6	15,8±0,3	17,7±0,6	20,0±0,0	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Antibiotiques testés					
Pénicilline G (10µg)	**Ampicilline (10µg)**	**Gentamycine (15µg)**	**Vancomycine (30µg)**	**Chloramphénicol (30µg)**	**Ofloxacine (5µg)**
0,0±0,0	0,0±0,0	26,0±0,0	0,0±0,0	22,7±1,2	38,0±2,0

-/-: Pas de zone observée, NT: non testé ; Quercétine : pas d'activité ; AcOEt : acétate d'éthyle ; MeOH : méthanol ; A.ac : acide acétique

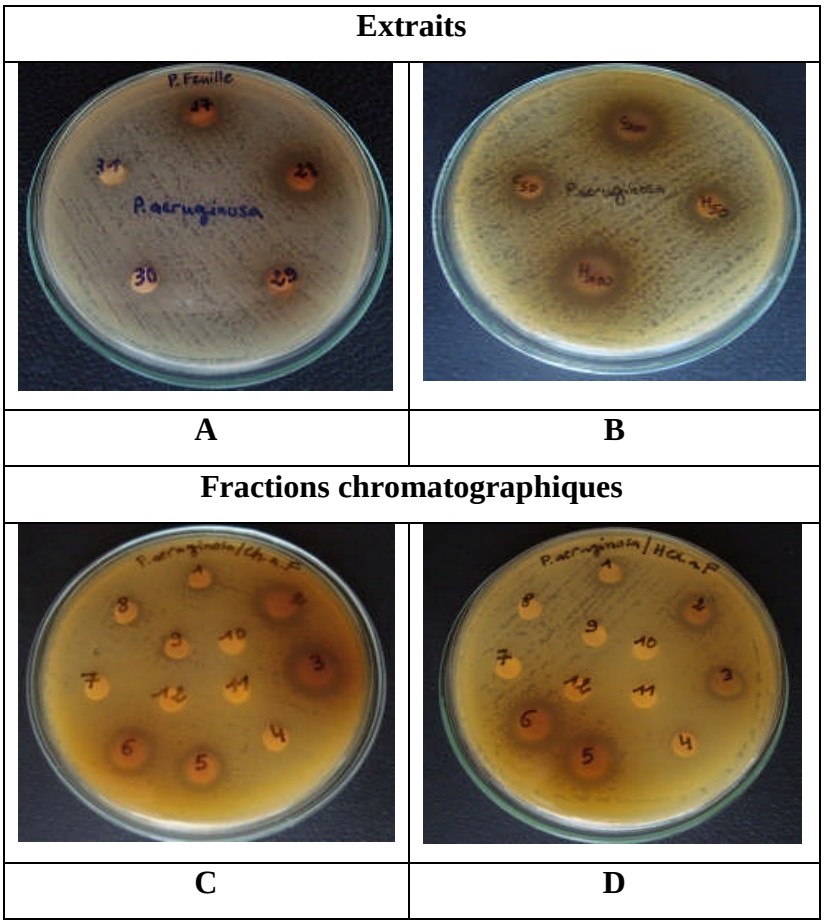


Figure 24. Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *P. aeruginosa* **A)** Extraits bruts de feuilles de *P. lentiscus* à 2mg/disque, 27: extrait éthanol; 28: acétate d'éthyle; 29: aqueux d'acétate d'éthyle; 30: chloroforme; 31: hexane. **B)** Extraits aqueux du chloroforme et d'hexane des feuilles, C_{50}: aqueux chloroforme à 1mg/disque; C_{100}: aqueux chloroforme à 2mg/disque; H_{50}: aqueux chloroforme à 1mg/disque; H_{100}: aqueux chloroforme à 2mg/disque. **C)** Fractions de l'aqueux du chloroforme feuilles, **D)** Fractions de l'aqueux d'hexane feuilles, 1: F_1 (0,1mg/disque), 2: F_1 (0,5mg/disque), 3: F_1 (1mg/disque), 4: F_2 (0,1mg/disque), 5: F_2 (0,5mg/disque), 6: F_2 (1mg/disque), 7: F_3 (0,1mg/disque), 8: F_3 (0,5mg/disque), 9 : F_3 (1mg/disque), 10: F_4 (0,1mg/disque), 11: F_4 (0,5mg/disque), 12: F_4 (1mg/disque).

Plusieurs études ont montré la sensibilité de *P. aeruginosa* aux extraits de plantes (Cottiglia *et al.*, 2001). En effet, sa sensibilité vis-à-vis des extraits apolaires de différentes parties de *Pistacia vera* a été mise en évidence par Özçelik *et al.* (2005) avec des CMI de 128µg/ml. Salva *et al.* (2004) ont rapporté une CMI de 0,25mg/ml avec l'extrait méthanolique des branches d'*Astronium balansae* (Anacardicées). Des CMI, clairement moins intéressantes, ont été déterminés pour les extraits méthanoliques de l'écorce des fruits de *Punica granatum* (punicacées) (10mg/ml) et du fruit de *Guazuma ulmifolia* (Sterculiacées) (20mg/ml) par Navarro *et al.* (1996).

Plusieurs travaux ont démontré que cette espèce peut s'avérer sensible aux extraits éthanoliques d'autres plantes. Ainsi la croissance de *P. aeruginosa* a été remarquablement inhibée par l'extrait des graines de *Syzyium aromaticum* (Myrtacées) (CMI 0.781mg/ml)

(Abu-Shanab *et al.,* 2004). Basile *et al.* (2005) ont prouvé que l'extrait des graines de *Paullinia cupana* est particulièrement actif contre cette souche avec une CMI de 16µg/ml. Benhammou *et al.* (2008) ont révélé une zone d'inhibition de 10,5mm de diamètre à 1,5mg/disque et de 14,5mm à 3mg/disque, pour l'extrait des feuilles de *P. lentiscus* contre *P. aeruginosa* (22212004).

L'extrait acétate d'éthyle des feuilles de *P. lentiscus* présente une activité importante avec une zone d'inhibition de 15,0mm (2mg/disque) qui est en accord avec les résultats d'Ali *et al*. (2001), ayant montré une activité inhibitrice de l'extrait acétate d'éthyle des feuilles de *Lawsonia inermis* avec une zone d'inhibition de 17mm de diamètre. Ainsi, le même extrait de l'écorce du tronc de *Klainedoxa gabonensis* a présenté des CMI de 625µg/ml (Ekouya *et al.,* 2006).

Cependant, des études ont démontré la résistance de cette espèce à plusieurs extraits de plantes. Ainsi, les extraits des fruits de *P. lentiscus* ne présentent aucune activité *vis-à-vis de P.aeruginosa,* ce qui est similaire aux résultats d'Ali et ses collaborateurs (2001) et Salva et ses collaborateurs (2004) qui ont, respectivement rapporté l'inactivité des extraits éthanolique et acétate d'éthyle des graines de *Nigella sativa et* de l'extrait méthanolique des fruits de *Capparis salicifolia* et *Capparis tweediana* (capparacées). La faible activité de l'extrait aqueux des feuilles de la plante *Trema cannabina* a été mise en évidence par Uddin *et al.* (2008), à une concentration de 500µg/puits et avec une zone de 10mm de diamètre. Dans la même étude aucune activité n'a été observée avec l'extrait méthanolique de la même plante. Navarro *et al.* (1996) ont prouvé que les extraits méthanoliques de *Eucalyptus globulus, Punica granatum, Artemisia mozicana* et *Bovvania arborea* possèdent une forte activité *in vitro* contre *Pseudomonas sp*.

L'espèce *P. aeruginosa* est sensible aux antibiotiques utilisés dans cette étude, à savoir la gentamycine (26mm) et l'ofloxacine (38mm), ce qui est en concordance avec les résultats de Pesewu *et al.* (2008) et d'Uddin *et al.* (2008), ayant rapporté des zones d'inhibition, respectivement, de 23mm et 27mm avec la gentamycine. D'autres auteurs ont montré sa résistance à l'ampicilline (10µg/ml) (Akinpelu *et al.,* 2008) et au chloramphénicol (Rodriguez-Vaquero *et al.,* 2007a).

L'activité des extraits polyphénoliques des plantes contre *P. aeruginosa* est digne de la notification spéciale, depuis qu'elle est caractérisée par une résistance naturelle considérable à la majorité des agents antimicrobiens à usage clinique (Nikitina *et al.*, 2007).

La souche *P. aeruginosa* est remarquablement la plus résistante de toutes les souches testées aux extraits des fruits de *P. lentiscus*. Les colonies croient identiquement au reste du tapis bactérien, ce qui prouve que ces extraits ne présentent aucune activité antibactérienne contre cette souche. Bien au contraire, ils semblent favoriser la prolifération et la surcroissance autours des disques, même augmentée avec l'augmentation de la dose de l'extrait (Fig.25). Ceci est peut être du à un catabolisme spécifique, car il a été démontré que les espèces du genre *Pseudomonas* sont impliquées dans la biodégradation des composés phénoliques (Whiteley et Bailey, 2000).

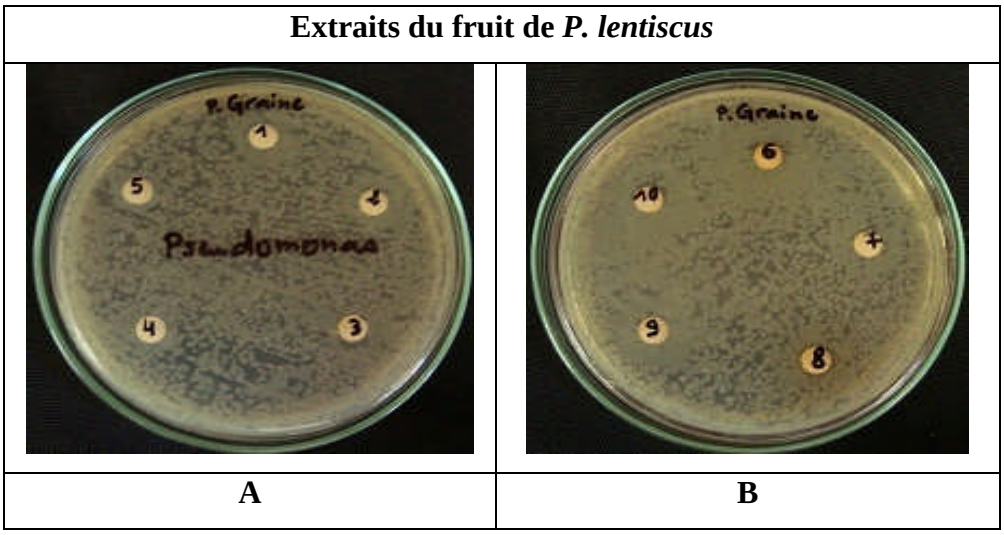


Figure 25. Activité des extraits des fruits de *P. lentiscus* sur *P. aeruginosa.* **A)** Extraits bruts des fruits à 0,02mg/disque ; 1: extrait éthanol; 2: acétate d'éthyle; 3: aqueux d'acétate d'éthyle; 4: chloroforme; 5: hexane. **B)** Extraits bruts des fruits à 0,1mg/disque; 6: extrait éthanol; 7: acétate d'éthyle; 8: aqueux d'acétate d'éthyle; 9: chloroforme; 10: hexane

III.3.5. Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *E. coli* (NAR)

Les résultats du tableau XI montrent que seuls les extraits acétate d'éthyle, aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane des feuilles de *P. lentiscus* exercent un effet inhibiteur sur *E. coli* (NAR), avec des zones d'inhibition de 10,7 à 16,0mm pour les extraits bruts, alors que les fractions présentent de faibles zones d'inhibition ($P<0,05$). Ces extraits aqueux et leurs fractions ont un effet bactériostatique à 0,4-0,5mg/ml et bactéricide à 0,5mg/ml (Tableau IV).

Le mélange méthanol/eau et eau/acide acétique ont permis de récupérer à partir de l'extrait inactif, éthanol des feuilles, deux fractions (F_3 et F_4) à faibles activités dont le diamètre est respectivement de 8,0mm et 9,0mm à 1mg/disque ($P<0,05$). En revanche, le fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle n'a donné aucune fraction active, ceci est probablement dû à la séparation des composants qui agissent en synergie.

L'activité des extraits aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane des feuilles a été retrouvée dans presque toutes les fractions chromatographiques mais avec de faibles diamètres de zones d'inhibition par rapport à l'extrait brut ($P<0,05$). Aucune activité n'a été enregistrée avec les extraits aqueux d'acétate d'éthyle, chloroforme et hexane, même après fractionnement. La même observation a été faite sur les extraits et les fractions chromatographiques des fruits ($P<0,05$), indiquant la résistance de cette souche à ces extraits.

Les diamètres des zones d'inhibition des extraits et des fractions chromatographiques des feuilles diffèrent significativement ($P<0,05$) de ceux des composés phénoliques purs**.** Les résultats obtenus avec l'acide gallique et l'acide caféique sur cette espèce, sont similaires à ceux obtenus par Rodriguez-Vaquero *et al.* (2007a). Contrairement aux résultats de la présente étude, ces mêmes auteurs n'ont observé aucune zone d'inhibition avec la catéchine mais avec la quercétine à 1mg/ml (Rodriguez-Vaquero *et al.*, 2007a).

Parmi les antibiotiques testés, seul la gentamycine (15µg) et le chloramphénicol (30µg) ont été actifs avec un diamètre de zone d'inhibition de 28,7 et 34,7mm, respectivement. Des résultats similaires ont été rapportés par de nombreux auteurs (Dall'Agnol *et al.*, 2003 ; Ghosh *et al.*, 2008), montrant la sensibilité d'*E. coli au* chloramphénicol (20,51mm à 40µg/ml) (Dall'Agnol *et al.*, 2003) et à la gentamycine (23mm à 10µg/ml) (Ghosh *et al.*, 2008). Contrairement à d'autres études, montrant sa résistance à l'ofloxacine (10µg/disque) (Sahin *et al.*, 2003); à la pénicilline (30µg/disque) (Okigbo et Ajalie, 2005; Ghosh *et al.*, 2008); à l'ampicilline (10µg) (Ghosh *et al.*, 2008) et à l'érythromycine (15µg/disque) (Mathabe *et al.*, 2006).

Tableau XI. Activité des extraits et des fractions chromatographiques de feuilles et des fruits de *P. lentiscus* sur *E. coli* (NAR)

Extraits	Diamètre des zones d'inhibition (mm)																	
	Concentration des extraits (mg/disque)					Concentration des fractions chromatographiques (mg/disque)												
						F1:Chloroforme			F2:AcOEt/MeOH (1/1)			F3:MeOH/eau (4/1)			F4:Eau/A.ac (1/ 0,005)		
	0,02	0,1	0,2	1	2	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1
Feuilles de *P. lentiscus*																		
Eth	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	7,8 ±0,3	7,8 ± 0,3	8,0 ± 0,0	8,5 ± 0,0	9,0 ± 0,0	-/-
AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	**10,7±0,6**	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq-AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Chl	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Chl	-/-	-/-	-/-	**12,0±0,0**	**15,7±0,6**	9,0±0,0	**11,0±0,0**	**11,3±0,3**	-/-	7,3±0,3	**10,3±0,3**	9,0±0,0	8,0±0,0	7,0±0,0	7,0±0,0	7,0±0,0	7,0±0,0
Hex	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Hex	-/-	-/-	-/-	**13,0±0,0**	**16,0±0,0**	7,8±0,3	**10,0±0,0**	7,8±0,3	-/-	8,3 ± 0,3	8,5 ± 0,0	-/-	-/-	7,3 ± 0,3	-/-	-/-	-/-
Fruits de *P. lentiscus*																		
Eth	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
Aq-AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Chl	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
Hex	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-

Composés phénoliques purs																				
Acide gallique					Acide caféique					Acide tannique					Catéchine				
0,02	0,1	0,2	1	2	0,02	0,1	0,2	1	2	0,02	0,1	0,2	1	2	0,02	0,1	0,2	1	2
-/-	-/-	-/-	7,0±0,0	8,0±0,0	-/-	-/-	-/-	-/-	7,0±0,0	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	7,8±0,3

Antibiotiques testés					
Pénicilline G (10µg)	**Ampicilline (10µg)**	**Gentamycine (15µg)**	**Vancomycine (30µg)**	**Chloramphénicol (30µg)**	**Ofloxacine (5µg)**
0,0±0,0	0,0±0,0	28,7±1,2	0,0±0,0	34,7±1,2	0,0±0,0

-/-: Pas de zone observée, NT: non testé ; Quercétine : pas d'activité ; AcOEt : acétate d'éthyle ; MeOH : méthanol ; A.ac : acide acétique

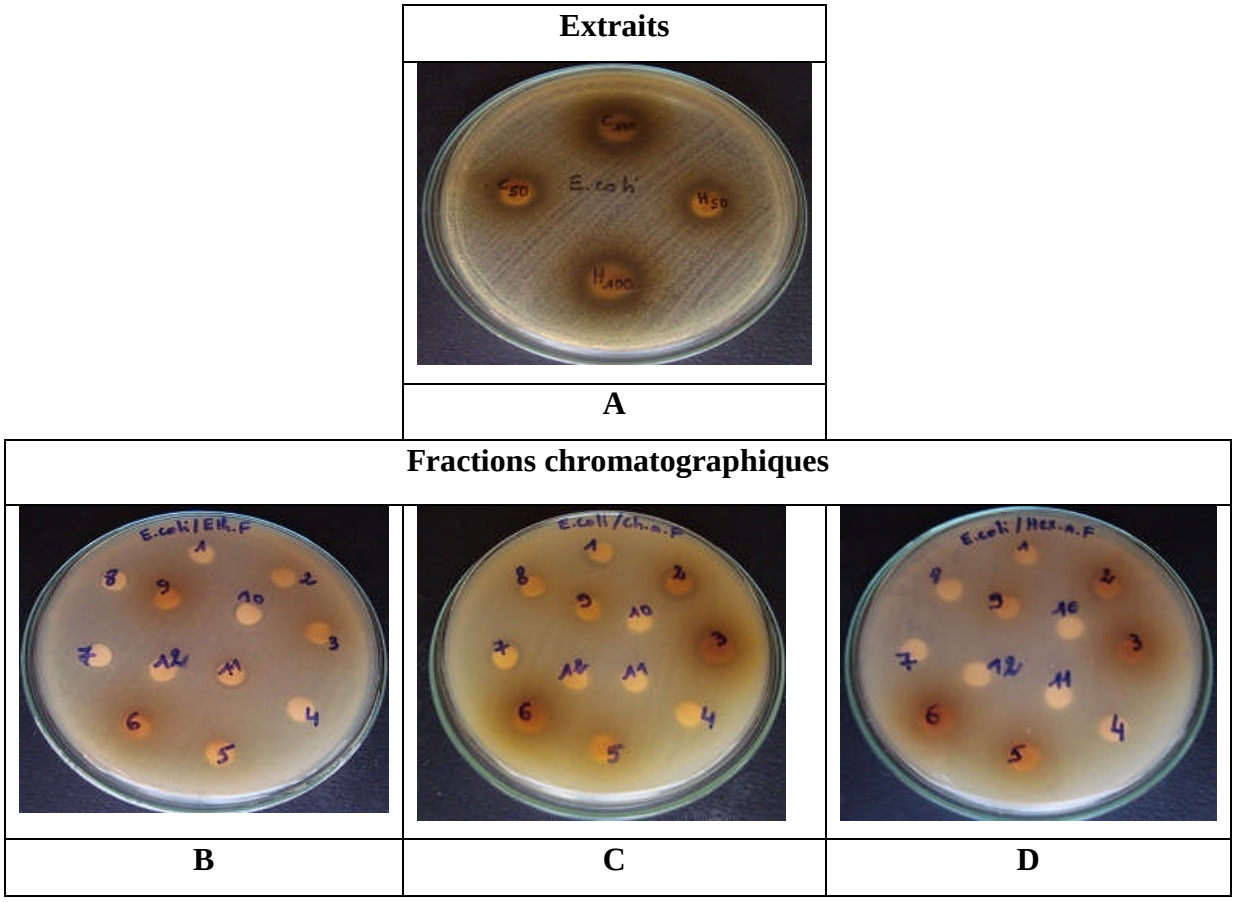


Figure 26. Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *E. coli* **A)** Extraits aqueux du chloroforme et d'hexane des feuilles, C_{50}: aqueux chloroforme à 1mg/disque; C_{100}: aqueux chloroforme à 2mg/disque; H_{50}: aqueux chloroforme à 1mg/disque; H_{100}: aqueux chloroforme à 2mg/disque. **B)** Fractions d'éthanol feuilles, **C)** Fractions de l'aqueux du chloroforme feuilles, **D)** Fractions de l'aqueux d'hexane feuilles, 1: F_1 (0,1mg/disque), 2: F_1 (0,5mg/disque), 3: F_1 (1mg/disque), 4: F_2 (0,1mg/disque), 5: F_2 (0,5mg/disque), 6: F_2 (1mg/disque), 7: F_3 (0,1mg/disque), 8: F_3 (0,5mg/disque), 9 : F_3 (1mg/disque), 10: F_4 (0,1mg/disque), 11: F_4 (0,5mg/disque), 12: F_4 (1mg/disque).

La sensibilité de cette souche vis-à-vis des extraits de plantes médicinales a été rapportée par plusieurs études. Voravuthikunchai *et al.* (2004) ont démontré une forte activité inhibitrice des extraits aqueux et éthanolique du fruit de *Quercus infectoria*, contre toutes les souches de *E. coli* O157:H7 étudiées, à une concentration de 2,5mg/disque, avec des diamètres de zones d'inhibition de 8 à 11mm et de 11 à 15mm, respectivement. L'extrait aqueux a donné des CMI: 0,09 à 0,78mg/ml et des CMB : 0,78 à 3,12mg/ml et l'extrait éthanolique a donné des CMI: 0,02 à 0,09mg/ml et CMB: 0,39 à 1,56mg/ml. Ces extraits présentent des valeurs de CMI plus intéressantes et des valeurs de CMB moins intéressantes que celles des extraits des feuilles de *P. lentiscus*.

Basile *et al.* (2000) ont montré l'effet de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Castanea sativa* sur *E. coli* (ATCC11229), avec une CMI de 0,256mg/ml et une CMB de 0,512mg/ml. Les mêmes résultats ont été observés par Sahin *et al.* (2003) et Kumar *et al.* (2006), en utilisant des extraits méthanoliques de plusieurs plantes.

Basile et ses collaborateurs (2005) et Özçelik et ses collaborateurs (2005) ont, respectivement, prouvé l'effet inhibiteur de l'extrait éthanolique des graines de *Paullinia cupana* sur cette souche avec une CMI de 32µg/ml et des extraits apolaires de différentes parties de *Pistacia vera* avec des CMI de 64µg/ml à 16µg/ml. Ali *et al*. (2001) ont rapporté l'inhibition de cette espèce par l'extrait acétate d'éthyle des feuilles de *Lawsonia inermis* (Ali *et al*., 2001).

Alanis *et al*. (2005) ont montré une activité inhibitrice de la majorité des plantes appartenant à plusieurs familles testées sur *E. coli* (ATCC25922) et *E. coli* O157:H7, ce qui montre la sensibilité de cette espèce aux extraits de plantes**.** Par ailleurs, l'extrait méthanolique des fruits de *Cocos nucifera* (palmées) et *Punica granatum* (punicacées) ont révélé une forte activité inhibitrice, à l'inverse, les extraits de la partie aérienne de *Schinus molle* (anacardiacées) et des graines de *Annona cherimola* (annonacées) qui ont révélé un faible effet (Alanis *et al*., 2005).

Les CMI et CMB retrouvées pour les différents extraits des feuilles varient de 0,4 à ≥1mg/ml et de 0,5 à >1mg/ml. Ces valeurs sont intéressantes, comparativement à celles exhibées par les extraits éthanoliques et aqueux de quatre plantes comestibles, *Entada africana* (écorce), *Terminalia avicennoides* (écorce), *Mitragyna stipulosa* (écorce*)* et *Lannae acida* (écorce de tige) dont la CMI des extraits efficaces s'est échelonnée de 1.56mg/ml à 50.00mg/ml, tandis que la CMB était entre 6.25mg/ml et 25.00mg/ml, sur dix souches de *E. coli* 0157:H7 (EHEC) (Aboaba *et al.*, 2006).

D'autres études ont rapporté sa résistance vis-à-vis des extraits d'autres plantes (Mathabe *et al.*, 2006). Les résultats des différents extraits de fruits de *P. lentiscus* sont en accord avec ceux obtenus par Ali *et al*. (2001) concernant les graines de *Nigella sativa*. Ces auteurs ont montré que les extraits éthanolique et acétate d'éthyle des graines de cette plante ne possèdent pas une activité antibactérienne vis-à-vis de *E. coli*. Navarro *et al.* (1996) ont démontré que l'extrait méthanolique de l'écorce des fruits de *Punica granatum* et du fruit de *Guazuma ulmifolia* ont une faible activité inhibitrice sur cette souche, avec des CMI de 10mg/ml et de 20mg/ml, respectivement. Des résultats similaires ont été observés par Salva *et al*. (2004), en utilisant les extraits méthanoliques des fruits de *Capparis salicifolia* et *Capparis tweediana* (capparacées). Les extraits des graines de *Brucea javanica* et les extraits des fruits de *Ardisia colorata* se sont montrés inactifs contre

toutes les souches de *E.coli* O157:H7 étudiées (Voravuthikunchai *et al.,* 2004). Lentz *et al.* (1998) ont démontré la résistance de cette souche, vis-à-vis des extraits éthanoliques de plusieurs plantes appartenant à différentes familles.

III.3.6. Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *K. pneumoniae* (E_{47})

Les résultats du tableau XII montrent que seuls les extraits aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane des feuilles de *P. lentiscus* exercent un effet inhibiteur sur *K. pneumoniae,* avec des zones d'inhibition de 12,0mm à 2mg/disque. L'augmentation de la concentration de ces extraits de 1mg/disque à 2mg/disque s'est accompagnée d'une augmentation du diamètre d'inhibition ($P<0,05$). Ces mêmes extraits ont un effet bactéricide à 0,7mg/ml et bactériostatique à 0,6mg/ml (Tableau IV).

Le fractionnement des extrait éthanolique et acétate d'éthyle des feuilles s'est accompagné de l'apparition des zones d'inhibition, indiquant la présence de faibles activités de 7,0 à 10,0mm, contrairement aux extraits aqueux du chloroforme et d'hexane où les diamètres ont diminué ($P<0,05$). Par contre, aucune zone d'inhibition n'a été observée avec les extraits des feuilles (aqueux d'acétate d'éthyle, chloroforme et hexane) et des fruits, y compris leur fractions.

L'analyse statistique révèle l'existence de différences significatives entre les différents extraits des feuilles et les molécules standards ($P<0,05$). A l'exception de l'acide tannique et la quercétine, tous les standards testés ont montré de faibles zones d'inhibition de 7,0 à 8,5mm avec des valeurs de CMI qui varient de 0,4 à 0,7mg/ml et de CMB supérieures à 1mg/ml (Tableau VI), alors que Rodriguez-Vaquero *et al.* (2007a) ont rapporté que l'acide gallique inhibe la croissance de *K. pneumoniae* à 25µg/ml.

Sur les six antibiotiques testés dans les mêmes conditions, seule l'ofloxacine (5µg) a manifesté une activité vis-à-vis de *K. pneumoniae* avec une zone d'inhibition de 30,0mm, ce qui prouve la résistance de celle-ci. Les résultats obtenus concernant la résistance de *K. pneumoniae* aux antibiotiques sont en accord avec ceux de la bibliographie (Sahin *et al.,* 2003 ; Keita *et al.,* 2004 ; Redriguez-Vaquero *et al.,* 2007a ; Akinpelu *et al.,* 2008). Ces auteurs avaient montré que cette souche montre de très faibles diamètres d'inhibition à l'ofloxacine (12mm à 10µg/disque) (Sahin *et al.,* 2003) et à l'ampicilline (14mm à 10µg/ml) (Akinpelu *et al.,* 2008) et aucune zone n'a été observée avec le chloramphénicol (Keita *et al.,* 2004).

