

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

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

**Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou**



**Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques**

**DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE**

## **Mémoire de fin d'étude**

**En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences biologiques**

**Option : Microbiologie Appliquée**

***Thème :***

**Caractérisation phytochimique et étude de l'activité  
antibactérienne et anti biofilm de l'extrait aqueux de feuilles  
d'*Arbutus unedo***

**Soutenu le : 17 juillet 2023**

**Réaliser par :**

M<sup>lle</sup> BELAID Karima

M<sup>lle</sup> DEMRI Lynda

**Proposé et dirigé par :**

Mr HOUALI Karim professeur à l'UMMTO

**Devant le jury composé de :**

- |             |                |  |
|-------------|----------------|--|
| - Président | MOUALEK Idir   | Maître de Conférences classe (A) à l'UMMTO |
| - Examineur | SEBBANE Hillal | Maître de Conférences classe (B) à l'UMMTO |

**Année universitaire : 2022/2023.**



# Remerciements



Nous tenons tout d'abord à remercier « **ALLAH** » le tout puissant de nous avoir donné le courage, la force, la patience et la santé pour accomplir ce travail.

Nous exprimons nos profonds remerciements à notre promoteur, monsieur **HOUALI. K** professeur à l'université Mouloud MAMMERY de Tizi-Ouzou tout d'abord pour avoir eu l'amabilité de nous ouvrir les portes de laboratoire, et pour la confiance et la liberté qu'il nous a donné ; sa bienveillance, son attention particulière, ses précieux conseils et son écoute tout le long de ce travail.

Nous tenons à remercier vivement monsieur **MOUALEK.I** maître de conférence classe A à l'université Mouloud MAMMERY de Tizi-Ouzou qui nous a ramené la plante étudiée et aussi d'avoir accepté de présider le jury et évaluer ce travail.

Nous remercions monsieur **SEBBANE.H** maître de conférence classe B à l'université Mouloud MAMMERY de Tizi-Ouzou qui nous a aidé et accompagné au niveau du laboratoire LABAB et aussi pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Enfin nous désirons remercier très sincèrement tout le personnel du laboratoire LABAB en particulier Melle SACI ainsi que le laboratoire physico-chimique du département BMC et toute personne qui a contribué chacune par son nom, de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

# DÉDICACE

*Louange à DIEU le tout puissant, qui m'a permis et faciliter d'en arriver là.*

*Merci seigneur pour tout.*

*« DIEU est bon en tout temps, en tout temps DIEU est bon »*

***À mon cher Père,***

*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. Que ce modeste travail soit l'exaucement de tes vœux tant formulés, le fruit de tes innombrables sacrifices, bien que je ne m'en acquitterai jamais assez.*

***À ma chère Maman,***

*Combattante, courageuse, honorable, aimable, sage et très patiente, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, tu as tout fait pour que je sois ce que je suis aujourd'hui.*

*Je ne te remercier jamais assez. Je vous aime à l'éternité.*

*Que DIEU vous bénisse et vous gardes pour moi mes chers parents.*

***À mes chers frères Noureddine, Brahim et Azedine,***

*μMerci pour vos encouragements, vos soutiens, votre amour et pour tout ce que vous faites pour moi. Je vous aime.*

***À la mémoire de mes grandes mères,***

*Paix à vos âmes, vous êtes toujours dans mon cœur et gravées dans ma mémoire.*

***À toute ma famille,***

*Merci pour le soutien que vous m'apportés, vos prières et votre amour.*

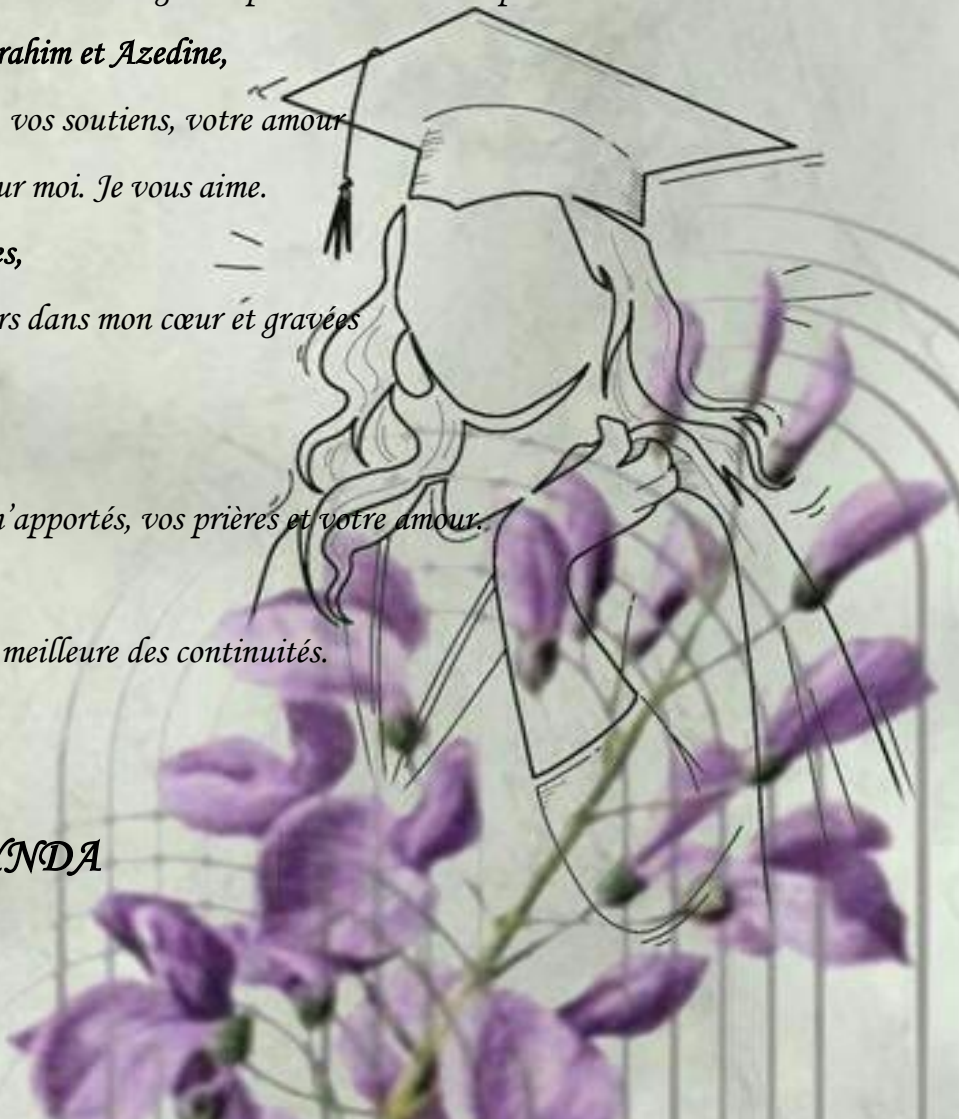
***À mon binôme KARIMA,***

*Réussite méritée, je te souhaite la meilleure des continuités.*

***À tous mes amis (es),***

*Merci d'exister.*

**LYNDA**



# DÉDICACE

*Je dédie ce travail à :*

*Mes chers parents,*

*Si j'ai atteint ce niveau c'est grâce à eux et leurs sacrifices ; ainsi qu'à l'ensemble de ma famille pour son soutien, aides, encouragement et sur tout pour son amour infini, pas seulement durant ce travail mais durant toute ma vie.*

*Mes amis,*

*Chacun par son nom, pour le soutien moral qu'ils m'ont apporté, leur écoute et leur amitié sincère.*

*Mes camarades,*

*Avec qui j'ai partagé les plus beaux moments tout le long de mon parcours universitaire.*

*Mon binôme Lynda,*

*A qui je souhaite d'autres réussites et bonne continuation.*



**KARIMA**

## Liste des abréviations

**ATCC** : Collection de Culture Type Américaine.

**BHIB** : Brain Heart Infusion Broth (Bouillon cœur-cerveille).

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice.

***E. coli*** : *Escherichia coli*.

**EA** : Extrait aqueux.

**EAG/g .MS** : Equivalent d'Acide Gallique par gramme de Matière Sèche.

**EPS** : Exo-Polymère Substance.

**Gram-** : Gram négatif.

**Gram+** : Gram positif.

**LPS** : Lipopolysaccharides

**PPT** : Polyphénols Totaux.

**RCA** : Rouge Congo Agar.

**rpm** : Rotation par minute.

***S. aureus*** : *Staphylococcus aureus*.

**SM** : Solution Mère

**UFC** : Unité Formant Colonie.

**UV** : Ultraviolet.

## Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> Noms vernaculaires d' <i>Arbutus unedo</i> .....	5
<b>Tableau II:</b> Composition chimique des différentes parties d' <i>Arbutus unedo</i> .....	12
<b>Tableau III:</b> Utilisations médicinales des différentes parties de la plante <i>Arbutus unedo</i> . ....	15
<b>Tableau IV:</b> Activités biologiques des polyphénols. ....	26
<b>Tableau V :</b> Préparation de la gamme de dilution de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux .....	45
<b>Tableau VI:</b> Résultats de screening phytochimique effectué sur la poudre de feuilles d' <i>Arbutus unedo</i> . ....	46
<b>Tableau VII:</b> Résultat de la teneur en sucres. ....	48
<b>Tableau VIII:</b> Résultats des diamètres des zones d'inhibition .....	51
<b>Tableau IX:</b> Résultats de formation de biofilms .....	54
<b>Tableau X:</b> Résultats des diamètres des zones d'inhibition. ....	55

