

*République Algérienne Démocratique et Populaire*

*Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*

UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE



## **MEMOIRE**

DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER ACADEMIQUE EN SCIENCES  
BIOLOGIQUES OPTION BIOTECHNOMOGIE MICROBIENNE

### ***THEME***

***EVALUATION DE L'INFLUENCE DE LA TEMPERATURE DE SECHAGE  
SUR L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET ANTIBACTERIENNE DES  
FEUILLES D'Arbutus unedo L.***

Réalisé par :

Mr HAMITOUCHE OUAMAR

M<sup>elle</sup> ZABCHI RACHIDA

Devant le jury :

Mr HOUALI.K	Professeur à l'UMMTO	Président de jury
Mr MOUALEK. I	Maitre-assistant classe A à l'UMMTO	Promoteur
Mme IRATNI .G	Maitre-assistant classe A à l'UMMTO	Co-promotrice
Mme MESTAR.N	Maitre-assistant classe A à l'UMMTO	Examinatrice
M <sup>elle</sup> LAHCENE.S	Maitre-assistant classe A à l'UMMTO	Examinatrice

**2015-2016**

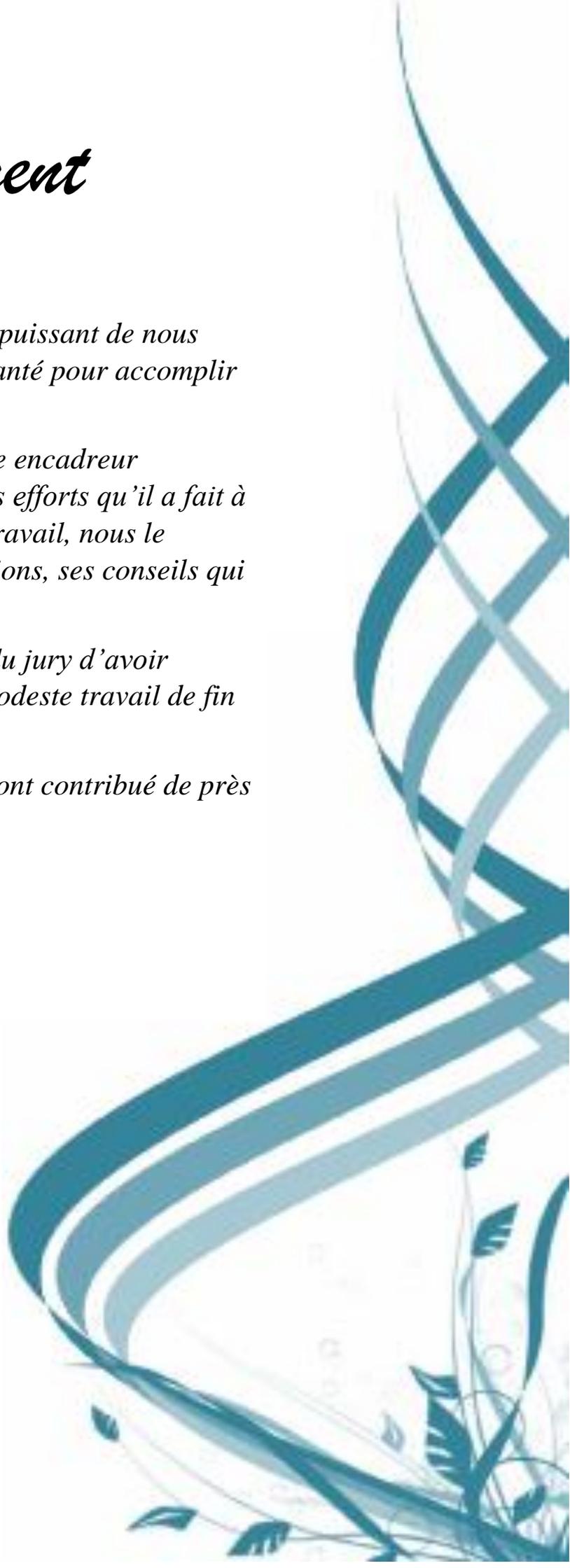
# *Remerciement*

*Tous d'abord ont remercié le dieu tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la santé pour accomplir ce travail.*

*Nous tenons à remercier vivement notre encadreur Monsieur MOUALEK Idir pour tous les efforts qu'il a fait à notre égard et d'encadrer ce modeste travail, nous le remercions pour son suivi, ses orientations, ses conseils qui nous ont servi de référence.*

*Nous tenons à remercier les membres du jury d'avoir répondu présent à l'évaluation de ce modeste travail de fin d'études.*

*Nous tenons à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à concrétiser ce travail.*



# Dédicaces

*Je dédie ce travail :*

*À ma chère mère aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que t'as consenti pour mon instruction et mon bien être. Je te remercie pour tout le soutien et l'amour que tu me portes depuis mon enfance et j'espère que ta bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de tes vœux tant formulés, le fruit de tes innombrables sacrifices, bien que je ne t'en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, t'accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne te déçois.*

*A mon père. Et à mon cher frère, et à l'âme de ma belle-mère Linda.*

*A mes chères tantes Houria et Messaad, et à ma petite sœur Hamida. Et à mon grand frère Saidi, Et à toute la famille Hamitouche et Mallek.*

*A mes amis préféré, Madjid, Maoui, Hassene, Ma chère binôme Rachida, Dihia.*

*A tous mes amis, Sekoura, Samir, Zineb, Adel, Mohand, Sandra.*

*Aux amis de la famille, la famille Debbache et la famille Medour. Et la famille Issaadi.*

*Je tiens tout particulièrement à dédier ce travail à ma défunte grand-mère Mazouza, que Dieu l'accueille dans son vaste Paradis.*

*Amirouche*

# Dédicaces

*Je dédie ce travail à :*

- ✓ *mes chers parents qui m'ont toujours conseillé et orienté et beaucoup sacrifié pour moi.*
- ✓ *mes frères : Amirouche , Sofiane.*
- ✓ *mes chères sœurs : Dihia et Sadia et son mari et leur petit ange Damia.*
- ✓ *mon cher Binôme Amirouche, et à tous mes amis : Skoura, Djura, Madjid, Rafik, Silia , Wissam, Dihia, Lilia , Fatiha, Hassiba, Silia K.*

*Rachida*



**Résumé****Abstract****Liste des figures****Liste des tableaux****Liste des abréviations**

## Introduction

.....	1
-------	---

**PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE****Chapitre I : Généralités sur l'arbousier (*Arbutus unedo L.*)**

I.1. Présentation d' <i>Arbutus unedo L.</i> : .....	2
I.2 Position systématique de la plante : .....	2
I.3 Noms vernaculaires : .....	3
I.4 Répartition géographique : .....	3
I.5 Morphologie et description Botanique d' <i>Arbutus unedo L.</i> .....	4
I.5.1 L'écorce : .....	4
I.5.2 Les feuilles : .....	5
I.5.3 Les fleurs .....	5
I.5.4 Le fruit : .....	6
I.6 Usages traditionnels : .....	6
I.6.1 Les racines .....	7
I.6.2 Les feuilles : .....	7
I.6.3 Le fruit : .....	7
I.7 Composition chimique : .....	9
I.7.1 Le Fruit : .....	9
I.7.2 Les feuilles : .....	9
I.7.3 Les racines : .....	10

**Chapitre II : Polyphénols et activités biologiques**

II. Polyphénols et activités biologiques : .....	11
II.1 Les Polyphénols : .....	11
II.1.1 Biosynthèse des composés phénoliques : .....	12
II.1.1.1 La voie de Shikimique : .....	12
II.1.1.2 La voie de l'acétate : .....	12

II.1.2 Rôle et intérêt des polyphénols : .....	12
II.1.3 Les principales classes des polyphénols : .....	13
II.1.3.1 Les acides phénoliques : .....	13
II.1.3.2 Les flavonoïdes : .....	14
II.1.3.3 Les tanins : .....	16
II.2 Activités biologiques : .....	17
II.2.1 Activité antioxydante : .....	17
II.2.1.1 Mécanisme d'action des antioxydants : .....	18
II. 2.2 Activité Antibactérienne : .....	20

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **Chapitre III : Matériels et méthodes**

III.1-Matériel : .....	21
III.1.1. Matériel végétal : .....	21
III.1.2-Préparation de l'extrait : .....	22
III.1.3 Souches bactériennes : .....	24
III.2 Méthodes d'analyses : .....	24
III.2.1 Dosage des polyphénols totaux : .....	24
A.Principe : .....	24
B. Mode opératoire : .....	25
III.2.2 Etude de l'activité antioxydante des extraits : .....	27
III.2.2.1 Test de capacité antioxydante totale (TAC) : .....	27
III.2.2.2 Test du pouvoir antioxydant par réduction du fer (FRAP) : .....	29
III.2.3 Activité antibactérienne. ....	31
III.2.3.1 Revivification des souches .....	31
III.3.2.2 Préparation de la suspension bactérienne : .....	31
III.3.2.3 Préparation des échantillons : .....	31
III.3.2.4 Méthode de diffusion sur disque : .....	32
III.3.2.5 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) : .....	32

### **Chapitre IV : Résultats et discussion**

IV.1 Analyses biochimiques : .....	33
IV.1.1 Teneur en polyphénols totaux : .....	33
IV.1.2 Capacité antioxydante totale : .....	34
IV.1.3 Réduction du fer : .....	37
IV.1.4 Activité antibactérienne : .....	40

---

IV.1.4.1 Détermination de l'activité antibactérienne : .....	40
IV.1.4.2 Détermination de la CMI :.....	44
Références Bibliographiques	
Annexes	

## Résumé

Les extraits de plantes sont actuellement le sujet de nombreuses études, dont l'objectif est l'évaluation de leurs nombreuses activités biologiques. Parmi les activités les plus étudiées, nous retrouvons, l'activité antioxydante et antibactérienne.

Notre étude a pour objectif l'évaluation de l'effet de la température de séchage sur l'activité antioxydante et antibactérienne des feuilles d'*Arbutus unedo L.*

Après séchage des feuilles à trois températures différentes (25°C, 50°C, 70°C) et préparation des extraits aqueux bruts, la teneur en polyphénols a été estimée par spectrophotométrie suivant la méthode colorimétrique au Folin-Ciocalteu. Celle-ci, avec respectivement 264.64, 181.33 et 152.2 mg EAG/g MS, pour les extraits obtenus à 25°C, 50°C et 70°C se trouvent largement affectée par l'augmentation de la température de séchage.

L'activité antioxydante, a été évaluée en mettant en œuvre deux méthodes. La première étant le test de capacité antioxydante totale (TAC) au molybdate d'ammonium et la deuxième étant le test de réduction du fer (FRAP).

Les résultats obtenus malgré le fait qu'ils font état d'une bonne activité antioxydante, celle-ci reste en moyenne inférieure au standard (vitamine C). De plus ces résultats indiquent une diminution du TAC de 18.73% et 30.17% ainsi que du FRAP de 47% et 49% respectivement pour le traitement à 50°C et 70°C.

Concernant l'activité antibactérienne des feuilles d'*Arbutus unedo L.*, les trois extraits à la concentration de 6 mg par disque, ont été testés sur quatre souches bactériennes (*Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Salmonella typhimurium* ATCC13311), et ont montrés un effet inhibiteur sur toutes les souches à l'exception de *Salmonella typhimurium* ATCC13311. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été estimées par la méthode de diffusion en milieu solide et ont mis en évidence une plus grande sensibilité de *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 avec une concentration effective de 9.37 mg/ml comparativement à la CMI de 18.75 mg/ml enregistré pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Cette étude en plus de mettre en relief le potentiel antioxydant et antibactérien de l'extrait aqueux d'arbousier, prouve la stabilité de ce dernier au traitement thermique et la relative stabilité des molécules bioactives qui le composent.

**Mots clés:** *Arbutus unedo L.*, polyphénols, activité antioxydante, activité antibactérienne, température.

## Abstract

Plant extracts are currently the subject of numerous studies, with objective the evaluation of their many biological activities. Among the studied activities, we find, the antioxidant and antibacterial activity.

Our study aims to evaluate the effect of drying temperature on the antioxidant and antibacterial activity of *Arbutus unedo L* leaves.

After drying the sheets at three different temperatures (25 ° C, 50 ° C, 70 ° C) and preparation of the crude water extracts, the polyphenol content was estimated spectrophotometrically by the colorimetric method Folin-Ciocalteu. These recorded for the three extracts, obtained at 25 ° C, 50 ° C and 70 ° C are respectively 264.64, 181.33 and 152.2 mg EAG / g DM, are significantly affected by increasing the temperature drying.

The antioxidant activity was evaluated using two methods. The first being the total antioxidant capacity test (TAC) of ammonium molybdate and the second being iron reduction test (FRAP).

Despite the fact that the results show a good antioxidant activity, it remains the standard lower average (vitamin C). Furthermore, these results indicate a reduction in the TAC of 18.73% and 30.17% and the FRAP 47% and 49% respectively for the treatment at 50 ° C and 70 ° C.

On the antibacterial activity of the leaves of *Arbutus unedo L*, the three extracts at a concentration of 6 mg per disk were tested on four bacterial strains (*Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Salmonella typhimurium* ATCC13311), and showed an inhibitory effect on all strains with the exception of *Salmonella typhimurium* ATCC13311. The minimum inhibitory concentrations (MIC) were estimated by the solid medium diffusion method and determined more *Bacillus cereus* sensitivity ATCC 10876 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 with an effective concentration of 9.37 mg / ml compared to the MIC of 18.75 mg / ml recorded for *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

This study also highlight the antioxidant and antibacterial potential of the aqueous extract of strawberry tree, proves the stability of the latter heat treatment and the relative stability of these activities.

Keywords: *Arbutus unedo L*, polyphenols, antioxidant activity, antibacterial activity, temperature.

## Listes des figures

Figure 1: photos d'arbousier. ....	4
Figure 2:Ecorce d'arbousier. ....	4
Figure 3:les feuilles de l'arbousier .....	5
Figure 4:Fleurs d'arbousier. ....	5
Figure 5:le fruit de l'arbousier.....	6
Figure 6:structure de base d'un phénol. ....	11
Figure 7:Structure de quelques acides hydroxybenzoïques.....	13
Figure 8:Structure de quelques acides hydroxycinnamiques. ....	14
Figure 9:structure de base d'un flavonoïde. ....	15
Figure 10:Principales classes des flavonoïdes.....	15
Figure 11:structures des tannins. ....	16
Figure 12:Extraits obtenus après broyage .....	21
Figure 13:Dispositif de filtration .....	22
Figure 14: Lyophilisateur .....	22
Figure 15:Etapes d'obtention de l'extrait brut.....	23
Figure 16:solutions mères dissoute dans de l'eau distille.....	23
Figure 17:Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	25
Figure 18:Protocole de dosage des polyphénols.....	26
Figure 19:Protocole du test capacité antioxydante totale. ....	28
Figure 20:protocole du test de réduction du Fer (FRAP). ....	29
Figure 21:protocole du test de réduction du Fer (FRAP). ....	30
Figure 22:Solutions mères pour le test de l'activité antibactérienne. ....	31
Figure 23:Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	33
Figure 24:Teneur en polyphénols des trois extraits.....	33
Figure 25: Capacité antioxydante totale des extraits séchés à 25, 50 et 70°C et de l'acide ascorbique. ....	35
Figure 26:Activité antioxydante totale des trois extraits et de l'acide ascorbique. ....	36
Figure 27:Résultat du test TAC. ....	37
Figure 28:Pouvoir réducteur des trois extraits et de l'acide ascorbique. ....	37
Figure 29:histogramme des pourcentages du pouvoir réducteur des trois extraits et l'acide ascorbique.(Frap). ....	39
Figure 30: Résultats du test de pouvoir réducteur.. ....	40
Figure 31:Test de l'activité antibactérienne des trois extraits sur <i>Bacillus cereus</i> ATCC.....	42
Figure 32:Test de l'activité antibactérienne sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC.....	43
Figure 33:Test de l'activité antibactérienne des trois extraits effectués sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC.....	43
Figure 34:Test de l'activité antibactérienne des trois extraits sur <i>Salmonella typhimurium</i> .....	44
Figure 35:Résultats de la détermination de la CMI des trois extraits vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .. ....	46

Figure 36:: Résultats de la détermination de la CMI des trois extraits vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	46
Figure 37:Résultats de la détermination de la CMI des trois extraits vis-à-vis de <i>Bacillus cereus</i> . .....	47
Figure 38:Disposition des disques pour la détermination des CMI.....	47

## Listes des tableaux

Tableau I: Propriétés biologiques du fruit et des feuilles d' <i>Arbutus unedo</i> L .....	8
Tableau II: Souches bactériennes testées.....	24
Tableau III: Tableau illustrant les dilutions des extraits pour la détermination des CMI. ....	32
Tableau IV: teneurs en polyphénols des trois extraits .....	34
Tableau V: Pourcentages de l'activité antioxydante des trois extraits et de l'acide ascorbique. ...	36
Tableau VI : IC <sub>50</sub> enregistrées pour les trois échantillons et l'acide ascorbique. ....	36
Tableau VII: Pourcentages de réduction du fer des trois extraits et l'acide ascorbique. ....	39
Tableau VIII: Pouvoir réducteur des extraits de feuilles d' <i>A. unedo</i> et l'acide ascorbique exprimés en IC <sub>50</sub> . ....	39
Tableau IX: Degré de sensibilité des bactéries aux extraits végétaux suivant le diamètre d'inhibition. ....	40
Tableau X: Sensibilité des bactéries aux antibiotiques utilisés. ....	41
Tableau XI: Diamètre des zones d'inhibition par les différents extraits étudiés.....	41
Tableau XII: valeurs de la des extraits vis-à-vis de <i>Bacillus cereus</i> . ....	45
Tableau XIII: valeurs de la CMI des extraits vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	45
Tableau XIV: Valeurs de la CMI des extraits vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	46

## Liste des abréviations

<b>µg :</b>	microgramme
<b>µl :</b>	microlitre
<b>ATB :</b>	Antibiotique
<b>ATCC :</b>	American Type Culture Collection.
<b>BHIB :</b>	Brain Heart infusion Broth
<b>CMI :</b>	Concentration Minimale Inhibitrice.
<b>Chr :</b>	Chromatographie
<b>EAG/g .MS :</b>	Equivalent d'Acide Gallique par gramme de Matière Sèche.
<b>ED :</b>	Eau Distillée
<b>ERO :</b>	Espèces Réactives d'Oxygène
<b>FRAP :</b>	Ferric Reducing Antioxydant Power
<b>IC<sub>50</sub> :</b>	Concentration Inhibitrice 50%
<b>Mg EAG :</b>	milligramme Equivalent d'Acide Gallique
<b>mg :</b>	milligramme
<b>MH :</b>	Mueller Hinton
<b>pH :</b>	potentiel Hydrogène
<b>PPT :</b>	Polyphénols Totaux
<b>Qst :</b>	Quantité suffisante
<b>ROS :</b>	Reactive Oxygen Species
<b>rpm :</b>	Rotation par minute.
<b>SM :</b>	Solution Mère.
<b>TAC :</b>	Total Antioxydant Capacity
<b>UFC :</b>	Unité Formant Colonie.
<b>UV :</b>	Ultraviolet
<b>µm :</b>	micromètre
<b>Vit C :</b>	Vitamine C

## Introduction

Les plantes médicinales, suscitent actuellement un intérêt majeur et grandissant en regard au nombre important de molécules bioactives qu'elles recèlent.

Plusieurs équipes de chercheurs se sont investies ces dernières années à étudier l'activité antioxydante de ces molécules, en raison du rôle qu'elles jouent dans la prévention des maladies induites par le stress oxydant (cancer, diabète, l'hypertension ... etc).