Tableau XII. Activité des extraits et des fractions chromatographiques de feuilles et des fruits de *P. lentiscus* sur *K .pneumoniae* (E_{47})

Extraits	Diamètre des zones d'inhibition (mm)																	
	Concentration des extraits (mg/disque)					Concentration des fractions chromatographiques (mg/disque)												
						F1:Chloroforme			F2:AcOEt/MeOH (1/1)			F3:MeOH/eau (4/1)			F4:Eau/A.ac (1/ 0,005)		
	0,02	0,1	0,2	1	2	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1
Feuilles de *P. lentiscus*																		
Eth	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	8,0±0,0	7,0±0,0	8,0±0,0	8,0±0,0	9,0±0,0	-/-
AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	**10,0±0,0**	9,0±0,0	-/-	7,5±0,0	9,0±0,0	7,0±0,0	7,0±0,0	-/-
Aq-AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Chl	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Chl	-/-	-/-	-/-	9,0±0,0	**12,0±0,0**	7,0±0,0	**10,3±0,3**	9,2±0,3	-/-	7,0±0,0	8,8±0,3	9,0±0,0	8,2±0,3	7,2±0,3	7,0±0,0	-/-	-/-
Hex	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Hex	-/-	-/-	-/-	9,7±0,6	**12,0±0,0**	7,0±0,0	8,3±0,3	-/-	-/-	8,3±0,3	8,2±0,3	-/-	-/-	8,0±0,0	-/-	-/-	-/-
Fruits de *P. lentiscus*																		
Eth	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
Aq-AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Chl	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
Hex	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-

Composés phénoliques purs																					
Acide gallique						Acide caféique					Acide tannique					Catéchine					
0,02	0,1	0,2	1	2		0,02	0,1	0,2	1	2	0,02	0,1	0,2	1	2	0,02	0,1	0,2	1	2	
-/-	-/-	7,0±0,0	7,5±0,0	8,5±0,0		-/-	-/-	-/-	7,0±0,0	7,0±0,0	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	7,3±0,3	7,8±0,3	8,0±0,0	

Antibiotiques testés				
Pénicilline G (10µg)	**Ampicilline (10µg)**	**Gentamycine (15µg)**	**Vancomycine (30µg)**	**Chloramphénicol (30µg)**	**Ofloxacine (5µg)**
0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	30,0±0,0

-/-: Pas de zone observée, NT: non testé ; Quercétine : pas d'activité ; AcOEt : acétate d'éthyle ; MeOH : méthanol ; A.ac : acide acétique

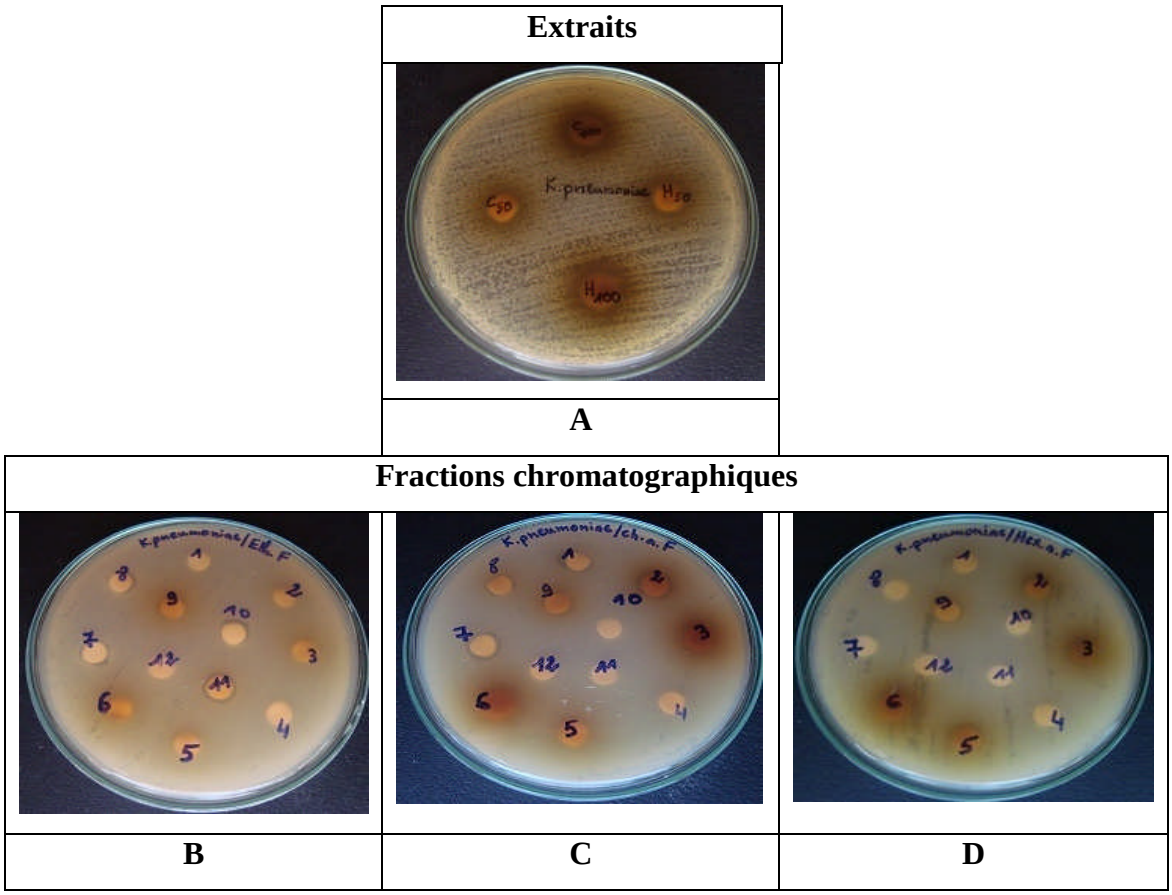


Figure 27. Activité des extraits et des fractions chromatographiques sur *K. pneumoniae* **A)** Extraits aqueux du chloroforme et d'hexane des feuilles, C_{50}: aqueux chloroforme à 1mg/disque; C_{100}: aqueux chloroforme à 2mg/disque; H_{50}: aqueux chloroforme à 1mg/disque; H_{100}: aqueux chloroforme à 2mg/disque. **B)** Fractions d'éthanol feuilles, **C)** Fractions de l'aqueux du chloroforme feuilles, **D)** Fractions de l'aqueux d'hexane feuilles, 1: F_1 (0,1mg/disque), 2: F_1 (0,5mg/disque), 3: F_1 (1mg/disque), 4: F_2 (0,1mg/disque), 5: F_2 (0,5mg/disque), 6: F_2 (1mg/disque), 7: F_3 (0,1mg/disque), 8: F_3 (0,5mg/disque), 9 : F_3 (1mg/disque), 10: F_4 (0,1mg/disque), 11: F_4 (0,5mg/disque), 12: F_4 (1mg/disque).

Plusieurs études ont démontré la sensibilité de l'espèce *K. pneumoniae* aux extraits de plantes. En effet sa sensibilité aux distillats de fruit de différentes variétés de mangue de Guinée a montré des zones d'inhibition de 14 à 22mm (Keita *et al.*, 2004). L'extrait méthanolique des branches de *Astronium balansae* (anacardiacées) inhibe *K.pneumoniae* (ATCC10031) avec une CMI de 0,5mg/ml (Salva *et al.*, 2004). L'extrait aqueux des écorces de racines de *Cordia gilletti* inhibe sa croissance avec une CMI supérieure à 1mg/ml (Okusa *et al*., 2007).

Les CMI et CMB retrouvées pour les différents extraits de feuilles varient de 0,4 à >1mg/ml et de 0,6 à >1mg/ml, respectivement. Ces valeurs sont moins intéressantes que celles exhibées par la fraction d'acétate d'éthyle de l'extrait aqueux des feuilles de *Castanea sativa* (CMI de 0,256mg/ml et CMB de 0,512mg/ml) (Basile *et al.*, 2000) et de l'extrait éthanolique de *Salvia potentillifolia* (CMI; 0,036mg/ml) (Kivrak *et al.*, 2009).

L'inefficacité des extraits de plantes vis-à-vis de cette souche a été rapportée par plusieurs auteurs. Les extraits méthanolique des fruits de *Capparis salicifolia* et *Capparis tweediana* (capparacées) n'ont aucun effet vis-à-vis de *K. pneumoniae* (ATCC10031) (Salva *et al.,* 2004). Natarajan *et al.* (2005) ont révélé la résistance de cette souche envers les extraits éthanolique et chloroforme des feuilles de *Euphorbia fusiformis*. Les travaux de Benhammou *et al.* (2008) ont démontré la résistance de cette espèce par rapport aux extraits éthanoliques des feuilles de *P. lentiscus* et *P. atlantica* (anacardiacées). Bonjar (2004) avait montré que les extraits méthanoliques (2mg/puits) de différentes parties (feuilles et fruits, etc.) de plusieurs plantes appartenant à différentes familles possèdent une faible activité vis-à-vis de *K. pneumoniae*.

Discussion générale de l'activité antibactérienne

Il est important de préciser qu'un résultat observé lors de l'évaluation d'une activité d'un extrait ou d'une fraction est la composante de deux paramètres: l'activité intrinsèque des produits actifs et leur quantité relative dans l'extrait. Par exemple, une activité avérée d'un extrait peut aussi bien être le reflet d'une faible quantité de constituants très actifs que d'une grande quantité de constituants relativement peu actifs.

Dans la présente étude, les teneurs en composés phénoliques des feuilles et fruits de *P. lentiscus* ont été évaluées, ainsi que leur effet antibactérien contre des bactéries pathogènes pour l'Homme. Les extraits de feuilles ont été efficaces vis-à-vis des $Gram^+$ et des $Gram^-$, avec une activité importante contre *S. aureus* et *B. subtilis*, et une activité plus au moins importante contre les autres souches, ce qui peut être liée à l'action des composés antibiotiques ou à la présence des toxines métaboliques (Duraipandiyan *et al.,* 2006 ; Salama et Marraiki, 2010). Le fruit n'a démontré aucune activité contre *L. innocua, P. aeruginosa, E. coli* et *K. pneumoniae*. Ces souches possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne de ces extraits et de leurs fractions chromatographiques. Quelques zones d'inhibition faibles, toutes inférieures à 15mm, ont été enregistrées avec *S. aureus* et *B. subtilis.* Cette différence d'activité entre les feuilles et les fruits de *P. lentiscus* peut être due au fait que les feuilles peuvent contenir moins de pigments et autres composés phénoliques qui peuvent interférer avec l'activité antimicrobienne des extraits ou peut simplement être due aux différents types de constituants antimicrobiens actifs et/ou à leur concentrations (Salama et Marraiki, 2010).

Ces résultats semblent confirmer le potentiel antibactérien de *P. lentiscus* et son utilisation dans la médicine traditionnelle.

D'après les résultats du dosage, la teneur en composés phénoliques n'est pas en relation directe avec l'activité antibactérienne, mais la nature des composés présents dans les extraits, que ce soit des phénols simples, flavonoïdes ou tannins.

L'effet inhibiteur le plus élevé est obtenu par les extraits aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane des feuilles de *P. lentiscus* qui ont inhibé toutes les souches testées au moins à deux concentrations. Rangasamy *et al.* (2006) ont rapporté que le pouvoir antibactérien de la plupart des extraits des plantes médicinales analysées réside dans l'extractant le plus polaire. Ces extraits (aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane des feuilles), bien qu'ils soient relativement pauvres en flavonoïdes, expriment une activité antibactérienne assez importante. Ceci pourrait être lié à la présence de composés dont la nature permet une activité antibactérienne élevée, malgré leurs faibles taux et/ou à la présence d'autres types de molécules, à savoir les acides phénols et les tannins, voir même à la présence des unités oligomériques des tannins, connus pour leur effet antibactérien (Navarro *et al.*, 1996 ; Dall'Agnol *et al.*, 2003 ; Taguri *et al.*, 2006). Inversement, d'autres extraits des feuilles, présentent de fortes teneurs en phénols totaux et en tannins, mais exhibent, entre autre, des activités modérées, aussi bien que nulles, ce qui démontre une faible corrélation entre l'activité antibactérienne et la quantité en composés phénoliques.

L'effet antibactérien le plus marqué est observé sur *S. aureus et B. subtilis* à différentes concentrations et avec presque tous les extraits et fractions chromatographiques. De tels résultats qui ont été rapportés pour la plupart des extraits étaient probablement du à la méthode d'extraction et/ou aux solvants utilisés (Eloff, 1998 ; Majhenič *et al.*, 2007 ; Pesewu *et al.*, 2008 ; Salama et Marraiki, 2010), au matériel végétal et/ou aux différentes souches bactériennes étudiées (Eloff, 1998 ; Pesewu *et al.*, 2008), à la tolérance intrinsèque des microorganismes et à la nature des composés phytochimiques présents dans l'extrait (Aqil et Ahmad, 2003) et aux différentes méthodes de vérification de l'activité antibactérienne (Lindberg *et al.*, 2004 ; Landete *et al.*, 2008).

La différence dans la structure de la paroi bactérienne joue un rôle important dans la susceptibilité des bactéries (Shan *et al.,* 2007 ; Tian *et al.,* 2009). Selon plusieurs auteurs, les bactéries Gram$^-$ ont une membrane externe constituée de lipopolysaccharides (LPS) qui limite la diffusion des composés hydrophobes (Yoda *et al.,* 2004 ; Tian *et al.,* 2009 ; Lacombe *et al.,* 2010). De plus, le périplasme contient des enzymes capables de détruire les molécules étrangères introduites de l'extérieur (Klančnik *et al.,* 2010), ce qui rend ces bactéries généralement moins sensibles aux extraits de plantes que les bactéries Gram$^+$ (Chan *et al.,* 2007 ; Estevinho *et al.,* 2008 ; Šamec *et al.,* 2010). D'ailleurs, tous les extraits de *P. lentiscus* semblent être plus actifs contre les Gram$^+$ que les Gram$^-$. Ce comportement n'est pas surprenant car les souches Gram$^-$ possèdent une résistance intrinsèque, qui est en relation avec la nature de leur membrane externe (Hayet *et al.,* 2008; Klančnik *et al.,* 2010). En effet, cette dernière rend leurs surfaces fortement hydrophiles tandis que les extrémités lipophiles des acides lipoteichoïques de la paroi des bactéries Gram$^+$ facilitent la pénétration des composés hydrophobes (Boussaada *et al.,* 2008), tel que les tannins qui peuvent atteindre la membrane cytoplasmique, et perturbent la force motrice de proton, le transport actif et la coagulation du contenu cellulaire (Tian *et al.,* 2009).

Il a été rapporté que l'effet inhibiteur des acides hydroxycinnamiques pourrait être lié à leurs chaines latérales qui pourraient faciliter leur transport à travers la membrane cellulaire. D'autre part, leurs dérivés sont connus pour agir avec les lipides membranaires en neutralisant leur potentiel électrique et en affectant leur métabolisme énergétique (Rodriguez-Vaquero *et al.,* 2007a,b).

Il est également probable que ces résultats observés soient dus à une différence d'affinité avec les cibles bactériennes. Yoda *et al.* (2004) ont rapporté que la propriété d'agglutination de l'EGCg aux porines et sa faible affinité avec LPS affectent largement sa perméabilité, limitant ainsi son agglutination au peptidoglycane réduisant la susceptibilité des Gram$^-$ à l'EGCg.

Il est probable que la résistance observée soit du à un catabolisme spécifique. Ogueke *et al.* (2007) ont rapporté que l'incapacité de l'extrait éthanolique de *Euphorbia hirta* à inhiber *Salmonella typhi* peut être due à la présence d'un mécanisme de détoxification des principes actifs de l'extrait. De même, il existe des microorganismes

capables de tolérer et même de métaboliser les acides hydroxycinnamiques par réduction de leur chaîne latérale. Ceci peut être la raison pour laquelle l'acide caféique n'a pas inhibé la croissance de *K. pneumoniae* (Rodriguez-Vaquero *et al.,* 2007a). Deschamps *et al.* (1980) cités par Min *et al.* (2008) ont rapporté dans une étude détaillée sur la dégradation du gallotannin par les bactéries aérobies, et quinze isolats bactériens appartenant aux genres *Klebsiella*, *Bacillus* et *Staphylococcus* utilisant le gallotannin comme unique source de carbone (Min *et al.*, 2008). Trois acides cinnamiques (acide coumarique, acide caféique et acide férulique) ont été rapportés pour être métabolisé par des souches de *Lactobacillus plantarum* (Landete *et al.*, 2008).

En outre, dans la technique de dilution dans l'agar les flavonoïdes se précipitent à des concentrations élevées dans les solutions contenant du carbonate de sodium. Cette précipitation est susceptible de provoquer la diminution de contact entre les cellules bactériennes et ces molécules par la formation de sels avec le carbonate de sodium, ce qui peut mener aux faux résultats négatifs **(**Cushnie *et al.*, 2003). En plus, il a été démontré que la présence des composés azotés organiques (protéines) dans le milieu d'analyse peut masquer les propriétés antibactériennes de certains composés phénoliques (Landete *et al.*, 2008). Cox *et al.* (2000) ont rapporté que les LPS peuvent être franchi plus facilement en présence de certains composés polycationiques qui augmentent la perméabilité des bactéries Gram$^-$**.**

Quand les effets antibactériens des extraits sont exprimés en terme de diamètre de zones d'inhibition, on assume qu'une zone plus large indique une susceptibilité plus élevée. Aussi, la largeur d'une zone d'inhibition est également fonction de la concentration initiale du composant, de sa solubilité, et de sa vitesse de diffusion dans l'agar (Lindberg *et al.*, 2004). Donc un faible effet inhibiteur observé avec la techniques de diffusion sur disque ne signifie pas nécessairement l'inactivité des extraits, mais leur caractère hydrophobe empêche leur diffusion uniforme dans les milieux à base de l'agar (Klančnik *et al.*, 2010). C'est notamment le cas de *P. aeruginosa* qui a présenté des valeurs de CMI/CMB de ≤0,1/0,3mg/ml, plus intéressantes que les diamètres des zones d'inhibition avec les extraits acétate d'éthyle, aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane des feuilles de *P. lentiscus* utilisées dans la présente étude.

La diminution du diamètre de la zone d'inhibition avec l'augmentation de la charge du disque pourrait s'expliquer par la diminution de l'activité de l'extrait qui serait due à une diminution de la solubilité de la (es) substance (s) active (s). Cependant, avec des concentrations plus élevées en extrait, la solubilité de ces derniers peut devenir un facteur limitant (Lindberg *et al.,* 2004).

Il est probable que la diminution de l'activité soit due à une modification des propriétés de la substance responsable de l'activité en présence d'autres composés de l'extrait (Pereira *et al.,* 2007 ; Estevinho *et al.,* 2008), aboutissant à une combinaison de deux composants actifs (majeur ou mineur) agissant en synergie (Brijesh *et al.,* 2006 ; Majhenič *et al.,* 2007 ; Paraschos *et al.,* 2007 ; Pereira *et al.,* 2007 ; vanVuuren, 2008 ; Figueiredo *et al.,* 2010 ; Nenaah, 2010), ou bien des composants mineurs d'extrait qui sont également actifs à de faibles concentrations (Lindberg *et al.,* 2004). Ceci peut être expliqué par l'effet de l'agar sur la diffusion des composés actifs qui est du à la diminution du pouvoir migratoire dans la gélose (Natarajan et *al.,* 2005 ; Proestos *et al.,* 2006).

Une diminution et parfois une annulation de l'effet inhibiteur a été aussi observée. C'est notamment le cas de la fraction F_4 de l'extrait aqueux d'hexane testée contre *S. aureus* à 0,5mg/disque, indiquant probablement que l'activité observée aux concentrations extrêmes (0,1mg/disque et 1mg/disque) soit due à l'action des composés différents; ceux qui agissent à de faibles doses et ceux qui agissent à de fortes doses d'extrait. Parmi les extraits de feuilles de *P. lentiscus*, l'extrait éthanol (contre *L. innocua*, *E. coli* et *K. pneumoniae*), acétate d'éthyle (contre *K. pneumoniae*) et chloroforme (contre *S. aureus* et *B. subtilis*) n'ont montré un effet inhibiteur qu'après leur fractionnement. Ceci pourrait être expliqué par l'effet d'encombrement par les substances présentes dans l'extrait brut et l'inhibition de la (es) molécule (s) active (s). Ou bien par sa (es) faible concentration au niveau de l'extrait et après fractionnement elle (s) s'est (sont) concentrée (s) dans la fraction et moins encombrée par des molécules, permettant ainsi son (leurs) action (Babayi *et al.,* 2004). Aussi, Il a été rapporté par Kuete *et al.* (2006) que l'activité antimicrobienne augmentait progressivement dans le fractionnement. *P. lentiscus* est utilisée en médecine traditionnelle, avec très peu d'indication sur son activité antibactérienne. Toutefois, elle a déjà été signalée comme renfermant un ou plusieurs principes actifs antimycobactériens (Sqalli *et al.,* 2007).

Il a été rapporté que *P. lentiscus* est caractérisée principalement par sa richesse en composés phénoliques, flavonoïdes et des flavonoïdes glycosylés (Stocker *et al.,* 2004 ; Longo *et al.,* 2007 ; Tsoko *et al.,* 2007 ; Gardeli *et al.,* 2008) et d'autres composés phénoliques comprenant l'acide gallique (Zhao *et al.,* 2005), procyanidines sous leur forme polymérisée (Topçu *et al.,* 2007) et tannins (Reig-Armiňana *et al.,* 2004).

La littérature rapporte que l'activité antibactérienne peut être liée aux tannins qui sont des composés actifs de plusieurs plantes médicinales. Ils forment des complexes irréversibles avec les protéines riches en proline, qui auraient comme conséquence l'inhibition de la synthèse des protéines de la paroi cellulaire. Cette propriété a pu expliquer les mécanismes d'action des extraits de plantes (Dall'Agnol *et al.,* 2003). Ils sont également des inhibiteurs efficaces de beaucoup d'enzymes hydrolytiques telles que les enzymes pectolytiques utilisées par les phytopathogènes (Aboaba *et al.,* 2006).

Min *et al.* (2008) suggèrent que la source des tannins influence l'activité antimicrobienne. Les tannins et l'acide gallique ont montré *in vitro* une activité contre *B. subtilis*, *S. aureus* et *E. coli* (Akiyama *et al.,* 2001 ; Kloucek *et al.,* 2005). *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes* et *H. pylori* (Kim *et al.,* 2010). Les composés phénoliques, particulièrement les ellagitannins, sont de forts composés inhibiteurs du genre *Staphylococcus* (Puupponen-Pimiä *et al.,* 2005c). Il a été rapporté que de nouveaux gallotannins et ellagitannins isolés de la croute du fruit de *Punica granatum* sont les principaux composants responsables de l'action antimicrobienne (Mathabe *et al.,* 2006). Il a été suggéré que les gallotannins de *Galla chinensis* sont des agents antibactériens efficaces (Tian *et al.,* 2009). Les tannins et les flavonoïdes ont été rapporté pour avoir plusieurs activités pharmacologiques y compris l'activité antidiarrhéique (Brijesh *et al.,* 2006). Les flavonols glycosylés isolés des parties aériennes de *Brunfelsia grandiflora* et certaines de ces structures sont connues pour être responsables de l'activité antibactérienne (Kloucek *et al.*, 2005).

L'extrait brut de *Phyllanthus amarus* possède une activité antibactérienne contre *B.subtilis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. paratyphi* et *S. aureus*. Parmi les composés isolés de cette plante, l'acide gallique et les tannins (Kloucek *et al.,* 2005). Différents auteurs ont étudié des racines de *Terminalia catappa* et ont détecté une bonne activité antimicrobienne des extraits de chloroforme et de méthanol contre *E. coli* et *S.*

aureus. Les études phytochimiques sur l'écorce et les feuilles de cette espèce démontrent la présence des tannins, des flavonoïdes glycosylés de l'acide gallique, de l'acide ellagique et de la rutine qui ont montré une activité antibactérienne *in vitro* Kloucek *et al.* (2005).

III.4. Cinétique de croissance de *S. aureus* en milieu liquide

Un suivi de l'évolution des cultures a été réalisé dans le temps en présence de l'extrait aqueux d'hexane et sa fraction F_2, qui a présenté expérimentalement une meilleure activité contre la souche la plus sensible (*S. aureus*) en terme de diamètre de zone d'inhibition (26,3mm) et de CMI et CMB de 0,2 et 0,5mg/ml (Tableau V). Les tubes qui ont servi de contrôle ne contiennent ni l'extrait ni la fraction.

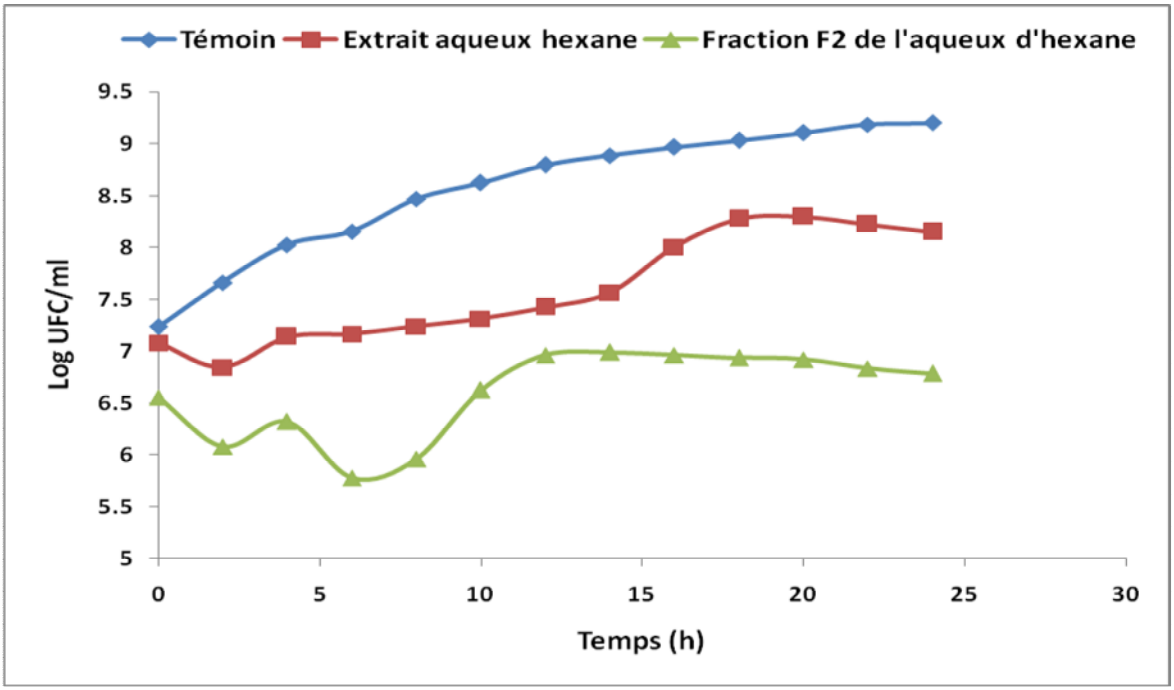


Figure 28. Courbe de croissance de *S. aureus* en absence (—◆—) et en présence de l'extrait (—■—) ou la fraction (—▲—)

D'après la Fig.27, l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'hexane et de sa fraction F_2 varie avec le temps d'incubation et le type d'extrait. Une croissance très rapide du témoin a été observée comparativement à celle contenant l'extrait ou la F_2.