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Répartition géographique mondiale d' <i>Arbutus unedo</i> .....	6
<b>Figure 2:</b> Arbre d' <i>Arbutus unedo</i> . .....	7
<b>Figure 3:</b> Feuilles d'Arbousier face inférieure et supérieure.....	8
<b>Figure 4:</b> Fruit d' <i>Arbutus unedo</i> . .....	8
<b>Figure 5:</b> Fleures d' <i>Arbutus unedo</i> . .....	9
<b>Figure 6:</b> Ecorce d' <i>Arbutus unedo</i> . .....	9
<b>Figure 7:</b> Structure chimique des composés phénoliques plus abondants dans les feuilles d' <i>Arbutus unedo</i> .....	11
<b>Figure 8:</b> Structure chimique des acides hydroxybenzoïques et des acides hydroxycinnamiques. ....	18
<b>Figure 9:</b> Structure chimique de Benzo-2-pyrone .....	18
<b>Figure 10 :</b> Structure chimique de trans-resveratrol.....	19
<b>Figure 11 :</b> Structure chimique de base de base des flavonoïdes .....	20
<b>Figure 12 :</b> Structure chimique de base des flavonols.....	20
<b>Figure 13:</b> Structure chimique de base des flavones .....	21
<b>Figure 14:</b> Structure chimique d'une flavonone.....	21
<b>Figure 15:</b> Structure chimique de base des flavanes .....	21
<b>Figure 16:</b> Structure chimique de deux isoflavones .....	22
<b>Figure 17:</b> Structure chimique de base des anthocyanidines.....	22
<b>Figure 18:</b> Structures des tannins .....	23
<b>Figure 19:</b> Structures de quelques alcaloïdes : (A) Quinine ; (B) Morphine ; (C) Caféine ....	24
<b>Figure 20 :</b> Structure chimique de base l'isoprène.....	25
<b>Figure 21 :</b> Formation d'un biofilm .....	29
<b>Figure 22 :</b> Localisation géographique de la région de récolte .....	32
<b>Figure 23 :</b> Macération de la poudre végétale.....	34
<b>Figure 24:</b> Grattage.....	34
<b>Figure 25 :</b> Deux boites contenues le milieu MHensemencées par <i>S. aureus</i> avant l'incubation ; (a) extrait pure et (b) extrait dilué ½ (disque n°2). ....	37
<b>Figure 26 :</b> Deux boites contenues le milieu MHensemencées par <i>E. coli</i> avant l'incubation ; (a) extrait pure et (b) extrait dilué ½ (disque n°2).....	38
<b>Figure 27 :</b> Deux boites contenus le milieu RCensemencées par <i>S. aureus</i> avant incubation ; (a) extrait pure et (b) extrait dilué ½ (disque n°2).....	39

<b>Figure 28 :</b> Courbe étalon de l'acide gallique. ....	49
<b>Figure 29 :</b> Résultats du test de l'activité antibactérienne de l'extrait pure (a) et dilué ½ (b) de feuilles d' <i>Arbutus unedo</i> vis-à-vis de la souche <i>S.aureus</i> (originale). ....	51
<b>Figure 30 :</b> Résultats du test de l'activité antibactérienne de l'extrait pure (a) et dilué ½ (b) de feuilles d' <i>Arbutus unedo</i> vis-à-vis de la souche bactérienne <i>E. coli</i> (originale). ....	51
<b>Figure 31:</b> Résultat de la formation de biofilms par <i>E. coli</i> et <i>S.aureus</i> sur milieu RC. ....	54
<b>Figure 32:</b> Résultat du test de l'activité anti biofilm de l'extrait pure (a) et dilué (b) de feuilles d' <i>Arbutus unedo</i> vis-à-vis de la souche bactérienne <i>S.aureus</i> (originale).....	55

# Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
<b>Introduction</b> .....	2

## Partie bibliographique

### Chapitre I : Généralités sur *Arbutus unedo*

1-Plantes médicinales .....	3
2-Définition d' <i>Arbutus unedo</i> .....	4
3-Noms vernaculaires.....	5
4-Classification taxonomique.....	5
5-Répartition géographique.....	6
6-Description botanique .....	7
7-Composition chimique .....	10
8-Usages traditionnels et intérêts .....	13

### Chapitre II : Métabolites secondaire et activités biologiques

1-Généralités .....	16
2-Classification des métabolites secondaires .....	16
2-1-Composés phénoliques.....	17
2-1-1-Classification des composés phénoliques .....	17
2-1-1-1-Acides phénoliques .....	17
2-1-1-1-1-Acides hydroxybenzoïques .....	17
2-1-1-1-2-Acides hydroxycinnamiques .....	18
2-1-1-2-Coumarines .....	18
2-1-1-3-Stilbènes .....	19
2-1-1-4-Flavonoïdes .....	19
2-1-1-5-Tanins.....	22

2-1-1-5-1-tanins hydrolysables.....	23
2-1-1-5-2-tanins condensés.....	23
2-1-1-6-Lignanes et les lignines.....	23
2-2-Alcaloïdes .....	23
2-3-Terpénoïdes.....	24
3-Rôles et intérêts des polyphénols .....	25
4-Activités biologiques .....	27
4-1-Activité antimicrobienne.....	27
4-2-Activité anti biofilm.....	28
4-2-1-Synthèse sur les biofilms .....	28
4-2-1-1-Définition .....	28
4-2-1-2-Composition d'un biofilm.....	28
4-2-1-3-Formation d'un biofilm.....	29
4-2-1-4-Effet anti biofilm.....	30
4-3-Activité anti oxydante .....	30
4-4-Activité anti inflammatoire .....	31
4-5-Activité anticancéreuse .....	31

## **Partie expérimentale**

### **Chapitre I : Matériel et méthodes**

1-Matériel.....	32
1-1-Matériel végétal.....	32
1-1-1-Récolte .....	32
1-1-2-Séchage .....	32
1-1-3-Broyage .....	33
1-2-Souches bactériennes .....	33
2-Méthodes.....	33
2-1- Préparation de l'extrait sec.....	33
2-1-1-Macération .....	33
2-1-2- Filtration.....	34
2-1-3-Evaporation .....	34
2-1-4-Grattage.....	34

2-2- Préparation de l'extrait aqueux .....	36
2-3-Rendement d'extraction .....	36
2-4-Préparation des suspensions bactériennes.....	36
2-5- Etude de l'activité antibactérienne :.....	36
2-5-1-Ensemencement des boites.....	37
2-5-2- Méthode de diffusion sur disque sur milieu Mueller Hinton.....	37
2-6- Etude de l'activité anti biofilm.....	38
2-6-1-Ensemencement des boites.....	38
2-6-2- Méthode de diffusion sur disque sur milieu rouge Congo.....	38
2-7- Screening phytochimique.....	39
2-7-1-Préparation de l'infusé .....	40
2-7-2-Testes phytochimiques.....	40
2-8- Dosage des sucres .....	41
2-8-1- Préparation de deux filtrats .....	41
2-8-2-Dosage des sucres totaux .....	42
2-8-3- Dosage des sucres réducteurs.....	42
2-8-4-Le taux de saccharose .....	43
2-9-Dosage des polyphénols totaux.....	44

## **Chapitre II : Résultats et discussion**

1-Rendement d'extraction .....	46
2-Résultats de screening phytochimique des feuilles d' <i>Arbutus unedo</i> .....	46
3-Détermination de la teneur en sucres .....	48
4- Détermination de la teneur en polyphénols totaux.....	49
5-Evaluation de l'activité antibactérienne .....	50
6-Evaluation de l'activité anti biofilm.....	53
6-1-Evaluation de la formation de biofilm.....	53
6-2-Evaluation de l'activité anti biofilm de l'extrait aqueux de la plante étudiée .....	55
<b>Conclusion</b> .....	57

### **Références bibliographiques**

### **Annexes**

### **Résumé**

# *Introduction*

Depuis la préhistoire, les plantes ont fourni à l'homme tous ses besoins en matière d'abri, de vêtement, de nourriture, de saveurs et de parfums et surtout en médicaments. Ces plantes ont formé la base de la médecine traditionnelle qui a donné naissance à certains médicaments importants encore utilisés aujourd'hui (GURIB-FAKIM, 2006).

L'inventaire réalisé par l'OMS, vers la fin des années 1970, a estimé que le nombre des espèces végétales ayant des propriétés médicinales était de l'ordre de 21 000 espèces dans le monde (PENSO, 1980 ; SCHIPPMANN *et al.*, 2002). On estime que 70 à 80 % de la population humaine, principalement dans les pays en développement, dépendent des plantes médicinales pour les soins primaires (BADIAGA, 2011).

Avec une superficie de 2 381741 km<sup>2</sup>, l'Algérie est reconnue pour sa diversité variétale en plantes médicinales et aromatiques, ainsi que leurs diverses utilisations populaires dans l'ensemble du pays. La richesse de la flore algérienne est incontestable, avec environ 4300 espèces et sous-espèces de plantes vasculaires (DOBIGNARD et CHATELAIN, 2010 ; 2013). Elle recèle un grand nombre d'espèces classées en fonction de leur degré de rareté : 289 espèces assez rares, 647 espèces rares, 640 espèces très rares, 35 espèces rarissimes et 168 espèces endémiques (KOUIDER *et al.*, 2019).

Plusieurs études ont rapporté la richesse des plantes médicinales et aromatiques en composants naturels, qui ont fourni une nouvelle application dans les domaines médicaux et pharmaceutiques. De plus, les huiles essentielles et les extraits organiques obtenus à partir de plantes ont démontré des propriétés biologiques telles que des effets antioxydants, anti-inflammatoires, antidiabétiques, anticancéreux et antimicrobiens (MRABTI *et al.*, 2021).

La résistance aux antibiotiques des souches bactériennes pose depuis quelques décennies un problème de santé publique dans le monde, car les antibiotiques de la dernière génération qui avaient un effet bactériostatique et bactéricide sur les germes deviennent de plus en plus inefficaces (LANGO-YARA *et al.*, 2020). Il s'avère donc nécessaire de rechercher de nouvelles molécules afin de pallier à ce problème.