En effet, le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications.

La plupart de ces maladies apparaissent avec le vieillissement cellulaire où diminue les défenses antioxydantes et augmente la multiplication mitochondriale de radicaux, qui oxydent les constituants cellulaires majeurs (BIDIE *et al.*,2011).

Deux systèmes de défense sont mis en œuvre par l'organisme, l'un endogène impliquant des enzymes détoxifiantes et l'autre exogène impliquant des molécules issues de notre alimentation tel les polyphénols. Ces derniers ne présentant pas les inconvénients des antioxydants de synthèse, se voient attribués une place importante dans la recherche pharmaceutique et agro-alimentaire. (DIDI.,2009)

Les polyphénols sont également connus pour leur activité antibactérienne et peuvent ainsi être un palliatif aux antibiotiques dont la médication abusive a donné naissance aux souches bactériennes résistantes, un problème préoccupant.

Malheureusement, le potentiel des plantes, sources pour la production de nouveaux médicaments est sous exploité, car sur 250.000 d'espèces de plantes sur la planète seul 6% ont été testés pour leur activité biologique. (BIDIE *et al.*,2011)

De par sa position géographique l'Algérie bénéficie d'une diversité phylogénétique importante parmi les plantes médicinales présentes en Algérie, nous trouvons *Arbutus unedo*. De la famille des Ericaceae (BAKCHICHE et GHERIB, 2014), l'arbousier est connu pour ses propriétés antiseptiques, antispasmodiques et astringentes. Reconnu et largement utilisé comme diurétique en Turquie et comme remède naturel pour l'hypertension et le diabète au Maroc (BOULLARD, 2001 ; EL HOUARI, 2007).

Notre étude a pour objectif l'évaluation de l'effet de la température de séchage des feuilles de l'arbousier sur l'activité antioxydante et antibactérienne de cette plante.

*Première partie*

---

*Etude bibliographique*

## *Chapitre I*

---

### *Généralité sur l'arbousier*

### I.1. Présentation d'*Arbutus unedo* L :

*Arbutus unedo* est une espèce d'arbre qui appartient au genre *Arbutus* et à la famille des Ericacées ; Grande famille cosmopolite représentée par 124 genres (dont *Arbutus* (arbousier), *Calluna* (callune), *Erica* (bruyère) et *Rhododendron*) et environ 4100 espèces. Les *Ericaceae* prédominent en Arctique, dans les régions tempérées et dans les montagnes tropicales et extratropicales du sud-est de l'Asie et d'Amérique avec une forte concentration dans l'Himalaya, en Nouvelle-Guinée et dans les Andes. En général, la plus grande densité ainsi que la plus grande diversité des *Ericaceae* se retrouve sous les climats méditerranéens (DIDI, 2009).

### I.2 Position systématique de la plante :

Selon les classifications botaniques établies par GUIGNARD (2001) et SPICHTER *et al.* (2004) la classification d'*Arbutus unedo* est comme suit :

Règne :	végétal
Embranchement :	Spermatophytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Sous-classe :	Gamopétales
Ordre :	Ericales
Famille :	Ericacées
Genre :	<i>Arbutus</i>
Espèce :	<i>Arbutus unedo</i>

### I.3 Noms vernaculaires :

<b>NOM BOTANIQUE</b>	<i>Arbutus unedo</i> (BARTELS 2000; BELOUED, 2001; GUIGNARD 2001)
<b>Nom Commun</b>	Busserole, raisin d'ours, petit buis (DELLILE, 2013)
<b>Nom Arabe</b>	Mathrounia, Qatilabihia, Acireddob, Hennaameur, Lenj, Boujbiba, (BELOUED, 2001 ; AIT-YOUSSEF, 2006)
<b>Nom Français</b>	Arbousier, arbre aux fraises (BENISTON ,1984 ; BARTEL, 1998 ; BROSSE, 2000 ; REYMAND, 2002)
<b>Nom Anglais</b>	Strawberrytree (BOSSARD, 1984)
<b>Nom Berbère</b>	Sisnou, Ticisnou, Bahennou (BELOUED, 2001)
<b>Nom Espagnol</b>	Madrono (AIT-YOUSSEF, 2006)
<b>Nom Allemand</b>	Erdbeerbaum (BOSSARD, 1984)

### I.4 Répartition géographique :

D'après MABERLEY (1997) le genre « *Arbutus* » comporte 14 espèces disséminées dans les régions tempérées de l'hémisphère nord ainsi qu'en Amérique tropicale.

*Arbutus unedo* L ; est l'une des espèces caractéristiques du maquis méditerranéen sur sols acides ou siliceux, en lisière de bois et sur les versants rocailleux, dans tout le bassin méditerranéen mais absente de certaines régions sur sol calcaire, présente aussi sur le littoral atlantique jusqu'en Irlande (POLESE, 2010).

Plante très abondante en Algérie dans les garrigues, les tells et les forêts, mais aussi en Tunisie et au Maroc (AIT-YOUCHEF, 2006). Elle se rencontre à des altitudes allant de 0 à 600 m, mais moins fréquemment au-delà de 1000 m (FERARD 2003).

## I.5 Morphologie et description Botanique d'*Arbutus unedo* L.

*Arbutus unedo* vit en moyenne entre 100 à 400 ans, il peut atteindre une hauteur de 10 m et une largeur de 0.8m (SOMMON,1987).

Cet arbrisseau rameux commun de la garrigue, est capable de vivre dans des bois et rochers du Midi de la France, d'Europe Méridionale, d'Asie Occidentale et du nord de l'Afrique (BOULLARD ,2001). Il est très résistant aux gels (jusqu'à  $-15^{\circ}\text{C}$ ), et s'adapte à une très large gamme de sols et d'expositions (MORRIS, 2007).



**Figure 1:** photos d'arbousier (Larbaa Nath Irathen).

### I.5.1 L'écorce :

D'un brun-rouge caractéristique est marquée de fines gerçures. Les rameaux sont rudes et velus (BROSSE, 2005).



**Figure 2:**Ecorce d'arbousier (Larbaa Nath Irathen).

### I.5.2 Les feuilles :

Lancéolées, aux bordures dentées, sont persistantes sur les rameaux. De forme ovale, au-dessus vert foncé luisant et au-dessous vert pâle (BIZOUARD,1962 ; AIT-YOUSSEF 2006). Elles peuvent atteindre 5 à 8 cm de longueur sur 3 à 4 cm de largeur (BOULLARD ,2001).



Figure 3:les feuilles de l'arbousier (Larbaa Nath Irathen).

### I.5.3 Les fleurs

Sont blanches parfois teintées de verdâtre, en gralots de 1cm de long, à 5 petites pointes recourbées, groupées en panicules pendant à l'extrémité des rameaux(POLESE,2010).



Figure 4:Fleurs d'arbousier. (Larbaa Nath Irathen)

**I.5.4 Le fruit :**

S'appelle arbose, il est sous forme d'une baie sphérique de 1 à 2 cm de diamètre à peau rugueuse couvertes de petites pointes coniques, rouge orangé à maturité à une durée de vie d'un an. Sa chair est molle, acidulée et sucrée (BOULLARD, 2001 ; ISERIN, 2001).



Figure 5:le fruit de l'arbousier. (Larbaa Nath Irathen)

**I.6 Usages traditionnels :**

*Arbutus Unedo* fréquemment utilisé dans la médecine traditionnelle au Maroc Orientale comme un remède naturel pour l'hypertension et le diabète (EL HOUARI, 2007). Les parties utilisées principalement sont : Feuilles, fruits, racines. Cette plante présente des propriétés astringentes efficaces en cas de diarrhée plus particulièrement au niveau des fruits et des feuilles (ESPICIER *et al.*, 2000).

### I.6.1 Les racines

La décoction de racine est utilisée contre l'hypertension. On lui attribue des propriétés anti-inflammatoires, il est également efficace contre les rhumatismes.

Les extraits des racines ont la capacité d'améliorer la sensibilité du barorécepteur artérielle, représentent de très bon hypoglycémiant, mais aussi réduisent le développement de l'hypertension et empêchent l'hypertrophie du myocarde. (MIGUEL *et al.*, 2014).

Les racines d'Arbousier sont un bon désinfectant des voies urinaires et soignent les blennorragies (BOULLARD, 2001 ; ISERIN, 2001).

### I.6.2 Les feuilles :

La décoction de feuilles est tenue pour un antiseptiques, antispasmodiques et astringentes (par sa teneur en tanin), aussi les recommande-t-on en cas de diarrhée ou d'engorgement du foie (BOULLARD, 2001).

En Turquie, les feuilles d'arbousier sont utilisées sous forme d'infusion pour leur effet diurétique (PABUÇCUOGLU, 2003).

### I.6.3 Le fruit :

Dans la médecine traditionnelle, il est rapporté que le fruit de *Arbutus unedo* possède des propriétés astringentes, diurétiques et antiseptiques (ÔZCAN et HACISEFEROGULLARI, 2007).

BELLAKHDAR (1997) souligne la nécessité de respecter les doses d'arbouses consommées, car elles sont anti-diarrhéiques en petite quantité, et deviennent purgatives en grande quantité (BOULLARD, 2001). C'est pour cela qu'il est déconseillé pendant la grossesse et en cas d'affection rénale (ISERIN, 2001).



Tableau I: Propriétés biologiques du fruit et des feuilles d'*Arbutus unedo* L

La partie étudiée	Activité prouvée	Auteur
Feuilles	Activité antioxydante prouvée sur model chimique et cellulaire	(PABUÇCUOGLU <i>et al.</i> ,2003)
Feuilles	Activité vasorelaxante	(LEGSSYER <i>et al.</i> ,2004)
Feuilles	Activité hypoglycémique	(BNOUHAM <i>et al.</i> ,2007)
Feuilles	Prévention des maladies cardiovasculaires uneffets in vitro anti-agrégants sur plaquettes humaines et hypotenseur	(EL HAOUARI <i>et al.</i> ,2007)
Feuilles	Activité anti-inflammatoire.	(MARIOTTO <i>et al.</i> , 2008)
Feuilles	Activité in vitro anti leishmania	(KIVCAK <i>et al.</i> ,2009)
Feuilles	Activité in vitro contre <i>Trichomonas vaginalis</i>	(ERTABAKLAR <i>et al.</i> , 2009)
Fruits	Antioxydant et neuroprotecteur	(FORTALEZAS <i>et al.</i> ,2010)
Fruits	L'extrait phénolique utilisé comme ingrédient fonctionnel dans les produits carnés transformés	(GANHÃO <i>et al.</i> ,2010)
Feuilles	anti-cancerogène	(TAVARES <i>et al.</i> ,2010)
Fruits et feuilles	Prévention de la peroxydation lipidique	(AKAY <i>et al.</i> ,2011)
Feuilles	Activitéantihémolytique Activité antioxydante prouvée sur model chimique et cellulaire	(MENDES <i>et al.</i> ,2011)
Feuilles	Capacité de piégeage du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et de chélation des métaux	(ORAK <i>et al.</i> ,2011)
Fruits	L'activité antioxydante est plus importante pour les fruits mûrs	(OLIVEIRA <i>et al.</i> ,2011)
Feuilles	Activité spasmolytique	(PAVLOVIC <i>etal.</i> ,2011)
Feuilles	Activité antibactérienne, principalement contre les bactéries Gram-positives Activité antimycobactérienne intracellulaire	(EL OUARTI <i>et al.</i> ,2012)
Feuilles	Activité antifongique	(FERREIRA <i>et al.</i> ,2012)
Fruits	Potentiel anti tumoral contre la lignée cellulaire humaine NCI-H460 (cancer bronchique)	(GUIMARÃES <i>et al.</i> ,2014)

## I.7 Composition chimique :

Une composition chimique distincte a été établie pour les différentes parties *d'Arbutus unedo* après des analyses physicochimiques effectuées par plusieurs auteurs.

### I.7.1 Le Fruit :

Le fruit de l'arbousier est comestible et très riche en tanin(AIT-YOUSEF,2006). D'après MIGUEL *et al.* (2014) il renferme plusieurs composés chimiques dont :

- **Les composés phénoliques :**

Les acides phénoliques, les flavonols (10,86 mg / 100 g), les flavan-3-ols (36,30 mg / 100 g), les dérivés de galloyl (24,63 mg / 100 g) et d'anthocyanes (13,77 mg / 100 g).

- **Les Vitamines :**

La vitamine « E » avec une teneur de 55.7 mg / 100g

La vitamine C ou autrement dite « l'acide ascorbique » avec une teneur de 89 mg / 100 g

- **Les Sucres :**

Le Fructose (27,8%) et le glucose (21,5%) sont les sucres prédominants dans les fruits, suivie de saccharose (1,80%) et le maltose (1,11%).

Selon une étude menée par DOUKANI et TABAK (2015), le fruit de l'arbousier 68.18% d'eau, 17.66% des solides solubles (les sucres, les sels, les protéines et les acides carboxyliques...), 19% de fibres alimentaires et 0.082% de pectine.

### I.7.2 Les feuilles :

Selon Ait-YOUCÉF (2006), les feuilles sont très riches en tanins, cette fraction représente environ 37% des polyphénols la composant. D'autres composés phénoliques la composent, tel que arbutoflavonol A et arbutoflavonol B, elle contient aussi d'après MALES *et al.* (2006) une quantité très importante de flavonoïdes qui varie entre 0.5% à 2%.

En plus de ce composé majoritaire, les feuilles de l'arbousier contiennent plusieurs autres molécules d'intérêt telle que l'arbutoside, présent à une estimation de 3,2%, ce dernier est connu pour son activité antiseptique urinaire. D'autre part l'unédoside , l'acide ursuline, l'hydroquinone libre (traces) ont été identifier au niveau de cette partie de la plante .

Les feuilles renferment aussi de l'acide gallique et isolique, qui sont caractérisées par leurs activités antioxydantes (DELLILE, 2007).

### I.7.3 Les racines :

Les différentes études effectuées sur les racines d'*Arbutus unedo* ont révélé que cette partie est majoritairement composée de catéchine réputé être un puissant antioxydant et anti-inflammatoire. D'autre part les racines sont constituées dans une moindre mesure d'acide benzoïque, gallique, protocatéchique et caféique. Les racines d'arbousier se retrouvent largement étudiées dans le traitement du cancer de la prostate grâce à la présence d'acide caféique, composé antimutagène (MIGEL *et al.*,2014).

D'autres composés phénoliques majoritaires dans les parties aériennes se retrouvent dans les racine d'*Arbutus unedo* en plus faibles proportions, comme les anthocyanes (3,65mg / g) et les flavonoides (0,56mg /g), dont les flavones et les flavonoles représentaient 0,17mg /g (DIB *et al.*,2011 ; MIGUEL *et al.*,2014).

## *Chapitre II*

---

### *Polyphénols et activités biologiques*

## II. Polyphénols et activités biologiques :

Connu comme particularité spécifique du végétale, le métabolisme secondaire se traduit par la capacité de synthétiser un grand nombre de substances chimiques appelées métabolites secondaires, ces dernières représentent un système de défense du végétal contre un nombre important d'agressions extérieures.

En effet les métabolites secondaires regroupent un nombre important de molécules. Parmi celles-ci nous retrouvons les polyphénols, dotés d'une grande variété de vertus thérapeutiques. Ces derniers jouent un rôle très important, principalement, dans la lutte contre le cancer, les maladies cardiovasculaires et la peroxydation lipidique. Expliquant de ce fait leur grande utilisation dans le domaine pharmacologique, ainsi que leur large application thérapeutique ces dernières années (ANDERSON et MARKHAM, 2006).

### II.1 Les Polyphénols :

Introduit en 1980, le terme « *polyphénol* » définit les produits du métabolisme secondaire des plantes.

Les polyphénols regroupent plus de 8 000 molécules divisées en différentes classes chimiques. Ces molécules ont en commun la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH), ils se caractérisent par des poids moléculaires compris entre 500 et 3000 Dalton (HENNEBELLE *et al.*, 2004).

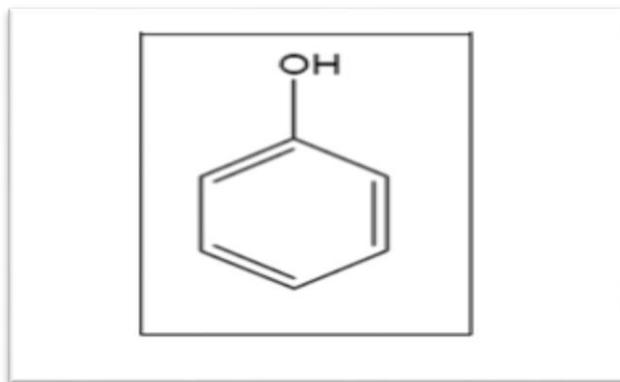


Figure 6: structure de base d'un phénol (LAGUERRE *et al.*, 2007).

### II.1.1 Biosynthèse des composés phénoliques :

Les cycles aromatiques des polyphénols sont issus de deux grandes voies métaboliques de synthèse : la voie shikimique et celle de l'acétate (BRUNETON, 1999).

#### II.1.1.1 La voie de Shikimique :

C'est la voie de biosynthèse des composés aromatiques qui conduit après transamination et désamination aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples (KNAGGS, 2003). Elle joue aussi un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde (YAO *et al.*, 1995).

#### II.1.1.2 La voie de l'acétate :

C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (FLEEGER et FLIPSE, 1964 ; RICHTER, 1993).

La diversité structurale des composés polyphénoliques n'est pas due seulement à cette double origine biosynthétique, mais aussi accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte (MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002).

### II.1.2 Rôle et intérêt des polyphénols :

Le rôle des composés phénoliques est maintenant reconnu dans différents aspects de la vie de la plante, et dans les différentes utilisations que fait l'homme des végétaux. Ils peuvent en effet intervenir dans certains aspects de la plante tel que :

1. La physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...).
2. Dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV), soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux (MUANDA, 2010).

3. Dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles...) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules...) et des produits qui en dérivent par transformation.
4. Dans les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentées...) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini.
5. Dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (MACHEIX *et al.*, 2005).

### II.1.3 Les principales classes des polyphénols :

Suivant la classification de CALABRESE (2003) on distingue trois principaux groupes de polyphénols : acides phénoliques, flavonoïdes et Tanins.