La croissance de *S. aureus* a été relativement lente lors des deux premières heures d'incubation avec l'extrait et la F_2. Le nombre de bactéries vivantes a été progressivement réduit à environ 10^6UFC/ml par rapport au témoin, même jusqu'à atteindre environ 10^5UFC/ml pour la F_2, après 6h d'incubation. Puis, de nouveau, la phase exponentielle de

croissance augmente lentement jusqu'à atteindre une charge de 10^8UFC/ml pour l'extrait et uniquement 10^6UFC/ml pour la F_2, mais moins que celle du témoin qui a atteint une charge d'environ 10^9UFC/ml après 24h d'incubation. Donc l'extrait fractionné a donné une fraction partiellement pure et plus active. La même observation a été faite par Kong *et al.* (2010a) avec une nouvelle coumarine (cajanuslactone) des feuilles de *Cajanus cajan* (L.) *Millsp* sur l'inhibition de la croissance de *S. aureus* où ils ont observé une réduction du nombre de bactéries vivantes à environ 10^2UFC/ml à 2 CMI (0,031 mg/ml) après 4h, mais le nombre a recommencé à augmenter jusqu'à atteindre la concentration de 10^4UFC/ml après 24h. Et dans la même étude l'auteur suggère que le mode d'action du cajanuslactone contre *S. aureus* est associé à la perte de l'intégrité de la membrane.

En effet, la diminution de la charge bactérienne est due aux conditions de stress où la croissance est ralentie suite à la destruction de certaines bactéries, conséquence de la dénaturation des enzymes, des systèmes de transport ainsi que d'autres protéines. De plus, dans ces conditions, la bactérie a besoin de plus de temps et de protéines néosynthétisées et d'enzymes pour qu'elle soit en mesure de se diviser.

La composition chimique des extraits des feuilles de *P. lentiscus* pourrait contribuer à l'activité observée, ce qui indique la présence de composés à activité antibactérienne **(**Salama et Marraiki, 2010**)**. Ces valeurs sont très intéressantes, puisqu'elles témoignent d'une très forte activité antibactérienne de ces composés dès les premières heures d'incubation. Le phénomène de sensibilité dépend, en fait, de plusieurs constituants de l'extrait et/ou de la fraction. L'effet des composés présents à faible taux n'est pas négligeable. Des phénomènes de synergie entre les différents constituants peuvent être à l'origine d'une activité beaucoup plus prononcée que celle prévisible par les composés majoritaires.

Cho *et al.* (2007) ont observé un effet bactéricide sur *E. coli* (approximativement 10^7/ml) après 30 heures d'incubation en présence de 5mg/ml de polyphénols du thé et ils ont montré que la survie de *E. coli* diminue en fonction de la durée du traitement (Cho *et al.*, 2007). D'après Cushnie *et al.* (2003), la galangine a réduit la charge de 5×10^5 CFU/ml de de *S. aureus* NCTC11561 de 1000 fois et celle de *S. aureus* NCIMB9968 de 30 fois, alors que l'exposition de *E. coli* NCTC 11954 à la même concentration de galangine n'a eu aucun effet détectable. Kaur et Singh (2008) ont rapporté que les composés phénoliques

présents dans l'extrait de fruits de *Livistona chinensis* possèdent une activité antibactérienne et peuvent interagir avec les biomolécules intracellulaires et interfèrent avec les processus vitaux conduisant à l'altération des fonctions de la paroi cellulaire.

L'activité antibactérienne des composés phénoliques, résulte de leur capacité à traverser la membrane cellulaire des bactéries et s'accumuler à des concentrations intracellulaires appropriées et à interagir ainsi avec les cibles intracellulaires (Kaur et Singh, 2008 ; Lacombe *et al.,* 2010) et membranaires, ceci grâce à leur caractère lipophile (Castillo-Juárez *et al.,* 2007 ; Lacombe *et al.,* 2010), les hydroxyles libres des composés phénoliques agissent comme des ligands pour le fer, indiquant leur incorporation dans les cellules à travers la membrane externe par le biais du système de transport du fer (Watanabe *et al.,* 1987).

III.5. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les extraits bruts et les fractions chromatographiques de *P. lentiscus* ont été solubilisés à raison de 10mg/ml dans le méthanol et séparés par chromatographie sur couche mince (CCM). Outre l'observation sous rayonnement UV à 254nm, les plaques ont été révélées à l'aide de la vanilline sulfurique, afin de donner un aperçu sur la composition des échantillons analysés.

Le développement de la CCM commence non seulement par le choix de la phase mobile de séparation mais aussi le choix de la phase stationnaire. Un système solvant a été utilisé, les chromatogrammes résultants comportent une série de spots, l'identification des composés était basée sur la comparaison des R_f (rapports frontaux) et des couleurs observés après révélations UV et à la vanilline des taches apparues sur CCM avec ceux des étalons notés dans les mêmes conditions expérimentales.

Lors du criblage de l'activité antibactérienne, les extraits aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane des feuilles de *P. lentiscus* et leurs fractions chromatographiques, s'étant avérés les plus actifs, ont été sélectionnés pour être soumis à une investigation phytochimique pour permettre une première orientation sur les classes de composés présents dans les échantillons analysés (Fig.28, 29, 30 et 31). Les informations recueillies ont ensuite été confrontées aux données bibliographiques collectées sur la famille et le genre de cette plante. Pour chacun des extraits de cette plante, les extraits aqueux du

chloroforme et aqueux d'hexane, nous avons récupéré trois et quatre fractions, respectivement, par fractionnement chromatographique sur colonne: la fraction chloroforme/acétate d'éthyle (**F_1**), acétate d'éthyle/méthanol (**F_2**), méthanol/eau (**F_3**), (**F_4**) étant la fraction aqueuse issue du rinçage de la colonne par eau/acide acétique. Les deux extraits aqueux de feuilles de *P. lentiscus* ont été analysés par l'application du système (acétate d'éthyle-acide formique-acide acétique-eau: EA-AF-AAc-H_2O), qui a donné une bonne séparation de ces composés, par son action d'hydrolyse acide.

Les chromatogrammes obtenus sont présentés dans les figures ci-après et les R_f des constituants ont été calculés et résumés dans les tableaux XIII et XIV pour les extraits aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane, respectivement. L'effet antibactérien des quatre fractions, de l'extrait aqueux d'hexane, récupérées sur colonne à 1; 0,5 et 0,1mg/ml et les trois premières fractions F_1, F_2 et F_3 de l'extrait aqueux du chloroforme ont exhibé des activités proches ($P<0,05$), tandis que la fraction F_4 n'a exprimé aucune activité. Leur analyse sur CCM à la lumière du jour, avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H_2O), révèle la présence majoritaire des dérivés de l'acide tannique (penta-galloylglucose)**.** Belemtougri *et al.* (2006) lors du criblage phytochimique de *Diospyros mespiliformis*, ont trouvé que les flavonoïdes et les tannins se trouvent dans les extraits aqueux. Selon Andriambelson *et al.* (1998), le système de séparation (EA-AF-AAc-H_2O) appliqué exerce une hydrolyse acide sur les formes complexes telles que les tannins (tannins hydrolysables), permettant ainsi la migration des trois unités issues de cet effet, en fonction de leur solubilité et leur poids moléculaires, qui pourraient correspondre aux dérivés galloyls et d'acide gallique.

III.5.1. Chromatographie sur couche mince de l'extrait aqueux chloroforme et ses fractions chromatographiques actives

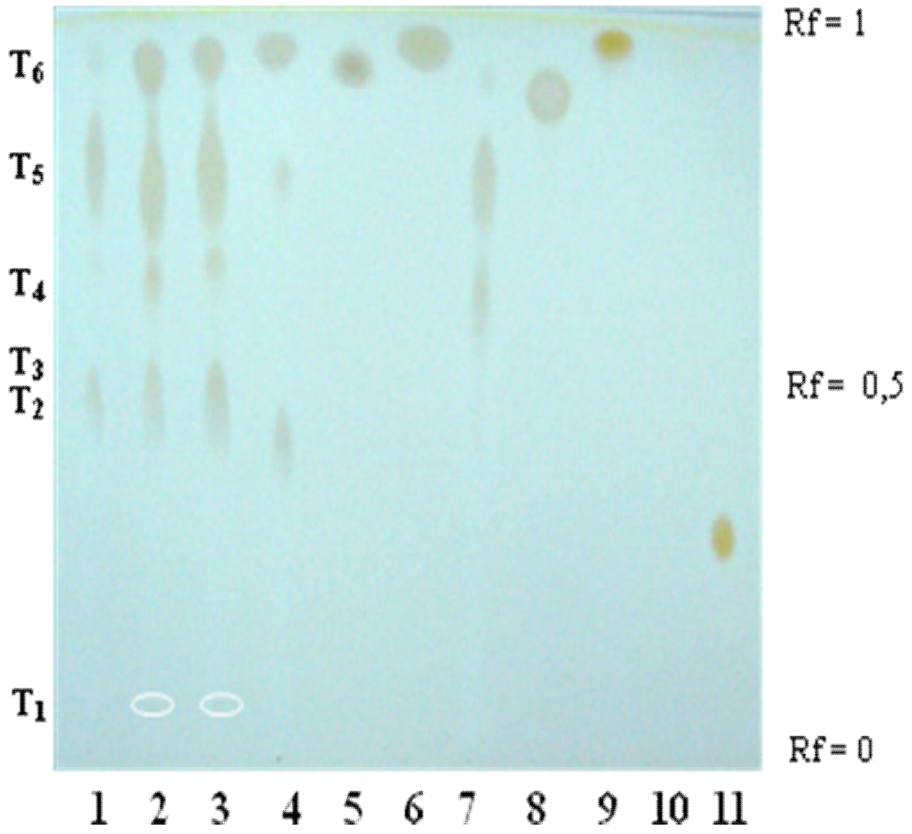


Figure 29. Chromatogramme de l'extrait aqueux du chloroforme de feuilles de *P. lentiscus*, de fractions issues du fractionnement sur colonne et de quelques standards, à la lumière du jour avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H2O). **1**) Extrait aqueux du chloroforme. **2**) F_1. **3**) F_2. **4**) F_3. **5**) Acide gallique. **6**) Acide caféique. **7**) Acide tannique. **8**) Catéchine. **9**) Quercétine. 10) Acide cinnamique. 11) Rutine.

Les profils de l'extrait aqueux du chloroforme et ses fractions observés à la lumière du jour apparaissent presque identiques, en révélant quatre taches pour l'extrait brut et cinq taches pour les deux premières fractions F_1 et F_2, alors que la fraction F_3 ne partage avec eux que peu de taches (T_2, T_5 et T_6). Certains composés ne se trouvent pas dans l'extrait brut qui a subit un fractionnement (T_1) et d'autres sont de couleur beaucoup moins intense T_4 et T_6, alors qu'ils se trouvent dans les fractions résultantes, sauf au niveau de la fraction F_3. Cela pourrait être expliqué par la différence de concentration de ces composés. La tache (T_6) a donné une couleur similaire à celle de l'acide gallique utilisée comme standard et partage avec ce dernier le même R_f. Ce composé est déjà mis en évidence par Abdelwahed *et al.* (2007) au niveau des fruits et par Topçu *et al.* (2007) au niveau des feuilles de *P. lentiscus*. En effet, le R_f et la couleur de la T_4 et T_5 sont similaires à ceux des dérivés galloyls issus de l'hydrolyse acide de l'acide tannique utilisé comme standard sur la même plaque (Fig.28).

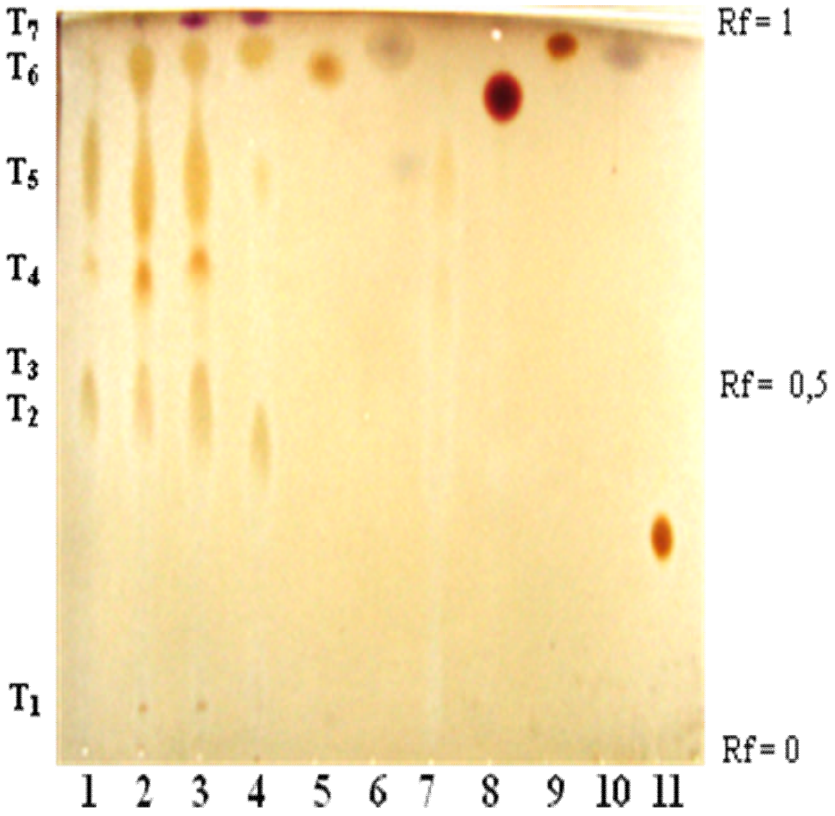


Figure 30. Chromatogramme de l'extrait aqueux du chloroforme de feuilles de *P. lentiscus*, de fractions issues du fractionnement sur colonne et de quelques standards, révélés par la vanilline sulfurique avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H O). **1**) Extrait aqueux du chloroforme. **2**) F_1. **3**) F_2. **4**) F_3. **5**) Acide gallique. **6**) Acide caféique. **7**) Acide tannique. **8**) Catéchine. **9**) Quercétine. **10)** Acide cinnamique. **11)** Rutine.

La révélation avec la vanilline sulfurique des chromatogrammes de l'extrait aqueux du chloroforme de feuilles de *P. lentiscus* a permis de mettre en évidence d'autres taches non visibles à la lumière du jour (T_3 et T_7) au niveau des fractions résultantes; cependant, une légère différence dans l'intensité de la coloration est observée pour certaines taches.

D'après la Fig.29, les fractions F_1 et F_2 sont séparées dans le même ordre en révélant sept taches de différentes couleurs, donc le profil chromatographique de ces deux fractions est remarquablement similaire. De ce fait, il est probable que ce système ait permis de séparer les mêmes composés et la différence dans l'activité pourrait être due à la différence dans la nature des composés non séparés ou non révélés sous UV et/ou à la vanilline. D'autre part, la tache T_6, qui s'est retrouvée dans l'extrait aqueux et ses fractions (Fig.29), est déjà supposée correspondre à l'acide gallique, en se référant à Topçu *et al.* (2007).

D'autre part, la tache T_1, qui n'est retrouvée que dans les fractions F_1 et F_2 (Fig.29), peut correspondre à des formes condensées, en se référant à Longo *et al.* (2007), qui ont purifié plusieurs composés anthocyanines et leurs formes condensées à partir de *P. lentiscus*, ce qui appuie encore leur présence au niveau de ces extraits. Un tel résultat témoigne de la richesse de ces extraits en divers composés et met en valeur les diverses applications thérapeutiques des feuilles de *P. lentiscus.*

Les différentes caractéristiques, couleur à la lumière du jour, R_f et révélation avec la vanilline sulfurique sont rassemblés dans le tableau XIII.

Tableau XIII. Caractéristiques des taches de l'extrait aqueux du chloroforme et ses fractions chromatographiques

Taches	Rapports frontaux	Observation à la lumière du jour	Observation sous UV	Révélation par la vanilline sulfurique
T_1	0,06	Grise	Invisible	Marron
T_2	0,5	Grise	Non fluorescente	Jaune pale
T_3	0,66	Invisible	Non fluorescente	Mauve
T_4	0,73	Grise	Noire	Jaune orange
T_5	0,77	Grise	Non fluorescente	Jaune pale
T_6	0,92	Grise	Non fluorescente	Jaune pale
T_7	0,98	Invisible	Invisible	Mauve

III.5.2. Chromatographie sur couche mince de l'extrait aqueux hexane et ses fractions chromatographiques actives

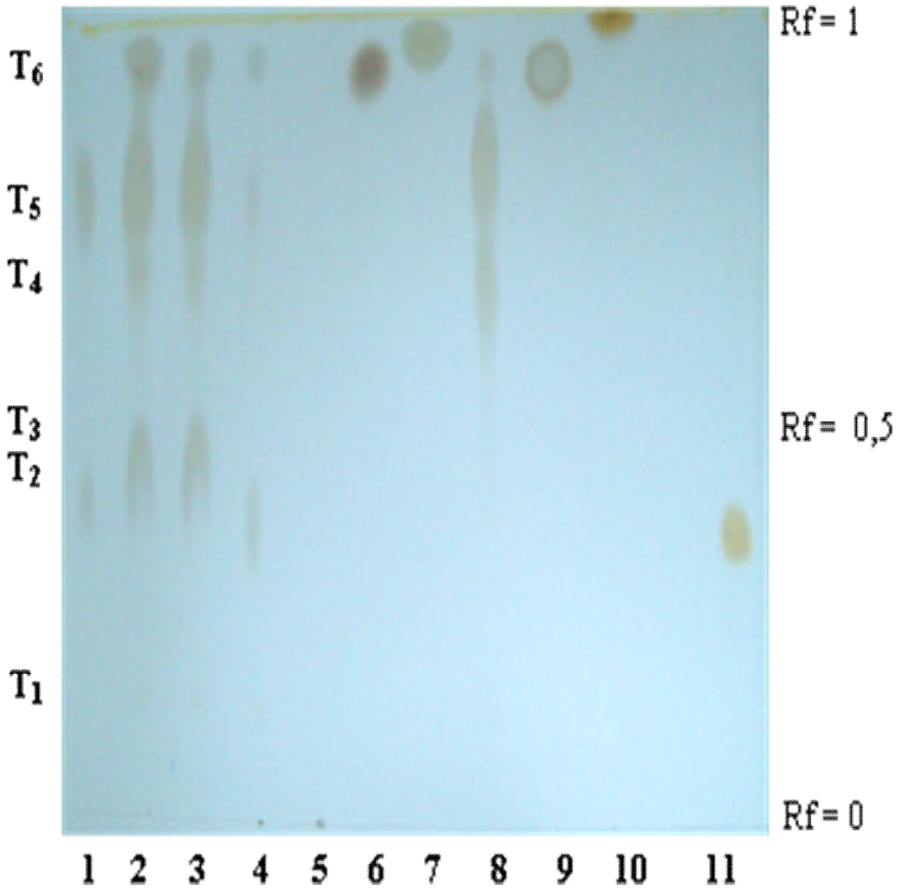


Figure 31. Chromatogramme de l'extrait aqueux d'hexane de feuilles de *P. lentiscus*, de fractions issues du fractionnement sur colonne et de quelques standards, à la lumière du jour avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H_2O). **1**) Extrait aqueux d'hexane. **2**) F_1. **3**) F_2. **4**) F_3. **5**) F_4. 6) Acide gallique. **7**) Acide caféique. **8**) Acide tannique. **9**) Catéchine. **10**) Quercétine. **11)** Rutine.

Ce système a donné une séparation des extraits et des fractions dont les chromatogrammes à la lumière du jour (Fig.30) révèlent deux taches communes (T_2 et T_5) entre l'extrait hexane et ses trois premières fractions chromatographiques, tandis que la fraction F_4 ne partage avec eux aucune tache. La différence dans la composition pourrait donc résider au niveau des composés n'ayant pas migré.

Les fractions F_1 et F_2 apparaît en manifestant cinq taches (T_1, T_2, T_4, T_5 et T_6), suivi par la fraction F_3 avec trois taches au même niveau de T_2, T_5 et T_6 issues de l'extrait aqueux d'hexane. Les taches T_1, T_4 et T_6 n'ont pas été mise en évidence au niveau de l'extrait aqueux d'hexane, ceci pourrait s'expliquer par leur présence en très faible concentration et que le fractionnement a permis de les concentrer. Les deux dernières taches (T_5 et T_6) qui caractérisent l'extrait aqueux d'hexane et ses trois premières fractions

ayant le même profil chromatographique (R_f, couleur sous UV et après révélation à la vanilline) que ceux des dérivés de l'acide tannique (tableau VIII), suggérant leur appartenance à cette famille de composés. En effet, Romani *et al.* (2002) ont estimé la teneur en tannins hydrolysables de 70% des composés phénoliques totaux, au niveau des feuilles de *P. lentiscus*. En plus de contenir des flavonols glycosylés, la myricétine et la quercétine, les feuilles de *P. lentiscus* contiennent de grandes quantités d'acide gallique et de dérivés galloyles (Romani *et al.*, 2002 ; Ljubuncic *et al.*, 2005).

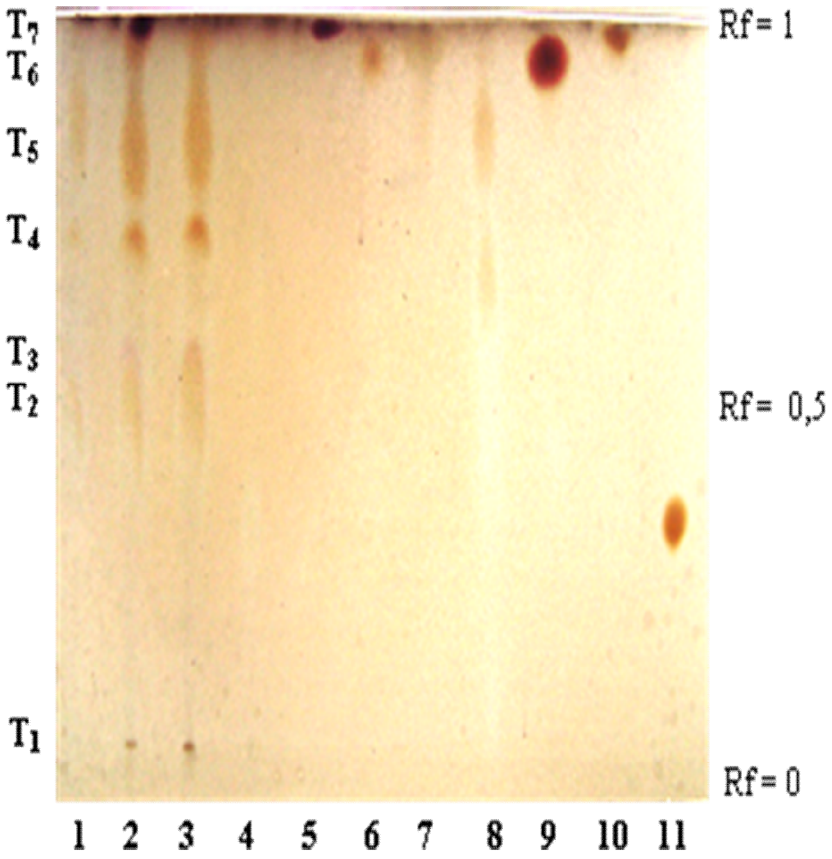


Figure 32. Chromatogramme de l'extrait aqueux d'hexane de feuilles de *P. lentiscus*, de fractions issues du fractionnement sur colonne et de quelques standards, révélés par la vanilline sulfurique avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H_2O). **1**) Extrait aqueux d'hexane. **2**) F_1. **3**) F_2. **4**) F_3. **5**) F_4. 6) Acide gallique. **7**) Acide caféique. **8**) Acide tannique. **9**) Catéchine. **10**) Quercétine. **11)** Rutine.

La révélation avec la vanilline sulfurique (Fig.31) des chromatogrammes des extraits de feuilles de *P. lentiscus* a permis de mettre en évidence d'autres composés qui ne sont pas visibles à la lumière du jour qui apparaissent sous différentes couleurs (tableau XIV). La figure précédente révèle la présence de huit taches ayant des couleurs différentes, concentrées en majorité dans l'extrait éthanolique et aqueux d'acétate d'éthyle.

L'extrait aqueux d'hexane et ses fractions ont exprimé avec ce révélateur des fractions bien distinctes de celles révélées à la lumière du jour et ils ont confirmé leur richesse en divers composés phénoliques. Comme nous l'avons signalé précédemment, la tache (T_6) pourrait correspondre à l'acide gallique. En effet, ce dernier est déjà mis en évidence au niveau des extraits organiques de cette plante (Topçu *et al.*, 2007). Quant aux taches (T_3 et T_7), elles correspondraient aux triterpènes car elles sont caractérisées par une couleur bleue violette similaires aux propriétés des triterpènes (Dohou *et al.*, 2004), conformément aux données de Assimopoulou *et al.* (2005) et Topçu *et al.* (2007), qui rapportent la présence d'autres composés tels que certaines résines (triterpènes) au niveau des feuilles de *P. lentiscus*.

La tache T_1 répartie entre les deux premières fractions (F_1 et F_2) est supposée correspondre à des formes complexes de composés phénoliques de haut poids moléculaire qui n'ont pas pu être éluées par ce système. La différence dans l'activité pourrait être due à des composés non séparés ou non révélés sous UV et par la vanilline. Les différentes caractéristiques, couleur à la lumière du jour, R_f et révélation avec la vanilline sulfurique sont rassemblés dans le tableau XIV.

Tableau XIV. Caractéristiques des taches de l'extrait aqueux d'hexane et ses fractions chromatographiques

Taches	Rapports frontaux	Observation à la lumière du jour	Observation sous UV	Révélation par la vanilline sulfurique
$T_{1.}$	0,08	Grise	Invisible	Marron
T_2	0,53	Grise	Non fluorescente	Jaune pale
T_3	0,59	Invisible	Non fluorescente	Mauve
T_4	0,71	Grise	Noire	Jaune orange
T_5	0,84	Grise	Non fluorescente	Jaune pale
T_6	0,95	Grise	Non fluorescente	Jaune pale
T_7	0,98	Invisible	Nnvisible	Mauve

Nous avons pu voir dans la partie bibliographique que les plantes du genre *P. lentiscus* sont connues pour leur richesse en composés phénoliques; la quercétine 3-glucoside, sans compter les dérivés d'acide gallique et de galloyls, anthocyanines et des flavonoïdes glycosides, à savoir la myricétine et la quercétine glycoside (Topçu *et al.,* 2007).

Bien que les tannins ne soient pas trouvés dans les extraits analysés sur la ligne de dépôt, leur présence peut être soupçonnée dans les extraits éthanolique et acétate d'éthyle. L'observation des plaques CCM sous UV n'a pas permis de mettre en évidence des quantités détectables d'autres composés phénoliques dans les extraits étudiés.

L'isolement de molécules à partir des extraits de *P. lentiscus* s'est avéré particulièrement difficile en raison de la présence de tannins dans ces derniers. Ces composés présentent de larges gammes de polarité et de poids moléculaires, ce qui rend l'isolement de molécules pures extrêmement délicat. Par conséquent, le travail préliminaire à l'étude des composés de cette plante a consisté à tester de nombreuses méthodes chromatographiques en association avec divers systèmes de solvants, afin de mettre au point un système de fractionnement permettant la séparation des tannins des autres composés de l'extrait.

- Toutes les taches observées ont des rapports frontaux différents, ce qui indique que les composés migrent à des vitesses différentes dépendantes de la polarité de la phase mobile et le poids moléculaire des composés (Diallo *et al.,* 2004).
- Notons toutefois qu'un résultat négatif, obtenu pour un extrait donné, ne doit pas exclure la présence de cette substance dans cet extrait. En effet, la concentration de ces substances est peut être très faible pour que l'on puisse détecter leurs présence sur plaque CCM.
- La différence dans la composition et dans l'activité pourrait donc résider au niveau de la nature des composés restés au point de dépôt (non séparés) ou non révélés sous UV et/ou à la vanilline.

Au fil des deux analyses chromatographiques des extraits de feuilles, il est clair que cette partie de la plante est une source intéressante de molécules à propriétés antibactériennes.