Dans ce contexte, notre travail s'oriente vers l'évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne et anti biofilm de l'extrait aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* ; ainsi qu'une analyse phytochimique de cette partie de la plante. Notre expérimentation est donc subdivisée en deux parties :

- Microbiologique ; dans le but d'évaluer l'effet antibactérien et anti biofilm de notre extrait.
- Biochimique ; qui consiste à l'analyse phytochimique ainsi qu'à l'extraction et dosage des polyphénols.

*Partie*  
*bibliographique*

## Chapitre I : Généralités sur *Arbutus unedo*

### 1-Plantes médicinales

Une plante médicinale est toute plante contenant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, d'atténuer ou de guérir une maladie. Certaines plantes contenant une série de substances efficaces peuvent avoir des actions très différentes selon leur préparation (SCHAUENBURG et PARIS, 1977).

Les plantes médicinales sont des drogues végétales, dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses, leurs principes actifs sont des composants essentiels d'une grande partie de nos médicaments et produits de soins (HANS, 2007). Environ 35 000 espèces de plantes sont employées dans le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains (ELQAJ *et al.*, 2007).

Depuis la nuit des temps, les traditions humaines ont su développer à travers les siècles la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. En effet, elles sont utilisées de différentes manières, décoction, macération, infusion, huile essentielle etc. Une ou plusieurs de leurs parties peuvent être utilisées telles que les racines, feuilles et fleurs (DJAALAB, 2013).

L'utilisation des plantes médicinales a conservé une large place du fait de leur efficacité dans diverses procédures thérapeutiques (LAZLI *et al.*, 2019). De part cette utilité, elles peuvent être vendues en herboristerie, en pharmacie, avec ou sans prescription selon la réglementation du pays (MAZARI *et al.*, 2010).

Dans les pays africains, les plantes constituent, les principaux moyens médicamenteux pour des soins pratiques en santé publique. Les travaux de N'GUESSAN *et al.*, (2009) rapportent qu'en médecine traditionnelle, certains organes de plantes, telles que les feuilles, les écorces, les racines sont utilisées dans le traitement d'affections courantes comme la fièvre typhoïde, les diarrhées, le paludisme, la bronchite et l'hypofertilité (BLA *et al.*, 2015).

L'utilisation des plantes médicinales en Algérie est en nette diminution, en raison d'un secteur sanitaire en continuel développement. Elle reste néanmoins fortement dans les zones reculées (REGUIEG, 2011).

### 2-Définition d'*Arbutus unedo*

*Arbutus* est un ancien nom latin désignant l'arbousier, la racine *arbor* signifie 'plante haute' pour désigner un arbre. Le terme « *Unedo* » est un nom latin qui dérivé de « unum edo = je mange un seul fruit », il est réutilisé par CARL LINNAEUSE (1753) (KHELFALLAH, 2013).

*Arbutus unedo*, est une plante méditerranéenne commune, appartenant au genre *Arbutus* de la famille des Ericaceae, ordre des Ericales (KACHKOUL *et al.*, 2019).

La famille des Ericacées est une grande famille cosmopolite représentée par 124 genres (dont *Arbutus* (arbousier), *Calluna* (calune), *Erica* (bruyère) et *Rhododendron* et environ 4100 espèces (MEBERLEY, 1987; STEVENS *et al.*, 2004 ; LHUILIER, 2007).

Il est très répondu en raison de sa tolérance à la sécheresse et sa capacité à se régénérer et recoloniser les forêts incendiées. Il résiste bien au gel jusqu'à des températures de -15°C, et il s'adapte à une très large gamme de sols et d'expositions (DOUKANI et TABRAK, 2014).

### 3-Noms vernaculaires

**Tableau I :** Noms vernaculaires d'*Arbutus unedo* peuvent être résumés dans le tableau suivant :

<b>Noms botaniques</b>	<i>Arbutus unedo.</i>
<b>Nom Commun</b>	Busserole, raisin d'ours, petit buis (DELILLE., 2013).
<b>Nom Arabe</b>	Mathrounia, Qatilabihia, Acireddob, Hennaameur, Lenj, Boujbiba (BELOUED, 2001 ; AIT-YOUSSEF, 2006).
<b>Nom Français</b>	Arbre aux fraise, Arbousier (BROSSE.,2000 ;DELILLE.,2007).
<b>Nom Anglais</b>	Strawberrytreetree, Apple of Cain (ANONYME., 2003).
<b>Nom Berbère ou targuis</b>	Sisnou, Ticisnou, Bahennou (BELOUED, 2001), Asesno, Assisnou, Issinsou (DELILLE, 2007).
<b>Nom Espagnol</b>	Madrono (AIT-YOUSSEF, 2006).
<b>Nom Allenand</b>	Westliche erdbeerbaum (BOSSARD, 1984).
<b>Nom Portugais</b>	Medronheiro.
<b>Nom Italien</b>	Corbizzolo.
<b>Nom grec</b>	Koumaria.

### 4-Classification taxonomique

Selon les classifications botaniques établies par GUIGNARD (2001) et SPICHIGER *et al.*, (2004) l'*Arbutus unedo* est classé comme suit :

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

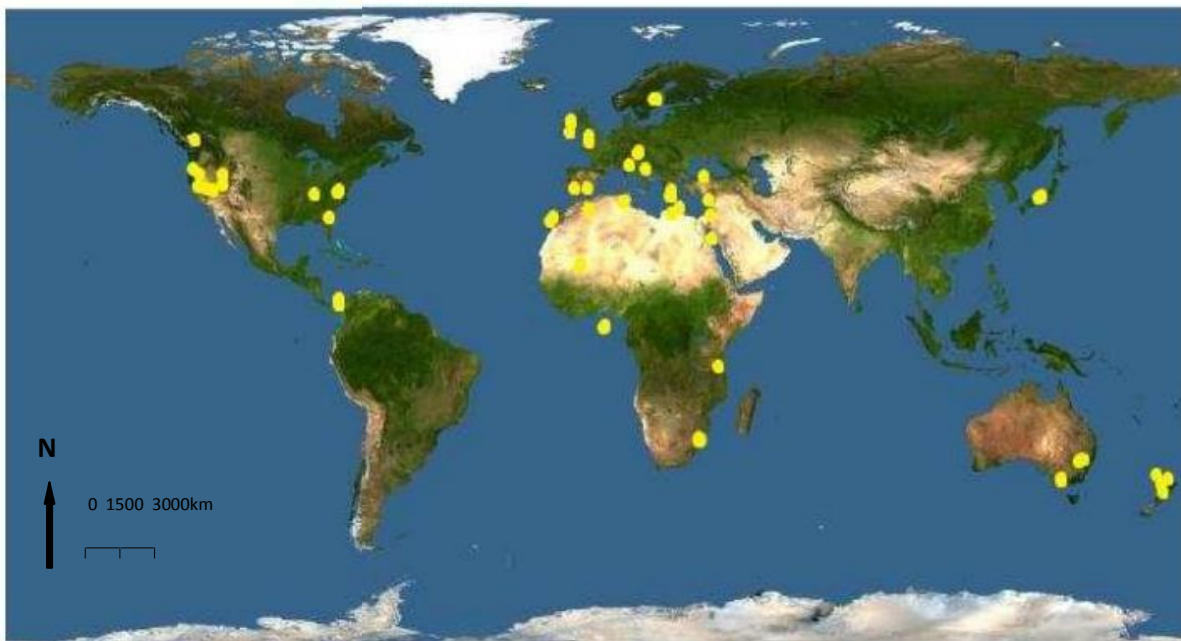
## 5-Répartition géographique

En général, la plus grande densité ainsi que la plus grande diversité des Ericaceae se retrouve sous les climats méditerranéens (MEBERLEY, 1987; STEVENS *et al.*, 2004 ; LHUILIER, 2007).

La répartition géographique de l'*Arbutus unedo* est mediteraneo-atlantique (ABBAYES *et al.*, 1971). Il pousse spontanément autour du bassin méditerranéen sur les sols acides ou siliceux, en lisière de bois et sur les versants rocailloux.

Il est très répandu dans le monde, il se trouve au nord-est de l'Afrique (hors Égypte et Libye) et les îles Canaries et l'Asie occidentale, où le gel n'est pas très habituel et la sécheresse estivale n'est pas très intense. En Europe, cette espèce pousse au Portugal, en Espagne, en France, en Italie, en Albanie, en Grèce, en Bosnie-Herzégovine, en Croatie, en Macédoine, au Monténégro, en Serbie et en Slovénie et dans les îles méditerranéennes (Baléares, Corse, Sardaigne, Sicile et Crète). Il est également capable de s'adapter aux conditions de la côte sud-ouest de l'Irlande (MIGUEL *et al.*, 2014).

*Arbutus unedo* est une 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)



**Figure 1:** Répartition géographique mondiale d'*Arbutus unedo* (KIRKALDYELLA 2000)

### 6-Description botanique

*Arbutus unedo* est un arbuste buissonnant de 1,5 à 3 m de haut, mais pouvant parfois atteindre une hauteur de 9 à 12 m de haut (SEIDEMANN., 1995). La distribution varie d'une altitude de 700 à 1000 M. L'arbre peut pousser sur des sols alcalins et relativement acides (pH 5–7,2) (CARCACHE-BLANCO *et al.*, 2006).



**Figure 2:** Arbre d'*Arbutus unedo*.

#### ❖ Feuilles

*Arbutus unedo* est un arbuste à feuilles persistantes de 5 à 8 cm de longueur sur 3 à 4 cm de largeur (BOULLARD, 2001). Elles sont coriaces avec le bord en dents de scie ou largement dentelées, à court pétiole de 7 à 8 mm, qui peut atteindre jusqu'à 15 mm (BIZOUARD et FAVIER, 1962).