#### II.1.3.1 Les acides phénoliques :

Ils englobent deux groupes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques :  
 -Les acides hydroxybenzoïques qui dérivent de l'acide benzoïque, présentant plusieurs structures qui sont : l'acide salicylique, l'acide gentisique, l'acide gallique. (Voir figure 7)

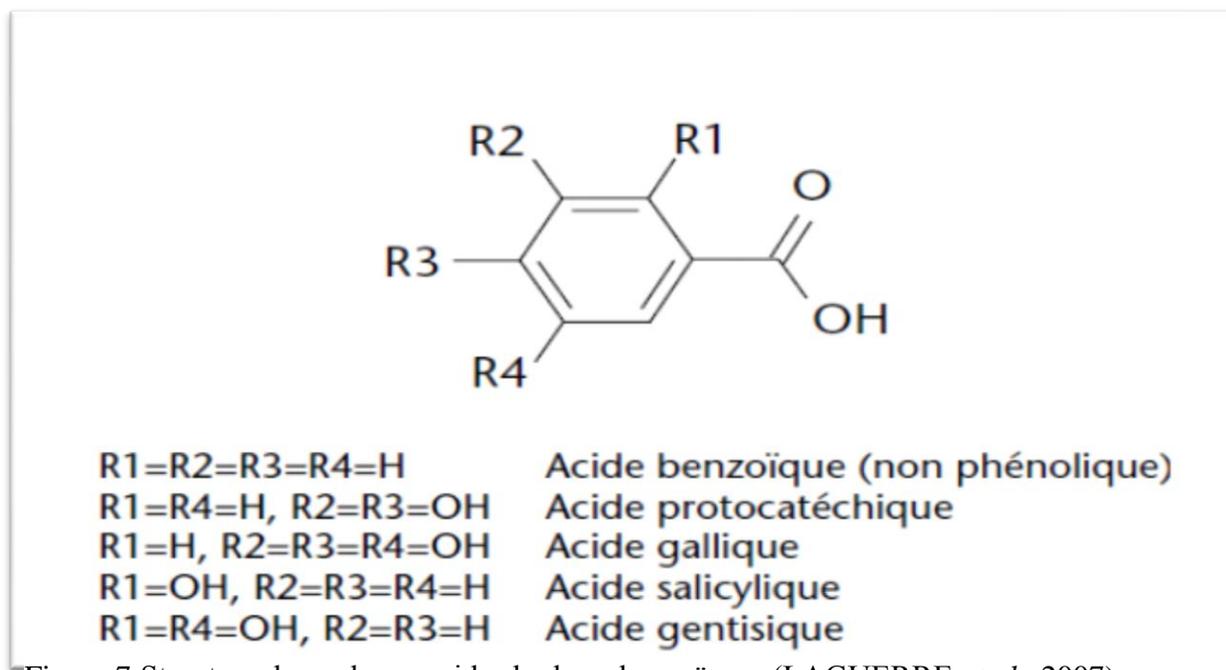


Figure 7: Structure de quelques acides hydroxybenzoïques (LAGUERRE *et al.*, 2007).

-Les acides hydroxycinnamiques qui dérivent de l'acide cinnamique qui ont aussi une diversité de structure: les acides comariques, féruliques, caféiques concernant leurs structures elles sont mieux illustrées dans le schéma dessous (voir figure 8)

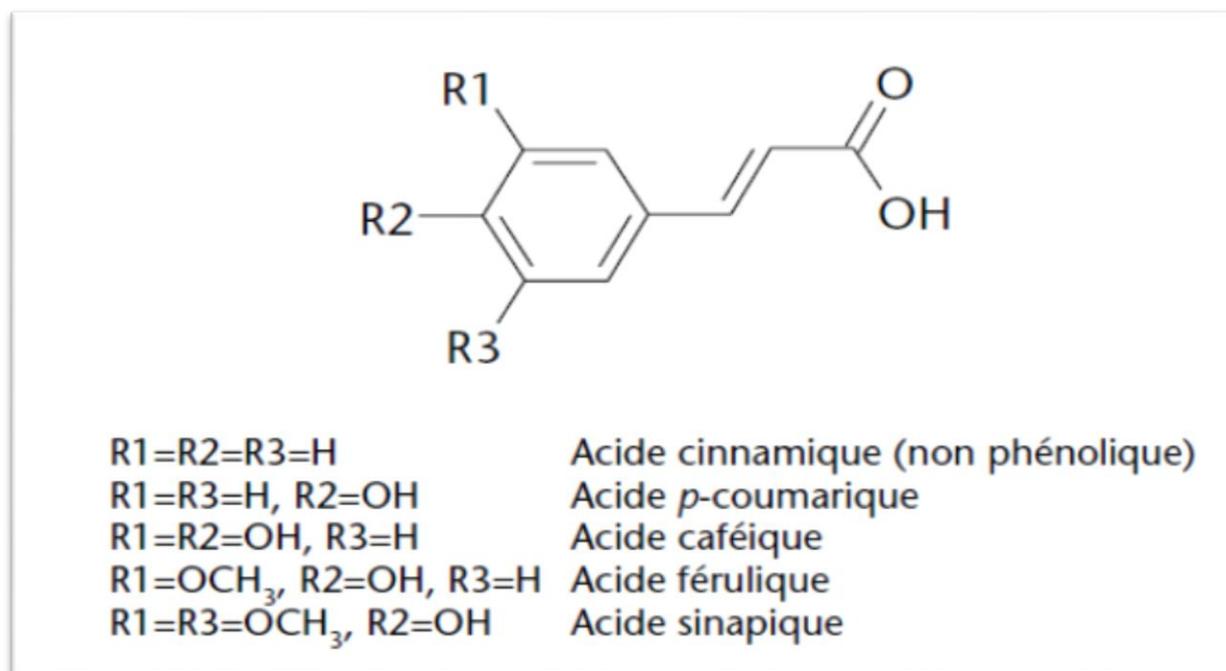


Figure 8: Structure de quelques acides hydroxycinnamiques (LAGUERRE *et al.*, 2007).

### II.1.3.2 Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques comprenant 15 atomes de carbone, soit deux noyaux aromatiques (A et B) et un hétérocycle Oxygéné (cycle C). Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques (plus de 6 000 composés) chez les plantes.

Ils se subdivisent en différentes classes dont on peut citer : les flavones, les flavanones et les anthocyanes (CHIRA *et al.*, 2008), cette classe est responsable des colorations jaunes, oranges et rouges des végétaux (fruits, légumes et plantes médicinales) (HAVSTEEN, 2002). Mais aussi jouent plusieurs rôles dans la plante, ainsi leur présence dans la cuticule foliaire assure la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV. Il a été établi aussi que les flavonoïdes ont des propriétés très prisées en médecine moderne vu leur rôle préventif des maladies cardiovasculaires (HARBORNE et WILLIAMS, 2000).



Les flavonoïdes, selon les espèces, se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophile. Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques (BRUNETON, 1999)

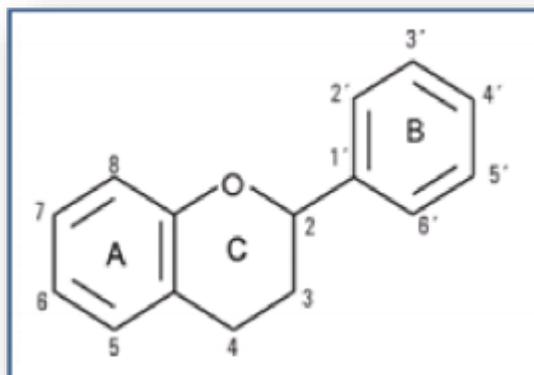


Figure 9: structure de base d'un flavonoïde (LAGUERRE *et al.*, 2007).

Selon LAGUERRE et ses collaborateurs (2007) il existe plusieurs classes des flavonoïdes qui sont bien illustrées dans la figure ci-dessous.

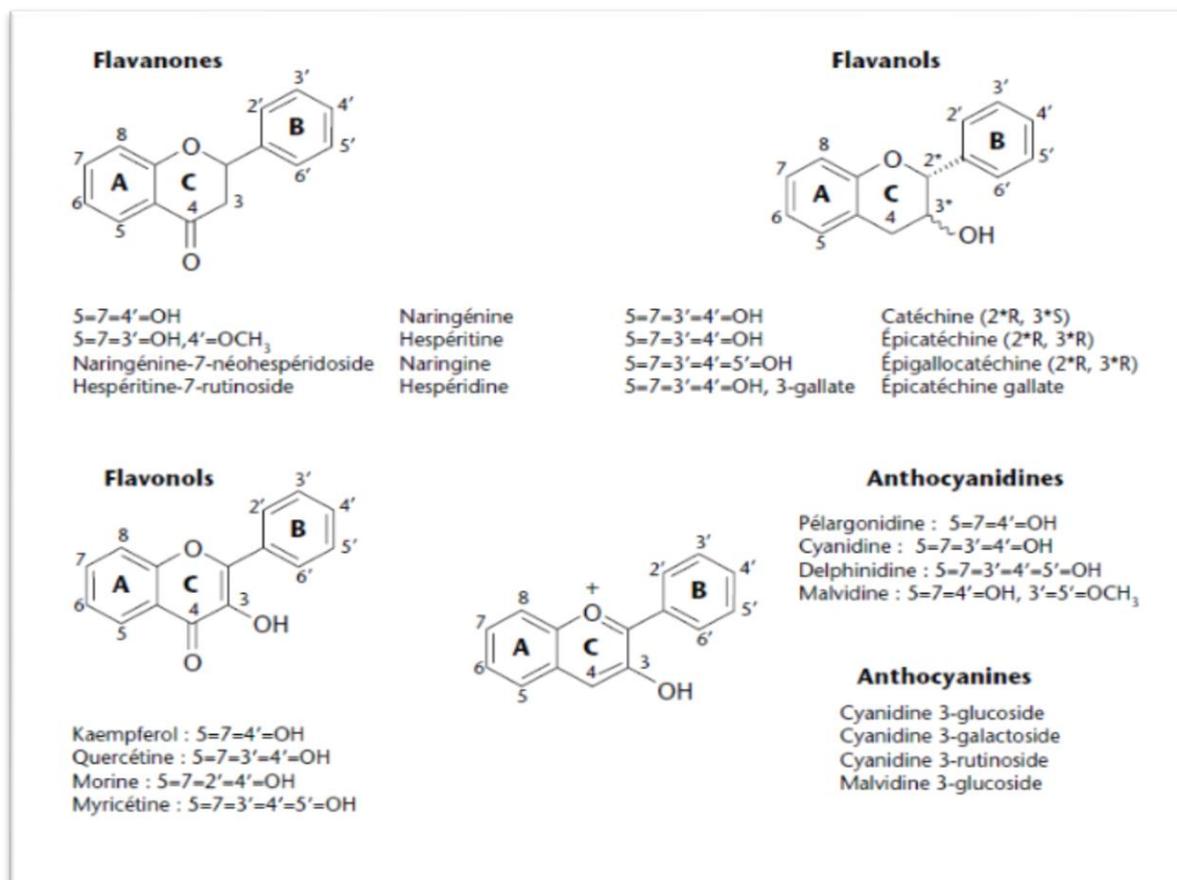


Figure 10: Principales classes des flavonoïdes (LAGUERRE *et al.*, 2007)

### II.1.3.3 Les tanins :

Les tanins sont des molécules rencontrées particulièrement dans les caroubes, les fèves sèches, le thé, le vin, l'écorce des grenades (BRUNETON, 1999).

Ils constituent un groupe avec une large diversité de structure qui ont en commun la capacité de lier et précipiter les protéines. Les tanins se rapportent au processus de tannage de peau animale pour former le cuir (KHANBABAEI et VAN REE, 2001).

Cette classe se divise en deux groupes principaux :

- les tanins hydrolysables : ils libèrent l'acide gallique, le glucose, l'acide quinique...
  - les tanins condensés ou non hydrolysables : tanins catéchiques (proanthocyanidols)
- (SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006). (Voir figure 11)

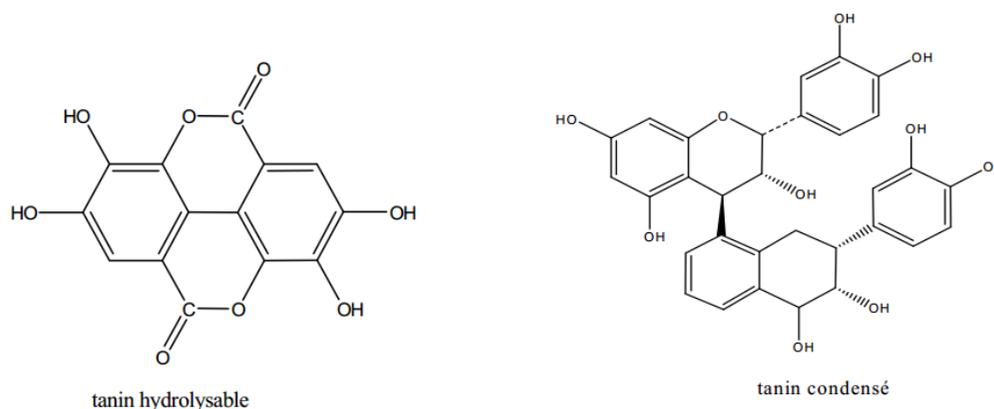


Figure 11: structures des tanins (BAHAZ et RACHDI, 2010).

## II.2 Activités biologiques :

Le stress oxydant a été décrit comme un facteur étiologique crucial impliqué dans diverses maladies chroniques humaines comme le cancer, les maladies cardiovasculaires, neurodégénérative, inflammation et le diabète...etc. Ces dommages oxydants sont réalisés par l'attaque des radicaux libres sur diverses biomolécules, en particulier les protéines, les lipides et l'ADN, ayant finalement comme conséquence la dégradation et la mort des cellules. De plus, la résistance aux antibiotiques par les microorganismes pathogènes est devenue un problème de santé publique de plus en plus préoccupant et justifie l'intérêt pour les antioxydants d'origine végétale. Ceux-ci en plus d'avoir une activité antibactérienne appréciables, restent des substances naturelles et donc avec un indice d'effet indésirable moindre (GHEDADBA *et al.*, 2015).

### II.2.1 Activité antioxydante :

La pollution, le stress, les rayonnements...etc et même le métabolisme normal de l'organisme génèrent à chaque instant dans l'organisme des molécules qu'on appelle espèces réactives de l'oxygène (ERO), ces derniers peuvent être des radicaux libres ou donnent naissance à des radicaux libres par interaction avec des molécules biologiques (Protéines, ADN, Lipides). (POPOVICI *et al.*, 2009).

Les radicaux libres qui induisent un phénomène d'oxydation, représentent des particules chimiques (molécules ou atomes) ayant un électron non apparié dans leur périphérie. Cet électron cherchera à se lier avec un autre électron, en l'arrachant à une autre molécule qui devient alors déséquilibrée donc instable. Un tel mécanisme peut déclencher une réaction en chaîne conduisant à la dégradation des molécules et à leur désintégration en molécules plus petites (MORELLE et ISRAEL, 2003).

Les ERO et radicaux libres sont des intermédiaires indispensables à l'organisme où ils sont impliqués dans des processus physiologiques à des faibles quantités. Cependant, l'excès de leurs productions peut devenir toxique pour l'organisme (POPOVICI *et al.*, 2009) cette surproduction donne lieu au stress oxydant qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies allant de l'artériosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, les ischémies et le processus du vieillissement...etc(KOECHLIN,2006).

Pour se protéger de ces effets, l'organisme a développé des systèmes de défense antioxydants pour neutraliser ou réduire les dommages causés par les radicaux libres (AMADOU, 2005).

Un antioxydant est défini comme une substance qui, ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation. Cette définition peut être élargie et le terme "antioxydant" englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets nocifs des processus ou réactions qui engendrent une oxydation exagérée (SHIMIZU ,2004).

Le système de défense antioxydant est constitué selon l'origine des antioxydants, d'une part par les enzymes antioxydantes (d'origine endogène) elles sont très efficaces tel que les enzymes de détoxification (catalase, superoxydedismutase, glutathionreductase), et les protéines qui assurent une complexation du fer et du cuivre, et d'autre part par des agents antioxydant (d'origine exogène par apport alimentaire) , ils incluent les vitamines (E et C), les polyphénols et les pigments caroténoïdes( $\beta$ -carotène) (BERSET ,2006).

Ces enzymes antioxydantes permettent l'éradication des radicaux libres, mais ne peuvent fonctionner efficacement que sous certaines conditions. Ce dysfonctionnement peut être comblé par une supplémentation exogène en antioxydants d'origine alimentaire. Ainsi, multiples sont les recherches initiées dans diverses spécialités pour l'extraction de ces composés à partir des plantes médicinales et la conservation de leurs activités (POPOVICI *et al.*, 2009).

De nombreux travaux notent une augmentation transitoire de la capacité antioxydante du plasma, lors de la consommation de produits riches en polyphénols (fruits et légumes) (MANACH *et al.*, 2005).

### II.2.1.1 Mécanisme d'action des antioxydants :

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la complexation d'ions et de métaux de transition. Cet intérêt a plusieurs origines ; en tant que constituants alimentaires, ces antioxydants naturels semblent contribuer de manière significative à la prévention des maladies telles que le cancer ou encore des maladies cardiovasculaires(AMADOU,2005).

Les polyphénols surtout expriment des propriétés antioxydantes par :

**-Le piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (ERO) :** ce processus consiste en une liaison polyphénols-ERO aboutissant à la stabilisation de l'espèce réactive de l'oxygène, par le transfert d'électrons ou de proton, du polyphénols vers l'ERO ( SHERWIN , 1976).

- **La suppression de la formation des ERO par l'inhibition de quelques enzymes ou par chélation des ions métalliques, impliqués dans leur production** : Les phénomènes d'interaction polyphénols-protéines ont été largement étudiés *in vitro*, le mécanisme d'inhibition des lipoxygénases par la quercétine n'est pas dû à une complexation ou à une oxydation du  $Fe^{2+}$ , mais plutôt à une inhibition irréversible résultant de liaisons covalentes entre l'enzyme et les dérivés oxydés de la quercétine.

Il est bien connu que le catéchol et le gallol et plusieurs dérivés fonctionnalisés (incluant la plupart des composés polyphénoliques) sont des chélateurs efficaces des métaux.

-**La protection des systèmes de défense antioxydants de l'organisme** : Représente une principale caractéristique des polyphénols, ces derniers sont des agents antioxydants très puissants. Ils sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. Cette même activité antioxydante permet aux une bonne circulation sanguine, coordonne l'activité du système immunitaire avec celle du cerveau et module la communication entre les cellules du corps.

-**Apport d'atomes d'hydrogène disponibles dans les substituants hydroxyles de leurs groupes phénoliques pour former des composés stables** : les polyphénols sont facilement déprotonés en présence du fer et forment des complexes très stables. Puisque les ligands de polyphénol stabilisent fortement les ions  $Fe^{+3}$  plus que les ions  $Fe^{+2}$ , les complexes catécholates et gallates des ions  $Fe^{+2}$  sont rapidement oxydés en présence de l'oxygène  $O_2$  pour former le complexe  $Fe^{+3}$  polyphénol, le processus généralement désigné sous le nom de l'autooxydation ( SANDHAR *et al.*, 2011).

-**réaction de réduction de l'oxydant par transfert d'électrons pour stopper l'oxydation** : une fois ligand de catécholates ou de gallates au  $Fe^{+3}$ , le polyphénol peut réduire le fer en  $Fe^{+2}$ . Ce processus de réduction de fer est souvent attribué à l'activité antioxydante et prooxydante des composés phénoliques (EL-HACI,2015).

## II. 2.2 Activité Antibactérienne :

La maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale.

Suite à cette préoccupation concernant les effets indésirables des molécules synthétiques destinées à la lutte contre les infections bactériennes, il semble donc important de trouver une alternative à l'utilisation des antibiotiques classiques (DJAHRA, 2014).

Récemment, beaucoup de chercheurs s'intéressent aux plantes médicinales pour leur richesse en polyphénols, flavonoïdes, tanins, ... etc. Qui possède en plus de leurs activités antioxydantes des activités antimicrobiennes.

Les polyphénols sont dotés d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement dû à leurs diversités structurales, les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité (COWAN, 1999). Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ceux-ci sont de puissants inhibiteurs des microorganismes (SCALBERT, 1991).

Plusieurs études expliquent l'activité antibactérienne des polyphénols par :

- L'inhibition des enzymes bactériennes expliqué par de fortes interactions protéines-polyphénols.
- Déstabilisation de la membrane plasmique et perte de sa fluidité.
- Mobilisation des micronutriments nécessaires au développement des cellules bactériennes (propriété de chélation).

Ces différents mécanismes sont observés pour nombre de polyphénols, mais sont tous réunis pour les flavonoïdes, qui sont ainsi la classe la plus inhibitrice de la croissance bactérienne (ULANOWSKA *et al.*, 2007).

## *Deuxième partie*

---

### *Etude expérimentale*

## *Chapitre III*

---

### *Matériel et Méthodes*

La partie expérimentale de notre étude a été réalisée au laboratoire commun de la faculté des sciences biologiques et agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, ainsi qu'au niveau du laboratoire de microbiologie appliquée dirigé par le professeur HOUALI.K.