Conclusion

L'émergence récente de la résistance aux antibiotiques à travers toutes les souches bactériennes pathogènes a profondément troublé le milieu médical exprimant un besoin urgent pour de nouvelles classes d'antibiotiques. C'est pourquoi l'investigation pharmacologique des plantes médicinales traditionnelles reste importante pour offrir des bases scientifiques pour l'usage traditionnel des plantes et fournir à la société de nouvelles sources de médicaments sains et efficaces. Les objectifs visés par ce travail sont l'évaluation qualitative et quantitative des extraits et fractions chromatographiques de *P. lentiscus* et la caractérisation partielle des extraits et fractions à activité antibactérienne.

La méthode d'extraction adoptée vise à extraire et à sélectionner les composés phénoliques à partir des deux parties de *P. lentiscus* et elle a permis de retenir sept extraits à partir des feuilles et cinq extraits pour les fruits. Les résultats du dosage des composés phénoliques contenus dans ces différents extraits ont révélé des teneurs considérables en polyphénols avec des quantités appréciables en phénols totaux, tannins et flavonoïdes dans les extraits de feuilles.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits et fractions chromatographiques de *P. lentiscus* à différentes concentrations contre les souches testées (*S. aureus B. subtilis*, *L. innocua*, *P. aeruginosa*, *E. coli* et *K. pneumoniae*) ont révélé que les extraits aqueux des feuilles (aqueux chloroforme et aqueux hexane) ainsi que leurs fractions respectives possèdent un effet inhibiteur très intéressant en raison de leur teneur en composés phénoliques**,** avec des valeurs (CMI , CMB) supérieures même à celles des standards utilisés ($P<0,05$). D'autre part, les extraits des fruits et leurs fractions chromatographiques ont manifesté aussi des effets relativement importants, notamment contre *S. aureus* et *B. subtilis*. Par contre, aucune activité n'a été déterminée vis-à-vis des autres souches. Une stimulation de la croissance dans d'autres cas est remarquée avec les fractions de l'extrait éthanolique des fruits contre *P. aeruginosa*.

L'évaluation quantitative de cette activité par la détermination des CMI et CMB, montre que *P. aeruginosa* est l'espèce la plus sensible vis-à-vis des extraits acétate d'éthyle, aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane des feuilles avec des CMI et CMB de ≤0,1/0,3mg/ml. D'autre part, les fractions chromatographiques des feuilles ont manifesté aussi des effets relativement plus importants que leurs extraits bruts en terme de diamètre de la zone d'inhibition, notamment les extraits aqueux au niveau des trois premières fractions (F_1, F_2 et F_3) de l'extrait aqueux de chloroforme et au niveau des quatre fractions (F_1, F_2, F_3 et F_4) de

l'extrait aqueux d'hexane et les valeurs de leurs CMI sont ≤0,1mg/ml et CMB sont entre 0,2 et 0,3mg/ml contre la même espèce.

Les résultats de l'analyse chromatographique sur couche mince des extraits actifs des feuilles de *P. lentiscus* à la lumière du jour et avec la vanilline sulfurique ont confirmé leur richesse en divers composés doués d'activité antibactérienne, ce qui met en valeur leurs applications thérapeutiques en médecine traditionnelle, malgré que l'usage traditionnel de cette plante n'ait pas été essentiellement dans le but anti-infectieux. En effet, l'activité antibactérienne des extraits aqueux des feuilles et de leurs fractions chromatographiques serait probablement dû aux différents composés phénoliques; flavonoïdes et surtout aux formes complexes, notamment les tannins hydrolysables et les dérivés galloyls qui ont été rapporté par plusieurs auteurs à avoir une forte activité antibactérienne.

L'évaluation qualitative et quantitative des standards ont montré que l'acide gallique est le plus actif sur toutes les souches avec un diamètre de la zone d'inhibition le plus important sur *S. aureus* (32,7mm) et les CMI/CMB les plus faibles (≤0,1/≤0,1) sur *P. aeruginosa* suivi des valeurs de ≤0,1/0,2mg/ml contre *S. aureus* et *L. innocua*. D'autre part, l'acide tannique a montré des valeurs de CMI et CMB de ≤0,1/0,2mg/ml sur *P. aeruginosa.*

Ainsi, ces résultats indiquent que les composés isolés de *P. lentiscus* peuvent être des molécules phytopharmaceutiques d'intérêt. D'autres propriétés biologiques devraient être étudiées pour évaluer son potentiel pharmacologique et pour comprendre le mécanisme d'action de ses composés.

Il est très difficile de mettre au point des médicaments à base d'extraits de plantes si leur composition n'est pas parfaitement définie. L'aromathérapie pourrait en revanche constituer une réelle alternative dans diverses situations pathologiques. En effet, l'usage des antibiotiques doit être limité, afin de freiner le développement des résistances qui les rendent inefficaces, en médecine humaine et vétérinaire.

Plusieurs études réalisées sur les traitements traditionnels en Afrique ont fait état de problèmes similaires. Il ressort de cette analyse l'intérêt d'une standardisation des remèdes traditionnels à base de plantes, ainsi que l'urgence de leur étude toxicologiques et pharmacologiques. Enfin, l'ensemble des résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une

première étape dans la recherche de substances naturelles biologiquement actives. Des essais complémentaires seront nécessaires pour pouvoir confirmer les performances mises en évidence.

Les résultats de la présente étude donnent un aperçu général sur le potentiel antibactérien des extraits de *P. lentiscus*. Donc des études sur ces extraits méritent d'être poursuivies et les perspectives qui en résultent sont:

-Réalisation de tests complémentaires tels que les activités anti-inflammatoire et inhibition d'enzymes.

-Purification et identification de composés à activité antibactérienne à partir de *P. lentiscus* ainsi que la détermination du mode d'action de ces substances. Il serait aussi très utile de tester leur toxicité *in vivo* dans le but de mettre en place des traitements naturels de maladies infectieuses mieux tolérés.

Références bibliographiques

A

-**Abdelwahed, A.; Bouhlel, I.; Skamdrani, I.; Valenti, K.; Kadri, M.; Guiraud, P.; Steiman, R.; Mariotte, A.-M.; Gherdia, K.; Laporte, F.; Dijoux-Franca, M.-G. et Chekir-Ghedira, L. (2007).** Study of antimutagenic and antioxidant activities 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus* confirmation by microarray expression profiling. *Chemico-Biological Interactions,* **165:** 1-13.

-**Aboaba, O. O. ; Smith, S. I. et Olude, F. O. (2006).** Antibacterial Effect of Edible Plant Extract on *Escherichia coli* 0157:H7. *Pakistan Journal of Nutrition,* **5** (4): 325-327.

-**Abu-Shanab, B.; Adwan, G.; Abu-Safiya, D.; Jarrar, N. et Adwaw, K. (2004).** Antibacterial activities of some plant extracts utilized in popular medicine in Palestine. *Turk J Biol*, **28:** 99-102.

-**Achamlale, S.; Rezzonico, B. et Grignon-Dubois, M. (2009).** Rosmarinic acid from beach waste: Isolation and HPLC quantification in *Zostera detritus* from Arcachon lagoon. *Food Chemistry*, **113:** 878–883.

-**Akiyama, H. ; Fujii, K. ; Yamasaki, O. ; Oono, T. et Iwatsuki, K. (2001).** Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **48:** 487-491.

-**Akinpelu, D. A.; Aiyegoro, O. A. et Okoh, A. I. (2008).** *In vitro* antimicrobial and phytochemical properties of crude extract of stem bark of *Afzelia Africana* (Smith). *African Journal of biotechnology*, **7 (20):** 3665-3670.

-**Akowuah, G. A. ; Ismail, Z. ; Norhayati, I. et Sadikun, A. (2005).** The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food Chemistry*, **93:** 311–317.

-**Alanis, A. D.; Calzada, F.; Cervantes, J. A., Torres, J. et Ceballos, G. M. (2005).** Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, **100:** 153-157.

-**Albaladejo, R. G. ; Sebastiani, F. ; Aparicio, A. ; Buonamici, A. ; González-Martínez, S. C. et Vendramin, G. G. (2008).** Development and characterization of eight polymorphic microsatellite loci from *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae). *Molecular Ecology Resources,* **8:** 904–906.

-**Albayrak, S.; Aksoy, A.; Sagdic, O. et Hamzaoglu, E. (2010).** Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. *Food Chemistry*, **119:** 114–122.

-**Alcará**z, L. E.; Blanco, S. E.; Puig, O. N.; Tomas, F. et Ferretti, F. H. (2000). Antibacterial activity of flavonoids against méthicillin-resistant *Staphylococcus aureus* stains. *Journal of theoritical Biology*, **205:** 231-240.

-**Ali, N. A. A.; Julich, W.-D.; Kusnick, C. et Lindequist, U. (2001).** Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*, **74:** 173- 179.

-**Ali-Emmanuel, N.; Moudachirou, M.; Akakpo, A. J. et Quetin-Leclercq, J. (2002).** Activité antibactérienne *in vitro* de *Cassia alata, Lantana camara* et *Mitracarpus scaber* sur *Dermatophilus congolensis* isolés au Bénin. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays trop.,* **55:** 183- 187.

-**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.

-**Alzoreky, N.S. et Nakahara, K. (2003).** Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*, **80:** 223-230.

-**Amarti, F.; Satrani, B.; Aafi, A.; Ghanmi, M.; Farah, A.; Aberchane, M.; El Ajjouri, M.; El Antry, S. et Chaouch, A. (2008).** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytothérapie,* **6:** 342–347.

-**Amhamdi, H. ; Aouinti1, F. ; Wathelet, J. P. et Elbachiri, A. (2009).** Chemical Composition of the Essential Oil of *Pistacia lentiscus* L. from Eastern Morocco. *Rec. Nat. Prod*., **3** (2): 90-95.

-**Andriambelson, E.; Magnier, C.; Hann-Archipoff, G.; Lebostien, A.; Anton, R.; Bertz, A.; Stoclet, J. C. et Andriansitohaina, R. (1998).** Natural dietary polyphenolic compound cause endothelium-dependent vasorelaxtion in rat thoracic aorta. *The Journal of Nutrition,* **128:** 2324-2333.

-**Anandjiwala, S. ; Srinivasa, H. et Rajani, M. (2007).** Isolation and TLC Densitometric Quantification of Gallicin, Gallic Acid, Lupeol and b-Sitosterol from *Bergia suffruticosa*, a Hitherto Unexplored Plant. *Chromatographia,* **66:** 725-734.

-**Ani, V. ; Varadaraj, M. C. et Naidu, K. A. (2006).** Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.). *Eur Food Res Technol,* **224:** 109–115.

-**Aqil, F. et Ahmad, I. (2003).** Broad-spectrum antibacterial and antifungal properties of certain traditionally used Indian medicinal plants. *World Journal of Microbiology et Biotechnology*, **19:** 653–657.

-**Assimopoulou, A. N.; Zlatanos, S. N. et Papageorgiou, V. P. (2005).** Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. *Food Chemistry*, **92:** 721-727.

-**Atindehou, K. K. ; Shmid, C. ; Brun, R. ; Koné, M. W. et Traore, D. (2004).** Antitrypanosomal and antiplasmodial activity of medicinal plants from Cote d'ivoire. *Journal of Ethnopharcology*, **90** (2-3): 221-227.

-**Awadh-Ali, N. A. ; Julich, W. D. ; Kusnick, C. et Lindequist, U. (2001).** Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharcology,* **74**: 731-179.

B

-**Babayi, H. ; Kolo, I. ; Okogun, J. I. et Ijah, U. J. J. (2004).** The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. *Biokemistri,* **16** (2):106-111.

-**Bahorun, T. (1997).** Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approchement visionnement potentielle. *Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius*, Pp: 83-94.

-**Bakkali, F. ; Averbeck, S. ; Averbeck, D. et Idaomar, M. (2008).** Biological effects of essential oils–a review. *Food and Chemical Toxicology*, **46:** 446–475.

-**Balasundram, N. ; Sundram, K. et Samman, S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, **99:** 191-203.

-**Bamoniri, A.; Ebrahimabadi, A. H. ; Mazoochi, A. ; Behpour, M. ; Kashi, F. J. et Batooli, H. (2010).** Antioxidant and antimicrobial activity evaluation and essential oil analysis of *Semenovia tragioides* Boiss. from Iran. *Food Chemistry*, xxx: xxx–xxx (Article in press)

-**Bandaranayake, W. M. (2002).** Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. *Wetlands Ecology and Management*, **10:** 421–452.

-**Bandera, M. D. C. D. L. ; Traveset, A. ; Valladares, F. et Gulŕas, J. (2008).** Gender, season and habitat: Patterns of variation in photosynthetic activity, growth and fecundity in *Thymelaea velutina*. *Acta Oecologica*, **34:** 294–302.

-**Barazani, O. ; Dudai, N. et Golan-Goldhirsh, A. (2003).** Comparison of mediterranean *Pistacia lentiscus* genotypes by random amplified polymorphic DNA, chemical, and morphological analyses. *Journal of Chemical Ecology,* **8** (29): 1939-1952.

-**Barbosa, D. S. (2007).** Green Tea Polyphenolic Compounds and Human Health. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, **2:** 407–413.

-**Basile, A. ; Ferrara, L. ; Del Pezzo, M. ; Mele, G. ; Sorbo, S. ; Bassi, P. et Montesano, D. (2005).** Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *Journal of Ethnopharmacology*, **102:** 32–36.

-**Basile, A. ; Giordano, S. ; López-Sáez, J. A. et Cobianchi, R. C. (1999).** Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry*, **52**:1479-1482.

-**Basile, A.; Sorbo, S.; Giordano, S.; RIcciardi, L.; Ferrara, S.; Montesano, D.; Castaldo Cobianchi, R.; Vuotto, M. L. et Ferrara, L. (2000).** Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia*, **71:** 110-116.

-**Bassole, H. N. ; Kabore, Z. l. et Traore, A. S. (2001).** Etude des profils bactériostatiques et bactéricides d'extraits végétaux vis-à-vis de germes pathogènes impliqués dans la contamination des denrées alimentaires d'origine animale. *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, **11:** 1l3-l22.

-**Batish, D. R.; Singh, H. P.; Kohli, R. K. et Kaur, S. (2008).** Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, **256:** 2166-2174.

-**Baumer, U. ; Dietemann, P. et Koller, J. (2008).** Identification of resinous materials on 16th and 17th century reverse-glass objects by gas chromatography/mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, xxx: xxx–xxx. (Article in press).

-**Baxter, N. J. ; Lilley, T. H. ; Haslam, E. et Williamson, M. P. (1997).** Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein Repeat Result in Complexation and Precipitation. *Biochemistry*, **36:** 5566-5577.

-**Beattie, K. D. ; Raouf, R. ; Gander, L. ; May, T. W. ; Ratkowsky, Christopher, D. ; Donner, C. D. ; Gill, M. ; Grice, I. D. et Tiralongo, E. (2010).** Antibacterial metabolites from Australian macrofungi from the genus *Cortinarius. Phytochemistry*, xxx: xxx–xxx (Article in press).

-**Belemtougri, R. G. ; Constantin, B. ; Cognard, C. ; Raymond, G. et Sawadogo, L. (2006).** Effects of two medicinal plants *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) and *Diospyros mespiliformis* L. (Ebenaceae) leaf extracts on rat skeletal muscle cells in primary culture. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, **7**(1): 56-63.

-**Benchaar, C. ; Calsamiglia, S. ; Chaves, A. V. ; Fraser, G. R. ; Colombatto, D. ; McAllister, T.A. et Beauchemin, K. A. (2008).** A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Journal of Animal Feed Science and Technology*, **145:** 209-228.

-**Benhammou, N.; Alik Benkkara, 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): 022-028.

-**Benjilali, B.; Tantaoui-Elaraki, A.; Ismaïli-Alaoui, M. et Avadi, A. (1986).** Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie*, **2:** 155-167.

-**Bennick, A. (2002).** Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med*, **13** (2)**:**184-196.

-**Bernard, F. X. ; Sable, S. ; Cameron, B. ; Provost, J. ; Desnottes, J. F. ; Crouzet, J. et Blanche, F. (1997).** Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41:** 992–998.

-**Biyiti, L. F. ; Mekóo, D. J. L. ; Tamzc, V. et Zollo, P. H. A. (2004).** Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, **13:** 11-20.

-**Boban, N. ; Tonkic, M. ; Modun, D. ; Budimir, D. ; Mudnic, I. ; Davorka Sutlovic, D. ; Punda-Polic, V. et Boban, M. (2010).** Thermally treated wine retains antibacterial effects to food-born pathogens. *Food Control*, **21:** 1161–1165.

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

-Bouaoun, D.; Hilan, C.; Garabeth, F. et Sfeir, R. (2007). Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante sauvage *Prangos asperula* Boiss. *Phytothérapie*, **5:** 129–134.

-Bourkhiss, M.; Hnach, M.; Bourkhiss, B.; Ouhssine, M. et Chaouch, A. (2007). Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc. *Afrique Science*, **3** (2): 232-242.

-Boussaada, O. ; Jihène Chriaa, J. ; Nabli, R. ; Ammar, S. ; Saidana, D. ; Ali Mahjoub, M. ; Chraeif, I. ; Helal, A. N. et Mighri, Z. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of methanol extracts of *Evax pygmaea* (Asteraceae) growing wild in Tunisia. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, **24:**1289–1296.

-Bouzouita, N. ; Kachouri, F. ; Ben Halima, M. et Chaabouni, M. M. (2008). Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea. Journal de la Société Chimique de Tunisie*, **10:** 119-125.

-Brada, M. ; Bezzina, M. ; Marlier, M. ; Carlier, A. et Lognay, G. (2007). Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **11** (1): 3–7.

-Brenes, A. et Roura, E. (2010). Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*, xxx: xxx–xxx. (Article in press).

-Brijesh, S. ; Daswani, P. G. ; Tetali, P. ; Rojatkar, S. R. ; Antia, N. H. et Birdi, T. J. (2006). Studies on *Pongamia pinnata* (L.) Pierre leaves: understanding the mechanism(s) of action in infectious diarrhea. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, **7** (8): 665-674.

-Briones-Nagata, M. P. ; Martinez-Goss, M. R. et Hori, K. (2007). A comparison of the morpho-cytology and chemical composition of the two forms of the cyanobacterium, *Nostoc commune* Vauch., from the Philippines and Japan. *Journal of Applied Phycology*, **19:** 675–683.

-Brown, A. K. ; Papaemmanouil, A. ; Bhowruth, V. ; Bhatt, A. ; Dover, L. G. et Besra, G. S. (2007). Flavonoid inhibitors as novel antimycobacterial agents targeting Rv0636, a putative dehydratase enzyme involved in *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase II. *Microbiology*, **153:** 3314-3322.

-Browning, D. R. (1971). *Chromatographie*. Éd. Masson et Cie, Paris 6, Pp: 5-75.

-Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie plantes médicinales. 3éme Edition. Éd. *TEC et DOC*. Lavoisier .Paris. 1120p.

-Burger, O. ; Weiss, E. ; Sharon, N. ; Tabak, M. ; Neeman, I. et Ofek, I. (2002). Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus by a high-molecular-weight constituent of cranberry juice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **42:** 279-284.

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

-Buzzini, P. ; Turchetti, B. ; Ieri, F. ; Goretti, M. ; Branda, E. ; Mulinacci, N. et Romani, A. (2007). Catechins and proanthocyanidins: naturally occurring *O*-heterocycles with antimicrobial activity. *Top Heterocycl Chem*, **10:** 239–263.

C

-Cacace, J. E. et Mazza, G. (2001). Extraction à l'eau sulfurée des anthocyanines et d'autres composés phénoliques du cassis. *Agriculture et Agroalimentaire Canada*, Pp : 1-15.

-Cacace, J. E. et Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, **59:** 379- 389.

-Cai, Y. Z.; Sun, M.; Xing, J.; Luo, Q.; et Corke, H. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, **78:** 2872-2888.

-Caravaca, F. ; Barea, J. M. et Roldán, A. (2002). Synergistic influence of an arbuscular mycorrhizal fungus and organic amendment on *Pistacia lentiscus* L. seedlings afforested in a degraded semiarid soil. *Soil Biology et Biochemistry*, **34:** 1139-1145.

-Carson, C. F. ; Mee, B. J. et Riley, T. V. (2002). Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* **46** (6):1914–1920.

-Castillo-Juárez , I. ; Rivero-Cruz, F. ; Celis, H. et Romero, I. (2007). Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens. Journal of Ethnopharmacology,* **114:** 72–77

-Castola, V. ; Bighelli, A. et Casanova, J. (2000). Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology,* **28:** 79-88.

-Castro-Vargas, H. I.; Rodríguez-Varela, L. I. ; Ferreira, S. R. S. et Parada-Alfonso, F. (2010). Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava L.*) using supercritical carbon dioxide and co-solvents. *Journal of Supercritical Fluids,* **51:** 319–324.

-Caturla, N.; Vera-Samper, E.; Villalain, J.; Mateo, C. R. et Micol, V. (2003). The relationship between the antioxidant and antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radical Biology and Medicine,* **34:** 648–662.

-Ćetković, S. G.; Đilas, M. S.; Čanadanović-Brunet, M. J. et Tumbas T. V. (2003). Thin-layer chromatography analysis and scavenging activity of marigold (*Calendula officinalis* L.) extracts. *APTEFF,* **34:** 1–148.

-Cevallos-Casals, B. A. et Cisneros-Zevallos, L. (2010). Impact of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible seed species. *Food Chemistry,* **119:** 1485–1490.

-Chan, E. W. C. ; Lim, Y. Y. et Mohammed Omar. (2007). Antioxidant and antibacterial activity of leaves of *Etlingera* species (Zingiberaceae) in Peninsular Malaysia. *Food Chemistry,* **104:** 1586–1593.

-Chanwitheesuk, A. ; Teerawutgulrag, A. ; Kilburn, J. D. et Rakariyatham, N. (2007). Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food Chemistry,* **100:** 1044-1048.

-Charef, M. ; Yousfi, M. ; Saidi, M. et Stocker, P. (2008). Determination of the Fatty Acid Composition of Acorn (Quercus), *Pistacia lentiscus* Seeds Growing in Algeria. *J Am Oil Chem Soc,* **85:** 921–924.

-Cheynier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Society for Clinical Nutrition,* **81:** 223–229.

-Chiang, H. ; Lo, Y et Lu, F. (1994). Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophila spinulosa* (Hook) Tryon. *Journal of Enzyme Inhibition,* **8 (1)**: 61-71.

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

-Cho, Y. S. ; Schiller, N. L. ; Kahng, H. Y. et Oh, K. H. (2007). Cellular Responses and Proteomic Analysis of *Escherichia coli* Exposed to Green Tea Polyphenols. *Curr Microbiol,* **55:** 501–506.

-Cimolai, N. et Cimolai, T. (2007). The cranberry and the urinary tract. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis,* **26:** 767–776.

-Ciocan, I. D. et Băra, I. I. (2007). Plant products as antimicrobial agents. *Secţiunea Genetică şi Biologie Moleculară, Tom VIII*. Pp: 151-156.

-Correia, O. et Diaz Barradas, M. C. (2000). Ecophysiological differences between male and female plants of *Pistacia lentiscus* L. *Plant Ecology,* **149:** 131–142.

-Cortina, J. ; Green, J. J. ; Baddeley, J. A. et Watson, C. A. (2008). Root morphology and water transport of *Pistacia lentiscus* seedlings under contrasting water supply: A test of the pipe stem theory. *Environmental and Experimental Botany,* **62:** 343–350.

-Cottiglia, F.; Loy, G.; Garau, D.; Floris, C.; Casu, M.; Pompei, R. et Bonsignore, L. (2001). Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium L. Phytomedicine,* **8** (4): 302-305.

-Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. C*linical Microbiology Reviews,* **12** (4): 564-582.

-Cox, S. D. ; Mann, C. M. ; Markham, J. L. ; Bell, H. C. ; Gustafson, J. E. ; Warmington, J. R. et Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, **88:** 170–175.

-Cushnie, T. P. T. et Lamb, A. J. (2005a). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **26:** 343–356.

-Cushnie, T. P. T. et Lamb, A. J. (2005b). Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *Journal of Ethnopharmacology*, **101:** 243–248.

-Cushnie, T. P. T. et Lamb, A. J. (2006). Assessment of the antibacterial activity of galangin against 4-quinolone resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine,* **13:** 187–191.

-Cushnie, T. P. T. ; Hamilton, V. E. S. et Lamb, A. J. (2003). Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiological Research,* 158: 281–289.

-Cuvelier, C.; Dotreppe, O.; et Istasse, L. (2003). Chimie, Sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **147** (5): 315-324.

D

-Dall'Agnol, R. ; Ferraz, A. ; Bernardi, A. P. ; Albring, D. ; Nör, C. ; Sarmento, L. ; Lamb, L. ; Hass, M. ; von Poser, G. et Schapoval, E. E. S. (2003). Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine,* **10:** 511–516.

-D'Archivio, M. ; Filesi, C. ; Di Benedetto, R. ; Gargiulo, R. ; Claudio Giovannini, C. et Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, **4** (43): 348-361.

-de Billerbeck, V.-G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie,* **5:** 249–253**.**

-De Bruyne, T. ; Pieters, L. ; Deelstra, H. et Vlietinck, A. (1999). Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*, **27**: 445-459.

-Delaquis, P. J. ; Stanich, K. ; Girard, B. et Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of Dill cilandro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, **74**: 101-109.

-De León, L. ; López, M. R. et Moujir, L. (2010). Antibacterial properties of zeylasterone, a triterpenoid isolated from *Maytenus blepharodes*, against *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Research,* xxx: xxx–xxx. (Article in press).

-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.

-Dembitsky, V. M. (2005). Astonishing diversity of natural surfactants: 6. biologically active marine and terrestrial alkaloid glycosides- a review. *lipids*, **40** (9): 869–900.

-Dembitsky, V. M. (2006). Astonishing Diversity of Natural Surfactants: 7. Biologically Active Hemi- and Monoterpenoid Glycosides- a review. *Lipids,* **41** (1): 1-27.

-Dembitsky, V. M. (2008). Bioactive cyclobutane-containing alkaloids- a review. *J Nat Med,* **62:**1-33.

-Derbel, S. ; et Ghedira, K. (2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie,* **1:** 28-34.

-de Rijke, E. ; Out, P. ; Niessen, W. M. A. ; Ariese, F. ; Cees Gooijer, C. et Brinkman, U. A. T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A,* xxx: xxx–xxx. (Article in press)

-Diallo, D. ; Sanogo, R. ; Yasambou, H. ; Traoré, A. ; Coulibaly, K. et Maïga, A. (2004). Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C. R. Chimie,* **7:** 1073–1080.

-Dietrich, H. et Pour-Nikfardjam, M. S. (2009). Influence of Phenolic Compounds and Tannins on Wine-Related Microorganisms. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine.* Pp: 307-334.

-Djeridane, A. ; Yousfi, M. ; Nadjemi, B. ; Boutassouna, D. ; Stocker, P. et Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry,* **97:** 654–660.

-Dogan, Y.; Baslar, S.; Aydin, H. et Mert, H. H. (2003). A study of the soil-plant interactions of *Pistacia lentiscus* L. distributed in the western Anatolian part of Turkey. *Acta Bot. Croat.,* **62** (2): 73–88.

-Dohou, N.; Yamni, K.; Gmira, N.; et Idrissi Hassani, L. M. (2004). Étude de polyphénols des feuilles d'une endémique ibéro marocaine, *Thymelaea lythroides*. *Acta Botanica Malacitana,* **29:** 233-239.

-Duraipandiyan, V. ; Ayyanar, M. et Ignacimuthu, S. (2006). Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *BMC Complementary and Alternative Medicine,* **6** (35): 1-7.

-Duru, M. E. ; Cakir, A. ; Kordali, S. ; Zengin, H. ; Harmandar, M. ; Izumi, S. et Hirata, T. (2003). Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia,* **74:** 170–176.

E

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

-Ekouya, A. ; Itoua, B.G. ; Ouabonzi, A. et Ouamba, J.-M. (2006). Isolement du gallate de méthyle et évaluation de I'activité antibactérienne et antitumorale de quelques extraits de *Klmnedoxa gabonensis* Pierre ex Engl. *Phytothérapie,* **3:**117-120.