Les feuilles sont ovales, allongées, dentelées et de couleur vert foncé luisant sur la partie antérieure et vert pâle sur la partie postérieure (AIT YUCEF, 2006), elles réfléchissent la lumière (BIZOUARD et FAVIER, 1962).



**Figure 3:** Feuilles d'Arbousier face inférieure et supérieure.

### ❖ Fruit

Le fruit est une baie sphérique couverte d'épis conique (FONSECA *et al.*, 2015). Varie considérablement dans la taille, bien qu'il fasse 1 à 3 cm de diamètre, pouvant atteindre jusqu'à 15 g, toujours hérissées de petites proéminences pyramidales (BIZOUARD et FAVIER, 1962) dont la couleur passe du vert au jaune puis au rouge orangé et enfin au rouge foncé à maturité (TARDIO *et al.*, 2002). Sa chair est molle de couleur jaune plus ou moins parfumée et douceâtre (BIZOUARD et FAVIER, 1962), un peu farineuse, acidulée et sucrée en même temps (TARDIO *et al.*, 2002).



**Figure 4:** Fruit d'*Arbutus unedo*.

### ❖ Fleurs

Elles sont blanchâtres, vertes au sommet, en forme de petites cruches ventrues à ouverture rétrécie (BIZOUARD et FAVIER, 1962) de 1cm de long, à 5 petites pointes recourbées, groupées en panicules à l'extrémité des rameaux (POLESE, 2010), rassemblées en petites grappes et apparaissent en septembre-octobre, en même temps que les fruits (CELIKEL *et al.*, 2008).



**Figure 5:** Fleures d'*Arbutus unedo*.

❖ **Ecorce**

Elle est écailleuse de couleur rouge brun, couvre le tronc qui peut avoir jusqu'à 35 cm de diamètre (BIZOUARD et FAVIER, 1962). Lorsque celui-ci devient âgée, elle prend une couleur brune terne, se fissure et finit par s'exfolier en petites plaques (BIZOUARD et FAVIER, 1962).



**Figure 6:** Ecorce d'*Arbutus unedo*.

❖ **Racine**

La racine, pivotante, à nombreuses ramifications ligneuses, est d'extraction difficile (BIZOUARD et FAVIER, 1962).

### 7-Composition chimique

#### ❖ Feuilles

Les feuilles d'*A. unedo* possèdent différents composés photochimiques, tels que les terpénoïdes, l' $\alpha$ -tocophérol, les huiles essentielles et les composés phénoliques (MOUALEK, 2018).

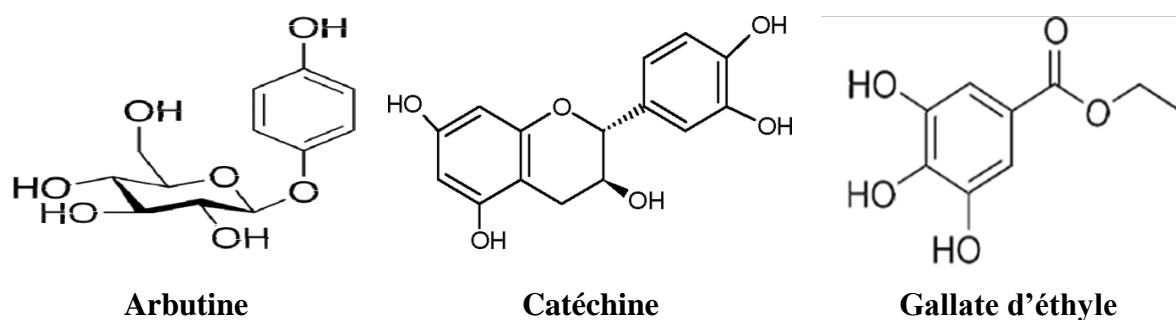
La fraction phénolique des feuilles montre une diversité de composés : tanins, flavonoïdes (catéchine gallate, myricétine, rutine, afzéline, juglanine, avicularine), glycosides phénoliques (quercitrine, isoquercitrine, hyperoside) et glucosides iridoïdes (CARCACHE *et al.*, 2006 ; MALES *et al.*, 2006 ; SANJUST *et al.*, 2008).

Les feuilles sont très riches en tanins, cette fraction représente environ 37% des polyphénols la composant. D'autres composés phénoliques la composent, tels que, arbutoflavonol A et B (Ait-YOUCHEF, 2006). Elle contient aussi d'après MALES *et al.* (2006) une quantité très importante de flavonoïdes qui varie entre 0.5% à 2%. Elles renferment aussi de l'acide gallique et isolique, qui sont caractérisés par leurs activités antioxydantes (DELLILE, 2007).

Les terpénoïdes identifiés dans cette même partie de l'arbre sont : l'acétate d'amine, l'acide bétulinique et le lupéol (GASPAR *et al.*, 1997 ; FIORENTINO *et al.*, 2007).

Les feuilles de l'arbousier contiennent plusieurs autres molécules d'intérêt tel que l'arbutoside, présent à une estimation de 3,2%. D'autre part l'unédoside, l'acide ursuline, l'hydroquinone libre (traces) ont été identifiées au niveau de cette partie de la plante (HAMITOCHE *et al.*, 2016).

Les composés polyphénoliques dominants sont l'arbutine, suivie de la catéchine et du gallate d'éthyle. Les études ont aussi montré que, selon les saisons et la répartition géographique, la composition et la concentration phytochimique pourraient varier. Par exemple, pour les extraits de feuilles venant de la Croatie, la quantité d'hyperoside et de quercitrine est plus élevée en janvier qu'en juin et juillet (MALES *et al.*, 2013 ; MORGADOA *et al.*, 2018).



**Figure 7:** Structure chimique des composés phénoliques plus abondants dans les feuilles d'*Arbutus unedo* (OLIVEIRA, 2011).

#### ❖ Fruit

La composition des baies est relativement mieux connue comparativement à celle des feuilles (MOUALEK, 2018). Les études phytochimiques des fruits d'*Arbutus unedo* ont révélé la présence de plusieurs sucres. En effet, ces fruits sont riches en monosaccharides (fructose et glucose), disaccharides (saccharose) et polysaccharides (cellulose et amidon) (ÖZCAN *et al.*, 2007).

Ces fruits contiennent plusieurs molécules bioactives dont 10,17 % de glucides, 0,51 % de lipides, 1 % de protéines, 48 mg/100 g de vitamine C, 0,2 mg/100 g d' $\alpha$ -tocophérols, 0,117 mg/100 g de  $\beta$ -tocophérols et 0,33 mg/100 g de vitamine A (SALEM, 2018).

Le fruit de l'arbousier est comestible et très riches en tanin (Ait-YOUCHEF, 2006), aussi bien que les flavonoïdes, la vitamine E, les caroténoïdes les anthocyanines, les dérivés d'acide gallique (AYAZ *et al.*, 2000 ; ALARCAO *et al.*, 2001 ; MALES *et al.*, 2006 ; PAWLOWSKA *et al.*, 2006; PALLAUF et RIVAS-GONZALO, 2008).

#### ❖ Racine

Les différentes études effectuées sur les racines d'*Arbutus unedo* ont révélé que cette partie est majoritairement composée de catéchine (DIB *et al.*, 2010).

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 (MIGUEL *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 flavonoïdes (0,56mg/g), dont les flavones et les flavonoles représentaient 0,17mg /g (DIB *et al.*, 2013 ; MIGUEL *et al.*, 2014).

**Tableau II:** Composition chimique des différentes parties d'*Arbutus unedo* (AIT YOUCEF, 2006 ; DOUKANI et TABAK, 2015 ; MALES et al., 2006 ; ALI-DELILLE, 2013; MIGUEL et al., 2014).

<b>Partie de la plante</b>	<b>Composés phénoliques</b>	<b>Sucres</b>	<b>Autres</b>
<b>Feuille</b>	Flavonoïdes Tannins Quercitine Catéchine Arbutin Arbutoflavonol A Arbutoflavonol B	Arbutoside Unédoside	Acide arsuline L'hydroquinone libre
<b>Fruit</b>	Les dérivés de galloyl Tannins Flavonols Anthocyanes	Sucre totaux Fructose Glucose Saccharose Maltose	Eau Fibres alimentaires Composés solides Acides organiques Protéines Niacine Acide ascorbique $\beta$ -carotène Potassium K <sup>+</sup> .
<b>Racine</b>	Anthocyanes Flavonoïdes Flavonols Arbutine		Composés mutagènes

### 8-Usages traditionnels et intérêts

Depuis l'antiquité, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale comme l'arbousier (*Arbutus unedo*) ont toujours été utilisés dans la médecine traditionnelle (EL HOUARI, 2007). Les parties utilisées principalement sont : Feuilles, fruits et racines.

#### ▪ Feuilles

Les feuilles d'*A. unedo* sont utilisées en phytothérapie en raison de leurs propriétés antiseptiques, diurétiques, astringentes (KARIKAS *et al.*, 1986 CARCACHE-BLANCO *et al.*, 2006) et purgatives, ils sont aussi appliqués dans le traitement du diabète et des états inflammatoires (ZIYYAT et BOUSSAIRI, 1998, AFKIR *et al.*, 2008, MARIOTTO *et al.*, 2008) et dans l'industrie chimique en raison de sa forte teneur en tanins. (CELIKEL *et al.*, 2008). Les feuilles ont également une forte activité antioxydante (PABUÇCUOGLU *et al.*, 2003), anti-hypertension (MIGUEL *et al.*, 2014) et antispasmodiques, celles-ci provoquent la contraction des tissus et des vaisseaux sanguins et stimulent la coagulation du sang (BOULLARD, 2001).

Elles sont aussi utilisées en décoction contre les affections des voies urinaire (cystite en particulier) et dans le traitement des infections rénales mineures (BOUZID, 2015).