### III.1-Matériel :

Le matériel utilisé durant notre expérimentation est donné dans l'Annexe 01.

#### III.1.1. Matériel végétal :

Les feuilles d'*Arbutus unedo*, ont été récoltées au mois de Février 2016, dans la région de Larbaa nath Irathen, wilaya de Tizi-Ouzou.

Arrivées au laboratoire les échantillons de feuilles subissent un tri et un nettoyage à l'eau distillé (une fois).

Une fois égouttées, les feuilles sont divisées en trois groupes. Le premier groupe est séché à 25°C à l'abri de la lumière, le deuxième et le troisième dans une étuve, respectivement à 50°C et 70°C. Pour chaque groupe la fin du séchage est déterminée par l'obtention de trois pesées consécutives à poids constant.

En fin de séchage, les feuilles sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique et la poudre obtenue est stocké dans de petits bocaux en verre.



Figure 12:Extraits obtenus après broyage (originale)

**A** : extrait séché à 25°C, **B** : extrait séché à 50°C, **C** : extrait séché à 70°C

### III.1.2-Préparation de l'extrait :

20g de poudre de feuilles ont été macérés dans 200ml de l'eau distillée pendant 24h sous agitation continue, puis filtré sur laine de verre.

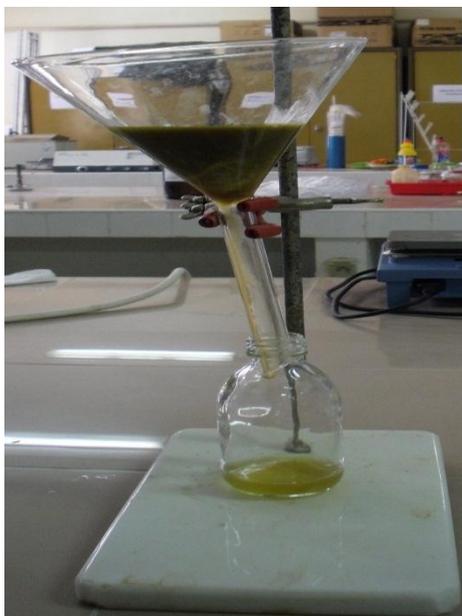


Figure 13:Dispositif de filtration (originale)

Le filtrat est reparti dans des cristallisoirs à raison de 25 ml par cristallisoir, congelé pendant 24h à  $-80^{\circ}\text{C}$ , puis lyophilisé.

Le lyophilisat obtenu est stocké à l'abri de l'humidité et de la lumière



Figure 14: Lyophilisateur (originale)

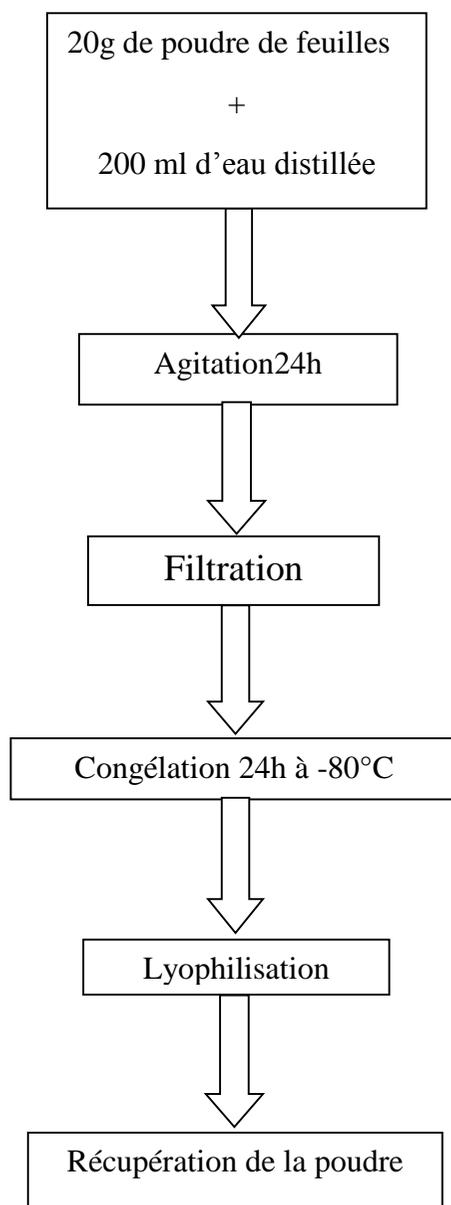


Figure 15: Etapes d'obtention de l'extrait brut (ORAK *et al.*, 2011)

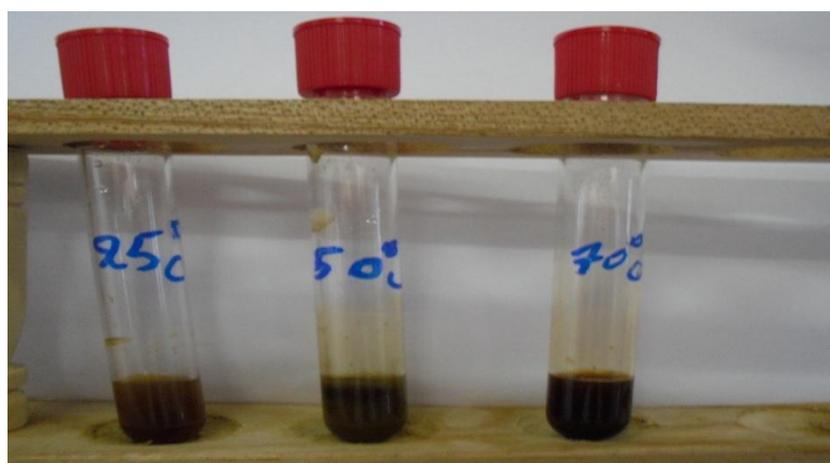


Figure 16: solutions mères dissoute dans de l'eau distille (originale).

### III.1.3 Souches bactériennes :

L'activité antibactérienne de nos extraits a été testée sur quatre souches bactériennes (Tableau II) de la collection du laboratoire de microbiologie appliquée.

Tableau II: Souches bactériennes testées

Gram positif (+)	Gram négatif (-)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311

## III.2 Méthodes d'analyses :

### III.2.1 Dosage des polyphénols totaux :

La teneur en polyphénols totaux des trois extraits a été dosée par spectrophotométrie selon la méthode colorimétrique au Folin-Ciocalteum mise au point en 1965 par SINGLETON et ROSSI.

#### A.Principe :

Le réactif Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (RIBEREAU-GAYON, 1968).

La coloration bleue produite, proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits végétaux, présente un maximum d'absorption à 765nm (BOIZOT et CHARPENTIER, 2006 ;GHAZI et SAHRAOUI, 2005).

## B. Mode opératoire :

La teneur en polyphénols totaux (PPT) a été déterminée par spectrophotométrie, suivant le protocole appliqué en 2007 par LI et ses collaborateurs (figure 18).

Dans des tubes à essai nous introduisons successivement 200  $\mu$ l de l'extrait végétal(200 $\mu$ g/ml), 1 ml de réactif de folin-ciocalteu fraîchement préparé dilué 10 fois dans l'eau distillée. Après une incubation de 4 minutes les tubes sont additionnés de 800  $\mu$ l de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 75mg/ml). Le mélange réactionnel est incubé à l'obscurité pendant 45 minutes, à température ambiante, puis la lecture de l'absorbance est effectuée à 760 nm.

Le même protocole est suivi pour la construction de la courbe étalon d'acide gallique (5-100 $\mu$ g/ml). La concentration en polyphénols de nos extrais exprimée en équivalent acide gallique (GAE) est calculé sur la base de l'équation de la droite d'étalonnage ci-dessous.

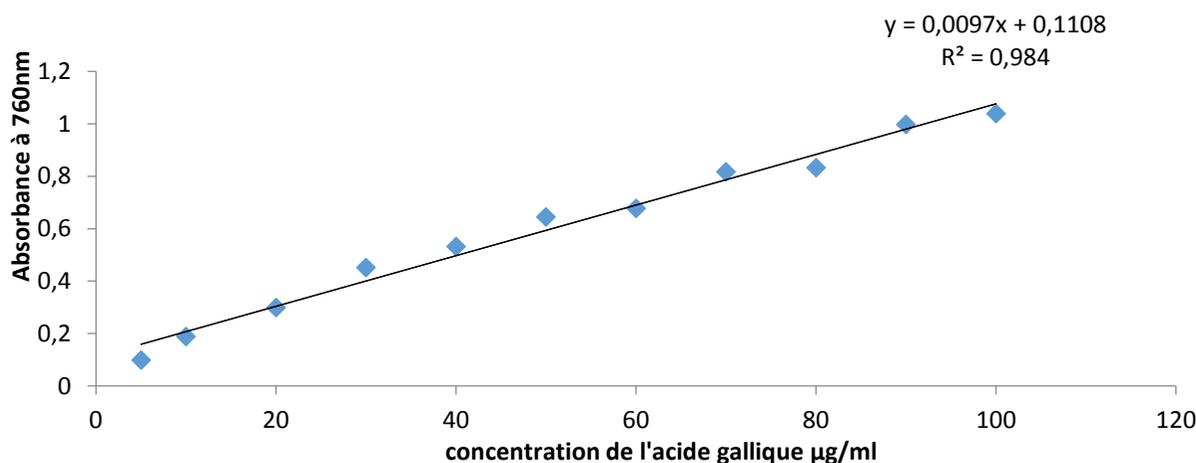


Figure 17: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

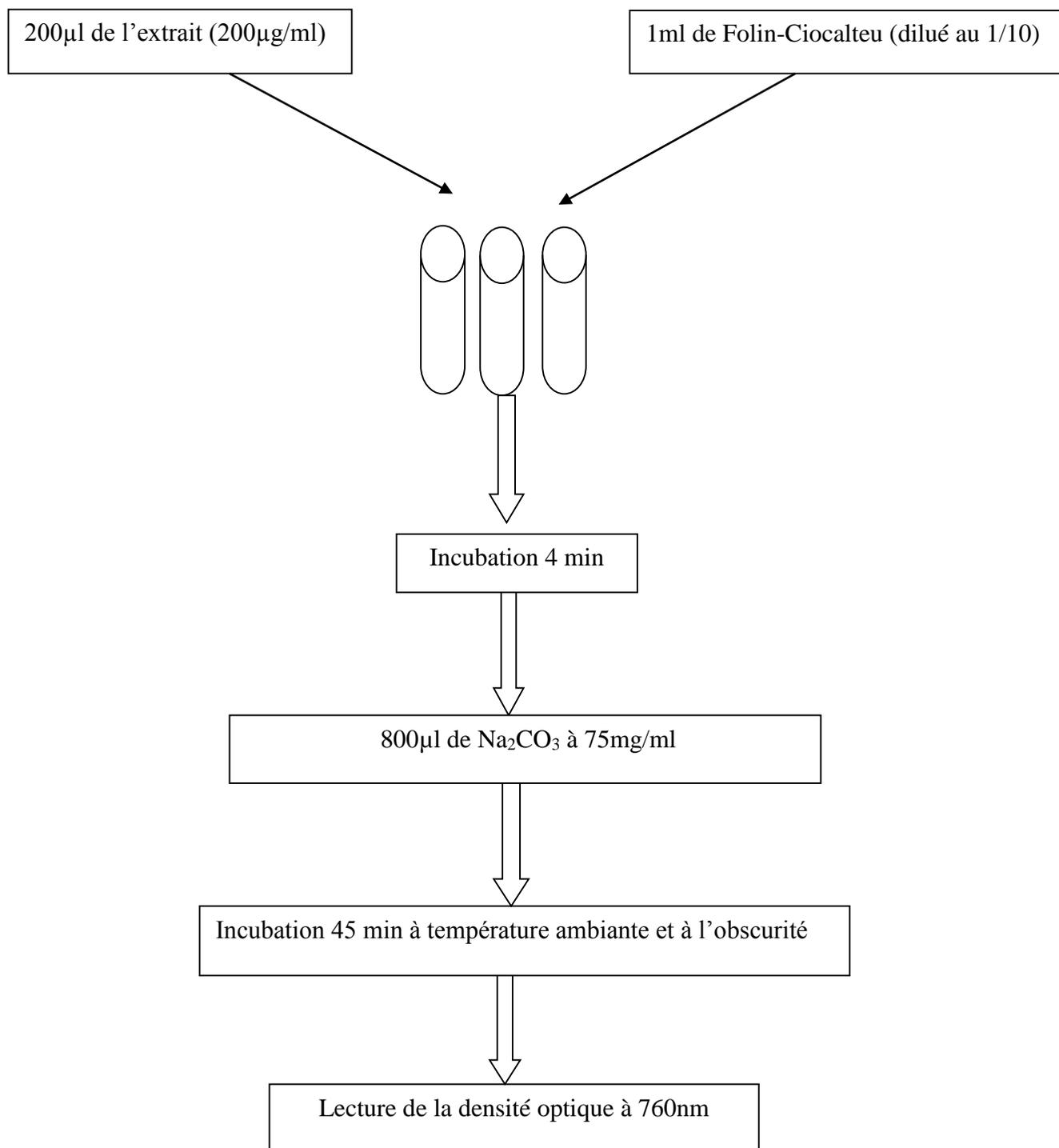


Figure 18: Protocole de dosage des polyphénols. (LI *et al.*, 2007).

### III.2.2 Etude de l'activité antioxydante des extraits :

#### III.2.2.1 Test de capacité antioxydante totale (TAC) :

##### A. Principe :

Dans cet essai, le mécanisme réactionnel est basé sur la réduction du molybdène(VI) au molybdène (V) par les composés réducteurs présents dans les échantillons.

Le complexe obtenu est composé de phosphomolybdate (V) de couleur verte, et son absorbance est mesuré par spectrophotométrie à 695nm (PRIETO *et al.*, 1999).

##### B. Mode opératoire :

Le protocole expérimental suivi est celui de PRIETO *et al.* (1999) (figure 19).

Dans des tubes à essai nous mélangeons, 0.1ml de l'extrait végétal (100 à 500 µg/ml) et 1 ml de réactif (0,6mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 28 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 4 mM de molybdate d'ammonium).

Le mélange est incubé à 95°C pendant 90 minutes au bain marie. Après refroidissement, la lecture de l'absorbance se fait à 695 nm.

L'acide ascorbique est utilisé comme référence dans les mêmes conditions opératoires ainsi que dans la même gamme de concentrations.

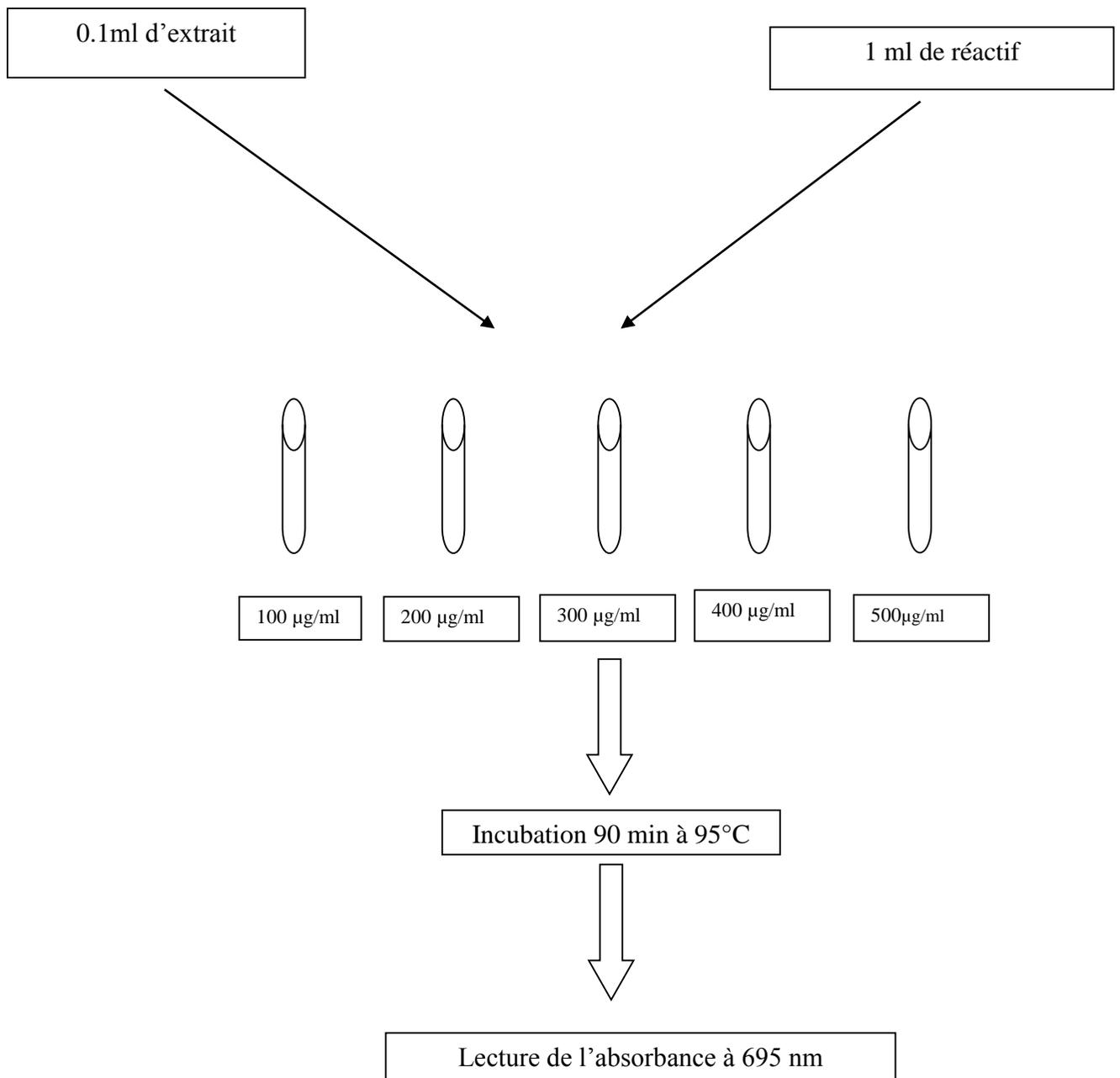


Figure 19: Protocole du test capacité antioxydante totale (PRIETO *et al.*, 1999).

### III.2.2.2 Test du pouvoir antioxydant par réduction du fer (FRAP) :

#### A. Principe :

Le pouvoir réducteur d'un extrait végétal est associé à son pouvoir antioxydant, l'activité réductrice du fer a été déterminée selon la méthode décrite par OYAIZU (1986), basée sur la réaction chimique de réduction du fer ferrique Fe (III) en fer ferreux Fe(II)(HUBERT, 2006).

Cette réduction est observée par le passage de la couleur jaune du fer ferrique ( $Fe^{+3}$ ) au bleu vert du fer ferreux ( $Fe^{+2}$ ), dont l'intensité mesurée à 700 nm, est proportionnelle au pouvoir réducteur des extraits testés (JAYAPRAKASH *et al.*, 2001).

#### B. Mode opératoire :

Le mélange réactionnel est composé de 400  $\mu$ l d'extrait aqueux (100 à 500  $\mu$ g/ml), 400  $\mu$ l de tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 400 $\mu$ l de ferricyanure de potassium à 1%. Une fois incubé 20 minutes à 50°C, ce dernier est additionné de 400 $\mu$ l d'acide trichloracétique à 10% puis centrifugé 10 minutes à 3000 rpm.