-El Ajjouri, M.; Satrani, B.; Ghanmi, M.; Aafi, A.; Farah, A.; Rahouti, M.; Amarti, F. et Aberchane, M. (2008). Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. et Link contre les champignons de pourriture du bois d'oeuvre. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.,* **12**(4): 345-351.

-Eldeen, I. M. S. ; Elgorashi, E. E. et Van Staden, J. (2005). Antibacterial anti-inflammatory anti-cholinesterase and mutagenic effects of extracts obtained from some trees used in South African traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology,* **102**: 457-464.

-Elizondo, A. M.; Mercado, E. C.; Rabinovitz, B. C. et Fernandez-Miyakawa, M.E. (2010). Effect of tannins on the *in vitro* growth of *Clostridium perfringens*. *Veterinary Microbiology,* xxx: xxx–xxx (Article in press).

-Eloff, J. N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica,* **64:** 711-714.

-Eloff, J. N. ; Famakin, J. O. et Katerere, D. R. P. (2005). *Combretum woodii* (Combretaceae) leaf extracts have high activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *African Journal of Biotechnology,* **4** (10): 1161-1166.

-El-Seedi, H.R.; Zahra, M.H.; Goransson, U. et Verpoorte, R. (2007). Cyclopeptide alkaloids. *Phytochem Rev,* **6:**143–165.

-Estevinho, L. ; Pereira, A. P. ; Moreira, L. ; Dias, L. G. et Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology,* **46:** 3774–3779.

F

-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. *Comptes Rendus Biologies,* **331:** 372–379.

-Farah, H. et Abdelhafid, B. (2008). Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques. Les technologies de laboratoire, 8: 20-27.

-Fernandez, A. ; Camacho, A. ; Fernandez, C. et Altarejos, J. (2000). Composition of the Essential Oils from Galls and Aerial Parts of *Pistacia lentiscus* L. *Journal Essenial Oil Research,* **12:** 19-23.

-Fisher, K. et Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. *Trends in Food Science and Technology*, **19:** 156-164.

-Figueiredo, N. L. ; de Aguiar, S. R. M. M. ; Falé, P. L. ; Ascensão, L. ; Serralheiro, M. L. M. et Lino, A. R. L. (2010). The inhibitory effect of *Plectranthus barbatus* and *Plectranthus ecklonii* leaves on the viability, glucosyltransferase activity and biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. *Food Chemistry*, **119:** 664–668.

-Frutos, P. ; Hervás, G. ; Giráldez, F. J. et Mantecón, A. R. (2004). Review. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research,* **2** (2): 191-202.

G

-Galati, G. et O'Brien, P. J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine,* **37** (3): 287–303.

-Gardeli, C. ; Papageorgiou, V. ; Mallouchos, A. ; Theodosis, K. et Komaitis, M. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus L.* and *Myrtus communis L.*: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*, **107:** 1120-1130.

-Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, **4:** 162-169.

-Goel, G. ; Puniya, A. K. ; Aguilar, C. N. et Singh, K. (2005). Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturwissenschaften,* **92:** 497–503.

-Goli, A. H. ; Barzegar, M. et Sahari, M. A. (2004). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, xxx: xxx–xxx. (Article in press).

-Gómez-Caravaca, A. M.; Gómez-Romero, M.; Arráez-Román, D.; Segura-Carretero, A. et Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* **41:**1220–1234.

-Gómez-Galera, S. ; Pelacho, A. M. ; Gené, A. ; Capell, T. et Christou, P. (2007). The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants-a review. *Plant Cell Rep,* **26:** 1689-1715.

-González-Segovia, R. ; Quintanar, J. L. ; Salinas, E. ; Ceballos-Salazar, R. ; Aviles-Jiménez, F. et Torres-López, J. (2008). Effect of the flavonoid quercetin on inflammation and lipid peroxidation induced by *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of guinea pig. *Journal of Gastroenterology,* **43:** 441–447.

-Ghosh, A. ; Das, B. K. ; Roy, A. ; Mandal, B. et Chandra, G. (2008). Antibacterial activity of some medicinal plant extracts. *J Nat Med,* **62:** 259–262.

-Gomber, C. et Saxena, S. (2007). Anti-Staphylococcal potential of *Callistemon rigidus. Central European Journal of Medicine,* **2** (1): 79–88.

-Gramza, A. et Korczak, J. (2005). Tea constituents (*Camellia sinensis L.*) as antioxidants lipid systems. *Trends in Food Science and Technology*, **16:** 351-358.

-Gravot, A. (2002). Etude de P450s impliqués dans la biosynthèse des furocoumarines chez *Ruta graveolens.* Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL): 221p.

-Guignard, J. L. (1996). Les composés phénoliques. Biochimie végétale. *Edition Masson, Paris*, Pp: 167-231.

-Guignard, J. L. (2000). Les composés aromatiques. Biochimie Végétale. *Edition Dunod.* Pp**:** 116-124.

-Gülçin, I. ; Uğuz, M. T. ; Oktay, M. ; Beydemir, S. et Küfrevioğlu, O. I. (2004). Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Clary Sage (*Salvia sclarea* L.). *Turk J Agric For*, **28:** 25-33.

-Gunawan, S.; Ismadji, S. et Ju, Y. H. (2008). Design and operation of a modified silica gel column chromatography. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, **39:** 625-633.

H

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

-Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies?. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, xxx: xxx–xxx (Article in press).

-Han, X. ; Shen, T. et Lou, H. (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance-a review. *International Journal of Molecular Sciences,* **8:** 950-988.

-Haraguchi, H.; Tanimoto, K.; Tamura, Y.; Mizutani, K. et Kinoshita, T. (1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, **48:** 125–129.

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

-Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology et Therapeutics*, **96:** 97-202.

-Hayet, E. ; Maha, M. ; Samia, A. ; Mata, M. ; Gros, P. ; Raida, H. ; Mohamed Ali, M. ; Si Mohamed, A. ; Gutmann, L. ; Mighri, Z. et Mahjoub, A. (2008). Antimicrobial, antioxidant, and antiviral activities of *Retama raetam* (Forssk.) Webb flowers growing in Tunisia. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, **24:** 2933–2940.

-Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R. et Bobilya, D. J. (2002). Flavonoids antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relatroships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13:** 572-584.

-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.

-Hijova, E. (2006). Bioavailability of chalcones-Minireview. *Bratisl Lek Listy,* **107** (3): 80-84.

-Hilan, C.; Bouaoun, D.; Aoun, J.; Sfeir, R. et Garabeth, F. (2009). Propriétés antimicrobiennes et toxicité par determination de la DL50 de l'huile essentielle de *Prangos asperula* Boissier. *Phytothérapie,* **7:** 8–14.

-Holley, R. A. et Patel, D. (2005). Improvement in shelf- life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *International Journal Food Microbilogy,* **22:** 273-292.

-Hosseinzadeh, H. ; Mirshojaeian, M. et Razavi, B. M. (2008). Antiemetic effect of *Pistacia vera L. (Pistachio)* leaves and nuts aqueous extracts in Young Chicken. *Pharmacologyonline,* **2:** 568-571.

I

-Ikigai, H. ; Nakae, T. ; Hara, Y. et Shimamura, T. (1993). Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica Biophysica Acta*, **1147:** 132–136.

-Inbar, M. ; Wink, M. et Wool, D. (2004). The evolution of host plant manipulation by insects: molecular and ecological evidence from gall-forming aphids on *Pistacia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **32:** 504–511.

-Ismail, H. I.; Chan, K. W.; Mariod, A. A. et Ismail, M. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*Cucumis melo*) methanolic extracts. *Food Chemistry*, **119:** 643–647.

J

-**Jimoh, F. O.; Adedapo, A. A. et Afolayan, A. J. (2010).** Comparison of the nutritional value and biological activities of the acetone, methanol and water extracts of the leaves of *Solanum nigrum* and *Leonotis leonorus*. *Food and Chemical Toxicology,* **48:** 964–971.

-**Ju, E. M.; Lee, S. E.; Hwang, H. J. et Kim, J. H. (2004)**. Antioxidant and anticancer activity extract from *Betula platyphylla* var. *Japonica Life Science,* **74:** 1013-1026.

K

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

-**Kähkönen, M. P.; Hopia, A. I.; Vuorela, H. J.; Rauha, J. P.; Pihlaja, K.; Kujala, T. S.; et Heinonen, M. (1999).** Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agriculture Food Chemistry,* **47:** 3954-3962.

-**Kaloustian, J.; Chevalier, J.; Mikail, C.; Martino, M.; Abou, L. et Vergnes, M.-F. (2008).** Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie,* **6:** 160–164.

-**Karou, D. ; Dicko, M. H. ; Simpore, J. et Traore, A. S. (2005).** Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*, **4** (8): 823-828.

-**Kaur, G. et Singh, R. P. (2008).** Antibacterial and membrane damaging activity of *Livistona chinensis* fruit extract. *Food and Chemical Toxicology,* **46:** 2429–2434.

-**Keita, Y.; Koné, O.; Ly, K. A. et Häkkinen V. (2004).** Étude chimique et de l'activité antibactérienne des distillats de quelques variétés de mangue de Guinée. *Comptes Rendus Chimie,* **7:** 1095-1100.

-**Kevin, R.; Paul, D.; Prenzel, G. et Glover, W. (1999).** Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry,* **66:** 401-436.

-**Khadri, A.; Neffati, M. ; Smiti, S.; Falé, P.; Lino, A. R. L.; Serralheiro, M. L. M. et Araújo, M. E. M. (2010).** Antioxidant, antiacetylcholinesterase and antimicrobial activities of *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (lemon grass) from Tunisia. *LWT - Food Science and Technology,* **43:** 331-336.

-**Khanbabaee, K. et van Ree, T. (2001).** Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.*, **18:** 641-649.

-**Kanko, C. ; El-Hadj Sawaliho, B. ; Kone, S. ; Gérard Koukoua, G. et N'Guessan, Y. T. (2004).** Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus. Comptes Rendus Chimie,* **7:** 1039–1042.

-**Khattak, S. ; Rehman, S. U. ; Shah, H. U. ; Ahmad, K. et Ahmad, M. (2005).** Biological effects of indigenous medicinal plants *Curcuma longa* and *Alpinia galangal. Fitoterapia,* **76**: 254-257.

-**Kim, T. J. ; Silva, J. L. ; Kim, M. K. et Jung, Y. S. (2010).** Enhanced antioxidant capacity and antimicrobial activity of tannic acid by thermal processing. *Food Chemistry,* **118:** 740-746.

-**Kintzios, S. E et Barberaki, M. G. (2004).** Plant that fight cancer. Edition CRC Press (Washington, Etats Unis)**.** Pp: 16-18.

-**Kita, M. et Uemura, D. (2006).** Bioactive heterocyclic alkaloids of marine origin. *Top Heterocycl Chem,* **6:** 157–179.

-**Kivrak, I.; Duru, M. E.; Öztürk, M.; Mercan, N.; Mansur Harmandar, M. et Topçu, G. (2009).** Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. *Food Chemistry,* **116:** 470–479.

-Klančnik, A. ; Piskernik, S. ; Jeršek, B. et Možina, S. S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods,* **81:** 121–126.

-Kloucek, P. ; Polesny, Z. ; Svobodova, B. ; Vlkova, E. et Kokoska, L. (2005). Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callerŕa District. *Journal of Ethnopharmacology,* **99:** 309–312.

-Kong, Y.; Fu, Y.-J.; Zu, Y.-G.; Chang, F.-R.; Chen, Y.-H.; Liu, X.-L. Stelten, J. et Schiebel, H.-M. (2010a). Cajanuslactone, a new coumarin with anti-bacterial activity from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. *Food Chemistry*, **121:** 1150–1155.

-Kong, C.-S. ; Um, Y. R. ; Lee, J. I. ; Kim, Y. A. ; Yea, S. S. et Seo, Y. (2010b). Constituents isolated from *Glehnia littoralis* suppress proliferations of human cancer cells and MMP expression in HT1080 cells. *Food Chemistry*, **120:** 385–394.

-Kordali, S.; Cakir, A.; Zengen, H.; et Duru, M. E. (2003). Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia*, **74:** 164-167.

-Kottakis, F. ; Lamari, F. ; Matragkou, Ch. ; Zachariadis, G. ; Karamanos, N. et Choli-Papadopoulou, T. (2008). Arabino-Galactan Proteins from *Pistacia lentiscus* var. chia: isolation, characterization and biological function. *Amino Acids,* **34:** 413–420.

-Kuete, V.; Metuno, R.; Ngameni, B.; Mbaveng Tsafack, A.; Ngandeu, F.; Fotso, G. W.; Bezabih, M.; Etoa, F.-X.; Ngadjui, B. T.; Abegaz, B. M. et Beng, V. P. (2007). Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Treculia obovoidea* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **112:** 531-536.

-Kuete, V.; Tabopda, T. K.; Ngameni, B. Nana, F.; Tshikalange, T. E et Ngadjui, B. T. (2010). Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of *Terminalia superba* (Combretaceae). *South African Journal of Botany*, **76:** 125–131.

-Kuete, V. ; Tangmouo, J. G. ; Penlap Beng, V. ; Ngounou, F. N. et Lontsi, D. (2006). Antimicrobial activity of the methanolic extract from the stem bark of *Tridesmostemon omphalocarpoides* (Sapotaceae). *Journal of Ethnopharmacology,* xxx: xxx–xxx (Article in press).

-Kukić, J. ; Popović, V. ; Petrović, S. ; Mucaji, P. ; Ćirić, A. ; Dejan Stojković, D. et Soković, M. (2008). Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food Chemistry,* **107:** 861–868.

-Kumar, V. P.; Chauhan, N. S.; Padh, H. et Rajani, M. (2006). Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology,* **107:** 183-188.

-Kumaraswamy, M. V.; Kavitha, H.U. et Satish, S. (2008). Antibacterial Evaluation and Phytochemical Analysis of *Betula utilis* D. Don Against Some Human Pathogenic Bacteria. *World Journal of Agricultural Sciences,* **4** (5): 661-664.

-Kunle, O. ; Okogun, J. ; Egamana, E. ; Emojevwe, E. et Shok, M. (2003). Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *Journals of Phytomedcine,* **10**: 59-61.

L

-Lacombe, A. ; Wu, V. C. H. ; Tyler, S. et Edwards, K. (2010). Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology,* **139:** 102–107.

-Laleh, G. H.; Frydoonfar, H.; Heidary, R.; Jameei, R. et Zare, S. (2006). The Effect of Light, Temperature, pH and Species on Stability of Anthocyanin Pigments in Four *Berberis* Species. *Pakistan Journal of Nutrition,* **5** (1): 90-92.

-Landete, J. M. ; Curiel, J. A. ; Rodríguez, H. ; de las Rivas, B. et Muňoz, R. (2008). Study of the inhibitory activity of phenolic compounds found in olive products and their degradation by *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Chemistry,* **107:** 320–326.

-Lapornik, B.; Prosek, M. et Wondra, A. G. (2005). Comparison of extract prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, **71:** 214-222.

-Larousse, (2001). Encyclopédie des plantes médicinales : Identification, préparations, soins. Pp: 28-31.

-Leboeuf, M. ; Cavé, A. ; Provost, J. ; Forgacs, P. et Jacquemin, H. (1982). Alcaloïdes des annonacées. XLIII: Alcaloïdes du *Xylopia frutescens* AUBL. *Plantes Médicinales et Phytothérapie,* **16 :**253-259.

-Lee, K.-W. ; Everts, H. et Beynen, A. C. (2004). Essential Oils in Broiler Nutrition**.** *International Journal of Poultry Science,* **3** (12): 738-752.

-Le Marchand, L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids–a review. *Biomedicine et Pharmacotherapy,* **56**: 296-301.

-Lentz, D. L.; Clark, A. M.; Hufford, C. D.; Meurer-Grimes, B.; Passreiter, C. M.; Cordero, J.; Ibrahim, O. et Okunade, A. L. (1998). Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **63:** 253-263.

-Lefevre, C. ; Kammerer, M. ; Le Guenic, M. ; Roussel, P. ; Alby, C. ; Linclau, O. ; Cartaud, G. ; Tainturier, D. ; Larrat, M. et Bareille, N. (2008). Le traitement des mammites cliniques de la vache laitière par des huiles essentielles. *Innovations Agronomiques*, **4:** 79-83**.**

-Lev-Yadun, S. et Gould, K. S. (2009). Role of Anthocyanins in Plant Defence. *Science, Business Media, LLC*. Pp: 22-48.

-Lindberg, L. E.; Willför, S. M. et Holmbom, B. R. (2004). Antibacterial effects of knotwood extractives on paper mill bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol,* **31:** 137–147.

-Liu, J.; Ando, R.; Shimizu, K.; Hashida, K.; **Makino, R.; Ohara, S. et Kondo, R. (2008).** Steroid 5a-reductase inhibitory activity of condensed tannins from woody plants. *The Japan Wood Research Society,* **54:** 68–75.

-Ljubuncic, P.; Song, H.; Cogan, U.; Azaizeh, H. et Bomzon, A. (2005). The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. *Journal of Ethnopharmacology,* **100:**198-204.

-Longo, L.; Scardino, A. et Vasapollo, G. (2007). Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. *Innovative Food Science and Emerging Technologies,* **8:** 360-364.

-Lopez, A. ; Hudson, J. B. et Towers, G. H. N. (2001). Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharcology,* **77**: 189-196.

-Loughlin, M. F. ; Ala'Aldeen, D. A. et Jenks, P. J. (2003). Monotherapy with mastic does not eradicate *Helicobacter pylori* infection from mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* **51:** 367-371.

-Lugasi, A.; Hovari, J.; Sagi, K. V.; et Biro, L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, **47** (4):119-125.

-Luthar, Z. (1992). Polyphenol classification and tannin content of buckwheat seeds *(Fagopyrum esculentum* Moench). *Fagopyrum,* **12:** 36-42.

M

-Macheix, J. J.; Fleuriet, A. et Jay-Allemand, C. H. (2005). Les composés phénoliques des végétaux. *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes*, Pp: 1 -31.

-Majhenič, L. ; Škerget, M. et Knez, Z. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, **104:** 1258–1268.

-Makkar, H. P. S. (2003). Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research,* **49:** 241-256.

-Maksimović, Z.; Malencié, N. D. et Kovacevié, N. (2004). Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technology*, **96** (8): 873-877.

-**Malbaša, V. R. ; Lončar, S. E. et Kolarov, A. L. (2004).** TLC analysis of some phenolic compounds in kombucha beverage. *APTEFF*, **35:** 1-280.

-**Maleš, Ž. ; Plazibat, M. ; Vundać, V. B. et Žuntar, I. (2006).** Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree–*Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Acta Pharm.,* **56:** 245–250.

-**Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C**. et **Jiménez, L**. **(2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Society for Clinical Nutrition,* **79:** 727-747.

-**Manach, C. ; Williamson, G. ; Morand, C. ; Scalbert, A. et Rémésy, C. (2005).** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Society for Clinical Nutrition,* **81:** 230–242.

-**Manthey, J. A.; Guthrie, N. et Grohmann, K. (2001).** Biological Properties of Citrus Flavonoids Pertaining to Cancer and Inflammation. *Current Medicinal Chemistry,* **8:** 135-153.

-**Marasco, E. K. et Schmidt-Dannert, C. (2007).** Biosynthesis of plant natural products and characterization of plant biosynthetic pathways in recombinant microorganisms. *Applications of Plant Metabolic Engineering*, 1–43.

-**Martínez-Luis, S. ; Pérez-Vásquez, A. et Mata, R. (2007).** Natural products with calmodulin inhibitor properties-a review. *Phytochemistry,* **68:** 1882-1903.

-**Martini, N. et Eloff, J. N. (1998).** The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology,* **62:** 255-263.

-**Mathabe, M. C. ; Nikolova, R. V. ; Lall, N. et Nyazema, N. Z. (2006).** Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa. *Journal of Ethnopharmacology,* **105:** 286–293.

-**Matkowski, A. (2008).** Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants–a review. *Biotechnology Advances,* **26:** 548–560.

-**McGraw, L. J.; Van der Merwe, D. et Eloff, J. N.(2005).** *In vitro* anthelminitic, antibacterial and cytotoxic effects of extracts plants used in South African ethnoveterinary medicine. *The Veterinary Journal,* **173:** 366-372.

-**Meral, G. et Karabay, N. Ű. (2002).** *In vitro* antibacterial activities of three *Hypericum* species from west Anatolia. *Journal of Biotechnology,* p: 6-10.

-**Min, B. R. 1.; Pinchak, W. E. 1.; Merkel, R.; Walker, S.; Tomita, G. et Anderson, R. C. (2008).** Comparative antimicrobial activity of tannin extracts from perennial plants on mastitis pathogens. *Scientific Research and Essay,* **3** (2): 66-73.

-**Mirzoeva, O. K.; Grishanin, R. N. et Calder, P. C. (1997).** Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol Res,* **152:** 239–246.

-**Mori, A.; Nishino, C.; Enoki, N. et Tawata, S. (1987).** Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry,* **26:** 2231–2234.

N

-**Naczk, M. et Shahidi, F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A,* **1054:** 95–111

-**Naczk, M. et Shahidi, F. (2006).** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis- a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41:** 1523-1542.

-**Naili, M. B. ; Alghazeer, R. O. ; Saleh, N. A. et Al-Najjar, A. Y. (2010).** Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arabian Journal of Chemistry,* **3:** 79–84.

-**Narayana, K. R.; Reddy, M. R.; Chaluvadi, M. R. et Krishna, D. R. (2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology,* **33:** 2-16.

-**Nasser, A. L. M.; Mazzolin, L. P.; Hiruma-Lima, C. A.; Santos, L. S.; Eberlin, M. N.; Monteiro de Souza Brito, A. R. et Vilegas, W. (2006).** Preparative Droplet Counter-Current Chromatography for the Separation of the New Nor-Seco-Triterpene and Pentacyclic Triterpenoids from *Qualea Parviflora. Chromatographia,* **64:** 695–699.

-**Natarajan, D.; John Britto, S.; Srinivasan, K.; Nagamurugan, N.; Mohanasundari, C. et Perumal, G. (2005).** Antibacterial activity of *Euphorbia fusiformis-A* rare medicinal herb. *Journal of Ethnopharmacology,* **102:**123-126.

-**Navarro, V. ; Villarreal, M. L. ; Rojas, G. et Lozoya, X. (1996).** Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *Journal of Ethnopharmacology,* **53:** 143-147.

-**Navarro-Garcia, V. M. ; Gonzalez, A. ; Fuentes, M. ; Aviles, M. ; Rios, M. Y. ; Zepeda, G. et Rojas, M. G. (2003).** Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology,* **87:** 85-88.

-**Nawaz, H.; Shi, J.; Mittal, G. S. et Kakuda, Y. (2006).** Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology,* **48:** 176–181.

-**Nenaah, G. (2010).** Antibacterial and antifungal activities of (beta)–carboline alkaloids of *Peganum harmala* (L) seeds and their combination effects. *Fitoterapia,* xxx: xxx–xxx. (Article in press)

-**Niemetz, R. et Gross, G.G. (2005).** Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis-a review. *Phytochemistry,* **66:** 2001–2011.

-**Nijveldt, R.; Robert, J.; Nood, E.; Danny, E. C.; Van Hoorn, P.; Boetens, G.; Klaske, V. N. et Paul, F. (2001).** Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential application. *American Journal of Clinical Nutrition,* **74:** 418-25.

-**Nikitina, V. S.; Kuz'mina, L. Y.; Melent'ev, A. I. et Shendel', G. V. (2007).** Antibacterial activity of polyphenolic compounds isolated from plants of Geraniaceae and Rosaceae families. *Applied Biochemistry and Microbiology,* **43** (6): 629–634.

-**Nostro, A.; Germano, M. P.; D'angelo, V.; Marino, A. et Cannatelli, M. A. (2000).** Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *Journal of Ethnopharmacology,* **53:** 143-147.

-**Nostro, A. ; Germano, M. P. ; D'Angelo, V. ; Marino, A. et Caunatelli, M. A. (2000).** Extraction methods bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology,* **30**: 379-384.

O

-**Ogueke, C. C.; Ogbulie, J.N.; Okoli, I.C. et Anyanwu, B. N. (2007).** Antibacterial Activities And Toxicological Potentials Of Crude Ethanolic Extracts Of *Euphorbia hirta*. *Journal of American Science,* **3** (3): 11-16.

-**Ohemeng, K. A.; Schwender, C. F.; Fu, K. P. et Barrett, J. F. (1993).** DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1). *Bioorganic et Medicinal Chemistry Letters,* **3:** 225–230.

-**Okigbo, R. N. et Ajalie, A. N. (2005).** Inhibition of some human pathogens with tropical plants extracts *Chromolaena odorata* and *Citrus aurantifolia* and some antibiotics. *International Journal of Molecular Medicines and Advance Sciences,* **1** (1): 34-40.

-**Okuda, T. (2005).** Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry,* **66:** 2012–2031.

-**Okusa, P. N.; Penge, O.; Devleechouwer, M. et Duez, P. (2007).** Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gilletii* De Wild (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology,* **112:** 476- 481.

-**Ong, K. C. et Khoo, H.-E. (1997).** Biological Effects of Myricetin-a review. *Gen. Pharmac.,* **29** (2): 121-126.

-Onslow M. W. (1920). Practical plant biochemistry. Edition the university press of Cambridge (Londres, Royaume Unis). Pp: 157- 159.

-Orhan, I.; Özcelik, B. et Şener, B. (2007). Antiviral and antimicrobial evaluation of some heterocyclic compounds from Turkish plants. *Top Heterocycl Chem*, **11:** 303-323.

-Orhan, D. D. ; Őzçelik, B. Őzgen, S. et Ergun, F. (2010). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research*, xxx: xxx–xxx. (Article in press).

-Oroojalian, F. ; Kasra-Kermanshahi, R. ; Azizi , M. et Bassami, M. R. (2010). Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. *Food Chemistry,* **120:** 765–770.

-Orzechowski, A. ; Ostaszewski, P. ; Jank, M. et Berwid, S. J. (2002). Bioactive substances of plant origin in food–impact on genomics-a review. *Reprod. Nutr. Dev.*, **42:** 461–477.

-Ostos, J. C. ; López-Garrido, R. ; Murillo, J. M. et López, R. (2008). Substitution of peat for municipal solid waste- and sewage sludge-based composts in nursery growing media: Effects on growth and nutrition of the native shrub *Pistacia lentiscus* L. *Bioresource Technology*, **99:** 1793–1800.

-Ouraïni, D. ; Agoumi, A. ; Ismaïli-Alaoui, M. ; Alaoui, K. ; Cherrah, Y. ; Alaoui, M.A. et Belabbas, M.A. (2007). Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L., comparée aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques. *Phytothérapie,* **1:** 6–14.

-Ouraïni, D.; Agoumi, A.; Ismaïli-Alaoui, M.; Alaoui, K.; Cherrah, Y.; Amrani, M. et Belabbas, M.-A. (2005). Étude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytothérapie*, **4:** 147-157.

-Őzçelik, B.; Aslan, M.; Orhan, I. et Karaoglu, T. (2005). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophylic extracts of *Pistacia vera*. *Microbiological Research*, **160:** 159-164.

-Özkan, G. ; Kuleaoan, H. ; Çelik, S. ; Göktürk, R. S. et Ünal, O. (2007). Screening of Turkish endemic *Teucrium montbretii* subsp. *pamphylicum* extracts for antioxidant and antibacterial activities. *Food Control,* **18:** 509–512.

P

-Palacio, S.; Mlilla, R. et Montserrat-Marti, G.(2005). A phonological hypothesis on the thermophilous distribution of *Pistacia lentiscus L. Journal of Flora,* **200:** 527-534.

-Paraschos, S. ; Magiatis, P. ; Mitakou, S. ; Petraki, K. ; Kalliaropoulos, A. ; Maragkoudakis, P. ; Mentis, A. ; Sgouras, D. et Skaltsounis, A. L. (2007). *In vitro* and *In vivo* Activities of Chios Mastic Gum Extracts and Constituents against *Helicobacter pylori. A*ntimicrobial *Agents and Chemotherapy*, **51** (2): 551–559.