#### ▪ Fruit

Le fruit de l'*Arbutus unedo* possède des propriétés astringentes, diurétiques (ÔZCAN et HACISEFEROGULLARI, 2007) et antiseptiques dans le traitement des infections des voies urinaires, (ALARCAO *et al.*, 2001). Il est utilisé aussi pour traiter les affections gastro-intestinales, les problèmes neurologiques et dermatologique (LEONTI *et al.*, 2009).

Selon BELLAKHDAR (1997), il est nécessaire de respecter les doses d'arbouses consommées, car en petite quantité, il joue un rôle anti-diarrhéique mais en cas d'excès, il devient toxique (BOULLARD, 2001), c'est pour cela qu'il est déconseillé pendant la grossesse et en cas d'affection rénale (ISERIN, 2001).

Il est généralement utilisé dans la production des boissons alcoolisées (vins, liqueurs et eaux-de-vie) et moins fréquemment consommé frais (SANTO, GALEGO, GONÇALVES, et QUINTAS, 2012). Il peut également être ajouté aux yaourts en morceaux ou en tant qu'arômes et être utilisé dans la confiserie, comme pour les garnitures de tarte et de pâtisserie (MIGUEL *et al.*, 2014). Il est également ajouté dans les produits à base de viande et de céréales (BOUZID, 2015). Le fruit sec est utile pour faire du thé, des saveurs et couleurs dans l'industrie (DIDI, 2009).

### ▪ Racine

Elle est utilisée en décoction contre l'hypertension et l'artériosclérose, on lui attribue des propriétés anti-inflammatoire, elle est également efficace contre les rhumatismes (AIT YOUCEF, 2006). Les racines sont également de bons désinfectant des voies urinaires et soignent les blennorragies (BOULLARD, 2001 ; ISERIN, 2001).

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).

### ▪ Ecorce

L'écorce est encore utilisée actuellement pour le tannage des cuirs. Le bois de l'arbousier est relativement facile à travailler et la souche permettrait de fabriquer des pipes appréciées par les connaisseurs. La carbonisation fournit un excellent charbon de bois (BIZOUAR et FAVIER, 1962).

### ▪ Fleurs

La floraison semble intéresser les apiculteurs, mais il faut reconnaître qu'elle favorise chez les abeilles la sécrétion de cire plutôt que de miel. Quoiqu'il en soit, *Arbutus unedo* n'a pas le défaut de certaines éricacées (en particulier *Androneda caluria*) dont les fleurs font produire aux abeilles un miel toxique (BIZOUARD et FAVIER, 1962).

**Tableau III:** Utilisations médicinales des différentes parties de la plante *Arbutus unedo*.

<b>Partie utilisée</b>	<b>Utilisation médicinale</b>	<b>Référence</b>
<b>Feuille et racine</b>	Affection gastro-intestinales ; Problèmes urologiques; Problèmes dermatologiques; L'application cardio-vasculaire; Maladies rénales; Hypertension; Les maladies cardiaques; Diabète; Antihémorroïdaires; Diurétique; Anti-inflammatoire; Anti-diarrhéique	ZIYYATI <i>et al.</i> , 1997. EI-HILALY <i>et al.</i> , 2003. LEONTI <i>et al.</i> , 2009. JOUAD <i>et al.</i> , 2001. CORNARA <i>et al.</i> , 2009.
<b>Fruit</b>	Affections gastro-intestinales; Problèmes neurologiques; Problèmes dermatologiques; Maladies rénales; L'application de cardiologie	EI-HILALY <i>et al.</i> , 2003. LEONETI <i>et al.</i> , 2009. CORNARA <i>et al.</i> , 2009.
<b>Ecorce</b>	Affections gastro-intestinales, Problèmes urologiques, Problèmes dermatologiques, Applications cardio-vasculaire.	LEONTI <i>et al.</i> , 2009.

## Chapitre II : Métabolites secondaires et activités biologiques

### 1-Généralités

Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes. Elles renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme. On distingue ainsi deux groupes de métabolites : les métabolites primaires et les métabolites secondaires (MUANDA, 2010).

Les métabolites primaires sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ces composés sont classés en quatre principaux groupes, les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques (MUANDA, 2010).

Le terme métabolite secondaire utilisé pour la première fois en 1891 par Albrecht Kossel qui l'introduisit par opposition à celui de métabolites primaires (HADACEK, 2002). Ce sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante (MUANDA, 2010).

Les métabolites secondaires se caractérisent par une très grande diversité structurelle, leur nombre serait compris entre 100 000 (HADACEK, 2002) et 200 000 (HARTMANN, 2007) mais sont produits en faible quantité (NEWMAN et CRAGG, 2012).

Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique (MUANDA, 2010).

### 2-Classification des métabolites secondaires

La majorité des métabolites secondaires sont regroupés en trois classes sur la base de leur origine biosynthétique : les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques (CROTEAU *et al.*, 2000).

### 2-1-Composés phénoliques

Introduit en 1980, le terme « polyphénol » définit les produits du métabolisme secondaire des plantes. Ce sont des molécules organiques hydrosolubles largement retrouvées dans le règne végétal. Ils sont issus du métabolisme secondaire des plantes (HADIM, 2018).

L'élément structural fondamental qui caractérise les polyphénols est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside...etc) (BRUNETON, 1999 ; HENNEBELLE *et al.*, 2004).

En fonction du nombre et de la position des groupements hydroxyles sur le squelette de base, toutes les classes de composés phénoliques comportent un grand nombre de structures différentes. (MUANDA, 2010). Ces derniers ont plus de 8000 structures phénoliques connues. Ils peuvent être divisés en trois groupes principaux : les flavonoïdes, les acides phénoliques et les stilbénoloïdes. Parmi eux, les flavonoïdes sont l'un des polyphénols les plus courants (PAN *et al.*, 2023).

#### 2-1-1-Classification des composés phénoliques

Les polyphénols sont communément subdivisés en acides phénoliques, coumarines, stilbènes, flavonoïdes, lignanes, lignines, tanins (BRUNETON, 1999).

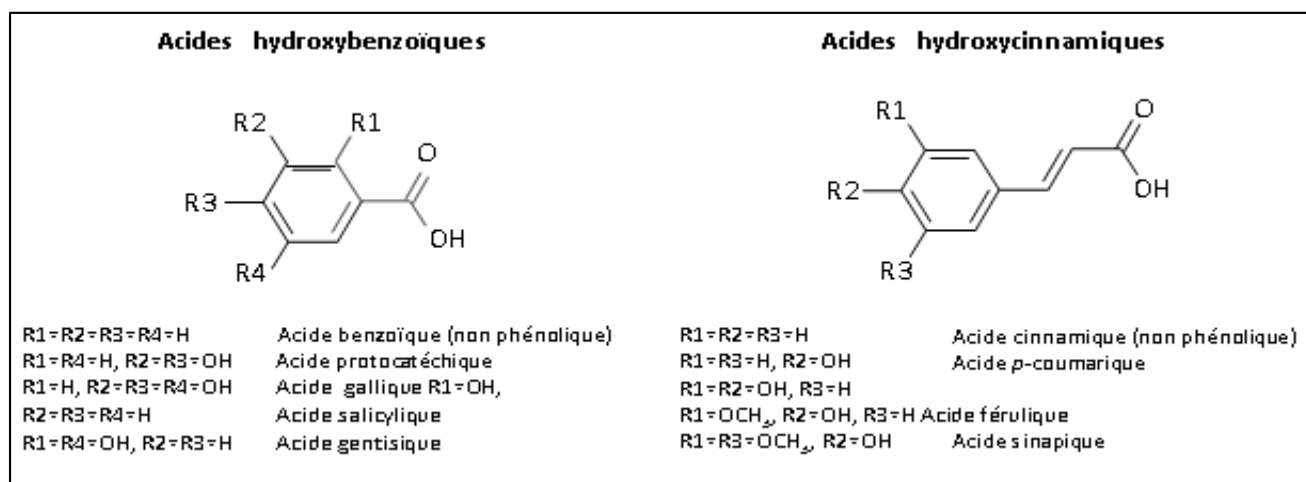
##### 2-1-1-1-Acides phénoliques

On distingue deux principales classes d'acide phénolique; les dérivés de l'acide benzoïque (GUIGNARD *et al.*, 1996) et les dérivés de l'acide cinnamique. (MALAGAS *et al.*, 1992)

La concentration de l'acide hydroxy-benzoïque est généralement très faible chez les végétaux comestibles. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine par contre ceux d'acides hydroxycinnamiques sont très présents (FLEURIET, 2005). Selon BENYAHYA (2014), ils sont répartis en deux groupes (Figure 8) :

**2-1-1-1-1-Acides hydroxybenzoïques** : dérivés de l'acide benzoïque, ils existent sous forme : libre, d'ester ou de glycoside. Leur structure de base est de type C6-C1 (BRIANCEAU, 2015). Exemple : Acide salicylique.

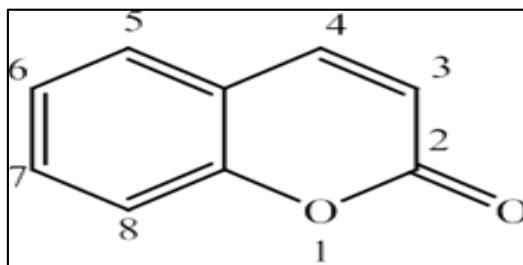
**2-1-1-1-2-Acides hydroxycinnamiques :** dérivés de l'acide cinnamique, existent sous forme combinée avec des molécules organiques et une structure de base C6-C3. Parmi les molécules importantes de groupe : l'acide férulique, l'acide caféique (NADOUR, 2010).



**Figure 8:** Structure chimique des acides hydroxybenzoïques et des acides hydroxycinnamiques (MUANDA, 2010).

### 2-1-1-2-Coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarouna odorata*. Aujourd'hui, près de 1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les microorganismes. (MUANDA, 2010).