400 $\mu$ l du surnageant sont récupérés et complétés de 400 $\mu$ l d'eau distillée et de 80 $\mu$ l de chlorure ferrique à 0.1% (figure 21). Puis la lecture de l'absorbance se fait à 700nm.

L'acide ascorbique est utilisé comme référence dans les mêmes conditions opératoires ainsi que dans la même gamme de concentrations.

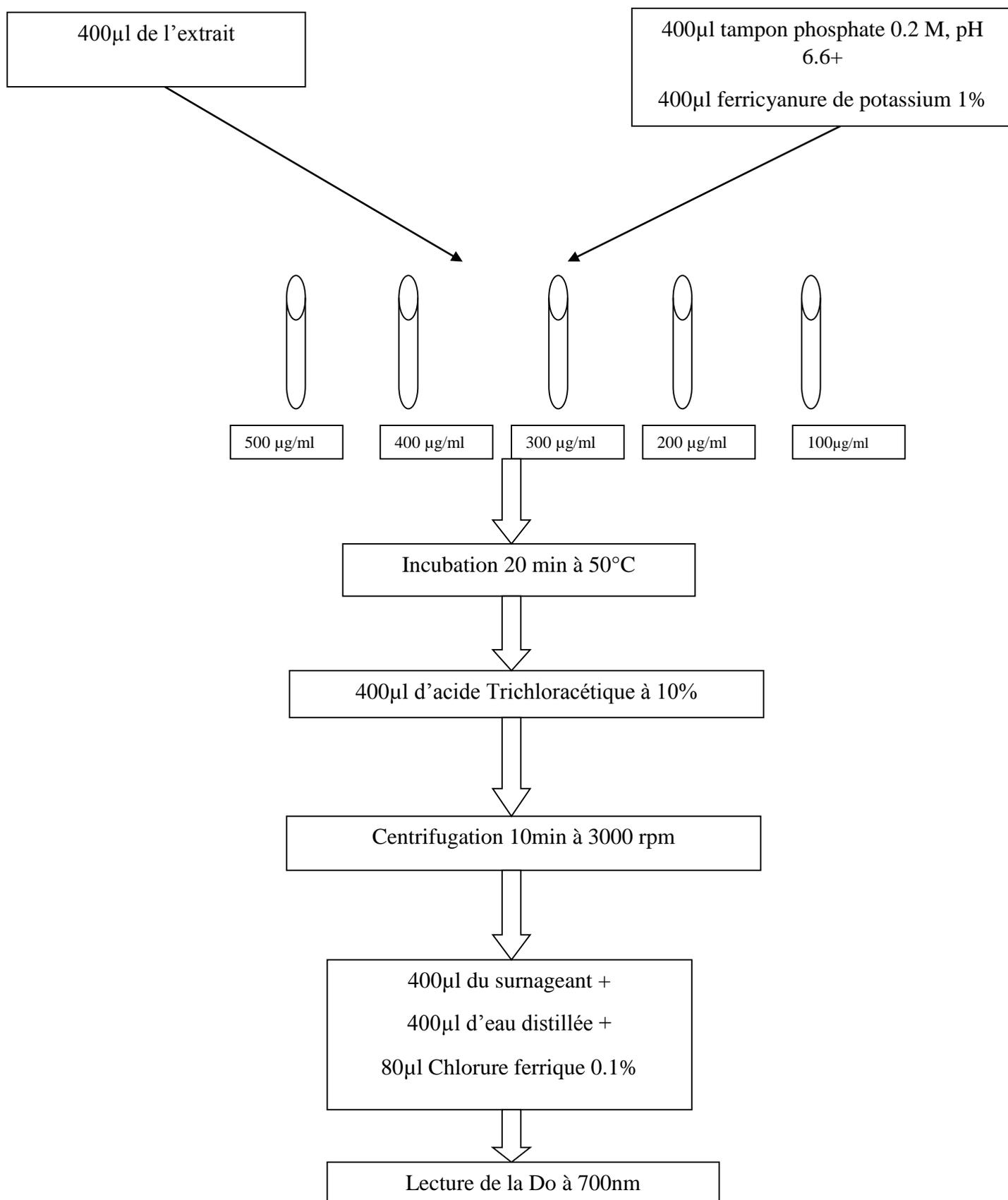


Figure 21: protocole du test de réduction du Fer (FRAP) (YILDIRIM *et al.*, 2001).

### III.2.3 Activité antibactérienne.

#### III.2.3.1 Revivification des souches

Les bactéries testées étant conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  et l'activité antibactérienne devant être réalisée sur une culture jeune, nous effectuons une revivification des souches en bouillon BHIB (24h à  $37^{\circ}\text{C}$ ), puis un repiquage sur Mueller Hinton (24h à  $37^{\circ}\text{C}$ ).

#### III.3.2.2 Préparation de la suspension bactérienne :

Les suspensions bactériennes sont préparées à partir des souches préalablement repiquées sur Mueller Hinton.

A l'aide d'une anse pasteur, on prélève quelques colonies isolées que l'on introduit dans des tubes contenant 5ml d'eau physiologique stérile. Après homogénéisation des suspensions, la densité optique mesurée à 620 nm doit être comprise entre 0.08 et 0.1, ce qui correspond à une concentration de  $10^6\text{UFC/ml}$  (DIB *et al.*, 2013).

#### III.3.2.3 Préparation des échantillons :

Les solutions stock d'échantillons sont obtenues par solubilisation de 300 mg de chaque extrait dans 1ml d'eau distillée stérile, puis filtrés sur filtre  $0.2\mu\text{m}$ .

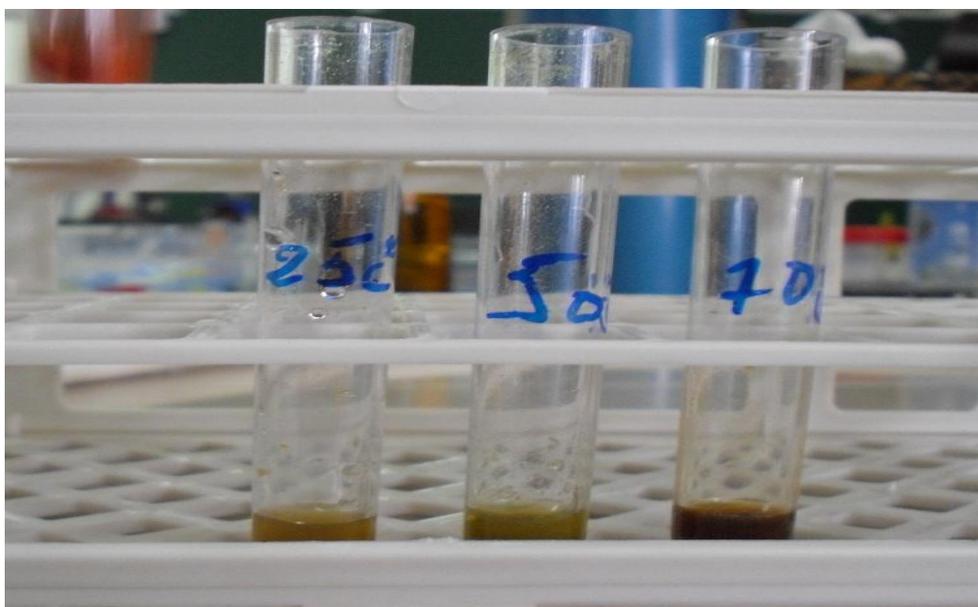


Figure 22: Solutions mères pour le test de l'activité antibactérienne (Original).

### III.3.2.4 Méthode de diffusion sur disque :

L'activité antibactérienne de nos extraits vis-à-vis des 4 souches a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu solide (DIB *et al.*, 2013).

Des disques de 6mm de diamètres découpés sur papier Whatman grade1 chr, sont stérilisés par autoclavage. Ces derniers sont déposés à la surface de la gélose Muller Hinton préalablement ensemencé par écouvillonnage, puis imprégnés de 20µl d'extraits.

Dans chaque boîte de pétri en plus des trois disques imprégnés, nous retrouvons un témoin négatif (disque + 20 µl d'eau distillée stérile), un témoin positif ((Acide nalidixique (NA, 30µg/disque) pour *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium*) et (Amoxiciline(AML, 30µg/disque) pour *Pseudomonas aeruginosa*)).

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés autour de chaque disque après incubation des boîtes 24h à 37°C.

### III.3.2.5 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration d'extrait pour laquelle, aucune croissance bactérienne n'est observée (SKANDAMIS et NYCHA, 2001).

Celle-ci, est déterminée par la méthode de diffusion sur disque décrite par DZOMBA et MUCHANYEREYI(2012). Dans les mêmes conditions opératoires que celles décrites précédemment, une série de 5 disques (D1 à D5) imprégnés (20 µl) d'une concentration décroissante d'extraits (37.5mg/ml à 2.3mg/ml) ( Tableau III) est disposées sur la gélose (MH).

Tableau III: Tableau illustrant les dilutions des extraits pour la détermination des CMI.

Dilutions	D1	D2	D3	D4	D5
Rapport de dilution	1	1/2	1/4	1/8	1/16
Concentration de l'extrait (mg/ml)	<b>37.5</b>	<b>18.7</b>	<b>9.4</b>	<b>4.7</b>	<b>2.3</b>

## *Chapitre IV*

---

### *Résultats et discussion*

Les résultats obtenus pour les tests effectués sont exprimés en moyenne de trois répétitions plus ou moins l'écart type.

## IV.1 Analyses biochimiques :

### IV.1.1 Teneur en polyphénols totaux :

La détermination de la teneur en polyphénols totaux des trois extraits a été effectuée suivant la méthode colorimétrique au réactif de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et ROSSI, 1965). Parallèlement à cette détermination une courbe d'étalonnage est établie en utilisant l'acide gallique, à différentes concentrations comme référence (figure23).

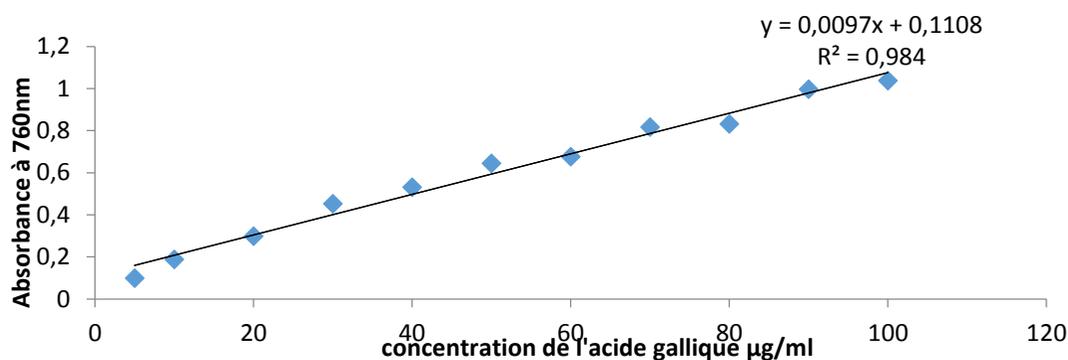


Figure 23: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les quantités de polyphénols (déterminées par l'équation  $y = 0.009x + 0.110$ ) correspondant à chaque extrait ont été rapportées en équivalent milligramme d'acide gallique par gramme de matière sèche (Figure24)

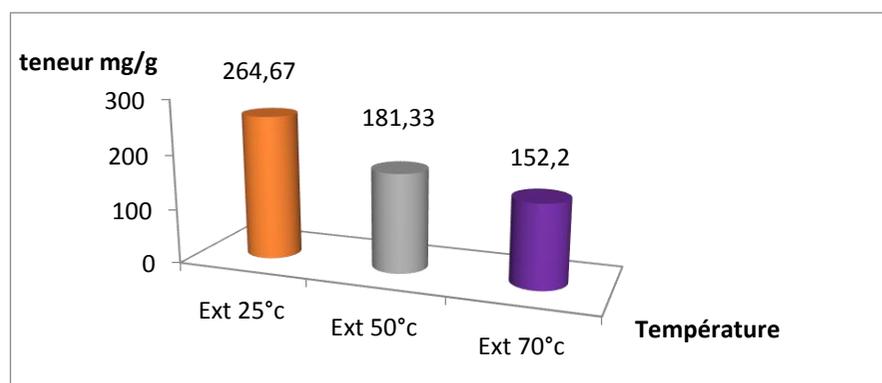


Figure 24: Teneur en polyphénols des trois extraits.

Tableau IV: teneurs en polyphénols des trois extraits

Extraits	teneur en PPT (mg EAG/g MS)
Ext 25°C	264.64 ± 8.5
Ext 50°C	181.33 ± 3.05
Ext 70°C	152.2 ± 0.79

Les différents dosages effectués mettent en évidence une variabilité des teneurs en polyphénols des trois extraits, selon la température de séchage appliquée. (Figure 24)

Ainsi en comparant la teneur en polyphénols des trois extraits aqueux, nous observons que la plus forte concentration est enregistrée pour l'extrait séché à 25°C (264,64± 8,5mg EAG/g MS). Cette dernière diminue de 31,49 % pour un séchage à 50°C (181,33±3,05 mg EAG/g MS) et de 42,5% pour un séchage à 70°C (152,2± 0,79 mg EAG/g MS).

La teneur en polyphénols enregistrée pour l'extrait aqueux d'*Arbutus unedo L* séchées à 25°C (264,64 ± 8,5mg EAG/g) est relativement supérieure à celle retrouvée par DIDI (2009) (192.4 ± 0.003mg EAG/g) sur la même plante.

Pour les deux autres températures appliquées, les résultats obtenus concordent avec les travaux de YOUSSEF et MOKHTAR (2014) et ZHANG (2009) qui rapportent respectivement des diminutions de 33,75% à 50°C et 65.9% à 60 °C sur (*Portula caoleracea L*).

La diminution dans les teneurs en polyphénols, peut-être expliquée par la dégradation thermique de ces molécules (MUELLER-HARVEY,2001). Cette sensibilité au traitement thermique, se traduit par la dégradation de la structure phénolique (RENARD *et al.*,2014) et l'apparition de nouvelles molécules à forte affinité vis-à-vis des protéines et des glucides (O'CONNEL et FOX, 1999).

#### IV.1.2 Capacité antioxydante totale :

La figure ci-dessous illustre les résultats obtenus pour le test du pouvoir antioxydant au molybdate d'ammonium, des trois extraits étudiés.

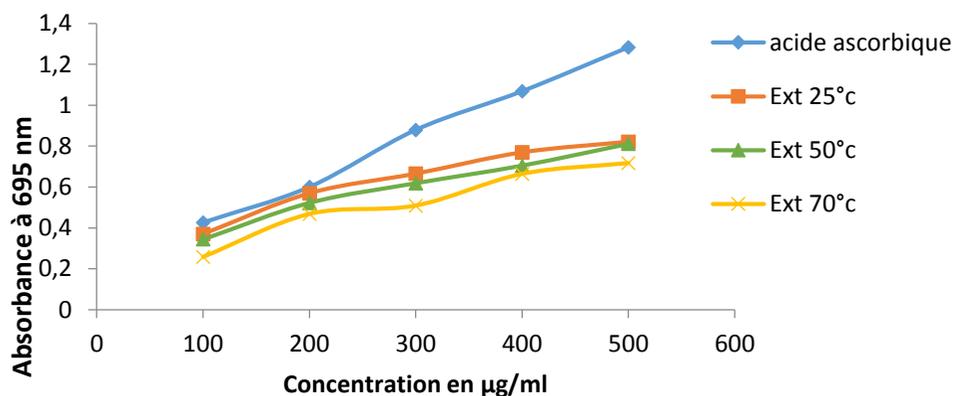


Figure 25: Capacité antioxydante totale des extraits séchés à 25, 50 et 70°C et de l'acide ascorbique.

Les résultats obtenus, révèlent une activité antioxydante appréciable de nos extraits et proportionnelle à la concentration utilisée. De plus, la figure (25) met en évidence la diminution de cette activité avec l'augmentation de la température de séchage

Ainsi comparativement à l'acide ascorbique, antioxydant de référence ( $IC_{50} = 0,200 \pm 0,008$  mg/ml), les extraits obtenus à 25°C, 50°C et 70°C avec respectivement des  $IC_{50}$  de  $0,287 \pm 0,006$  mg/ml,  $0,334 \pm 0,003$  mg/ml et  $0,411 \pm 0,017$  mg/ml se caractérisent par des activités antioxydantes relativement proches de celle enregistrée pour la vitamine C.

L'extrait exposé à une température de séchage de 25°C est celui qui se caractérise par la plus forte activité antioxydante. Les résultats pour les extraits exposés à une température de 50°C et 70°C quant à eux sont affectés respectivement d'une baisse de 18.73% et 30.17%.

Comparé aux travaux de RODRIGUEZ *et al.* (2016) sur les feuilles d'*Aristotelia chilensis* qui rapporte respectivement une baisse de l'ordre de 39.54% (50°C) et 45.27% (70°C), nos extraits ont une plus forte activité antioxydante. De plus celle-ci reste relativement conservée au regard des résultats obtenus (tableau v). Ainsi au maximum d'activité enregistrée à la concentration de 500 µg/ml, celle-ci diminue de 1,71% pour un séchage à 50°C et 12,63% pour un séchage 70°C.

En raison d'une forte corrélation entre les teneurs en polyphénols et l'activité antioxydante totale, la diminution des teneurs en ces substances bioactives affecte négativement l'activité antioxydante de l'extrait végétale (RODRIGUEZ *et al.*, 2016). Néanmoins certains auteurs

rapportent une augmentation de cette activité antioxydante et expliquent cela par la formation de nouveaux composés à activité antioxydante (TOMAINO *et al.*,2005).

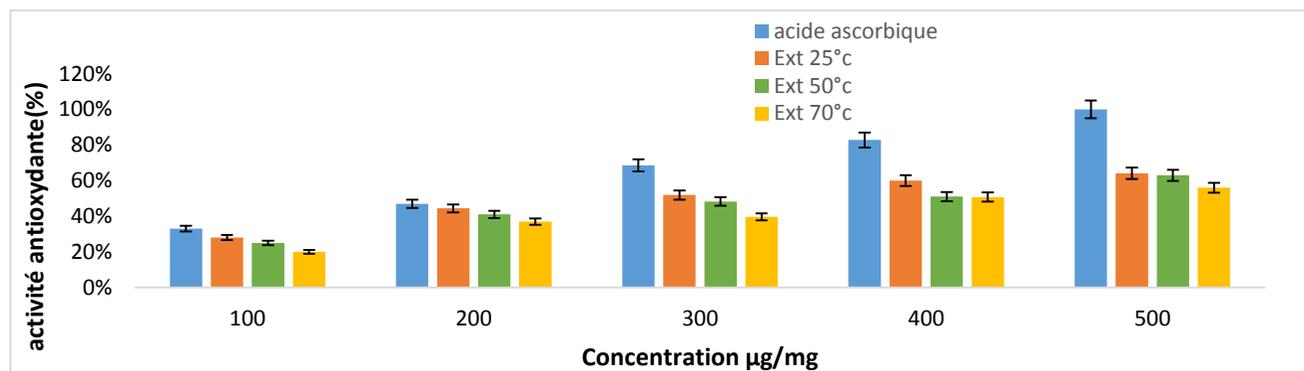


Figure 26:Activité antioxydante totale des trois extraits et de l'acide ascorbique.

Tableau V:Pourcentages de l'activité antioxydante des trois extraits et de l'acide ascorbique.