-Park, E.-J. et Jhon, D.-Y. (2010). The antioxidant, angiotensin converting enzyme inhibition activity, and phenolic compounds of bamboo shoot extracts. *LWT - Food Science and Technology,* **43:** 655–659.

-Pass, D. M.; Foley, W. J. et Bowden, B. (1998). Vertebrate herbivory on *eucalyptus*—identification of specific feeding deterrents for common ringtail possums *(pseudocheirus peregrinus}* by bioassay-guided fractionation of *eucalyptus ovata* foliage. *Journal of Chemical Ecology,* **24** (9): 1513-1527.

-Peer, W. A. et Murphy, A. S. (2006). Flavonoids as Signal Molecules: Targets of Flavonoid Action, Pp : 239-257. *In :* The Science of Flavonoids, *The Ohio State University Columbus, Ohio, USA.*

-Pennachio, M. ; Kemp, A. S. ; Taylor, R. P. ; Wickens, K. M. et Kienow L. (2005). Interesting biological activities from plants traditionally used by Native Australians. *Journal of Ethnopharmacology*, **96:** 597-601.

-**Pesewu, G. A. ; Cutler, R. R. et Humber, D. P. (2008).** Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. *Journal of Ethnopharmacology,* **116:** 102–111.

-**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.

-**Peterson, J. et Dwyer, J. (1998).** Flavonoïds: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research,* **18** (12):1995-2018.

-**Pietta, P. G. (2000).** Flavonoids as antioxydants. *Journal of Natural Products*, **63:** 1035-1042.

-**Pincemail, J. ; Bonjean, K. ; Cayeux, K. et Defraigne, J.-O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme,* **16:** 233–239.

-**Pinelo, M.; Fabbro, D. P.; Manzocco, L.; Nunňez, M. J. et Nicoli, M. C. (2005).** Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* by products. *Food Chemistry,* **92:** 109-117.

-**Plaper, A.; Golob, M.; Hafner, I.; Oblak, M.; Solmajer, T. et Jerala, R. (2003).** Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem Biophys Res Commun,* **306:** 530–536.

-**Poklar Ulrih, N. ; Ota, A. ; Šentjurc, M. ; Kure, S. et Abram, V. (2010).** Flavonoids and cell membrane fluidity. *Food Chemistry,* **121:** 78–84.

-**Porat, Y.; Abramowitz, A. et Gazit, E. (2006).** Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism- a review. *Chem Biol Drug Des,* **67:** 27-37.

-**Proestos, C.; Boziaris, I. S.; Kapsokefalou, M. et Komaitis, M. (2008).** Natural antioxidant constituents from selected aromatic plants and their antimicrobial activity against selected pathogenic microorganisms. *Food Chemistry,* **46(2):** 151-156.

-**Proestos, C.; Boziaris, I. S.; Nychas, G. J. E.** et **Komaitis, M. (2006).** Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry***, 95:** 664-671.

-**Punitha, S. M. J.; Babu, M. M.; Sivaram, V.; Shankar, V. S.; Dhas, S. A.; Mahesh, T. C.; Immanuel, G. et Citarasu, T. (2008).** Immunostimulating influence of herbal biomedicines on nonspecific immunity in Grouper *Epinephelus tauvina* juvenile against *Vibrio harveyi* infection. *Aquacult Int,* **16:** 511–523**.**

-**Puupponen-Pimiä, R.; Nohynek, L.; Alakomi, H.-L. et Oksman-Caldentey, K.-M. (2005a).** Bioactive berry compounds-novel tools against human Pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol,* **67:** 8-**18.**

-**Puupponen-Pimiä, R.; Nohynek, L.; Alakomi, H.-L. et Oksman-Caldentey, K.-M. (2005b).** The action of berry phenolics against human intestinal pathogens. *BioFactors,* **23:** 243–251.

-**Puupponen-Pimiä, R.; Nohynek, L.; Hartmann-Schmidlin, S.; Kahkonen, M.; Heinonen, M.; Maatta-Riihinen, M. et Oksman-Caldentey, K. M. (2005c).** Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of Applied Microbiology.* **98:** 991-1000.

Q

-**Quílez, A. ; Berenguer, B. ; Gilardoni, G. ; Souccar, C. ; de Mendonça, S. ; Oliveira, L. F. S. ; Martín-Calero, M. J. et Vidari, G. (2010).** Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-*Helicobacter pylori* activities of several fractions isolated from Piper carpunya Ruiz & Pav. *Journal of Ethnopharmacology,* **128:** 583–589.

R

-**Raghavan, S. et Richards, M. P. (2006).** Comparison of solvent and microwave extracts of cranberry press cake on the inhibition of lipid oxidation in mechanically separated turkey. *Food Chemistry,* xxx: xxx–xxx. (Article in press).

-**Raghavendra, M. P.; Satish, S. et Raveesha, K. A. (2008).** *In vitro* antibacterial potential of alkaloids of *Samanea saman* (Jacq.) Merr. Against *Xanthomonas* and human pathogenic bacteria. *World Jornal of Agricultural Sciences,* **4:** 100-105.

-**Rahman, I. ; Saibal K. Biswas, S. K. et Kirkham, P. A. (2006).** Regulation of inflammation and redox signaling by dietary Polyphenols. *Biochemical pharmacology*, **72:** 1439-1452.

-**Raj Narayana, K. ; Sripal Reddy, M. ; Chaluvadi, M. R. et Krishna, D. R. (2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology,* **33:** 2-16.

-**Rangasamy, O.; Raoelison, G.; Rakotoniriana, F. E.; Cheuk, K.; Urverg-Ratsimamanga, S. ; Quetin-Leclercq, J.; Gurib-Fakim, A. et Hussein Subratty, A. (2006).** Screening for anti-infective properties of several medicinal plants of the Mauritians flora. *Journal of Ethnopharmacology,* xxx: xxx–xxx (Article in press).

-**Ranilla, L. G. ; Kwon, Y.-I. ; Emmanouil Apostolidis, E. et Shetty, K. (2010).** Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology,* **101:** 4676–4689.

-**Rauha, J. P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K. Vuorela, H. et Vuorela, P. (2000).** Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology,* **56:** 3–12.

-**Reed, J. D. (1995).** Nutritional Toxicology of Tannins and Related Polyphenols in Forage Legumes. *Journal Animal Science,* **73:** 1516-1528.

-**Reig-Armiñana, J.; Calatayud, V.; Cerveró, J.; García-Breijo, F. J.; Ibars, A. et Sanz, M. J. (2004).** Effects of ozone on the foliar histology of the mastic plant (*Pistacia lentiscus* L.). *Environmental Pollution,* **132:** 321-331.

-**Ribéreau-Gayon, P. (1968).** Notions générales sur les composés phénoliques, méthodes générales d'étude des composés phénoliques. *In :* Les composés phénoliques des végétaux. *Edition Dunod*, Pp: 1-27.

-**Richter, G. (1993).** Les composés phénoliques métabolisme des végétaux, (physiologie et biochimie), *Edition Dunod*, Pp: 331-337.

-**Robard, I. (2004).** Plantes médicinales d'outre-mer et pharmacopées : aspects juridiques, économiques et culturels. *Phytothérapie*, **1:** 16-21.

-**Robards, K.; Prenzeler, P. D.; Tucker, G.; Swatsitang, P. et Glover, W. (1999).** Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruits. *Food Chemistry,* **66:** 401-436.

-**Rodriguez-Vaquero, M. J.; Alberto, M. R. et Manca de Nadra, M. C. (2007a).** Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control,* **18:** 93-101.

-**Rodriguez-Vaquero, M. J.; Alberto, M. R. et Manca de Nadra, M. C. (2007b).** Infuence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, **18:** 587–593.

-**Rodríguez-Vaquero, M. J. ; Tomassini Serravalle, L. R. ; Manca de Nadra, M. C. et Strasser de Saad, A. M. (2010).** Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. *Food Control,* **21:** 779–785.

-**Roginsky, V. et Lissi, E. A. (2005).** Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry,* **92:** 235–254.

-**Romani, A.; Pinelli, P.; Galardi, C.; Mulinacci, N. et Tattini, M. (2002).** Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochemical Analysis,* **13:** 79-86.

S

-**Şahin, F.; Karaman, I.; Gűllűce, M.; Öğűtçű, H., Şengűl, M.; Adigűzel, A.; Ôztűrk, S. et Kotan, R. (2003).** Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hotensis L.*. *Journal of Ethnopharmacology,* **87:** 61-65.

-**Salama, H. M. H. et Marraiki, N. (2010).** Antimicrobial activity and phytochemical analyses of Polygonum aviculare L. (Polygonaceae), naturally growing in Egypt. *Saudi Journal of Biological Sciences,* **17:** 57-63.

-**Salvat, A. ; Antonacci, L.; Fortunato, R. H.; Suarez, E. Y. et Godoy, H. M. (2004).** Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. *Phytomedicine,* **11:** 230-234.

-**Šamec, D. ; Gruz, J. ; Strnad, M. ; Kremer, D. ; Kosalec, I. ; Jurišić Grubešić, R. ; Karlović, K. ; Lucic, A. et Piljac-Zˇegarac, J. (2010).** Antioxidant and antimicrobial properties of *Teucrium arduini L.* (Lamiaceae) flower and leaf infusions (*Teucrium arduini* L. antioxidant capacity). *Food and Chemical Toxicology,* **48:** 113–119.

-**Samy, R. P. et Gopalakrishnakone, P. (2008).** Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery–a review. *eCAM,* 1-12.

-**Sato, M.; Tsuchiya, H.; Akagiri, M.; Takagi, N. et Iinuma, M. (1997).** Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anticandidal chalcones. *Australian Dental Journal,* **42:** 343–346.

-**Satrani, B.; Ghanmi, M.; Farah, A.; Aafi, A.; Fougrach, H.; Bourkhiss, B.; Bousta, D. et Talbi, M. (2007).** Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux,* **146:** 85-96.

-**Scalbert, A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry,* **30:** 3875-3883.

-**Schmitt-Schillig, S.; Schaffer, S.; Weber, C. C.; Eckert, G. P. et Műller, W. E. (2005).** Flavonoids and the aging brain. *Journal of Physiology and Pharmacology,* **56** (1): 23-36.

-**Schulz, H.; Baranska, M. ; Belz, H.-H. ; Rosch, P. ; Strehle, A. M. et Popp, J. (2004).** Chemotaxonomic characterization of essential oil plants by vibrational spectroscopy measurements. *Vibrational Spectroscopy,* **35:** 81-86.

-**Seeram, N. P.; Lee, R.; Scheuller, H. S. et Heber, D. (2006).** Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. *Food Chemistry,* **97:** 1–11.

-**Shan, B.; Cai, Y.-Z.; Brooks, J. D. et Corke, H. (2007).** The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology,* **117:** 112–119.

-**Shan, B. ; Cai, Y.-Z. ; Brooks, J. D. et Corke, H. (2007).** The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology,* **117:** 112–119.

-**Shang, J.-H. ; Cai, X.-H. ; Feng, T. ; Zhao, Y.-L. ; Wang, J.-K. ; Zhang, L.-Y. ; Yan, M. et Luo, X.-D. (2010).** Pharmacological evaluation of Alstonia scholaris: Anti-inflammatory and analgesic effects. *Journal of Ethnopharmacology,* xxx: xxx–xxx. (Article in press).

-**Sharma, A.; Patel, V. K. et Ramteke, P. (2009).** Identification of vibriocidal compounds from medicinal plants using chromatographic fingerprinting. *World J Microbiol Biotechnol,* **25:** 19-25.

-**Shiota, S.; Shimizu, S.; Mizushima, T.; Ito, H.; Hatano, T.; Yoshida, T. et Tsuchiya, T. (2004).** Mechanisms of action of Corilagin and Tellimagradin I that remarkably potentiate the activity ob ß-lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiology Immunology,* **48:** 67-73.

-**Shuaibu, M. N.; Wuyep, P. T. A.; Yanagi, T. Hirayama, K.; Ichinose, A.; Tanaka, T. et Kouno, I. (2008).** Trypanocidal activity of extracts and compounds from the stem bark of *Anogeissus leiocarpus* and *Terminalia avicennoides. Parasitol Res,* **102:** 697-703.

-**Sindambiwe, J. B. ; Calomme, M. ; Cos, P. ; Totté, J. ; Pieters, L. ; Vlietinck, A. et Vanden Berghe, D. (1999).** Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. *Journal of Ethnopharcology,*. **65:** 71-77

-**Sine, J.-P. (2003)**. Séparation et analyse des biomolécules. Edition ellipses, Paris, Pp: 70-100.

-**Song, J.-H. ; Yang, T.-C. ; Chang, K.-W. ; Han, S.-K. ; Yi, H.-K. ; Jeon, J.-G. (2007).** *In vitro* effects of a fraction separated from *Polygonum cuspidatum* root on the viability, in suspension and biofilms, and biofilm formation of mutans streptococci. *Journal of Ethnopharmacology*, **112:** 419–425.

-**Sousa, A.; Ferreira, I. C. F. R.; Calhelha, R.; Andrade, P. B. ; Valentão, P. ; Seabra, R. ; Estevinho, L. ; Bento, A. et Pereira, J. A. (2006).** Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives 'alcaparra'. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **14:** 8533-8538.

-**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.

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

-**Sqalli, H.; El ouarti, A.; Ennabili, A.; Ibnsouda, S.; Farah, A.; Haggoud, A.; Houari, A. et Iraqui, M. (2007).** Évaluation de l'effet antimycobactérien de plantes du centre-nord du Maroc. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux,* **146:** 271-288.

-**Skerget, M.; Kotnik, P.; Hadolin, M.; Hras, A. R.; Simonic, M et Knez, Z. (2005).** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Journal of Food Chemistry*, **89:** 191-198.

-**Stapleton, P. D.; Shah, S.; Hamilton-Miller, J. M. T. Hara, Y.; Nagaoka, Y.; Kumagai, A.; Uesato, S. et Taylor, P. W. (2004).** Anti- *Staphylococcus aureus* activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-*O*-acyl-catechins. *International Journal of Antimicrobial Agents,* **24:** 374–380.

-**Stepanović, S.; Antić, N.; Dakić, I. et Švabić-Vlahović, M. (2003).** *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiological Research*, **158:** 353-357.

-**Stermitz, F. R.; Lorenz, P.; Tawara, J. N.; Zenewicz, L. A. et Lewis, K. (2000).** Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Applied biological sciences,* **97** (4): 1433-1437.

-**Stocker, P.; Yousfi, M.; Djerridane, O.; Perrier, J.; Amziani, R.; El Boustani, S. et Moulin, A. (2004).** Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie,* **86:** 919–925**.**

-**Svedström, U.; Vuorela, H.; Kostiainen, R; Laakso, I. et Hiltunen, R. (2006).** Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoids prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, **1112:** 103-111.

-**Sudano Roccaro, A.; Blanco, A. R.; Giuliano, F.; Rusciano, D. et Enea, V. (2004).** Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **48:** 1968–1973.

-**Sun, B.; Leandro, M. C.; de Freitas, V. et Spranger, M. I. (2006).** Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A,* **1128:** 27–38.

T

-**Taguri, T.; Tanaka, T. et Kouno, I. (2006).** Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biology Pharmacology Bulltin*, **29** (11): 2226-2235.

-**Tajkarimi, M. M. ; Ibrahim, S. A. et Cliver, D. O. (2010).** Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control,* xxx: xxx–xxx. (Article in press).

-**Tapiero, H.; Tew, K. D.; Nguyen Ba, G. et Mathé, G. (2002).** Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?. *Biomed Pharmacother,* **56:** 200-207.

-**Tepe, B. ; akpulat, H. A. ; Sokmen, M. ; Daferera, D. ; Yumrutas, O. ; Aydin, E. ; Polissiou, M. et Sokmen, A. (2006).** Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from turkey. *Food Chemistry,* **97:** 719-724.

-**Tian, F. ; Li, B. ; Ji, B. ; Yang, J. ; Zhang, G. ; Chen, Y. et Luo, Y. (2009).** Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry,* **113:** 173-179.

-**Topçu, G.; Ay.; M.; Bilici, A.; Sarikurkcu, C.; Ozoturk, M. et Ulubelen, A. (2007).** A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry,* **103:** 816-822.

-**Trabelsi, N. ; Megdiche, W. ; Ksouri, R. ; Falleh, H. ; Oueslati, S. ; Soumaya, B. ; Hajlaoui, H. et Abdelly, C. (2010).** Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT - Food Science and Technology,* **43:** 632–639.

-**Troszyńska, A. ; Narolewska, O. ; Robredo, S. ; Estrella, I. ; Hernández, T. ; Lamparski, G. et Amarowicz, R. (2010).** The effect of polysaccharides on the astringency induced by phenolic compounds. *Food Quality and Preference,* **21:** 463–469.

-**Tsao, R. et Deng, Z. (2004).** Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B,* **812:** 85–99.

-**Tsokou, A.; Georgopoulou, K.; Melliou, E.; Magiatis, P. et Tsitsa, E. (2007).** Composition and Enantiomeric Analysis of the Essential Oil of the Fruits and the Leaves of *Pistacia vera* from Greece. *Molecules,* **12:** 1233-1239.

-**Tsuchiya, H. et Iinuma, M. (2000).** Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine,* **7:** 161–165.

-**Tsuchiya, H.; Sato, M.; Miyazaki, T.; Fujiwara, S.; Tanigaki, S.; Ohyama M.; Tanaka, T. et Iinuma, M. (1996).** Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology,* **50:** 27–34.

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

U

-**Uddin, S. N.; Akond, M. A.; Mubassara, S. et Yesmin, M. N. (2008).** Antioxidant and antibacterial activities of *Trema cannabina. Scientific Research,* **3** (2): 105-108.

V

-**Vagionas, K. ; Ngassapa, O. ; Runyoro, D. ; Graikou, K. ; Gortzi, O. et Chinou, I. (2007).** Chemical analysis of edible aromatic plants growing in Tanzania. *Food Chemistry,* **105:** 1711–1717.

-**van Vuuren, S. F. (2008).** Antimicrobial activity of South African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology,* **119:** 462–472.

-**Vergé, S. ; Soulet, S. ; Lacan, F. ; Mas, T. ; Arnaudinaud, V. ; Nay, B. ; Castagnino, C. ; Delaunay, J.-C. ; Chèze, C. ; Monti, J.-P. ; Deffieux, G. ; Mérillon, J.-M. ; Nuhrich, A. et Vercauteren, J. (1999).** Les polyphenols du vin : de la chimie pour la vie. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux,* **138:** 75-90.

-**Vermerris, W. et Nicholson, R. (2006).** Phenolic compound biochemistry. 276p.

-**Vogel, H.; González, M.; Faini, F.; Razmilic, I.; Rodríguez, J.; Martín, J. S. et Urbina, F. (2005).** Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean *Haplopappus*-species known as bailahuén. *Journal of Ethnopharmacology*, **97:** 97–100.

-**Voravuthikunchai, S.; Lortheeranuwat, A.; Jeeju, W.; Sririrak, T.; Phongpaichit,S. et Supawita, T. (2004).** Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7. *Ethnopharmacology,* **94:** 49-54.

-**Voravuthikunchai, S. P. ; Sririrak, T. ; Limsuwan, S. ; Supawita, T. ; lida, T. ; et Hond, T. (2005).** Inhibitory effect of active coumpounds from *Punica granatum* on verocytotoxin production by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* **0157**:H7. *Journal of Health Science,* **51** (5):590-596.

-**Vovk, I.; Simonovska, B. et Vuorela, H. (2005).** Separation of eight selected flavan-3-ols on cellulose thin-layer chromatographic plates. *Journal of Chromatography A,* **1077:** 188-194.

W

-**Wang, Y.-C.; Hsu, H.-W. et Liao, W.-L. (2008).** Antibacterial activity of *Melastoma candidum D.* Don. LWT-*Food Science and Technology*, **41:** 1793-1798.

-**Waghorn, G. (2008).** Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology,* **147:** 116-139.

-**Watanabe, N.-A. ; Nagasu, T. ; Katsu, K. et Kitoh, K. (1987).** E-0702, a New Cephalosporin, Is Incorporated into *Escherichia coli* Cells via the *tonB*-Dependent Iron Transport System. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy Apr.,* **31** (4): 497-504.

-**Whelan, T. J. ; Gray, M. J. ; Slonecker, P. J. ; Shalliker, R. A. et Wilson, M. A. (2005).** Study of the selectivity of reversed-phase columns for the separation of polycarboxylic acids and polyphenol compounds. *Journal of Chromatography A,* **1097:** 148–156.

-**Whiteley, A. S. et Bailey, M. J. (2000).** Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. *Applied Environmental Microbiology,* **66:** 2400-2407.

-**Widsten, P. ; Heathcote, C. ; Kandelbauer, A. ; Guebitz, G. ; Nyanhongo, G. S. ; Prasetyo, E. N. et Kudanga, T. (2010).** Enzymatic surface functionalisation of lignocellulosic materials with tannins for enhancing antibacterial properties. *Process Biochemistry*, xxx: xxx–xxx (Article in press).

-**Willför, S. M. Smeds, A. I. et Holmbom, B. R. (2005).** Chromatographic analysis of lignans. *Journal of Chromatography A,* xxx: xxx–xxx. (Article in press).

-**Wong, P. Y. Y. et Kitts, D. D. (2006).** Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilandro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chemistry*, **97**: 505-515.

X

-**Xie, D. Y. et Dixon, R. A. (2005).** Proanthocyanidin biosynthesis–still more questions than answers?. *Phytochemistry,* **66:** 2127-2144.

Y

-**Yadav, J. P. ; Arya, V. ; Yadav, S. ; Panghal, M. ; Kumar, S. et Seema Dhankhar, S. (2009).** *Cassia occidentalis* L.: A review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile. *Fitoterapia,* xxx: xxx–xxx (Article in press).

-**Yamamato, H. et Ogawa, T. (2002).** Antimicrobial activity of perilla seet polyphénols against oral pathogenic bacteria. *Bioscience Biotechnology Biochemistry,* **66** (4): 921-924.

-**Yoda, Y.; Hu, Z.-Q.; Zhao, W.-H. et Shimamura, T. (2004).** Different susceptibilities of *Staphylococcus* and Gram-negative rods to epigallocatechin gallate. *J Infect Chemother,* **10:** 55-58.

-**Yoshimura, M.; Amakura, Y.; Tokuhara, M. et Yoshida, T. (2008).** Polyphenolic compounds isolated from the leaves of *Myrtus communis*. *Journal Natural Medicine*, **62:** 366-368**.**

-**Yu, H. ; Zhang, L. ; Li, L. ; Zheng, C. ; Guo, L. ; Li, W. ; Sun, P. et Qin, L. (2010).** Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research,* xxx : xxx–xxx (Article in press).

Z

-**Zhao, X. ; Sun, H. ; Hou, A. ; Zhao, Q. ; Wei, T. et Xin, W. (2005).** Antioxidant properties of two gallotannins isolated from the leaves of *Pistacia weinmannifolia*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1725:** 103-110.

-**Zaidi–Yahiaoui, R. ; Zaidi, F. et Ait Bessai, A. (2008).** Influence of gallic and tannic acids on enzymatic activity and growth of *Pectobacterium chrysanthemi* (*Dickeya chrysanthemi* bv. *chrysanthemi*). *African Journal of Biotechnology*, **7** (4): 482-486

-**Zhao, W.-H. ; Asano, N. ; Hu, Z.-Q. et Shimamura, T. (2003).** Restoration of antibacterial activity of β-lactams by epigallocatechin gallate against β-lactamase-producing species depending on location of β-lactamase. *J Pharm Pharmacol*, **55:** 735-740.

-**Zhao, W.-H.; Hu, Z.-Q.; Okubo, S.; Hara, Y. et Shimamura, T. (2001).** Mechanism of synergy between epigallacatechin gallate and β- lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **45:** 1737-1742.

-**Zhang, J. ; Shen, Q. ; Lu, J.-C. ; Li, J.-Y. ; Liu, W.-Y. ; Yang, J.-J. ; Li, J. et Xiao, K. (2010).** Phenolic compounds from the leaves of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Ijinskaja and their inhibitory activity against PTP1B. *Food Chemistry*, **119:** 1491-1496.

-**Zhang, J. D. ; Xu, Z. ; Cao, Y. B. ; Chen, H. S. ; Yan, L.; An, M. M. ; Gao, P. H. ; Wang, Y. ; Jia, X. M. et Jiang, Y. Y. (2006).** Antifungal activities and action mechanisms of compounds from *Tribulus terrestris* L. *Journal of Ethnopharmacology*, **103**: 76-84.

-**Zhang, Y.-M., Lu, Y.-J. et Rock, C. H. (2004).** The Reductase Steps of the Type II Fatty Acid Synthase as Antimicrobial Targets. *Lipids*, **39** (11): 1055-1060.

-**Zhang, Y.-M. et Rock, C. O. (2004).** Evaluation of Epigallocatechin Gallate and Related Plant Polyphenols as Inhibitors of the FabG and FabI Reductases of Bacterial Type II Fatty-acid Synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, **279** (30): 30994-31001

-**Zhou, S.-H. ; Fang, Z.-X. ; Lü, Y. ; Chen, J.-C. ; Liu, D.-H. et Ye, X.-Q. (2009).** Phenolics and antioxidant properties of bayberry (*Myrica rubra Sieb*. et Zucc.) Pomace. *Food Chemistry*, **112:** 394-399.

-**Zovko Končić, M. ; Kremer, D. ; Gruz, J. ; Strnad, M. ; Biševac, G. ; Kosalec, I. ; Šamec, D. et Piljac-Žegarac, J. (2010).** Antioxidant and antimicrobial properties of *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb. flower, leaf and stem infusions. *Food and Chemical Toxicology*, xxx: xxx-xxx (Article in press).

Annexes

Annexe I. Courbes d'étalonnage utilisées pour le calcul des taux de phénols totaux, flavonoïdes et tannins.