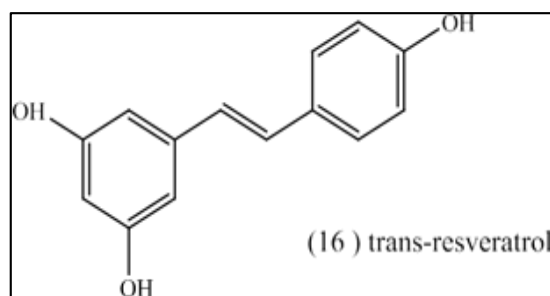


**Figure 9:** Structure chimique de Benzo-2-pyrone (MUANDA, 2010).

### 2-1-1-3-Stilbènes

Les stilbènes sont des composés poly phénoliques qui ont une structure C6-C2-C6, deux noyaux benzéniques reliés par un pont méthylène. Ils sont produits par les plantes en réponse à des attaques fongiques, bactériennes ou virales (CHIRA et al, 2008).

Les stilbènes se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine, parmi ces composés on trouve le resveratrol qui est un anticancéreux présent dans certaines plantes médicinales, l'exemple le trans-resveratrol (MUANDA, 2010).



**Figure 10** : Structure chimique de trans-resveratrol (TSAI *et al.*, 2017).

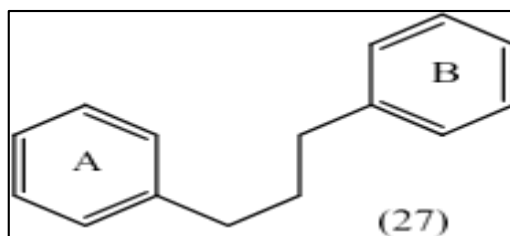
### 2-1-1-4-Flavonoïdes

Le terme flavonoïde provient du latin « flavus », signifiant « jaune ». Ces molécules sont des pigments quasi hydrosolubles qui sont synthétisés à partir de la phénylalanine, qui contribuent à la coloration des fleurs et des fruits en jaune (DIDI, 2009).

Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. On dénombre près de 6500 flavonoïdes (MUANDA, 2010).

Les flavonoïdes présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone, constitué de deux noyaux aromatiques à 6 carbone et d'un hétérocycle central de type pyrane, formant une structure C6-C3-C6 (HAVESTEEN, 2002).

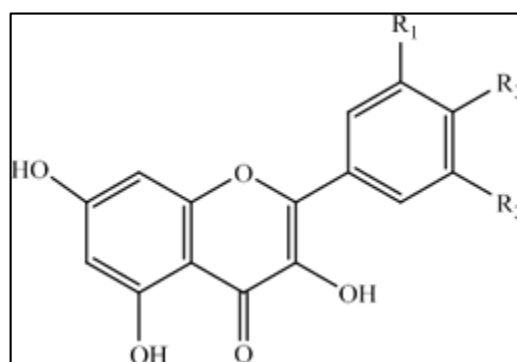
En se basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines ; flavonoles ; isoflavonoles ; flavones ; isoflavones ; flavanes ; flavanols ; isoflavanols ; flavanones ; isoflavanones et auronnes (HAVSTEEN, 2002).



**Figure 11** : Structure chimique de base de base des flavonoïdes (MUANDA, 2010).

- **Flavonols**

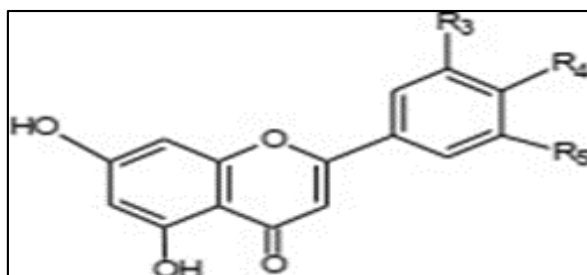
Les flavonols sont des composés flavonoïdes largement répandus. Ils sont incolores et caractérisés par la présence d'un groupement carbonyle en position 4 et d'un groupement hydroxyle en position 3. Les flavonols tels que la myricétine, la quercétine, l'isorhamnétine et le kaempférol sont la plupart du temps présents sous forme d'O-glycosides. (CHIRA et al, 2008). Les structures chimiques de quelques flavonols sont reprises ci-dessous (MUANDA, 2010).



**Figure 12** : Structure chimique de base des flavonols (MUANDA, 2010)

- **Flavones**

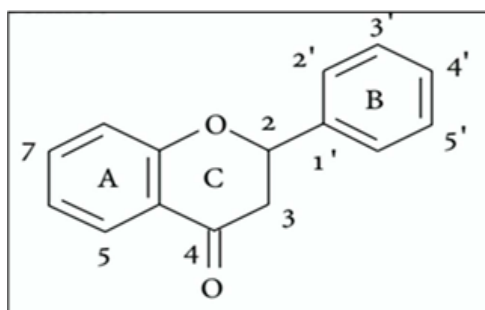
Les flavones sont structurellement très proches des flavonols, la différence provenant de l'absence de l'hydroxyle en C3. Il existe aussi de très nombreuses substitutions des flavones, telles que l'hydroxylation, la méthylation, les O- et C-alkylation et glycosylation. (CHIRA *et al.*, 2008).



**Figure 13:** Structure chimique de base des flavones (MUANDA, 2010).

- **Flavanones**

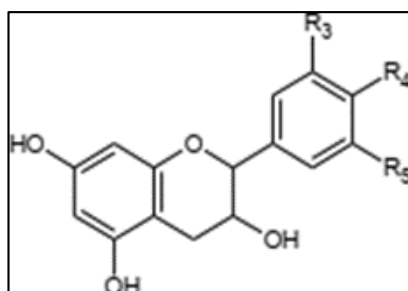
Ils sont les premiers produits de la voie de synthèse des flavonoïdes. Elles sont caractérisées par l'absence de la double liaison entre C2 et C3 et par la présence d'un centre d'asymétrie. (CHIRA *et al.*, 2008). Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols (Trik, 2020).



**Figure 14:** Structure chimique d'une flavonone (BRUNETON, 2009).

- **Flavanes**

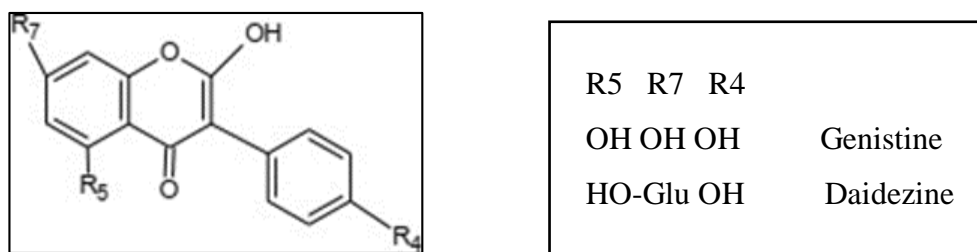
Leur principale classe est les flavan-3-ols. Ces derniers sont la catégorie de flavonoïdes la plus complexe (CHIRA *et al.*, 2008).



**Figure 15:** Structure chimique de base des flavanes (CHORFI, 2022).

- **Isoflavones**

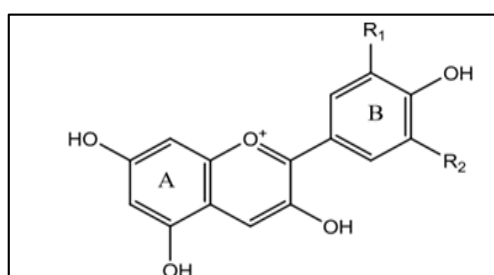
Ils constituent une grande et très diversifiée sous classe de flavonoïdes. Ces composés très actifs se trouvent essentiellement chez les légumineuses. Leur structure ne diffère des autres flavonoïdes que par la présence du cycle  $\beta$  en position 3.



**Figure 16:** Structure chimique de deux isoflavones (MUANDA, 2010).

- **Anthocyanidines**

La structure de base des anthocyanines est caractérisée par un noyau « flavon » généralement glucosylé en position C3 (GUINARD, 1996). Ce sont des pigments rouges en milieu acide, virant au bleu-violet en milieu neutre ou faiblement alcalin (BRAVO *et al.*, 2001). Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu (HARBONE, 1967).



**Figure 17:** Structure chimique de base des anthocyanidines (MACHEIX *et al.*, 2005).

### 2-1-1-5-Tanins

Le terme tanin fut introduit à la fin du dix-huitième siècle pour définir les substances organiques présentes dans les extraits aqueux des feuilles, fleurs, tiges et fruits (SWAIM, 1979). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leur centre asymétrique et leur degré d'oxydation (HEMINGWAY, 1992).

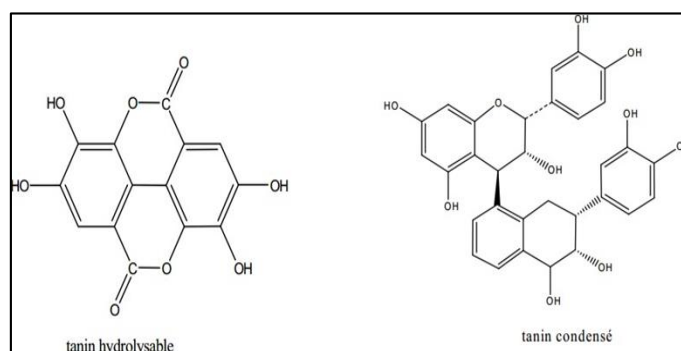
Les tanins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire. Ce sont des molécules fortement hydroxylées et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont

associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments (Alkurd *et al.*, 2008).

Il existe deux catégories des tanins, d'origine biosynthétiques différentes : les tanins hydrolysables et condensés (Paolini, 2003).