	100µg/ml	200µg/ml	300 µg/ml	400 µg/ml	500 µg/ml
<b>Vit C</b>	33%±0,06	47%±0,05	68,6%±3,82	82,8%±3,90	100%±0,00
<b>Ext 25°C</b>	28%±1,19	44%±0,78	51,9%±1,91	60,07%±5,65	64,10%±3,06
<b>Ext 50°C</b>	25%±0,6	41%±0,94	48,3%±0,84	51%±0,98	63%±0,52
<b>Ext 70°C</b>	20%±1,18	37%±1,45	39,7%±0,63	50,8%±2,13	56%±1,05

Vit C : Vitamine C

Ext : Extrait

Tableau VI : IC<sub>50</sub> enregistrées pour les trois échantillons et l'acide ascorbique.

Extraits	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
<b>Acide ascorbique</b>	0,200±0,008
<b>Extrait séché à 25°C</b>	0,287±0,006
<b>Extrait séché à 50°C</b>	0,334±0,003
<b>Extrait séché à 70°C</b>	0,411±0,017

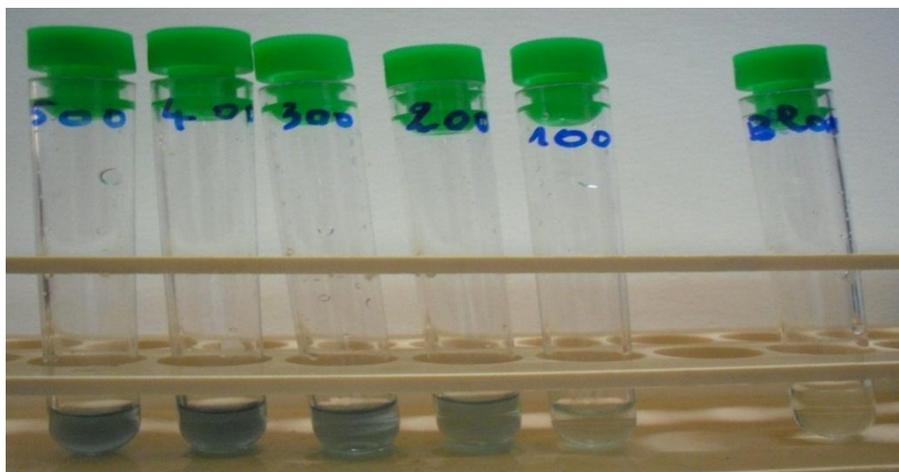


Figure 27: Résultat du test TAC (originale).

#### IV.1.3 Réduction du fer :

Les résultats obtenus illustrés en figure 28, indiquent que le pouvoir réducteur présente une augmentation proportionnelle à la concentration d'extrait appliquée. En comparant les résultats obtenus pour les extraits de feuilles d'*Arbutus unedo*, à ceux de l'acide ascorbique, nous remarquons une différence importante entre les densités optiques enregistrées.

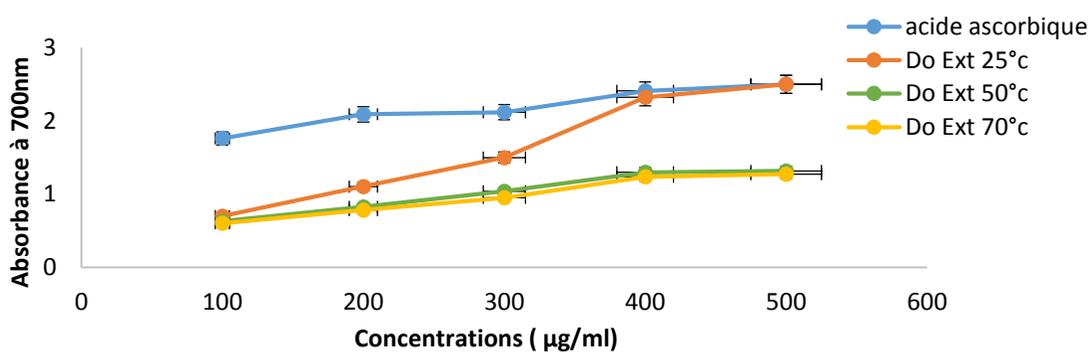


Figure 28: Pouvoir réducteur des trois extraits et de l'acide ascorbique.

L'extrait issu d'un séchage à 25 °C se démarque des deux autres extraits, par un pouvoir réducteur similaire à celui enregistré pour la vitamine C aux concentrations de 400 et 500 µg/ml (tableau VII). Ces résultats, prouvent l'excellent pouvoir réducteur de notre extrait à ces concentrations. Néanmoins, en comparant les IC<sub>50</sub>, l'extrait à 25°C se trouve affecté d'une baisse de 48.4% par rapport à la vitamine C.

Pour les deux autres extraits, malgré une faible activité réductrice, nous pouvons affirmer que celle-ci se trouve conservée, lors du passage d'un séchage à 50°C à un séchage à 70°C, au regard des faibles variations enregistrées (baisse de 2% à la concentration de 500 µg/ml).

Néanmoins, cette variation est plus marquée lors du passage d'un traitement thermique à 25°C à un traitement thermique à 50°C (baisse de 47% à 500 µg/ml) et à 70°C (baisse de 49% à 500 µg/ml), ce qui dénote d'une activité réductrice plus faible. Ces résultats mettent en évidence la sensibilité thermique du pouvoir réducteur des extraits étudiés.

Des résultats similaires sont rapportés par JENG *et al.* (2015), sur les feuilles de *Ipomoea batatas*, qui rapporte une baisse de 52.19% lors d'un séchage à 50°C. GONÇALVES *et al.* (2014) quant à lui, retrouve une baisse du pouvoir réducteur de même ordre (58%) lors du séchage à 50°C des feuilles de *Cyanara cardunculus* L, mais elle est nettement plus importante lors du séchage à 70°C (88%).

Les tests du TAC et du FRAP d'un composé peuvent servir comme indicateur significatif de son potentiel antioxydant (JEONG *et al.*, 2004).

La corrélation entre la teneur en polyphénols de l'extrait et l'activité réductrice reste l'un des justificatifs à la baisse de cette activité biologique. De plus, comme précédemment une augmentation de cette activité peut être observée pour certains extraits et serait la conséquence de l'apparition de nouvelles molécules à forte activité réductrice.

Comparativement aux extraits fractionnés, les extraits bruts sont réputés plus actifs. Cette forte activité peut être expliquée par la composition complexe de ces extraits en substance phénoliques et aux interactions entre-elles. Parmi ces composés nous retrouvons les flavonoïdes, réputés d'une part être les plus puissants donneurs d'électrons et d'autre part les premiers composés responsables du pouvoir antioxydant des extraits végétaux grâce à leurs groupements hydroxyles (HEIM *et al.*, 2002., SHAIDI et NACZK, 2004). Malgré un rôle majeur dans l'activité antioxydante des plantes, cette classe de polyphénols reste la première et la plus affectée par le traitement thermique (KLIMCZAK *et al.*, 2006).

Tableau VII: Pourcentages de réduction du fer des trois extraits et l'acide ascorbique.

concentration	100 µg/ml	200 µg/ml	300 µg/ml	400 µg/ml	500 µg/ml
<b>Vit C</b>	71%±5.95	83.6%±4.30	84.7%±4.10	96.8%±0.98	100%±0.00
<b>Ext 25°C</b>	28.04%±2.45	44.1%±1.28	60% ±3.07	92.9%±4.13	100%±0.00
<b>Ext 50°C</b>	25.2%±1.54	33%±1.29	42%±0.08	51.9%±0.54	53%±0.86
<b>Ext 70°C</b>	24.12%±3.24	31.28%±3.01	38%±0.88	49.5%±0.80	51%±0.65

Ext : Extrait

Vit C : Vitamine C

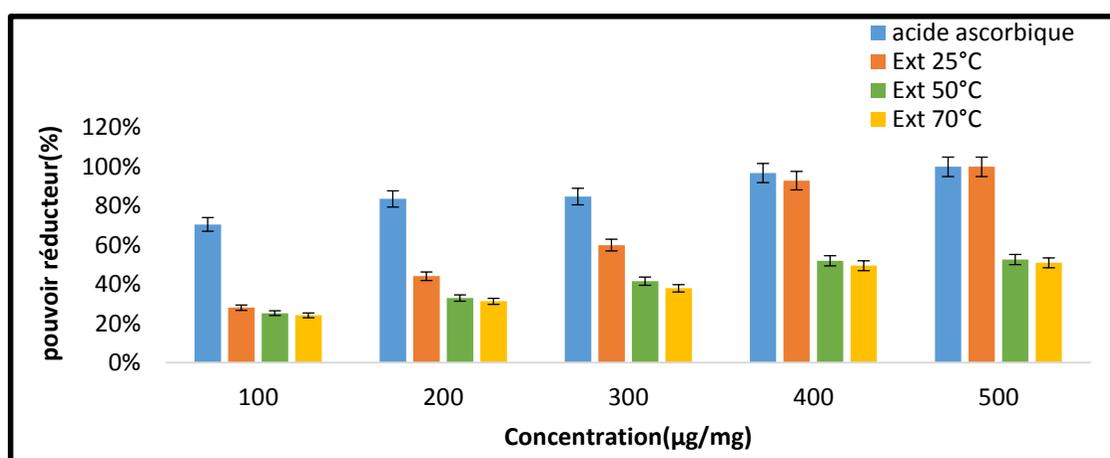


Figure 29: histogramme des pourcentages du pouvoir réducteur des trois extraits et l'acide ascorbique. (Frap).

Tableau VIII: Pouvoir réducteur des extraits de feuilles d'*A. unedo* et l'acide ascorbique exprimés en IC<sub>50</sub>.

Extraits	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
<b>Acide ascorbique</b>	0,071±0.006
<b>Extrait séché à 25°C</b>	0,219±0.01
<b>Extrait séché à 50°C</b>	0,423±0.05
<b>Extrait séché à 70°C</b>	0,461±0.043



Figure 30: Résultats du test de pouvoir réducteur. (originale).

#### IV.1.4 Activité antibactérienne :

##### IV.1.4.1 Détermination de l'activité antibactérienne :

L'effet antibactérien des polyphénols est l'une des activités biologiques les plus étudiées (BASLI *et al.*, 2012).

L'activité antibactérienne des extraits des feuilles d'*Arbutus unedo* a été testée sur 4 souches bactériennes (2 de Gram – et 2 de Gram +), par la méthode de diffusion sur gélose Muller Hinton (DIB *et al.*, 2013). Dans cette dernière, la sensibilité des souches se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des disques (Figure 31,32,33,34).

La lecture des résultats est faite par une mesure des diamètres des zones d'inhibition autour de chaque disque. Ainsi le degré de sensibilité des souches bactériennes testées est déterminé par comparaison de leurs diamètres d'inhibition aux diamètres référencés (tableaux IX,X).

Tableau IX: Degré de sensibilité des bactéries aux extraits végétaux suivant le diamètre d'inhibition (DURAFFOURD et LAPRAZ, 2002).

Diamètre d'inhibition	≤8mm	8 à 14mm	15 à 20mm	≥20mm
Sensibilité	Résistance	Sensibilité limitée	Sensibilité moyenne	Très sensible
Degré de sensibilité	(-)	(+)	(++)	(+++)

**d** : diamètre d'inhibition.

Tableau X: Sensibilité des bactéries aux antibiotiques utilisés (ANONYME, 2013).

Antibiotique	Code	Charge( $\mu\text{g}$ )	Résistance (-)	Sensibilité moyenne (+)	forte Sensibilité (++)
<b>Amoxiciline</b>	AML	30 $\mu\text{g}$	$d \leq 13\text{mm}$	$14\text{mm} \leq d \leq 17\text{mm}$	$d \geq 18\text{mm}$
<b>Acide nalidixique</b>	NA	30 $\mu\text{g}$	$d \leq 13\text{mm}$	$14\text{mm} \leq d \leq 18\text{mm}$	$d \geq 19\text{mm}$

Tableau XI: Diamètre des zones d'inhibition par les différents extraits étudiés (en mm).

Extractions et ATB Souches	Antibiotiques (AML/NA) (mm)	Ext 25°C (mm)	Ext 50°C (mm)	Ext 70°C (mm)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	NA 24 $\pm$ 0,00 (++)	12 $\pm$ 0,00 (+)	12 $\pm$ 0,1 (+)	13,3 $\pm$ 0,23 (+)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	NA 25 $\pm$ 0,00 (++)	12 $\pm$ 0,00 (+)	12 $\pm$ 0,06 (+)	14,3 $\pm$ 0,12 (+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	AML 33,7 $\pm$ 0,06 (++)	12 $\pm$ 0,00 (+)	11 $\pm$ 0,00 (+)	11,7 $\pm$ 0,06 (+)
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	NA 25,7 $\pm$ 0,06 (++)	0 (-)	0 (-)	0 (-)

Ext : extrait, AML : Amoxiciline, NA : Acide nalidixique.

Les résultats obtenus à la concentration de 6 mg par disque (Tableau XI), indiquent que les trois extraits de feuilles d'*Arbutus unedo*, exercent un effet antibactérien sur toutes les souches testées à l'exception de *salmonella typhimurium*.

Pour les trois extraits les diamètres d'inhibition obtenus, variant entre  $11 \pm 0,00$  mm et  $14,3 \pm 0,12$  mm, ne présentent pas de différence importante.

Comparativement aux travaux de LITAIEM *et al*,(2013) sur les feuilles *Zingiber officinale Roscoe* traité à 40, 50, 60 et 70°C, trouve à une concentration de 2 mg par disque, une perte de l'activité antibactérienne dès que l'on dépasse les 40°C pour 3 des souches étudiées. La perte de l'activité antibactérienne est aussi constatée dans cette étude pour *Staphylococcus aureus* des les 60°C. Cette perte de l'activité antibactérienne peut être expliquée par la dénaturation thermique des substances végétales à activité antibactérienne. Dans notre étude l'activité antibactérienne est conservée, ce qui indique la résistance des molécules bioactives à la dénaturation thermique. Néanmoins, BOLOU *et al*,(2011) dans leur étude sur l'influence de la température sur l'activité antibactérienne des feuilles de *Terminalia glaucescens*, trouvent que le traitement thermique a peu d'effet sur les diamètres des zones d'inhibition et révélant ainsi le caractère thermostable des molécules bioactives.

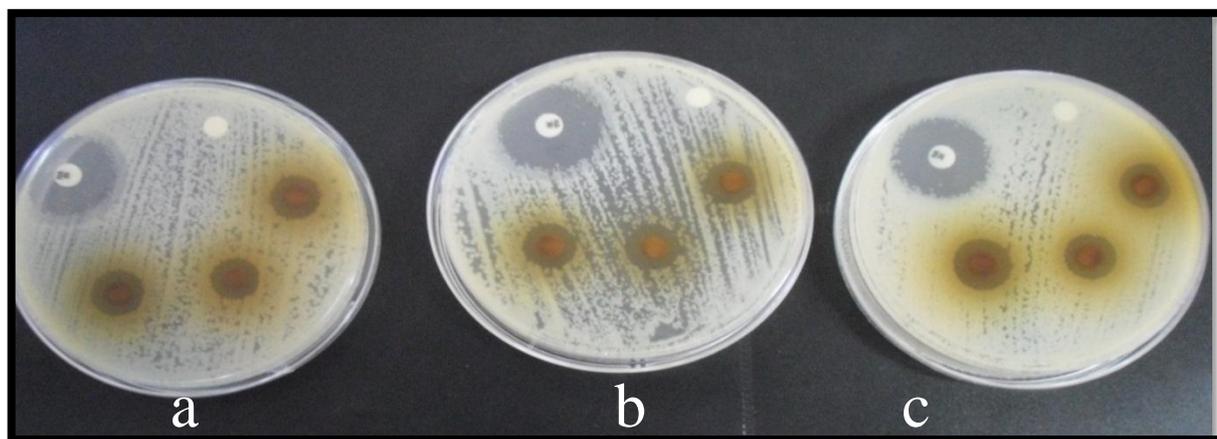


Figure 31: Test de l'activité antibactérienne des trois extraits sur *Bacillus cereus* ATCC.

**a** : Extrait des feuilles séchées à 25°C ; **b** : Extrait des feuilles séchées à 50°C ; **c** : Extrait des feuilles séchées à 70°C

Les trois répétitions sur la même boîte

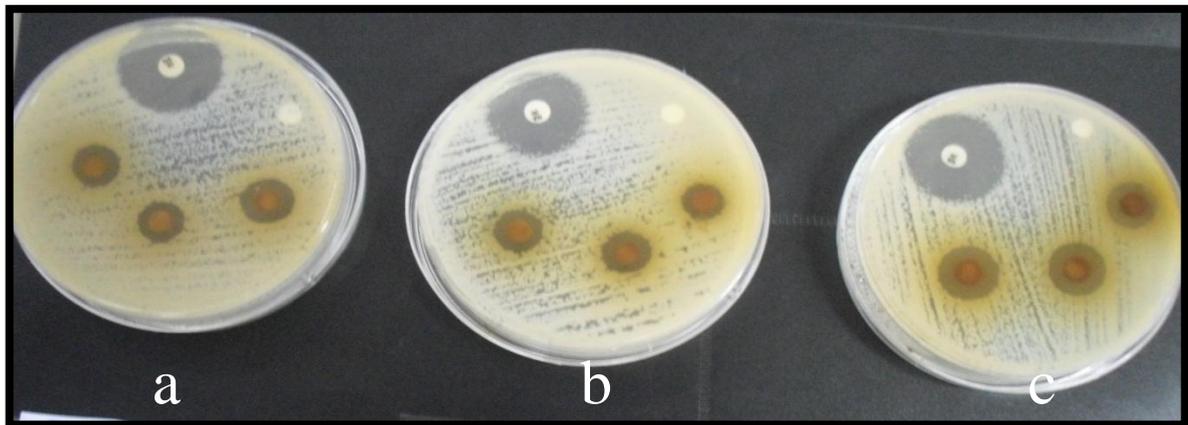


Figure 32: Test de l'activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* ATCC.

**a** : Extrait des feuilles séchées à 25°C ; **b** : Extrait des feuilles séchées à 50°C ; **c** : Extrait des feuilles séchées à 70°C.

Les trois répétitions sur la même boîte

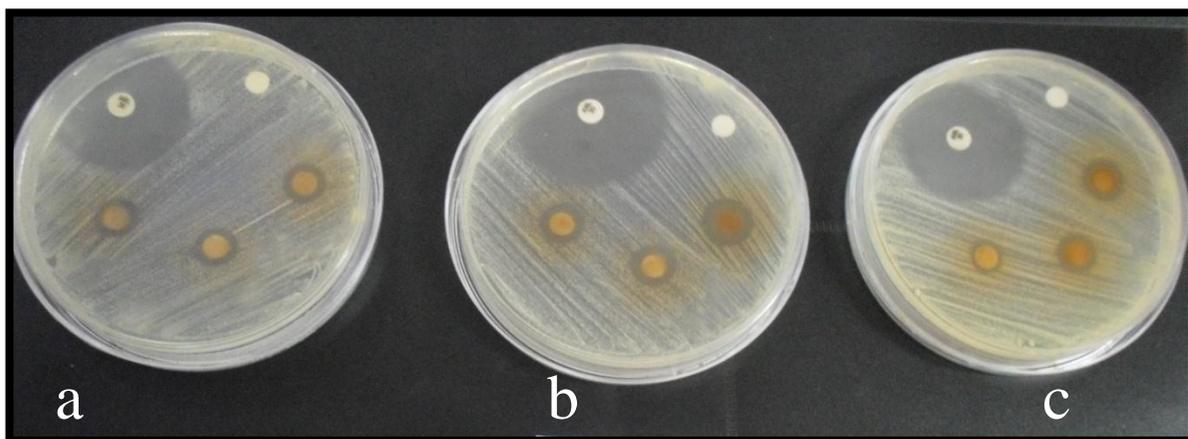


Figure 33: Test de l'activité antibactérienne des trois extraits effectués sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC.