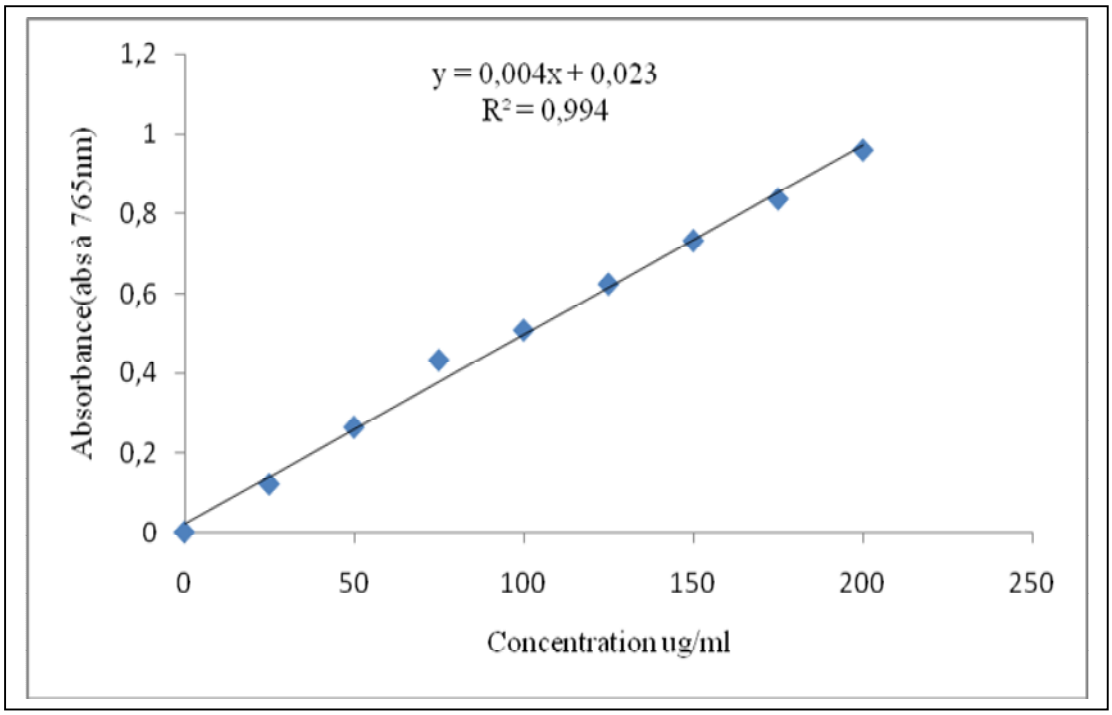


Figure 33. Courbe d'étalonnage avec la catéchine pour le dosage des phénols totaux

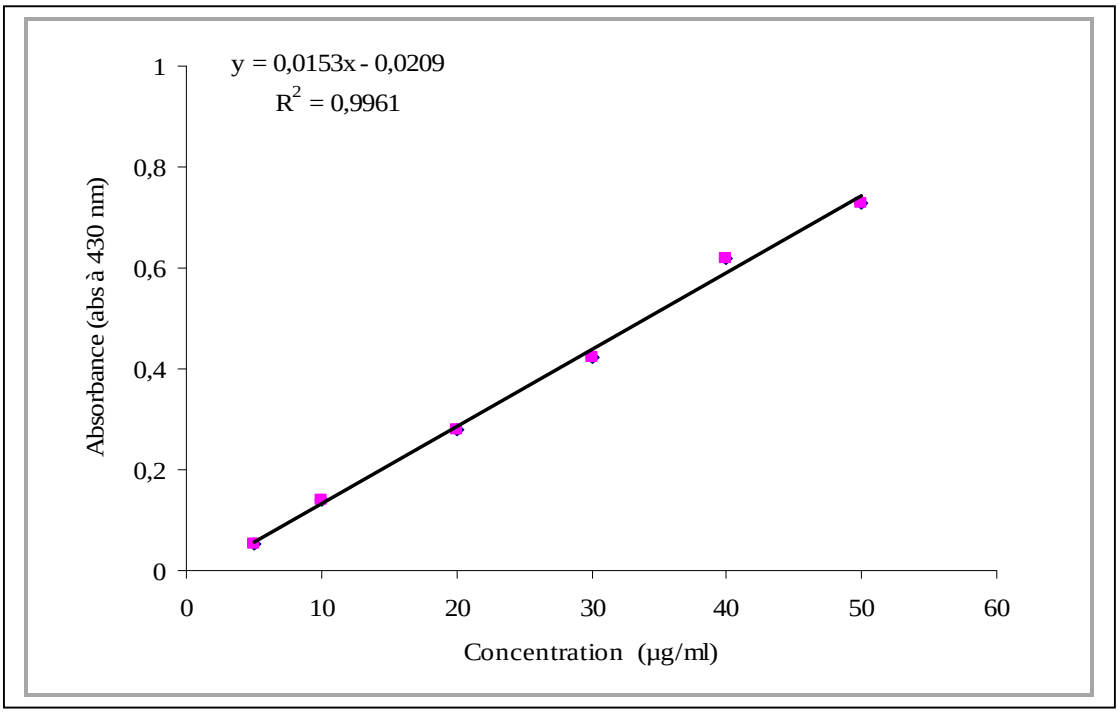


Figure 34. Courbe d'étalonnage avec la rutine pour le dosage des flavonoïdes

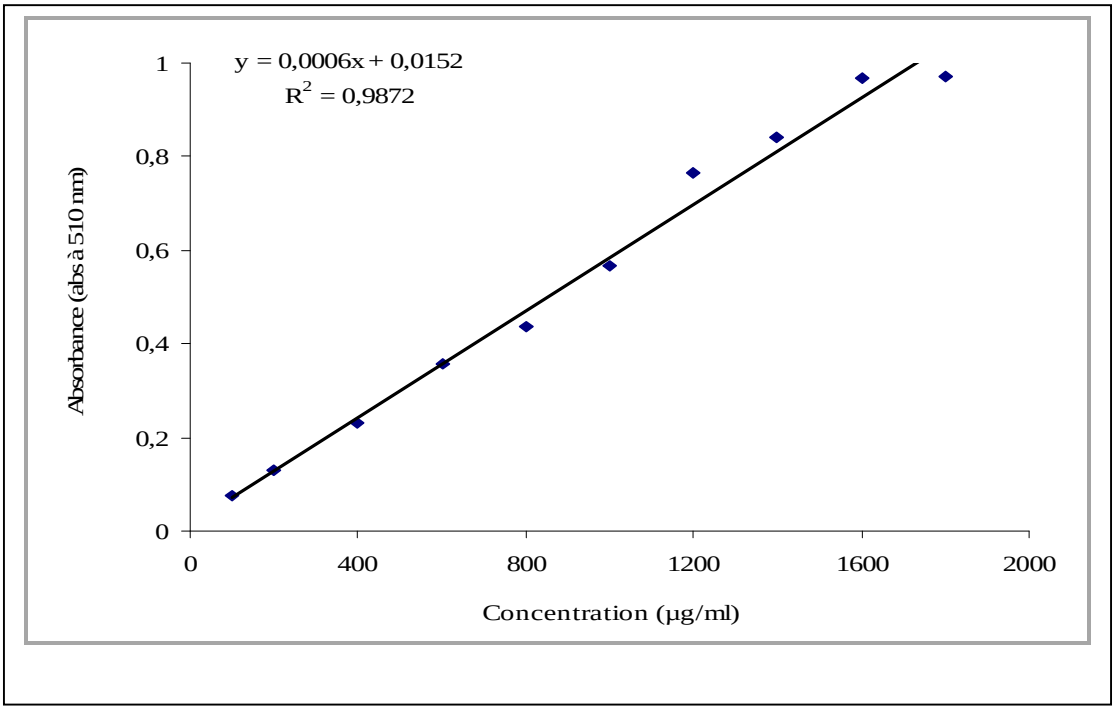


Figure 35. Courbe d'étalonnage avec l'acide tannique pour le dosage des tannins

Annexe II.

Tableau XV. Quelques caractères bactériologiques et pouvoir pathogène des souches bactériennes étudiées

Souches	Caractères bactériologiques	Pouvoir pathogène
S. aureus	Cocci à Gram$^+$ en amas, paires, aéroanaérobie	Peut être à l'origine de toxi-infections alimentaires, entérocolites aigues, syndrome de choc toxique, d'infection cutanées, sous-cutanées, muqueuses, de septicémies, staphylococcies osseuses, pleuro-pulmonaires, urogénitales, neuroméningées et l'endocardite staphylococcique.
B. subtilis	Bacille à Gram$^+$, aérobie stricte	Bactérie opportuniste qui est à l'origine de méningite, otite, mastoïdite, infection urinaire, bactériémie, pneumonie, endocardite, abcès de l'orbite, panophtalmie, kératite et iridocyclite.
L. innocua	Bacille à Gram$^+$	Non pathogène, elle a le même profile de résistance que *L. monocytogenes*
P. aeruginosa	Bacille à Gram$^-$, aérobie stricte, production de pyocyanine et de pyoverdine	Pathogène opportuniste, provoque des infections pulmonaires, urinaires, ostéo-articulaires, oculaires, O.R.L., méningées, cutanées, bactériémies, entérites à bacille pyocyanique et des endocardites.
E. coli	Coccobacille à Gram$^-$, aéroanaérobie	espèce commensale du tube digestif de l'Homme et des animaux, responsable des infections intestinales et extra-intestinales (infections urinaires, méningites néo-natales, suppurations diverses).
K. pneumoniae	Bacille à Gram$^-$, aéroanaérobie	Isolée principalement de broncho-pneumopathies aigues ou sub-aigues, mais aussi d'infections urinaires, hépato-biliaires ou de pus divers même peut provoquer des septicémies.

Tableau XVI. Diamètres des zones édités par le CFA-SFM, 2007

Antibiotiques	Abréviation	Sensible	Résistant
Pénicilline G	P (G)	≥29	<29
ampicilline	Amp	≥**19**	<**14**
Gentamycine	GEN	≥16	<14
Chloramphénicol	C	≥23	<19
Vancomycine	V	≥17	-
Ofloxacine	OFX	≥22	<16

Annexe III.

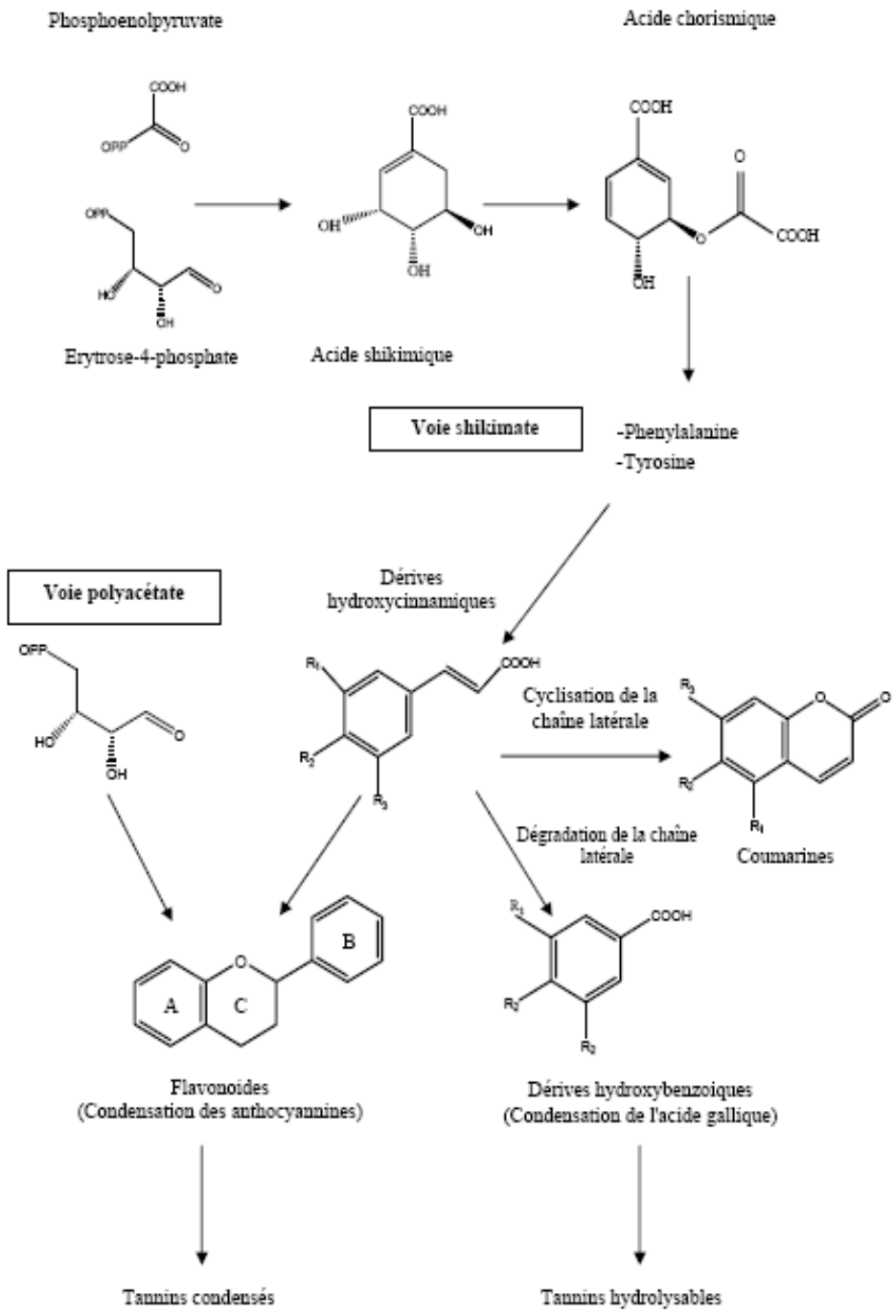


Figure 36. Voies de biosynthèse des différentes classes de composés phénoliques

Annexe IV.

Témoins négatifs

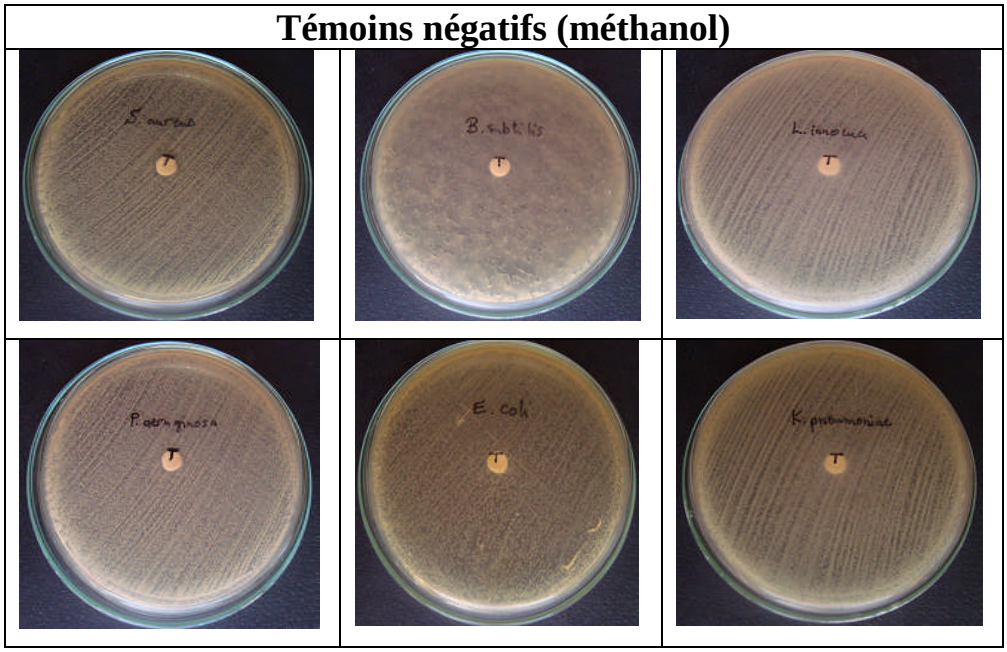
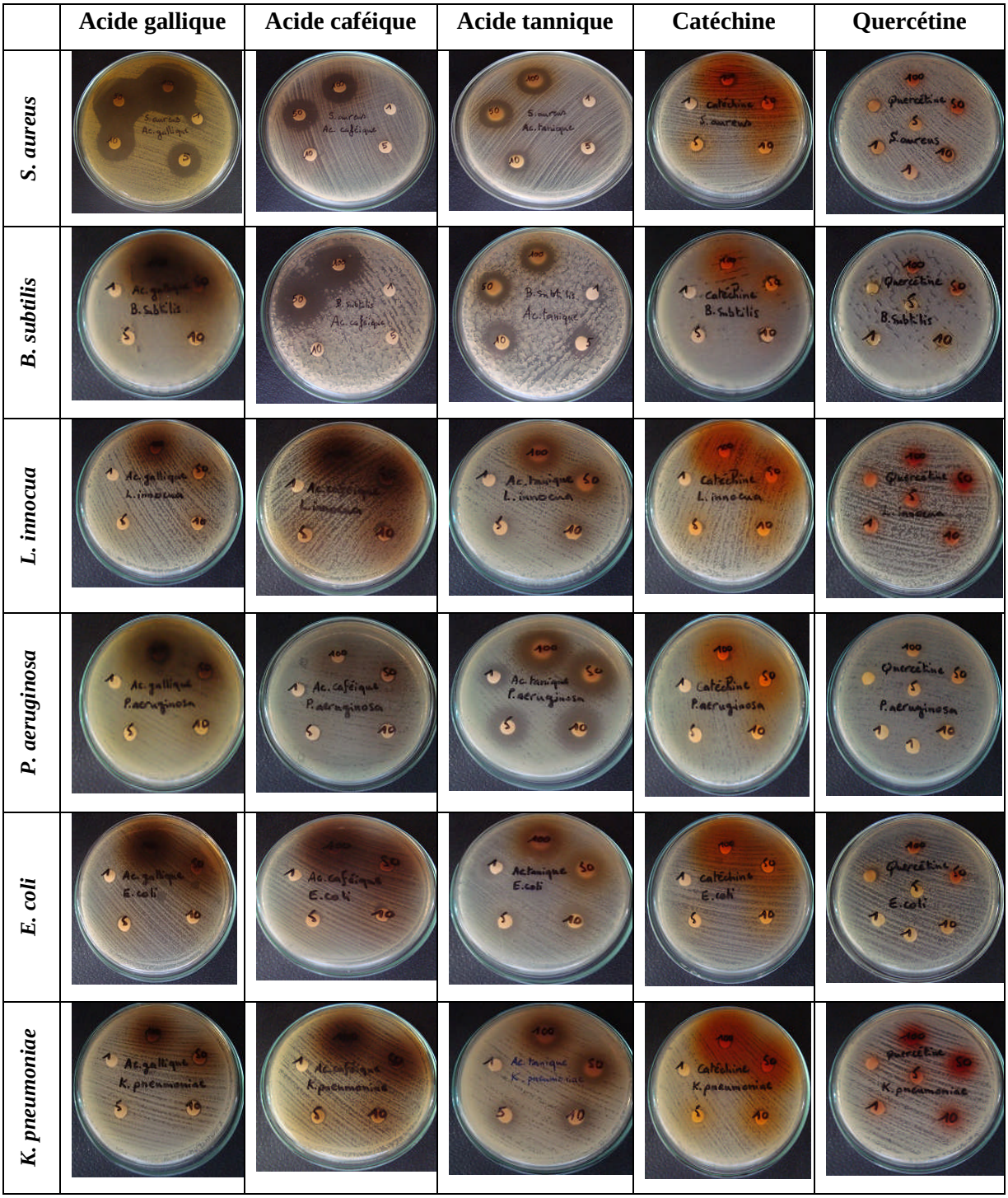


Figure 37. Témoin négatif sur *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *L. innocua*, *E. coli* et *K. pneumoniae*

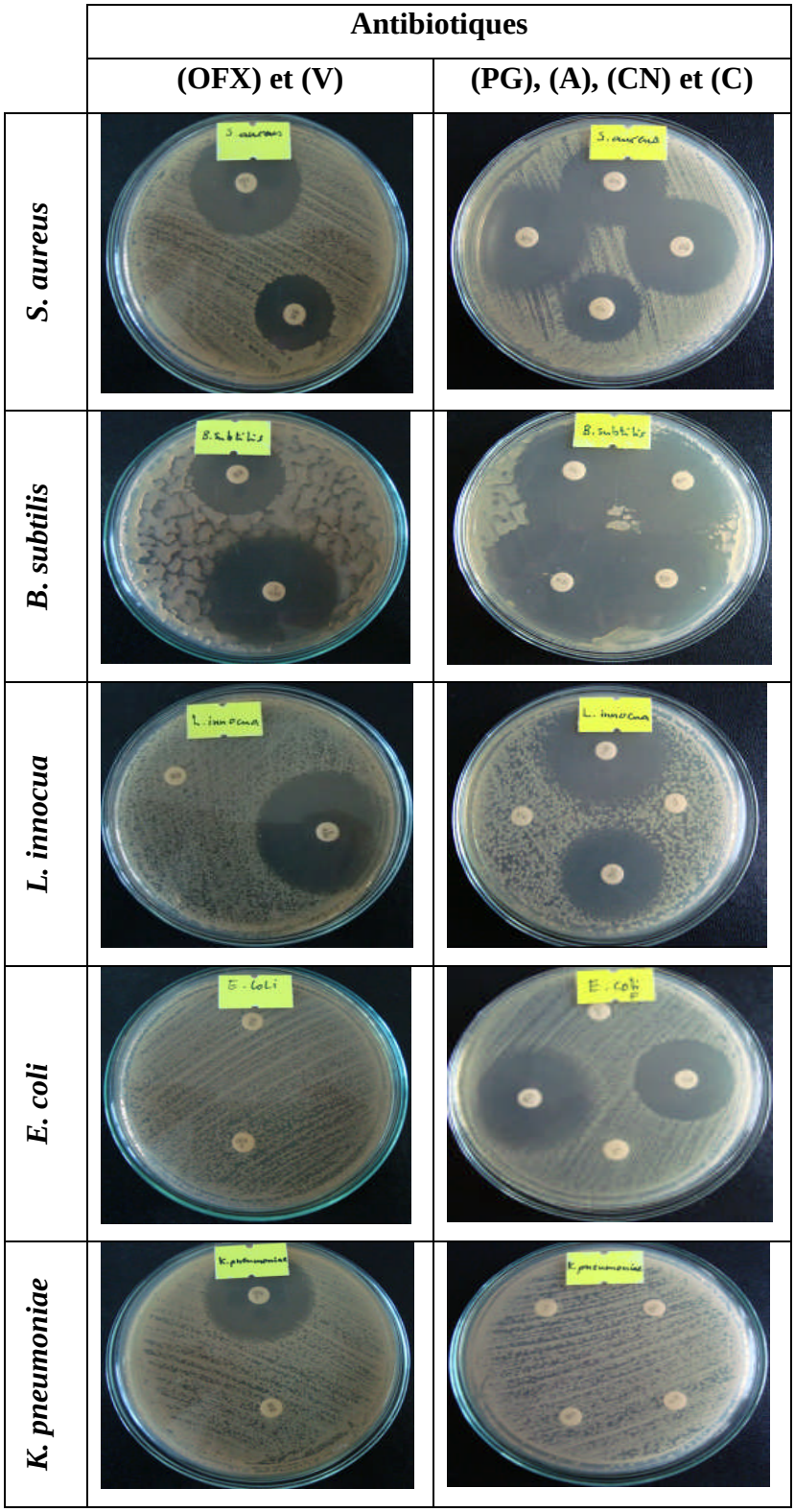
Composés phénoliques purs



1 : 0,02 mg/ disque; **5 :** 0,1 mg/ disque**; 10 :** 0,2 mg/ disque; **50 :** 1 mg/ disque**; 100 :** 2 mg/ disque

Figure 38. Activité des composés phénoliques purs sur *S. aureus, B. subtilis, P. aeruginosa, L. innocua, E. coli* et *K. pneumoniae* à différentes concentrations.

Antibiotiques (témoins positifs)



Pénicilline G: (PG); Ampicilline: (A); Vancomycine: (V); Gentamycine: (CN); Chloramphénicol: (C); Ofloxacine: (OFX)

Figure 39. Activité des antibiotiques sur *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *L. innocua*, *E. coli* et *K. pneumoniae*.

Annexe V. L'étude statistique des résultats des diamètres des zones d'inhibition

Tableau XVIIa. Activité des extraits et des fractions chromatographiques des feuilles de *P. lentiscus* sur *S. aureus* (ATCC 6538)

Extraits	Diamètre des zones d'inhibition (mm)																	
	Concentration des extraits (mg/disque)					Concentration des fractions chromatographiques (mg/disque)												
						F1:Chloroforme			F2:AcOEt/MeOH (1/1)			F3:MeOH/eau (4/ 1)			F4:Eau/A.ac(1/0,005)		
	0,02	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,1**	**0,5**	**1**	**0,1**	**0,5**	**1**	**0,1**	**0,5**	**1**	**0,1**	**0,5**	**1**
Feuilles de *P. lentiscus*																		
Eth	-/-	7,8±0,3^{c}	9,7±0,6^{g}	**19,8±0,3^{p}**	**20,3±0,6^{q}**	-/-	-/-	8,0±0,0^{c}	-/-	9,0±0,0^{e}	10,0±0,0^{gh}	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
AcOEt	-/-	8,0±0,0^{c}	10,8±0,3^{ij}	**22,7±0,6^{u}**	**23,7±0,6^{v}**	-/-	9,5±0,0^{f}	10,0±0,0^{gh}	8,0±0,0^{c}	10,8±0,3^{ij}	**12,2±0,3^{k}**	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq-AcOEt	-/-	-/-	-/-	**18,0±0,0^{n}**	**19,3±0,0^{o}**	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	9,0±0,0^{e}	8,0±0,0^{c}	-/-	-/-	8,5±0,0^{d}	-/-	-/-
Chl	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	10,0±0,0^{gh}	8,0±0,0^{c}	-/-	-/-	-/-	10,2±0,3^{h}	8,0±0,0^{c}	-/-	-/-
Aq- Chl	-/-	-/-	**15,8±0,3^{l}**	**16,0±0,0^{l}**	**21,8±0,3st**	**20,7±0,6^{qr}**	**21,7±0,3^{s}**	**15,7±0,6^{l}**	-/-	9,8±0,3^{g}	**15,7±0,0^{l}**	**24,0±0,0^{v}**	**21,7±0,6^{s}**	**16,0±0,0^{l}**	-/-	-/-	-/-
Hex	-/-	-/-	-/-	8,0±0,0^{c}	8,0±0,0^{c}	8,2±0,3^{cd}	8,3±0,3^{d}	-/-	-/-	9,2±0,3^{e}	10,0±0,0^{gh}	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Hex	-/-	-/-	**17,0±0,0^{m}**	**17,8±0,3^{n}**	**21,7±0,6^{s}**	**19,2±0,3^{o}**	**21,0±0,0^{r}**	**22,2±0,3^{t}**	11,2±0,3^{j}	**25,0±0,0^{w}**	**26,3±0,6^{x}**	-/-	11,0±0,0^{j}	**21,0±0,0^{r}**	**16,0±0,0^{l}**	-/-	**25,0±0,0^{w}**

Composés phénoliques purs																					
Acide gallique						**Acide caféique**					**Acide tannique**					**Catéchine**				
0,02	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,02**	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,02**	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,02**	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**
10,0±0,0^{gh}	16,7±0,6^{m}	20,3±0,6^{q}	30,3±0,6^{y}	32,7±0,6^{z}	-/-	-/-	-/-	18,0±0,0^{n}	19,8±0,3^{p}	-/-	-/-	10,7±0,6^{i}	15,7±0,6^{l}	17,8±0,3^{n}	-/-	-/-	-/-	7,0±0,0^{b}	9,3±0,3^{ef}

Antibiotiques testés				
Pénicilline G (10µg)	**Ampicilline (10µg)**	**Gentamycine (15µg)**	**Vancomycine (30µg)**	**Chloramphénicol (30µg)**	**Ofloxacine (5µg)**
29,3±1,2	20,0±2,0	30,7±1,2	22,7±1,2	30,7±1,2	32,0±0,0

Dans le même tableau les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement, les valeurs sont classées par ordre croissant b<c<d<e<f<g<h<i<j<k<l<m<n<o<p<q<r<s<t<u<v<w<x<y<z.

-/-: Pas de zone observée.

Tableau XVIIb. Activité des extraits et des fractions chromatographiques des fruits de *P. lentiscus* sur *S. aureus* (ATCC 6538)

Extraits	**Diamètre des zones d'inhibition (mm)**																	
	Concentration des extraits (mg/disque)					**Concentration des fractions chromatographiques (mg/disque)**												
						F1:Chloroforme			**F2:AcOEt/MeOH (1/1)**			**F3:MeOH/eau (4/ 1)**			**F4:Eau/A.ac(1/0,005)**		
	0,02	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,1**	**0,5**	**1**	**0,1**	**0,5**	**1**	**0,1**	**0,5**	**1**	**0,1**	**0,5**	**1**
Fruits de *P. lentiscus*																		
Eth	7,0±0,0^{b}	8,0±0,0^{d}	8,0±0,0^{d}	9,7±0,6^{h}	**11,0±0,0^{k}**	8,0±0,0^{d}	**11,3±0,3^{k}**	**13,0±0,0^{l}**	**10,0±0,0^{i}**	**12,7±0,3^{l}**	**11,0±0,0^{k}**	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
AcOEt	8,0±0,0^{d}	7,7±0,6^{c}	8,0±0,0^{d}	8,3±0,6^{e}	**10,0±0,0^{i}**	-/-	-/-	-/-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	9,0±0,0^{f}	8,0±0,0^{d}	-/-
Aq-AcOEt	-/-	-/-	-/-	8,3±0,6^{e}	9,0±0,0^{f}	-/-	8,0±0,0^{d}	11,0±0,0^{k}	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Chl	8,0±0,0^{d}	8,0±0,0^{d}	8,0±0,0^{d}	9,0±0,0^{f}	9,0±0,0^{f}	-/-	-/-	8,0±0,0^{d}	8,2±0,3^{de}	-/-	-/-	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
Hex	7,7±0,6^{c}	8,0±0,0^{d}	8,0±0,0^{d}	9,0±0,0^{f}	9,0±0,0^{f}	-/-	-/-	-/-	8,2±0,3^{de}	-/-	-/-	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-

Composés phénoliques purs																				
Acide gallique						**Acide caféique**					**Acide tannique**					**Catéchine**				
0,02	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,02**	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,02**	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,02**	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**
10,0±0,0^{i}	16,7±0,6^{n}	20,3±0,6^{q}	30,3±0,6^{r}	32,7±0,6^{s}	-/-	-/-	-/-	18,0±0,0^{o}	19,8±0,3^{p}	-/-	-/-	10,7±0,6^{j}	15,7±0,6^{m}	17,8±0,3^{o}	-/-	-/-	-/-	7,0±0,0^{b}	9,3±0,3^{g}

Antibiotiques testés					
Pénicilline G (10µg)	**Ampicilline (10µg)**	**Gentamycine (15µg)**	**Vancomycine (30µg)**	**Chloramphénicol (30µg)**	**Ofloxacine (5µg)**
29,3±1,2	20,0±2,0	30,7±1,2	22,7±1,2	30,7±1,2	32,0±0,0

Dans le même tableau les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement, les valeurs sont classées par ordre croissant b<c<d<e<f<g<h<i<j<k<l<m<n<o<p<q<r<s.