**2-1-1-5-1-tanins hydrolysables :** Comme leur nom l'indique, ces tanins subissent facilement une hydrolyse acide et basique, ils s'hydrolysent sous l'action enzymatique et de l'eau chaude (MUANDA, 2010).

**2-1-1-5-2-tanins condensés :** appelés aussi proanthocyanidines ou procyanidines, ce sont des oligomères ou polymères des flavonoïdes. (CONARD *et al.*, 2017) Les tanins condensés sont des polyphénols de masse molaire élevée. Ils résultent de la polymérisation auto oxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diol (MUANDA, 2010).



**Figure 18:** Structures des tannins (BAHAZ et RACHDI, 2010).

### 2-1-1-6-Lignanes et les lignines

Les lignanes répondent à une représentation structurale de type (C6-C3); l'unité (C6 - C3) est considérée comme un propylbenzène.

Les lignines constituent une classe importante de produits naturels dans le règne végétal et seraient formées par polymérisation oxydative de monolignols (monomères) qui sont les alcools p-coumarique, coniférique et sinapique (MUANDA, 2010).

### 2-2-Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques d'origine végétale, azotée et à caractère alcalin. (MUANDA, 2010). On en dénombre près de 12 000 structures différentes et constituent

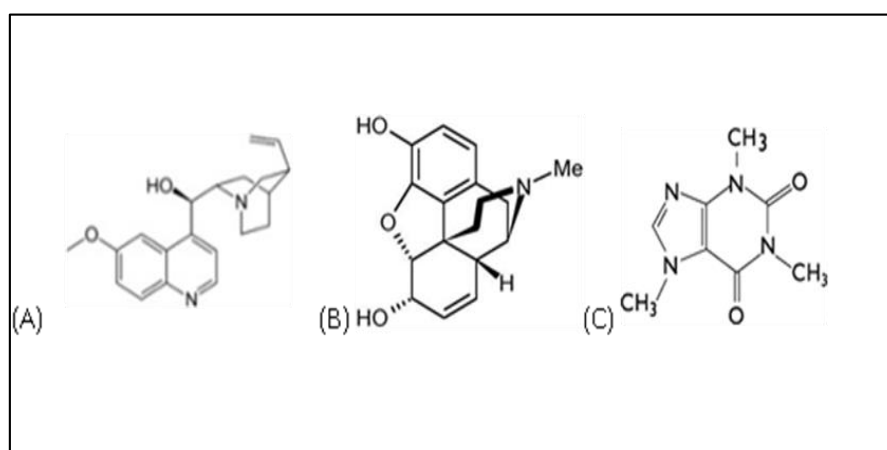
l'une des fractions les plus puissantes des principes actifs issus des plantes médicinales (STÖCKIGT *et al.*, 2002 ; ZENK et JUENGER, 2007 ; ROBERTS et WINK, 2013).

On distingue trois classes d'alcaloïdes :

- **Alcaloïdes vrais** : synthétisés uniquement par les végétaux, ils proviennent biosynthétiquement d'acides aminés (MOUALEK *et al.*, 2018).

- **Proto-alcaloïdes** : ils proviennent d'acides aminés simples dont l'azote n'est pas impliqué dans un cycle (MOUALEK *et al.*, 2018).

- **Pseudo-alcaloïdes** : Ils présentent le plus souvent, toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas dérivés des acides aminés (BRUNETON, 1999).



**Figure 19:** Structures de quelques alcaloïdes : (A) Quinine ; (B) Morphine ; (C) Caféine (CHORFI, 2022).

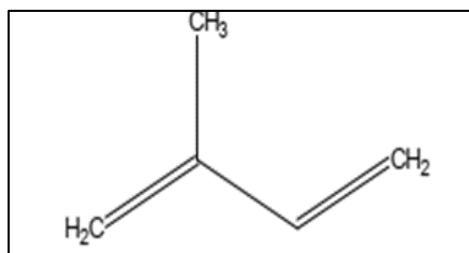
### 2-3-Terpénoïdes

Spécifiques du règne végétal se retrouvent chez les organismes marins, les champignons et même les animaux.

Avec un nombre de composés identifiés compris entre 30000 et 40000, les terpènes constituent la famille la plus largement diversifiée du point de vue structural (KAMPRANIS et al, 2007 ; DEGENHARDT et al, 2009).

Parmi les terpènes les plus importants on trouve : l' $\alpha$ -pinène, le  $\beta$ -pinène, le  $\delta$ -3- carène, le limonène et le carotène. (MUANDA, 2010).

La structure carbonée de base des terpénoïdes est constituée d'un assemblage d'un nombre variable d'unités 2-méthylbutane (aussi appelées unités isoprène - C5). Ces assemblages peuvent être modifiés par ajout/soustraction de groupes méthyles ou ajout d'atomes d'oxygène.



**Figure 20** : Structure chimique de base l'isoprène (MUANDA, 2010).

### 3-Rôles et intérêts des polyphénols

La famille des polyphénols comprend des milliers de molécules dont les propriétés intéressent au plus haut point l'industrie agro-alimentaire. Les polyphénols sont responsables du brunissement, participent à l'astringence et à l'amertume, sont aussi des molécules aromatiques et colorées, et ont un impact majeur sur les propriétés organoleptiques des produits. Par leurs propriétés antiseptiques, antibactériennes, antifongiques, les polyphénols peuvent avoir un impact sur la conservation des produits, notamment cosmétiques, alimentaires ou médicamenteux (SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006).

L'intégration du métabolisme phénolique dans le programme général de développement des organes végétaux pose elle-même la question du rôle éventuel de ces substances. Les polyphénols ont été liés à la qualité alimentaire des fruits. Les anthocyanes et certains flavonoïdes contribuent à la coloration des fruits mûrs. Les composés phénoliques déterminent également la saveur des fruits : les tanins sont responsables de l'astringence des fruits non mûrs, les flavanones sont responsables de l'amertume des agrumes et peuvent être transformés chimiquement pour produire les dihydrochalcones sucrées (DUBOIS *et al*, 1977).

Les pigments responsables de la coloration des fleurs représentent des signaux visuels qui attirent les pollinisateurs. La plupart de ces pigments sont des anthocyanes et des cétones. D'autres polyphénols incolores, tels que les flavonols et les flavanones, interagissent avec les anthocyanes pour modifier la couleur des fleurs et des fruits par co-pigmentation (BROUILLARD *et al.*, 1997).

Les polyphénols sont des micro-constituants végétaux abondants dans nos aliments. Ces composés sont reconnus pour leur forte bioactivité qui se traduit au niveau de l'organisme par une large gamme de propriétés biologiques, potentiellement intéressantes pour contribuer aux effets santé des produits végétaux (MORAND et MILENKOVIC, 2014).

Ils suscitent actuellement un grand intérêt en raison de leurs bénéfices potentiels dans la prévention des maladies liées à l'âge : infarctus du myocarde, cancer, maladies neurodégénératives (HENNEBELLE, SAHPAZ & BAILLEUL, 2004).

En raison de leurs interactions possibles avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes, les composés phénoliques jouent un rôle important dans la prévention de certaines maladies (MUANDA, 2010).

**Tableau IV:** Activités biologiques des polyphénols.

<b>Composés phénoliques</b>	<b>Activités</b>	<b>Références</b>
<b>Acides phénols (cinnamique et benzoïques)</b>	Anti-inflammatoire Antipyrétique Antioxydant Antiradicalaire Antifongique antivirale Anticancéreux	(HENNEBELLE <i>et al.</i> , 2004), (MOUALEK <i>et al.</i> , 2016) ; (COWAN, 1999) ; (BAHORUN, 1997).
<b>Flavonoïdes</b>	Antioxydant Anti-inflammatoire Antiagrégant plaquettaire Antiallergique Antibactérienne Anti carcinogènes	(HALLIWELL, 1994) ; (DJERIDANE <i>et al.</i> , 2007) ; (SUTRADHAR <i>et al.</i> , 2008) ; (LI <i>et al.</i> , 2007) ; (KRAVCHENKO <i>et al.</i> , 2003).
<b>Anthocyanes</b>	Antioxydant Antifongique Anti-inflammatoire	(PINENT <i>et al.</i> , 2016) ; (RIAZ <i>et al.</i> , 2016) ; (SHAO <i>et al.</i> , 2018).
<b>Coumarines</b>	Antiœdémateux Protectrice vasculaire Diurétique et carminatives	(SMYTH <i>et al.</i> , 2009) (ITO <i>et al.</i> , 2009) ; (HENNEBELLE <i>et al.</i> , 2004)

	Antiparasitaire	(MELAGRAKI <i>et al.</i> , 2009).
<b>Tannins galliques (hydrolysables) et catéchiques (condensés)</b>	Antioxydant	(OKAMURA <i>et al.</i> , 1993).
<b>Lignines</b>	Anti-inflammatoire Antialgésique	(KIM, 2009).
<b>Lignanés</b>	Antioxydant Anti-inflammatoire	(CASARIN <i>et al.</i> , 2014).

#### 4-Activités biologiques

Les polyphénols ont des propriétés saines potentielles sur l'organisme humain, principalement en tant qu'agents antioxydants, antiallergiques, anti-inflammatoires, anticancéreux, antihypertenseurs et antimicrobiens (DAGLIA, 2012).

##### 4-1-Activité antimicrobienne

Beaucoup de groupes de recherches ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales et ils ont trouvé que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries mais aussi contre les champignons, les levures et les virus (JÜRGEN *et al.*, 2009).

D'autres groupes de chercheurs sont arrivés à identifier et isoler les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes, cette étape constitue une plateforme pour plusieurs applications incluant l'industries pharmaceutique, cosmétique et alimentaire (HUANG *et al.*, 2008).