**a** : Extrait des feuilles séchées à 25°C ; **b** : Extrait des feuilles séchées à 50°C ; **c** : Extrait des feuilles séchées à 70°C.

Les trois répétitions sur la même boîte

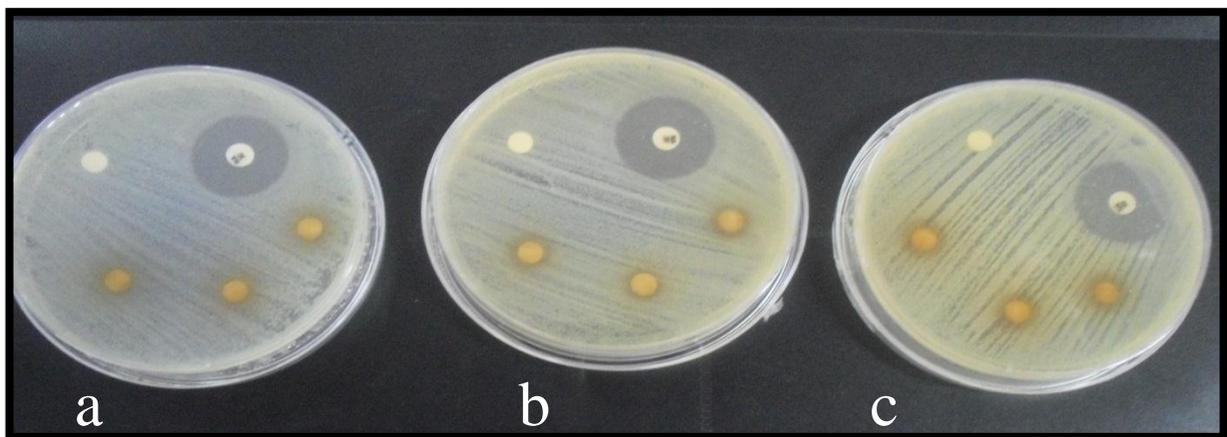


Figure 34: Test de l'activité antibactérienne des trois extraits sur *Salmonella typhimurium*.

**a** : Extrait des feuilles séchées à 25°C ; **b** : Extrait des feuilles séchées à 50°C ; **c** : extrait des feuilles séchées à 70°C.

Les trois répétitions sur la même boîte

#### IV.1.4.2 Détermination de la CMI :

La détermination de la concentration minimale inhibitrice des extraits sur les souches bactériennes ayant exprimées une sensibilité aux extraits (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*), est effectué selon la méthode de diffusion sur gélose décrite par DZOMBA et MUCHANYEREYI (2012).

Notre étude indique que les souches étudiées, ne présentent pas la même sensibilité vis-à-vis des extraits, ce qui se traduit par une variation des concentrations effectives en extraits (tableau XII, XIII, XIV).

*Bacillus cereus* ATCC 10876 ainsi que *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, présentent la plus grande sensibilité à la concentration inhibitrice de 9.37 mg/ml, comparativement à *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dont la croissance a été inhibée à 18.75 mg/ml.

De plus les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas d'effet de la température de séchage sur la CMI pour les trois souches.

Comparativement aux CMI rapportées par FHATUWANI (2014) sur les *Athrixia phyllicoides* (45 à 65°C), la CMI enregistrée dans notre étude (9.37 mg/ml) pour *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 est supérieure à celle rapportée par cet auteur pour les

mêmes souches (6.3 mg/ml). Dans le cas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, nous obtenons une CMI de 18.75 mg/ml, qui est là aussi supérieur à celle rapportée par la même étude (3.1 mg/ml).

Tableau XII: valeurs de la des extraits vis-à-vis de *Bacillus cereus*.

Dilutions C (mg/ml)	D1 37.5	D2 18.75	D3 9.37	D4 4.68	D5 2.34
<b>Ext 25°C</b>	–	–	–	+	+
<b>Ext 50°C</b>	–	–	–	+	+
<b>Ext 70°C</b>	–	–	–	+	+

(–) pas de développement (inhibition)

(+) développement (pas d'inhibition)

Tableau XIII: valeurs de la CMI des extraits vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Dilutions C (mg /ml)	D1 37.5	D2 18.75	D3 9.37	D4 4.68	D5 2.34
<b>Ext 25°C</b>	–	–	+	+	+
<b>Ext 50°C</b>	–	–	+	+	+
<b>Ext 70°C</b>	–	–	+	+	+

(–) pas de développement (inhibition)

(+) développement (pas d'inhibition)

Tableau XIV: Valeurs de la CMI des extraits vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*.

Dilutions	D1	D2	D3	D4	D5
C (mg/ml)	37.5	18.75	9.37	4.68	2.34
<b>Ext 25°C</b>	-	-	-	+	+
<b>Ext 50°C</b>	-	-	-	+	+
<b>Ext 70°C</b>	-	-	-	+	+

(-) pas de développement (inhibition)

(+) développement (pas d'inhibition)

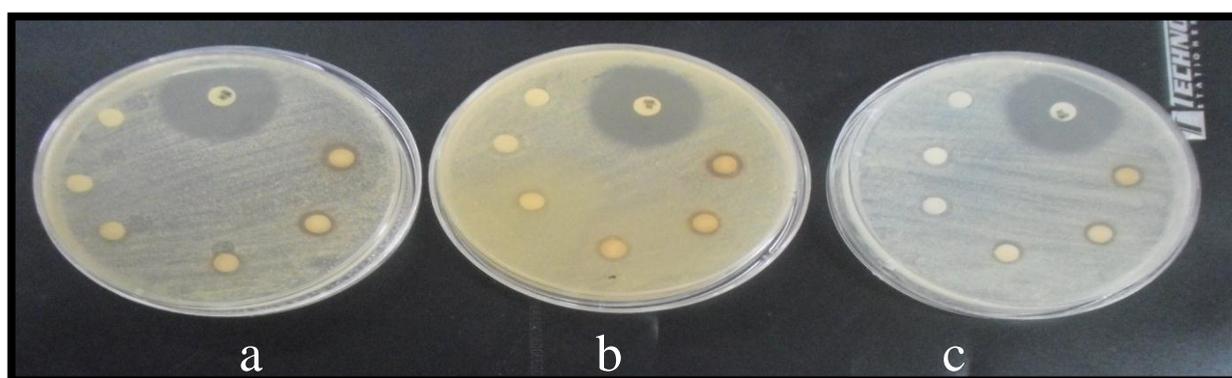


Figure 35: Résultats de la détermination de la CMI des trois extraits vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*.

**a** : Extrait des feuilles séchées à 25°C ; **b** : Extrait des feuilles séchées à 50°C ; **c** : Extrait des feuilles séchées à 70°C.

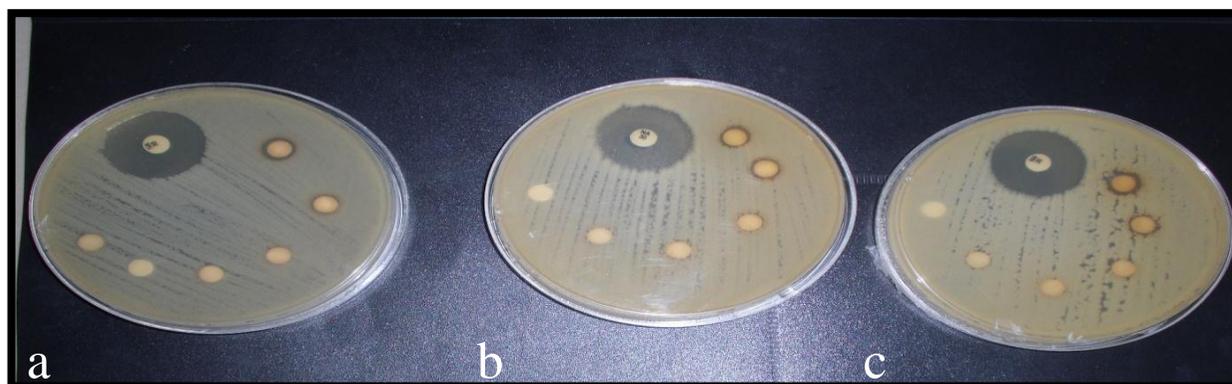


Figure 36: Résultats de la détermination de la CMI des trois extraits vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

**a** : Extrait des feuilles séchées à 25°C ; **b** : Extrait des feuilles séchées à 50°C ; **c** : Extrait des feuilles séchées à 70°C.

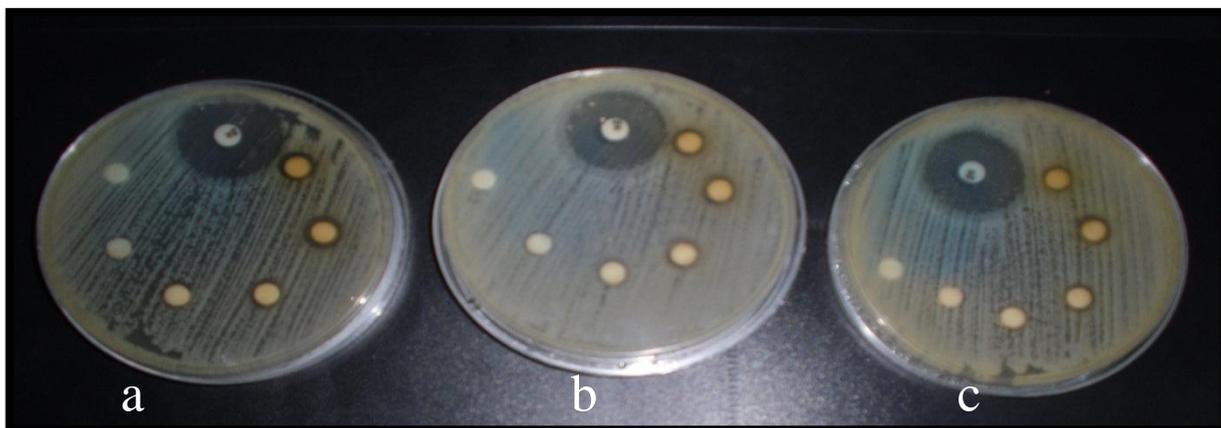


Figure 37: Résultats de la détermination de la CMI des trois extraits vis-à-vis de *Bacillus cereus*.

**a** : Extrait des feuilles séchées à 25°C ; **b** : Extrait des feuilles séchées à 50°C ; **c** : Extrait des feuilles séchées à 70°C.

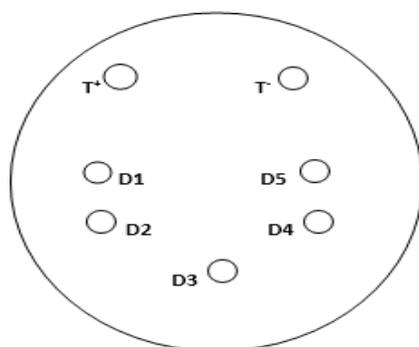


Figure 38: Disposition des disques pour la détermination des CMI

## Conclusion

La recherche de nouvelles substances naturelles palliatives aux synthétiques, suscite de nos jours un intérêt grandissant et se justifie par l'incrimination de ces dernières dans nombre d'effets indésirables.

La mise en œuvre du matériel végétal, imposant des contraintes pouvant détériorer les substances bioactives, et ainsi aboutir à la perte d'activité, nous nous proposons d'évaluer l'effet de la température sur l'activité antioxydante et antibactérienne des feuilles de l'arbousier.

Dans un premier temps les feuilles d'arbousier sont soumises à un séchage à trois températures différentes (25°C, 50°C et 70°C). Dans un deuxième temps, au travers un dosage spectrophotométrique, nous évaluons l'effet de ces trois températures sur les teneurs en polyphénols

Les résultats obtenus en plus de faire état de la richesse en composés phénoliques de nos échantillons, font aussi état d'une diminution proportionnelle à la température appliquée des teneurs en ces composés. Cette diminution est de l'ordre de 31.49 % en passant d'un séchage à 25°C (264.64±8.5mg EAG/g MS) à 50°C (181.33±3.05 mg EAG/g MS) et de 42.5% pour un séchage à 70°C (152.2±0.79 mg EAG/g MS). Néanmoins, une variation relativement plus faible (16.06%) est enregistrée lors du passage de 50°C à 70°C.

L'activité antioxydante a été évaluée par deux méthodes (TAC et FRAP), ces deux tests ont révélé une activité antioxydante de nos extraits relativement proches de celle enregistrée pour l'antioxydant de référence. Toutefois, cette activité se trouve affecté par l'augmentation de la température de séchage. Ainsi lors du passage de 25°C à un traitement thermique de 50°C puis 70°C, le TAC diminue respectivement de 18.73% et 30.17% et le FRAP respectivement de 47% et 49%.

L'effet de la température sur l'activité antibactérienne des feuilles d'*arbutus unedo* vis-à-vis de quatre souches (*Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Salmonella typhimurium* ATCC 13311) a été évalué par la méthode de diffusion sur disque. Les trois extraits ont eu un effet inhibiteur sur toutes les souches à l'exception de *Salmonella typhimurium*. Les diamètres d'inhibition ne présentant

pas de différences significatives, nous pouvons dire que l'activité antibactérienne reste conservée malgré l'augmentation de la température de séchage. De plus le degré de sensibilité des souches sensibles, a été mis en évidence par la détermination de la CMI. Celle-ci a montré qu'avec une CMI de 18.75mg/ml, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 est la souche la moins sensible comparativement à *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pour lesquelles nous avons enregistré une CMI de 9.37mg/ml.

Malgré une teneur en polyphénols relativement importante et une activité antioxydante appréciable, cette étude nous a permis de mettre en évidence l'effet négatif du séchage à température élevée, sur ces deux paramètres. Cet effet négatif ne se retrouve pas pour ce qui est de l'activité antibactérienne, qui reste relativement stable. Ainsi nous pouvons conclure que la température altère les molécules responsables de l'activité antioxydante mais pas celle jouant un rôle dans l'effet antibactérien de nos extraits.

En perspective et pour compléter cette étude il serait intéressant de :

- Etudier l'effet de la température sur d'autres activités biologiques (anti-inflammatoire, anti-radicalaire...) et d'autres parties de l'arbousier (tiges, racines et fruits).
- Etudier l'effet de la température sur la composition phénolique des extraits aqueux d'arbousier, en faisant appel aux techniques de haute performance comme l'HPLC.
- Optimiser le processus de séchage en faisant intervenir d'autres paramètres comme le temps, la pression, les infrarouges et les micro-ondes.
- Tester les extraits étudiés sur un nombre plus important de souches bactériennes et initier les tests sur les souches fongiques.

### A

**AIT-YOUSSEF M. (2006).** Les plantes médicinales en kabylie. Ed : Ibis press ,Paris.349p

**AKAY S., ALPAK I. et YESIL-CELIK TAS O.(2011).**Effects of process parameters on supercritical CO<sub>2</sub> extraction of total phenols from strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: An optimization study.J. Sep. Sci, 34 :1925–1931.

**AMADOU A.(2005).**,Étude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* .thèse de doctorat en pharmacie,WILLD. (MYRTACEAE) et d'Odonto-Stomatologie. Mali.99p.

**ANDERSON O.M.et MARKHAM K.R. (2006).**Flavonoids :Chemistry, Biochemistry and Applications.Taylor & Francis.: 01-32 :397-425.

**ANDRIANTSITOHAINA R. et MARTIN S.(2002).** Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. Ann. Cardiol. Angéiol,51 (6): 304-15.

### B

**BAHAZ M. et RACHDI H.(2010).**Quantification des principes actifs (Les composés phénoliques) de *Rhazinolepis Lonadoides* Coss (Tichert), thèse d'ingénieur ,université de Ouargla,Algérie,54p.

**BAKCHICHE B. et GHERIB A.(2014).** Activités antioxydantes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle d'Algérie. International Journal of Innovation and Applied Studies, Vol. 9 No : 167-172.

**BARTELS A.(1998).**Guide des plantes de bassin méditerranéen.Ed :AugenUlmer,Paris.400p.

**BASLI A., CHIBANE M., MADANI K., et OUKIL N.(2012).** Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf. Phytothérapie, 10(1) : 2-9.

**BELLAKHDAR J.(1997).** Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires La pharmacopée marocaine traditionnelle, ÉdIbis Pres,Paris.764 p.

**BELOUED A. (2001).** Plantes médicinales d'Algérie. *Office des Publications Universitaires*, alger.277p.

**BENISTON W.S., et BENISTON N.T.(1984).**Flore d'Algérie.Ed Entreprise nationale du livre,Alger,99p.

**BERSET C.(2006).**Antioxydants Phénoliques Structure,Propriété,Source Végétale ,Chap 8;in : « Les Polyphénols En Agroalimentaire ».Ed Tec et Doc,Lavoisier,Paris.389p.

**BIDIE P., N'GUESSAN B.B., YAPO A.F., N'GUESSAN J.D.et DJAMAN A.J.(2011).** Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. Sciences & Nature ,Vol. 8 N°1 :1 – 11.

**BIZOUARD P. et FAVIER J.C. (1962).** Corse historique. Contribution à l'étude de la valeur nutritive de quelques plantes naturellement abondante en corse :Corse Historique, N°8 :3-14.

**BNOUHAM M., MERHFOUR F.Z., LEGSSYER A., MEKHFI H., MAALLEM S., et ZIYYAT A. (2007).** Antihyperglycemic activity of *Arbutus unedo*, *Ammoides pusilla* and *Thymelaea hirsuta*.An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 62(8):630-632.

**BOIZOT N. et CHARPENTIER, J. P.(2006).**Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Le Cahier des Techniques de L'Inra:79-82.

**BOLOU G.E.K., ATTIOUA B., N'GUESSAN A.C., COULIBALY A., N'GUESSAN J.D.et DJAMAN A.J.(2011).** Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*, Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 80 :772 – 790.

**BOSSARD R. et CUISANCE P.(1984).** Arbres et arbusres d'ornement des régions tempérées et méditerranéennes. Ed : Tec & Doc Lavoisier.458p.

**BOULLARD B. (2001).** Plantes médicinales du monde Croyance et réalités. Ed ESTM. Paris ,636p.

**BROSSE J. et PELT J.M.(2005).**Larousse des arbres. Ed Larousse. Paris.576p.

**BRUNETON J.( 1999).** Pharmacognosie Photochimie Des Plantes Médicinales , 4ème édition, Technique et Documentation,Lavoisier ; Paris.1242p.

### C

**CHIRA K., SUH J.H., SAUCIER C.et TEISSEDRE P.L.(2008).** Les Polyphénols Du Raisin. Phytothérapie, 6 (2):75-82.

**CALABRESE G.(2003).** Valeur nutritionnelle des raisins de table. [Bulletin de l'OIV](#) , n°863-64 :122-134.

### D

**DELILLE L.( 2007)** .les plantes médicinales d'Algérie. Édition BERTI,148p.

**DELLILE L.(2013).** Les plantes médicinales d'Algérie ;3<sup>ème</sup> Ed ; Edition BERTI.240p.

**DIB M.E.A., ALLALI H., BENDIABELLAH A., MELIANI N. et TABTI B. (2013).** Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Arbutus unedo* L. Journal of Saudi Chemical Society, 17(4):381-385.

**DIDI A.(2009).** Etude de l'activité antioxydante des flavonoïdes de l'*Arbutus unedo* et du *Dapline gaidium* L de la région de Tlemcen ; thèse majister ; universite aboubekr belkaïd-tlemcen,Algérie.128p.

**DJAHRA A.B.(2014),** Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare L*, thèse doctorat, UNIVERSITE BADJI MOKHTAR,ANNABA,Algérie.97p.

**DOUKANI K et TABAK S .(2015).** Profil Physicochimique du fruit "Lendj" (*Arbutus unedo L.*), *Nature & Technology* , n° 12 : 53-66.