-/-: Pas de zone observée, NT: non testé.

Tableau XVIIIa. Activité des extraits et des fractions chromatographiques des feuilles de *P. lentiscus* sur *B. subtilis* (ATCC 6633)

Extraits	Diamètre des zones d'inhibition (mm)																	
	Concentration des extraits (mg/disque)					Concentration des fractions chromatographiques (mg/disque)												
						F1:Chloroforme			F2:AcOEt/MeOH (1/1)			F3:MeOH/ eau (4/ 1)			F4:Eau/A.ac(1/ 0,005)		
	0,02	0,1	0,2	1	2	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1
Feuilles de *P. lentiscus*																		
Eth	-/-	-/-	-/-	8,0±0,0^{e}	10,0±0,0^{i}	-/-	-/-	7,3±0,6^{cd}	-/-	8,8±0,3^{g}	10,8±0,6^{j}	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
AcOEt	-/-	-/-	-/-	**10,0±0,0^{i}**	**10,0±0,0^{i}**	-/-	8,5±0,0^{f}	9,0±0,0^{g}	-/-	9,7±0,6^{h}	**11,2±0,3^{kl}**	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq-AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Chl	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	7,5±0,0^{d}	8,0±0,0^{e}	7,0±0,0^{b}	7,0±0,0^{b}	8,5±0,0^{f}	8,0±0,0^{e}	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Chl	-/-	-/-	-/-	**12,7±0,3^{m}**	**15,0±0,0^{q}**	**22,8±0,3^{x}**	**22,0±0,0^{w}**	**21,2±0,3^{v}**	**10,0±0,0^{i}**	**17,0±0,0^{s}**	**22,0±0,0^{w}**	-/-	**19,8±0,3^{u}**	**13,2±0,3^{n}**	-/-	-/-	-/-
Hex	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Hex	-/-	-/-	-/-	**12,5±0,5^{m}**	**14,7±0,6^{p}**	**18,0±0,0^{t}**	**19,8±0,3^{u}**	**13,0±0,0^{n}**	**10,0±0,0^{i}**	**17,0±0,0^{s}**	**20,0±0,0^{u}**	-/-	-/-	**14,0±0,0^{o}**	**11,0±0,0^{jk}**	**11,5±0,0^{l}**	**16,3±0,3^{r}**

Composés phénoliques purs																				
Acide gallique					Acide caféique					Acide tannique					Catéchine				
0,02	0,1	0,2	1	2	0,02	0,1	0,2	1	2	0,02	0,1	0,2	1	2	0,02	0,1	0,2	1	2
-/-	-/-	-/-	7,2±0,3^{bc}	9,7±0,6^{h}	-/-	-/-	-/-	23,7±0,6^{y}	25,7±0,6^{z}	7,0±0,0^{b}	11,3±0,3^{l}	12,7±0,6^{m}	15,0±0,0^{q}	16,7±0,6^{s}	-/-	-/-	-/-	-/-	7,5±0,0^{d}

Antibiotiques testés				
Pénicilline G (10µg)	**Ampicilline (10µg)**	**Gentamycine (15µg)**	**Vancomycine (30µg)**	**Chloramphénicol (30µg)**	**Ofloxacine (5µg)**
42,0±2,0	35,3±2,3	34,0±0,0	28,0±0,0	34,7±1,2	36,7±1,2

Dans le même tableau les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement, les valeurs sont classées par ordre croissant b<c<d<e<f<g<h<i<j<k<l<m<n<o<p<q<r<s<t<u<v<w<x<y<z.

-/-: Pas de zone observée.

Tableau XVIIIb. Activité des extraits et des fractions chromatographiques des fruits de *P. lentiscus* sur *B. subtilis* (ATCC 6633)

Extraits	Diamètre des zones d'inhibition (mm)																	
	Concentration des extraits (mg/disque)					Concentration des fractions chromatographiques (mg/disque)												
						F1:Chloroforme			F2:AcOEt/MeOH (1/1)			F3:MeOH/eau (4/ 1)			F4:Eau/A.ac(1/0,005)		
	0,02	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,1**	**0,5**	**1**	**0,1**	**0,5**	**1**	**0,1**	**0,5**	**1**	**0,1**	**0,5**	**1**
Fruits de *P. lentiscus*																		
Eth	8,3±0,6^{e}	8,0±0,0^{d}	8,0±00^{d}	**10,0±0,0^{i}**	**11,0±0,0^{k}**	8,5±0,0^{e}	7,0±0,0^{b}	7,0±0,0^{b}	7,5±0,0^{c}	7,0±0,0^{b}	7,0±0,0^{b}	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
AcOEt	8,0±0,0^{d}	8,0±0,0^{d}	8,0±00^{d}	**10,7±0,6^{j}**	**13,2±0,3^{n}**	-/-	-/-	-/-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
Aq-AcOEt	**15,0±0,0^{o}**	-/-	-/-	8,0±0,0^{d}	8,0±0,0^{d}	8,0±0,0^{d}	8,0±0,0^{d}	7,0±0,0^{b}	-/-	-/-	-/-	7,5±0,0^{c}	7,0±0,0^{b}	7,0±0,0^{b}	-/-	-/-	-/-
Chl	**10,0±0,0^{i}**	9,0±0,0^{f}	8,0±00^{d}	**10,0±0,0^{i}**	**11,0±0,0^{k}**	8,0±0,0^{d}	7,0±0,0^{b}	7,0±0,0^{b}	7.5±0,0^{c}	7.5±0,0^{c}	7.5±0,0^{c}	NT	NT	NT	-/-	-/-	-/-
Hex	8,0±0,0^{d}	8,0±0,0^{d}	8,0±00^{d}	9,3±0,6^{g}	**10,0±0,0^{i}**	8,0±0,0^{d}	7,5±0,0^{c}	7,0±0,0^{b}	7,5±0,0^{c}	7,0±0,0^{b}	8,0±0,0^{d}	NT	NT	NT	9,0±0,0^{f}	7,5±0,0^{c}	7,0±0,0^{b}

Composés phénoliques purs																				
Acide gallique					**Acide caféique**					**Acide tannique**					**Catéchine**				
0,02	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,02**	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,02**	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,02**	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**
-/-	-/-	-/-	7,2±0,3^{b}	9,7±0,6^{h}	-/-	-/-	-/-	23,7±0,6^{q}	25,7±0,6^{r}	7,0±0,0^{b}	11,3±0,3^{l}	12,7±0,6^{m}	15,0±0,0^{o}	16,7±0,6^{p}	-/-	-/-	-/-	-/-	7,5±0,0^{c}

Antibiotiques testés				
Pénicilline G (10µg)	**Ampicilline (10µg)**	**Gentamycine (15µg)**	**Vancomycine (30µg)**	**Chloramphénicol (30µg)**	**Ofloxacine (5µg)**
42,0±2,0	35,3±2,3	34,0±0,0	28,0±0,0	34,7±1,2	36,7±1,2

Dans le même tableau les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement, les valeurs sont classées par ordre croissant b<c<d<e<f<g<h<i<j<k<l<m<n<o<p<q<r.

-/-: Pas de zone observée, NT: non testé.

Tableau XIX. Activité des extraits et des fractions chromatographiques des feuilles de *P. lentiscus* sur *L. innocua* (CLIP 74915)

Extraits	Diamètre des zones d'inhibition (mm)																	
	Concentration des extraits (mg/disque)					Concentration des fractions chromatographiques (mg/disque)												
						F1:Chloroforme			F2:AcOEt/MeOH(1/1)			F3:MeOH/eau (4/ 1)			F4:Eau/A.ac (1/0,005)		
	0,02	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,1**	**0,5**	**1**	**0,1**	**0,5**	**1**	**0,1**	**0,5**	**1**	**0,1**	**0,5**	**1**
Feuilles de *P. lentiscus*																		
Eth	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	8,0±0,0^{d}	8,0±0,0^{d}	8,0±0,0^{d}	9,0±0,0^{e}	**10,0±0,0^{f}**	-/-
AcOEt	-/-	-/-	-/-	8,0±0,0^{d}	9,0±0,0^{e}	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq-AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Chl	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Chl	-/-	-/-	8,0±0,0^{d}	**10,3±0,6^{g}**	**14,7±0,6^{i}**	-/-	-/-	7,3±0,3^{c}	-/-	-/-	8,0±0,0^{d}	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Hex	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Hex	-/-	-/-	9,0±0,0^{e}	**10,3±0,6^{g}**	**14,7±0,6^{i}**	7,0±0,0^{b}	8,0±0,0^{d}	8,2±0,3^{d}	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Composés phénoliques purs

Acide gallique					Acide caféique					Acide tannique					Catéchine				
0,02	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,02**	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,02**	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**	**0,02**	**0,1**	**0,2**	**1**	**2**
-/-	-/-	-/-	7,0±0,0^{b}	8,0±0,0^{d}	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	10,0±0,0^{f}	12,0±0,0^{h}	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Antibiotiques testés

Pénicilline G (10µg)	**Ampicilline (10µg)**	**Gentamycine (15µg)**	**Vancomycine (30µg)**	**Chloramphénicol (30µg)**	**Ofloxacine (5µg)**
0,0±0,0	0,0±0,0	26,7±1,2	0,0±0,0	31,3±1,2	38,0±0,0

Dans le même tableau les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement, les valeurs sont classées par ordre croissant b<c<d<e<f<g<h<i.
-/-: Pas de zone observée.

Tableau XX. Activité des extraits et des fractions chromatographiques des feuilles de *P. lentiscus* sur *P. aeruginosa* (ATCC27853)

Extraits	Diamètre des zones d'inhibition (mm)																	
	Concentration des extraits (mg/disque)					Concentration des fractions chromatographiques (mg/disque)												
						F1:Chloroforme			F2:AcOEt/MeOH (1/1)			F3:MeOH/eau (4/ 1)			F4:Eau/A.ac(1/0,005)		
	0,02	0,1	0,2	1	2	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1
Feuilles de *P. lentiscus*																		
Eth	-/-	-/-	-/-	9,3±0,6^{d}	**10,0±0,0^{e}**	-/-	-/-	-/-	-/-	8,2±0,3^{b}	**10,0±0,0^{e}**	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
AcOEt	-/-	-/-	-/-	**11,0±1,0^{f}**	**15,0±1,0^{k}**	-/-	-/-	9,0±0,0^{c}	-/-	**11,0±0,0^{f}**	**12,3±0,3^{h}**	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq-AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Chl	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Chl	-/-	-/-	-/-	**11,7±0,6^{g}**	**15,7±0,6^{m}**	**10,2±0,3^{e}**	**15,3±0,6^{l}**	**17,0±0,0^{n}**	-/-	**13,0±0,0^{i}**	**13,7±0,3^{j}**	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Hex	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Hex	-/-	-/-	8,0±0,0^{b}	**12,3±0,3^{h}**	**17,0±0,0^{n}**	**10,2±0,3^{e}**	**12,2±0,3^{h}**	**11,2±0,3^{f}**	-/-	**15,0±0,0^{k}**	**15,0±0,0^{k}**	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Composés phénoliques purs																				
Acide gallique					Acide caféique					Acide tannique					Catéchine				
0,02	0,1	0,2	1	2	0,02	0,1	0,2	1	2	0,02	0,1	0,2	1	2	0,02	0,1	0,2	1	2
-/-	-/-	10,0±0,0^{e}	19,8±0,3^{p}	21,7±0,6^{q}	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	9,0±0,0^{c}	13,7±0,6^{j}	15,8±0,3^{m}	17,7±0,6^{o}	20,0±0,0^{p}	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Antibiotiques testés				
Pénicilline G (10µg)	**Ampicilline (10µg)**	**Gentamycine (15µg)**	**Vancomycine (30µg)**	**Chloramphénicol (30µg)**	**Ofloxacine (5µg)**
0,0±0,0	0,0±0,0	26,0±0,0	0,0±0,0	22,7±1,2	38,0±2,0

Dans le même tableau les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement, les valeurs sont classées par ordre croissant b<c<d<e<f<g<h<i<j<k<l<m<n.
-/-: Pas de zone observée.

Tableau XXI. Activité des extraits et des fractions chromatographiques des feuilles de *P. lentiscus* sur *E. coli* (NAR)

Extraits	Diamètre des zones d'inhibition (mm)																	
	Concentration des extraits (mg/disque)					Concentration des fractions chromatographiques (mg/disque)												
						F1:Chloroforme			F2:AcOEt/MeOH(1/1)			F3:MeOH/eau (4/ 1)			F4:Eau/A.ac(1/0,005)		
	0,02	0,1	0,2	1	2	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1
Feuilles de *P. lentiscus*																		
Eth	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	7,8±0,3^{d}	7,8±0,3^{d}	8,0±0,0^{d}	8,5±0,0^{e}	9,0±0,0^{f}	-/-
AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	**10,7±0,6^{i}**	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq-AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Chl	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Chl	-/-	-/-	-/-	**12,0±0,0^{l}**	**15,7±0,6^{n}**	9,0±0,0^{f}	**11,0±0,0^{j}**	**11,3±0,3^{k}**	-/-	7,3±0,3^{c}	**10,3±0,3^{h}**	9,0±0,0^{f}	8,0±0,0^{d}	7,0±0,0^{b}	7,0±0,0^{b}	7,0±0,0^{b}	7,0±0,0^{b}
Hex	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Hex	-/-	-/-	-/-	**13,0±0,0^{m}**	**16,0±0,0^{o}**	7,8±0,3^{d}	**10,0±0,0^{g}**	7,8±0,3^{d}	-/-	8,3±0,3^{e}	8,5±0,0^{e}	-/-	-/-	7,3±0,3^{c}	-/-	-/-	-/-

Composés phénoliques purs																					
Acide gallique						Acide caféique					Acide tannique					Catéchine					
0,02	0,1	0,2	1	2		0,02	0,1	0,2	1	2	0,02	0,1	0,2	1	2	0,02	0,1	0,2	1	2	
-/-	-/-	-/-	7,0±0,0^{b}	8,0±0,0^{d}		-/-	-/-	-/-	-/-	7,0±0,0^{b}	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	7,8±0,3^{d}	

Antibiotiques testés					
Pénicilline G (10µg)	**Ampicilline (10µg)**	**Gentamycine (15µg)**	**Vancomycine (30µg)**	**Chloramphénicol (30µg)**	**Ofloxacine (5µg)**
0,0±0,0	0,0±0,0	28,7±1,2	0,0±0,0	34,7±1,2	0,0±0,0

Dans le même tableau les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement, les valeurs sont classées par ordre croissant b<c<d<e<f<g<h<i<j<k<l<m<n.
-/-: Pas de zone observée.

Tableau XXII. Activité des extraits et des fractions chromatographiques des feuilles de *P. lentiscus* sur *K .pneumoniae* (E_{47})

Extraits	Diamètre des zones d'inhibition (mm)																	
	Concentration des extraits (mg/disque)					Concentration des fractions chromatographiques (mg/disque)												
						F1:Chloroforme			F2:AcOEt/MeOH(1/1)			F3:MeOH/eau(4/1)			F4:Eau/A.ac(1/0,005)		
	0,02	0,1	0,2	1	2	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1
Feuilles de *P. lentiscus*																		
Eth	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	8,0±0,0^{g}	7,0±0,0^{b}	8,0±0,0^{g}	8,0±0,0^{g}	9,0±0,0^{k}	-/-
AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	**10,0±0,0^{n}**	9,0±0,0^{k}	-/-	7,5±0,0^{e}	9,0±0,0^{k}	7,0±0,0^{b}	7,0±0,0^{b}	-/-
Aq-AcOEt	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Chl	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Chl	-/-	-/-	-/-	9,0±0,0^{k}	**12,0±0,0^{p}**	7,0±0,0^{b}	**10,3±0,3^{o}**	9,2±0,3^{l}	-/-	7,0±0,0^{b}	8,8±0,3^{j}	9,0±0,0^{k}	8,2±0,3^{h}	7,2±0,3^{c}	7,0±0,0^{b}	-/-	-/-
Hex	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Aq- Hex	-/-	-/-	-/-	9,7±0,6^{m}	**12,0±0,0^{p}**	7,0±0,0^{b}	8,3±0,3^{h}	-/-	-/-	8,3±0,3^{h}	8,2±0,3^{h}	-/-	-/-	8,0±0,0^{g}	-/-	-/-	-/-

Composés phénoliques purs																				
Acide gallique						Acide caféique					Acide tannique					Catéchine				
0,02	0,1	0,2	1	2	0,02	0,1	0,2	1	2	0,02	0,1	0,2	1	2	0,02	0,1	0,2	1	2
-/-	-/-	7,0±0,0^{b}	7,5±0,0^{e}	8,5±0,0^{i}	-/-	-/-	-/-	7,0±0,0^{b}	7,0±0,0^{b}	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	7,3±0,3^{d}	7,8±0,3^{f}	8,0±0,0^{g}

Antibiotiques testés					
Pénicilline G (10µg)	**Ampicilline (10µg)**	**Gentamycine (15µg)**	**Vancomycine (30µg)**	**Chloramphénicol (30µg)**	**Ofloxacine (5µg)**
0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	30,0±0,0

Dans le même tableau les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement, les valeurs sont classées par ordre croissant b<c<d<e<f<g<h<i<j<k<l<m<n<o.
-/-: Pas de zone observée.

Annexe VI. Composition des milieux de culture utilisés (pour 1l d'eau distillée)

PCA			***Mueller-Hinton***		
Tryptone.....	05	g	Infusion de viande de bœuf	300	g
Extrait de levure.....	2,5	g	Hydrolysât de caséine.....	17,5	g
Glucose……..	01	g	Amidon.....	1,5	g
Agar……..	15	g	Agar.....	17	g
pH	7		pH	7,4	
Giolitti contoni			***Chapman***		
Tryptone.....	10	g	Extrait de viande.....	01	g
Extrait de viande.....	05	g	Peptone de caséine.....	10	g
Extrait de levure.....	05	g	Chlorure de sodium.....	75	g
Chlorure de sodium.....	05	g	D mannitol.....	10	g
Glycine.....	20	g	Rouge de phénol.....	0,025	g
Pyruvate de sodium.....	03	g	Agar……	15	g
pH	6,9		pH	7,4	
Hektoen			***EMB***		
Proteose peptone.....	12	g	Peptone de viande.....	10	g
Extrait de levure.....	03	g	Lactose.....	10	g
Chlorure de sodium.....	05	g	Phosphate di potassique.....	02	g
Hyposulfite de sodium.....	05	g	Eosine jaunâtre.....	0,4	g
Sels biliaires.....	09	g	Bleu de méthylène.....	0,067	g
Citrate de fer ammoniacal..	1,5	g	Agar.....	13,5	g
Salicine.....	02	g	pH	7	
Lactose.....	12	g			
Saccharose.....	12	g	***Bouillon nutritif***		
Fuschine acide.....	0,04	g	Macération de viande.....	10	g
Bleu de bromothymol.....	0,064	g	Peptone trypsique.....	05	g
Agar.....	13,5	g	NaCl ou KCl.....	05	g
pH	7,6		pH	7,4	

Résumé

Cette étude a porté sur l'activité antibactérienne des extraits et des fractions chromatographiques des feuilles et des fruits de *Pistacia lentiscus*. Les différents extraits ont été analysés pour leurs teneurs en composés phénoliques ainsi que pour leur activité antibactérienne. Cette dernière a été réalisée par la méthode de diffusion sur gélose contre trois souches $Gram^+$ (*Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Bacillus subtilis* ATCC6633 et *Listeria innocua* CLIP74915) et trois souches $Gram^-$ (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Escherichia coli* NAR et *Klebsiella pneumoniae* E_{47}). D'autre part, la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) des extraits et fractions chromatographiques actifs ont été déterminées par la méthode de dilution en milieu solide.

Les résultats indiquent que les extraits de feuilles sont riches en polyphénols. D'autre part, les tests antibactériens ont montré des activités variables selon la souche bactérienne, la partie de la plante et la nature de l'extrait (organique ou aqueux) et/ou la fraction. *S. aureus* était l'espèce la plus sensible, puisque sa croissance a été inhibée par tous les extraits avec le diamètre le plus large de 23,7mm et par la majorité des fractions chromatographiques avec une zone d'inhibition la plus importante de 26,3mm, alors que *L. innocua* et *K. pneumoniae* étaient les plus résistantes.

Les résultats de la CMI et de la CMB des extraits et des fractions chromatographiques actifs ont montré que les extraits aqueux du chloroforme, aqueux d'hexane et d'acétate d'éthyle des feuilles ont été les plus actifs à l'égard de *S. aureus* (CMI: 0,2mg/ml; CMB:0,3 et 0,7mg/ml) et de *P. aeruginosa* (CMI: ≤0,1mg/ml; CMB: 0,3mg/ml). De leurs part, les fractions F_2 d'acétate d'éthyle, F_1 et F_2 de l'aqueux d'hexane se sont avérées les plus actives, à l'égard de *P. aeruginosa* (CMI: ≤0,1mg/ml; CMB: 0,2mg/ml). Les dosages de phénols totaux, flavonoïdes et tannins, ainsi que les révélations par CCM suggèrent que cette activité antibactérienne est attribuée principalement à la richesse de cette plante en composés phénoliques. Ces résultats préliminaires pourraient permettre de justifier l'usage de cette plante dans le traitement de certaines affections d'origine bactérienne et que ses composés phénoliques pourraient être exploités à des fins thérapeutiques, notamment antibactériennes.

Mots clés

Activité antibactérienne, *Pistacia lentiscus*, composés phénoliques, CCM, fractions chromatographiques.

Abstract

This study focused on the antibacterial activity of extracts and of chromatographic fractions of leaves and fruits of *P. lentiscus*. Various extracts were analysed for their phenolic content and antibacterial activity. This was done by the method of diffusion against three $Gram^+$ (*Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Bacillus subtilis* ATCC6633 and *Listeria innocua* CLIP74915) and three $Gram^-$ (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Escherichia coli* NAR and *Klebsiella pneumoniae* E47) strains. On the other hand, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of active extracts; were determined using the dilution method on solid medium.

The results indicate that the leaves extracts are rich in polyphénols. On the other side, the Antibacterial tests exhibited different activities depending on the strain used, the part of the plant and the nature of the extract (organic or aqueous) and/or the fractions. *S. aureus* was the most sensitive since its growth was inhibited by all the extracts with the widest diameter of 23mm except chloroform extract of leaves and by the majority of chromatographic fractions with the largest zone of inhibition 26,3mm, whereas *L. innocua* and *K. pneumoniae* were the most resistant.

The results of the MIC and the MBC of active extracts and chromatographic fractions showed that the aqueous extract of chloroform, the aqueous extract of hexane and that of ethyl acetate of leaves showed the best activity against *S. aureus* (MIC: ≤0.1mg/ml; MBC: 0.7mg/ml) and *P. aeruginosa* (MIC: ≤0.1mg/ml; MBC: 0.3mg/ml). For their part, the fractions F_2 of ethyl acetate extract, F_1 and F_2 of aqueous of hexane proved to be the most active against *P. aeruginosa* (MIC: ≤0,1mg/ml; MBC: 0,2mg/ml). Determination of total phenols, flavonoids and tannins and the revelation by TLC suggested that the antibacterial activity is attributed mainly to the richness of this plant in phenolic compounds. These preliminary results may justify the use of this plant in the treatment of certain bacterial diseases and that phenolic compounds may be exploited for therapeutic purposes, especially antibacterial.

Key words

Antibacterial activity, *Pistacia lentiscus*, phenolic compounds, TLC, chromatographic fractions.

ملخص

هذه الدراسة تركز على النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلصات و العينات الكروماتوغرافية لأوراق وثمار *Pistacia lentiscus*.تم اختبار مختلف المستخلصات لمستويات مركبات الفينول، بالاضافة الى نشاطها المضاد للبكتيريا. أجري الاختبارالمضاد للجراثيم على مختلف المستخلصات و العينات بطريقة الانتشار على سطح جيلوز ضد ثلاثة سلالات من غرام ايجابي($Gram^+$) (*Staphylococcus aureus* ATCC6538 ، *Bacillus subtilis* ATCC6633 و*Listeria innocua* CLIP74915) وثلاث سلالات من غرام سلبي ($Gram^-$) (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 ، *Escherichia coli* NAR و *Klebsiella pneumoniae* E_{47}) من ناحية أخرى ، تم تحديد الحد الأدنى للتركيز المكبح (CMI) و الحد الأدنى للتركيز القاتل (CMB) للمستخلصات و العينات الفعالة بطريقة الانحلال في وسط صلب.

تشيرالنتائج الى أن مستخلصات الاوراق غنية بمادة البولبفينول. من جهة أخرى،أظهرت الاختبارات المضادة للبكتيريا مختلف الأنشطة تبعا لسلالة البكتيرية ،جزء النبتة المستعمل و طبيعة المستخلص (عضوي أو مائي) و العينة. *S. aureus* كانت البكتيريا الأكثر حساسية حيث كل المستخلصات كبحت نموها مع أوسع قطر23,7مم باستثناء مستخلص الكلوروفورم لأوراق النبتة و غالبية العينات الكروماتوغرافية مع اكبر منطقة تثبيط 26,3مم ، في حين أن *L. innocua* و *K. pneumoniae* كانت الأكثر مقاومة.

أظهرت نتائج CMI وCMB للمستخلصات والعينات الكروماتوغرافية الفعالة أن المستخلص المائي الكلوروفورمي، المائي الهكسيني و مستخلص الاستات الايثيل لأوراق النبتة كانت الأكثر نشاطا ضد*S. aureus* (CMI :0.2 ملغ/ مل ؛CMB : 0.3 و 0.7 ملغ/ مل) و *P. aeruginosa* (CMI ≥0.1 ملغ/ مل؛ CMB : 0.3 ملغ/ مل). من جانبها، اثبتت عينات F_2 لمستخلص الأستات الايثيل ، F_1 وF_2 للمستخلص المائي الهكسيني انها الأكثر نشاطا ضد *P. aeruginosa* (CMI ≥0.1 ملغ/ مل ؛CMB : 0.2 ملغ/ مل). كمية الفينول الكلية، مركبات الفلافونويد والعفص، اضافة الى الكشف من قبل الكرومطوغرافية على قطع ملاساء يسندون هذا النشاط المضاد للبكتيريا الى حد كبير الى ثراء النبتة بالمركبات الفينولية. من هذه النتائج الأولية يمكن تبرير استعمال هذه النبتة في علاج بعض الأمراض التي تسببها البكتيريا والتي يمكن استغلال مركباتها الفينولية لأغراض علاجية ، بما في ذلك مضاد للجراثيم.

كلمات الاساسية :

المفعول المضاد الحيوي ، *Pistacia lentiscus* ، مركبات فينولية ،كرومطوغرافية على قطع ملاساء، عينات كروماتوغرافية