**DURAFFOURD C. et LAPRAZ J.C. (2002).** Traité de Phytothérapie clinique. Endobiogénie et Médecine. Edition Masson, Paris.827p.

**DZOMBA P. et MUCHANYEREYI N.(2012).** Potential antimicrobial plant extract based therapeutics from temnocalyxobovatus roots. *European Journal of Medicinal Plants*, 2(3):209-215.

### *E*

**EL HAOUARI M., LOPEZ, J.J., MEKHFI H., ROSADO J.A.et SALIDO M.G.(2007),**Antiaggregant effects of *Arbutus unedo* extracts. *J Ethnopharmacol*,325–331.

**EL OUARTI A., HAOUAT A.C.,SQALLI H.,HAGGOUD A., ENNABILI A.,IBNSOUDA S., IACHAGAR M. et IRAQUI M. ( 2012).** Extra- and intracellular antimycobacterial activity of *Arbutus unedo L.* *Afr. J. Microbiology*,6 :1283–1290.

**EL-HACI I.A.E.(2015),** Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales endémiques du sud algérien., thèse Doctorat., Université Abou-Baker-Belkaid Telemcen., Algérie.164p

**ERTABAKLAR H.,KIVÇAK B., MERT T.et TÖZ S.Ö.(2009).** In vitro activity of *Arbutus unedo* in leaf extracts against *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *Turk. Soc. Parasitol*,33 : 263–265.

### *F*

**FAVIER A. (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr*; 64 :390-396.

**FAVIER A.,(2003),** Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*,108-117.

**FERARD P.(2003).**La nature est une source d'inspiration importante dans la pratique photographique. Thème : Végétal,N° 1256 :1-2.

**FHATUWANI N.,NGEZIMANA., WONDER.et MUDAU.(2014).** Effect of Different Drying Methods on Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Bush Tea (*Athrixia phylicoides*).*International Journal of Agriculture and Biology*,16: 1011-1014.

**FLEEGER J.L et FLIPSE I.J.(1964).** Metabolism of bovine semen XIII. Malonic acid metabolism by bovine spermatozoa. *J. DairySci.* 47 (5): 535-538.

**FERREIRA S., SANTOS J., DUARTE A., DUARTE A.P. et QUEIROZ J.A. (2012)**

Screening of antimicrobial activity of *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* extracts. *Nat. Prod.*, 26, 1558–1560.

**FORTALEZAS S., TAVARES L., PIMPAO R., TYAGI M., PONTES, V., ALVES P.M., MCDOUGALL G., STEWART D., FERREIRA R.B. et SANTOS C.N. (2010).**

Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit (*Arbutus unedo*). *Nutrients*, 2 :214–229

### G

**GANHÃO R., ESTEVEZ M., KYLLI P., HEINONEN M., et MORCUENDE D. (2010)**

Characterization of selected wild Mediterranean fruits and comparative efficacy as inhibitors of oxidative reactions in emulsified raw pork burger patties. *J. Agric. Food Chem.* 58 : 8854–8861

**GHAZI F. et SAHRAOUI S. (2005).** Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de datte communes Tantboucht et Hamraia, thèse d'ingénieur en agronomie, El Harrach. Algérie.

**GHEDADBA N., HAMBABA A., AYACHI A., ABERKANE M.C., BOUSSELSA H**

**et OUELD-MOKHTAR S.M. (2015).** Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of leaf extracts of *Marrubium deserti* de Noé ex Coss ; *Phytothérapie*, 13 :118-129.

**GONÇALVES F., BARBOSA R., BARRACOSA P., et GUINE R. (2014).** Effect of drying on the phenolic composition and antioxidant activity of leaves of the thistle (*C. cardunculus* L.). In 8th World Congress on Polyphenols Applications. 151p.

**GUIGNARD J.L. (2001).** Botanique systématique moléculaire. Ed: Masson. Paris. 290 p.

**GUIMARÃES R., BARROS L., CALHELHA R.C., CARVALHO A.M., QUEIROZ**

**M.J.R.P. et FERREIRA S. (2014).** Bioactivity of different enriched phenolic extracts of wild fruits from Northeastern Portugal: A comparative study. *Plant Foods Hum. Nutr.* 69 :37–42.

### H

**HARBORNE J. B. et WILLIAMS C. A. (2000).** Advances In Flavonoid Research Since 1992. *Phytochemistry*. 55 : 481-504.

**HAVSTEEN B. H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therap.* 96: 67-202.

**HEIM K.E., TAGLIAFERRO A.R., et BOBILYA D.J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship; *Journal. Nutr. Biochem.* 13: 572-584.

**HENNEBELLE T., SAHPAZ S. et BAILLEUL F.,(2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: 3-6.

**HUBERT J. (2006).** Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, Thèse de doctorat Institut national polytechnique de Toulouse, France.174p.

### *I*

**ISERIN P. (2001).** Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation, soins. 2<sup>ème</sup>Ed, Larousse, Londre.275p

### *J*

**JAYAPRAKASH G.K., SINGH R.P. et SAKARIAH K.K.(2001).** Antioxidant activity of grape seed extracts on peroxidation models in-vitro.*J Agric. Food Chem.* (55): 1018-1022.

**JENG T. L., LAI C.C., LIAO T.C., LIN S.Y., et SUNG J. M. (2015).** Effects of drying on caffeoylquinic acid derivative content and antioxidant capacity of sweet potato leaves. *journal of food and drug analysis*, 23(4):701-708.

**JEONG S.M., KIM S.Y, KIM D.R, JO S.C, NAM K.C, AHN D.U et LEE S.C.(2004).** Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52: 3389-3393.

### *K*

**KNAGGS A.R. (2003).**The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, 20 : 119-136.

**KHANBABAEE K. et VAN REE T.(2001).** Tannins: Classification and definition, *Nat Prod Rep*, 18:641-649.

**KIVCAK B.,MERT T.,ERTABAKLAR H., BALCIOĞLU I.C.et TÖZ S.O.(2009)** in vitro activity of arbutus unedo agaisnt leishmania tropica promastigotes. *Turk. Soc. Parasitol.* 33 : 114–115

**KLIMCZAK I., MALECKA M., SZLACHTA L., GLISZCZYNSKA-SWIGLO A.(2007).** Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20 : 313–322.

**KOECHLIN R.C. (2006).**Oxygène, stress oxydant et supplémentations antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutritionclinique et métabolisme*, 20 : 165–177.

### *L*

**LAGUERRE M.,LOPEZ-GIRALDO L., LECOMTE J., PINA, M. et VILLENEUVE P.(2007).**Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *Oxford College of London*,14 (5): 278-292.

**LEGSSYER A., ZIYYAT A., MEKHIFI H., BNOUHAM M., HERRENKNECHT C., ROUMY, V., FOURNEAU, C., LAURENS, A., HOERTER J. et FISCHMEISTER R. (2004).** Tannins and catechin gallate mediate the vasorelaxant effect of *Arbutus unedo* on the rat isolated aorta, *Phytotherapie*, 18 :889–894.

**LI H.B., CHENG K.W., WONG C.C., FAN K.W., CHEN F. et TIAN Y. (2007).** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102 :771-776.

**LITAIEM J., TOUIL A., CHEMKHI S. et ZAGROUBA F. (2013).** Changes in Physicochemical Properties Of Dehydrated Garlic During Infrared Drying. *Iles de Kerkennah-Sfax (Tunisie)*:247-253.

### M

**MABERLEY D.J. (1997).** the plant-book. A portable dictionary of the higher plants. Cambridge university Press. Cambridge. 858 p.

**MACHEIX J.J, FLEURIET A. et JAY-ALLEMAND C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne. 192p.

**MACHEIX J.J, FLEURIET A. et SARNI M. (2006).** Composés Phénoliques Dans La Plante-Structure, Biosynthèse, Répartition et Rôles, Chap01 ; in : « Les Polyphénols en Agroalimentaire ». Ed Tec et Doc, Lavoisier, Paris. 389p.

**MALES Z., PLAZIBAT M. ET VUNDAC V.B. (2006).** Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree -*Arbutus unedo* L (Ericaceae), *Acta pharm.* 56: 245-250.

**MANACH C., MAZUR A., SCALBERT A. (2005).** Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, 16 : 1–8 .

**MARIOTTO S., ESPOSITO E, PAOLA R.D., CIAMPA A., MAZZON E., PRATI A.C. DARRA, E., VINCENZI, S., CUCINOTTA G. et CAMINITI R. (2008).** Protective effect of *Arbutus unedo* aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. *Pharmacol.* 57 :110–124.

**MARTIN S. et ANDRIANTSITOHAINA R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, 51 : 304–315.

**MENDES L., FREITAS V., BAPTISTA P. et CARVALHO M. (2011).** Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food and chemical toxicology*, 49(9):2285-2291.

**MIGUEL M.G., FALEIRO M.L., GUERREIRO A.C. et ANTUNES M.D. (2014).** *Arbutus unedo* L.: Chemical and Biological Properties, *Molecules* , 19 : 15799-15823.

**MORRIS R. (2007).** Edible, medicinal and useful plants for healthier world, plants for a future. 70p.

**MORELLE J.ETR ESRAEL L.(2003).**L'oxydation des aliments et la santé. Ed Impression Librairie F-X. de Guibert, 257 pp.

**MUANDA F.N.(2010).** Identification De Polyphenols, Evaluation De Leur Activite Antioxydante Et Etude De Leurs Proprietes Biologiques.Thèse Doctorat, l'Université Paul Verlaine-Metz.160p.

**MUELLER-HARVEY I.(2001).**Analysis of hydrolysable tannins. Anim, Feed Sci, Technol; 91: 3-20.

### O

**O'CONNELL J.E.et FOX P.F.(1999).** Proposed mechanism for the effect of polyphenols on the heat stability of milk. International Dairy Journal 9 (8) :523–536.

**OLIVEIRA I., BAPTISTA P., MALHEIRO CASAL R.S.A.B. et PEREIRA J.A. (2011).** Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. Food. Int,44 :1401–1407.

**ORAK H H., YAGAR H., ISBILIR S.S., DEMIRCI A.Ş.,GÜMÜS T.et EKINCI N. .(2011).** Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf. Food Sci.Biotechnol,120 :1249–1256.

**OYAIZU M. (1986).** Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine, Jpn J Nutr, 103 :413-419.

**ÖZCAN M.M.et HACISEFEROGULLARI H.( 2007).** The strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral contents. J. Food Eng.78 : 1022–1028.

### P

**PABUÇCUOĞLU A., KIVCAK B., BAS M., and MERT T.( 2003).**Antioxydant activity of *Arbutus unedo* leaves, Fitotherapy,74:597–599.

**PAVLOVIC D.R.; BRANKOVIC, S.; KOVACEVIC, N.; KITIC, D.; VELJKOVIC, S.( 2011).** Comparative study of spasmolytic properties, antioxidant activity and phenolic content of *Arbutus unedo* from Montenegro and Greece. Phytotherapy,25:749–754.

**PERCIVAL S.L.( 2004).** Microbiology of waterborne diseases, Ed Elsevier Academic Press, Amsterdam.480p.

**POLESE J.M. (2010).** Arbres et arbustes de Méditerranée. Ed EDISUD, Imprimé en UE .135p

**POPOVICI C., SAYKOVA I., TYLKOWSKI B., (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH ;Revue de génie industriel,4 :25-39.

**PRIETO P., PINEDA M. et AGUILAR M.M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E, *Anal Biochem*, 269: 337-341

### R

**RENARD C.M.G.C., CARIS-VEYRAT C. et DUFOUR C. (2014).** Le Bourvellec C. 1 *Innovations Agronomiques* 42 :125-137

**REYMAND J. (2002).** La flore de pharmacien. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris.260p.

**RIBEREAU G. P.(1968).**Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris. 254p

**RICHTER G.(1993).**Métabolisme des végétaux Physiologie et Biochimie. Ed. Presses Polytechniques et Universitaire Romandes,Lausane.526p

**RODRÍGUEZ K., AH-HEN K. S., VEGA-GÁLVEZ A., VÁSQUEZ V., QUISPE-FUENTES I., ROJAS P.ET LEMUS-MONDACA, R. (2016).** Changes in bioactive components and antioxidant capacity of maqui, *Aristoteliachilensis* [Mol] *Stuntz*, berries during drying. *LWT-Food Science and Technology*, 65:537-542.

### S

**SANDHAR H.K., KUMAR B., PRASHER S., TIWARI P., SALHAN M. et SHARMA P.(2011).** A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *International Pharmaceutica Scientia*. 1 (1) :25-41.

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

**SHIMIZU H.(2004).**Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population .the Hisayama study , *Stroke*,35 (9) : 2072-2077.

**SILBERFELD T.(2011).** Plante mellifères. *Abeilles & Fleurs*. N° (723): 29-30.

**SINGLETON V.L et ROSSI J.A.(1965).**Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *Am J EnolVitic*, 16:144-158

**SKANDAMIS P.N. et NYCHAS G.J.E. (2001).** Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *J. Applied Microbiol*,91 : 1011-1022.

**SOMON E.(1987).**Arbres, Arbustes et Arbrisseaux en Algérie. Ed OPU,Alger.143p

**SPICHIGER R.E., SAVOLAINEN V.V., FIGEAT M., et MONOD J.D. (2004).**Botanique systématique des plantes à fleur. 3<sup>ème</sup> Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes.413 pp.

### T

**TAVARES L., FORTALEZAS S., CARRILHO C., MCDUGALL G. J., STEWART D., FERREIRA R. B. et SANTOS C. N. (2010).** Antioxidant and antiproliferative properties of strawberry tree tissues:*Journal of Berry Research*, 1(1): 3-12.

**TOMAINO A., F. CIMINO, V. ZIMBALATTI, V. VENUTI, V. SULFARO, A. DE PASQUALE, AND A. SAIJA. (2005).** Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spic essential oil: Food Chem. 89:549–554.

*U*

**ULANOWSKA K., MAJCHRZYK A., MOSKOT M., JAK-BKIEWICZ B. J. and ou et W-AGRZYN G.(2007).** Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. Biologia; 62 :132-135.

*Y*

**YAO K., DE LUCA V.et BRISSON N.(1995).** Creation of a Metabolic Sink for Tryptophan Alters the Phenylpropanoid Pathway and the Susceptibility of Potato to *Phytophthora infestans*. Plant Cell,7: 1787-1799

**YILDIRIM A., MAVI A. et KARA A. A.(2001).** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49:411-420.

**YOUSSEF K. M. et MOKHTAR S.M. (2014).** Effect of Drying Methods on the Antioxidant Capacity, Color and Phytochemicals of *Portulacaoleracea* L. Leaves. Journal of Nutrition & Food Sciences.322(4) :2155-9600.

### **Autres references:**

**ANONYME.(2013).**liofilchem-antibiotic disk Interpretative Criteria and Quality Control-F14013-Rev7. ([www.liofilchem.net](http://www.liofilchem.net))

## *Annexes*

---

## Annexe 01 : Matériel utilisé

Outillage	Appareillage	Produits et réactifs chimique	Milieux de culture
Flacons	Étuve	Eau distillée	Bouillon BHIB(Brain Heart Infusion Broth)
Ependorfs	Broyeur électrique	Acide-L-ascorbique $C_6H_8O_6$ (vitamine C)	
Tubes à essai.	Réfrigérateur		
Fioles.	Lyophilisateur	Ammonium molybdate	Milieu MH (Mueller Hinton gélosé)
Béchers.	Bain marie	Phosphate dibasique de sodium $Na_2HPO_4$	
Passoire	Spectrophotomètre		
Entonnoir	Autoclave	Phosphate monobasique de sodium $NaH_2PO_4$	
Laine de verre	Agitateur à plaque chauffante	Acide sulfurique $H_2SO_4$	
Pinces.	vortex	Tampon phosphate ( $NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4$ )	
Micropipettes	Balance de précision	Chlorure ferrique $FeCl_3$	
Anses.	centrifugeuse	Ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$	
filtres		Acide trichloracétique $C_2HCl_3O_2$ 10%	
Pipettes Pasteur		Réactif Folin-Ciocateu	
Écouvillons.		Bicarbonate de sodium $Na_2CO_3$	
Erlenmeyer			
Papier whatman.		Acide gallique $C_7H_6O_5$	
Papier aluminium		Eau physiologique ( $NaCl$ 9g/l)	
Boites de pétri		Disques d'antibiotiques	
Bec besen			

**Annexe 02 : Composition des milieux de cultures.**

<b>Milieu MH (Gélose Mueller Hinton)</b>	
Infusion de viande bovine	3g
Hydrolysate acide de caséine	17.5 g
Amidon soluble	1.5g
Agar	15.0 g
Eau distillée	QST

<b>Milieu BHIB(Brain Heart Infusion Broth)</b>	
Extrait Coeur-cervelle	17.5g
Peptone pancréatique de gélatine	10.0g
Chlorure de sodium	05.0g
Phosphate di sodique	02.5g
Glucose	02.0g
Eau distillée	QST

**Annexe 03 : Caractéristiques des souches testées.**

<b>Gram positif</b>	
<b>Souche</b>	<b>Caractéristiques</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	Ce sont des cocci à gram+, en amas, immobiles, sont des bactéries ubiquitaires, cette espèce n'a pas d'exigence nutritive particulière, son métabolisme respiratoire est aérobie-anaérobie facultatif, les colonies apparaissent en 18 heures, à 37°C, c'est l'espèce la plus pathogène du genre <i>Staphylococcus</i> vu qu'elle possède un pouvoir invasif par une forte capacité de

	<p>multiplication et dispersion dans l'organisme avec un pouvoir toxique et antigénique chez le sujet infecté, Elles constituent l'essentiel de la flore résidente de la peau de l'homme et des animaux. L'émergence de la multirésistance chez cette espèce est la principale cause de l'inefficacité de son traitement.</p>
<p><i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876</p>	<p>C'est des bacilles longs, mobiles à Gram positif, appartenant à la famille des Bacillaceae, de formes régulières, en courtes chaînes, son type respiratoire est aéro-anaérobie facultatif, peuvent être sporulés. Cette bactérie sécrète de nombreuses toxines, elle pousse sur gélose ordinaire à 37°C en atmosphère normale ; elle est résistante à la pénicilline G, amoxicilline, amoxicilline+acide clavulanique, céphalosporines,</p> <p>Bacillus cereus est responsable de toxi-infections alimentaires caractérisées par des symptômes diarrhéiques (8 à 16h après ingestion) et par des symptômes émétiques (1 à 6h après ingestion).</p>
<p><b>Gram négatif</b></p>	
<p><b>Souche</b></p>	<p><b>Caractéristique</b></p>
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</p>	<p>Ce sont des bacilles fins à Gram négatif, non capsulés, mobiles grâce à la présence de 1 à 2 flagelles, elles sont de caractère aérobie strict. Ces bactéries ont des exigences nutritives peu importantes elles sont capables de survivre dans différents milieux (eaux, surface, air, aliments) et particulièrement en milieu humide, poussent à 41°C. <i>P. aeruginosa</i> est responsable principalement de la broncho-pneumopathies et les affections respiratoires et les infections nosocomiales, il s'agit d'une bactérie qui présente une résistance pour plusieurs antibiotiques.</p>

<p><i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311</p>	<p>Une souche de référence qui fait partie des entérobactéries, bacilles à Gram négatifs, mobiles pour la plupart (ciliature péritriche) mais certaines sont immobiles, aéro-anaérobies facultatifs. Une bactérie isolée dans différents environnements humains et animaux, présentent très souvent un phénotype de multirésistance vis à vis des antibiotiques suivants : l'ampicilline, le chloramphénicol, la streptomycine, les sulfamides et les tétracycline, elles sont responsables d'une toxoinfection alimentaire qui est la fièvre typhoïde.</p>
---	---