L'activité antimicrobienne principalement contre les bactéries Gram-positif (ORAK *et al.*, 2011 ; HAOUAT *et al.*, 2012) des extraits des feuilles d'*Arbutus unedo* est largement traitée dans la littérature scientifique. La fraction insaponifiable de ses feuilles a été active pour inhiber la croissance de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* et *Candida albicans* (DIBA *et al.*, 2010). Les extraits aqueux, quant à eux, ont donné un effet inhibiteur vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (ORAK *et al.*, 2011 ; MALHEIRO *et al.*, 2012) *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus epidermis* (MALHEIRO *et al.*, 2012).

La maîtrise des infections bactériennes devient difficile du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance en raison de l'utilisation abusive des antibiotiques, ce qui a constitué un problème de santé publique important à l'échelle mondiale et motive ainsi l'orientation de la recherche scientifique vers de nouvelles molécules d'origine végétale (BILLING et al., 1998).

Certains auteurs supposent que les biomolécules présentes dans les extraits végétaux tels que les polyphénols et plus particulièrement les flavonoïdes agissent sur la membrane cytoplasmique ou la paroi cellulaire bactérienne, causant des dommages structurels et fonctionnels (DIXON *et al.*, 2005 ; KOSALEC *et al.*, 2005 ; SCAZZOCCHIO *et al.*, 2006 ; HEINONEN, 2007).

Plusieurs études *in vitro* ont démontré que les extraits aqueux des feuilles d'*Arbutus unedo* L. sont dotés d'une activité antibactérienne. (MOUALEK, 2018). Le potentiel antibactérien de ces derniers dépend de sa teneur en polyphénols et plus particulièrement en flavonoïdes et tanins (FERREIRA *et al.*, 2012).

### **4-2-Activité anti biofilm**

#### **4-2-1-Synthèse sur les biofilms**

##### **4-2-1-1-Définition**

Un biofilm est une communauté de différents micro-organismes aérobies ou anaérobies (bactéries, champignons, algues, protozoaires, etc.) qui se caractérisent par des cellules fixées les unes aux autres, l'ensemble ainsi formé étant lui-même fixé à une surface non toxique (bois, verre, plastique, métal sauf cuivre, poisson, etc.). Les micro-organismes sécrètent une matrice complexe de substances exopolymériques appelés classiquement EPS (Exo-Polymère Substance) (ALNNASOURI, 2010).

Ils sont particulièrement connus pour leurs effets négatifs sur la santé publique et cause d'un large éventail d'infections chez l'homme, ainsi que leurs impacts écologiques et économiques considérable (CHALVET de ROCHEMONTE, 2009 ; MAHAMATI et al., 2013).

##### **4-2-1-2-Composition d'un biofilm**

Le biofilm est composé de microorganismes unicellulaires et de la matrice d'exopolysaccharides. Les micro-organismes représentent moins de 10 % de la masse sèche du

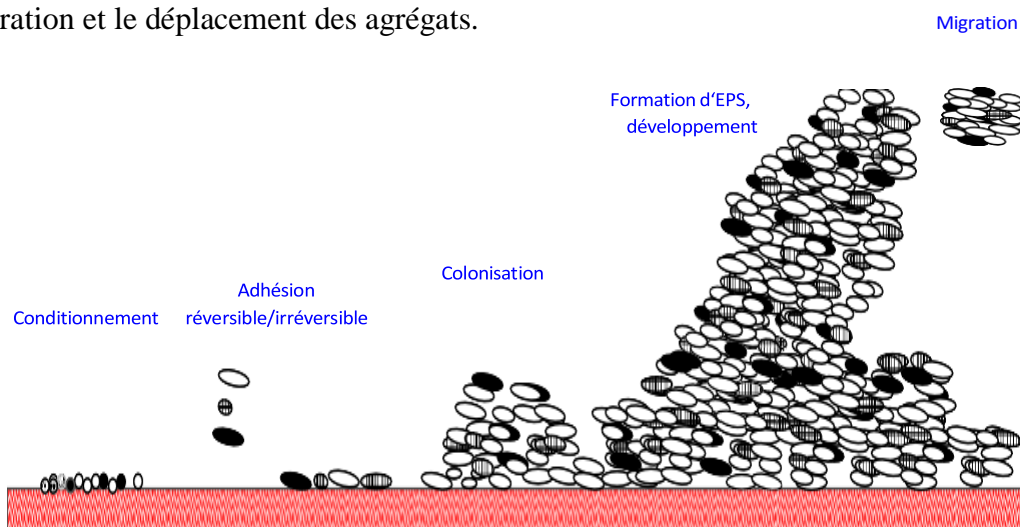
biofilm alors que la matrice peut en représenter plus de 90 % selon l'espèce impliquée (COSTERTON, 1999).

Les biofilms ont généralement des teneurs élevées en exopolymères qui les composent de 50 à 90% (CHARACHLIS *et al.*, 1983 ; CHRISTENSEN *et al.*, 1990; NIELSEN *et al.*, 1997). Le contenu de la matrice peut varier d'un organisme à un autre, mais ce sont généralement des polysaccharides et des protéines (SUTHERLAND, 2001), ainsi que leurs combinaisons (glycoprotéines) (HUMPHREY *et al.*, 1979) qui sont majoritaires. La composition des EPS en sucre et en protéine dépend de l'alimentation (COMTE *et al.*, 2007 ; ALNNASOURI *et al.*, 2010).

### 4-2-1-3-Formation d'un biofilm

Les différentes études montrent que les biofilms se forment de la même manière quel que soit l'environnement qu'ils colonisent (JOHN *et al.*, 2006 ; COSTERTON *et al.*, 1987). La formation du biofilm est composée de cinq étapes (STEVEN *et al.*, 2000 ; JOHN *et al.*, 2006 ; CHARACKLIS *et al.*, 1990 ; LAPPIN-SCOTT et COSTERTON, 1995) suivantes :

1. Conditionnement d'un film de nutriments sur la surface ;
2. Positionnement des micro-organismes à la proximité de la surface ;
3. Adhésion réversible et irréversible des microorganismes sur la surface conditionnée ;
4. Croissance, colonisation et maturation sur la surface ;
5. Migration et le déplacement des agrégats.



**Figure 21** : Formation d'un biofilm (ALNNASOURI, 2010).

### 4-2-1-4-Effet anti biofilm

La maîtrise des infections bactériennes devient complexe, vu la structure spécifique des biofilms qui fournit un haut niveau de résistance aux antibiotiques, aux désinfectants et aux détergents (CLOSTERON *et al.*, 1999 ; STEWART et CLOSTERON, 2001; STEWART et FRANKLIN, 2008). Par conséquent, lorsque les cellules existent dans un biofilm, elles deviennent 10 à 1000 fois plus résistantes aux antimicrobiens (KANAAAN *et al.*, 2017).

Plusieurs études ont évalué la capacité d'extraits de plantes à empêcher leur formation par l'inhibition de la synthèse des différents appendices membranaires (fimbriae, pilis, curls...) qui permettent la fixation des bactéries aux surfaces biotiques ou abiotique.

### 4-3-Activité anti oxydante

Les antioxydants sont des molécules qui, lorsqu'elles sont présentes à faible concentration par rapport au substrat oxydable, retardent ou stoppent le processus d'oxydation, et ainsi régulent l'équilibre redox cellulaire (ARUOMA, 1996). 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).

Les antioxydants les plus connus sont le  $\beta$ -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. Ces derniers, en particulier les flavonoïdes, ont des propriétés antioxydantes en raison de leur capacité à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH) et superoxydes (O<sub>2</sub>) (BOUDET, 2007 ; RICE-EVANS *et al.*, 1996)

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.*, 2004). Ce qui permet de prévenir l'apparition de nombreuses pathologies notamment les cancers, les maladies cardiovasculaires et le diabète (ICHAH *et al.*, 2011), c'est en cela qu'on s'intéresse de plus en plus aux antioxydants présents dans les plantes notamment ceux d'*Arbutus unedo* L., dans les feuilles très riches en tanins, flavonoïdes, coumarines) (MEKHFI *et al.*, 2006).

L'activité antioxydante est fortement liée au solvant utilisé lors de l'extraction des principes actifs à partir des feuilles d'arbousier. (PABUÇCUOGLU *et al.*, 2003 ; OLIVEIRA *et al.*, 2009). L'effet antioxydant, corrélé positivement, non seulement quantitativement avec

les molécules antioxydantes, mais aussi qualitativement (VINSON *et al.*, 2001). La variabilité du potentiel antioxydant des extraits de feuilles est aussi liée à la zone de collecte et au génotype de l'arbousier (PAVLOVIC *et al.*, 2011).

#### 4-4-Activité anti inflammatoire

L'inflammation est une réaction adaptative engendrée en réponse à des stimuli nocifs telle qu'une infection ou une agression tissulaire. Elle nécessite une régulation fine, généralement bénéfique, elle conduit à l'élimination d'éventuels pathogènes et au retour à l'homéostasie du tissu lésé (NATHAN, 2002; BARTON, 2008).

Les plantes anti-inflammatoires regroupent des espèces de diverses familles dont les principes actifs présumés responsables de l'activité anti-inflammatoire sont de nature chimique variée tel que les composants phénoliques. Ces derniers présentent une capacité très importante à prévenir et traiter les maladies inflammatoires, et encore à éliminer les causes de l'inflammation comme par exemple élimination des aliments pro-inflammatoires (graisses saturés, excès de sucre...etc. (BIERHAUS *et al.*, 1997).

L'effet anti-inflammatoire d'une solution aqueuse des feuilles d'*Arbutus unedo* a été mis en évidence par MARIOTTO *et al.*, (2008) sur l'inflammation pulmonaire aiguë induite chez un rat. Leurs résultats ont montré que les composés biologiques contenus dans les feuilles de cette plante sont capables de réduire considérablement l'inflammation pulmonaire.

#### 4-5-Activité anticancéreuse

Plus récemment, des recherches menées *in vitro* et *in vivo* suggèrent que les polyphénols sont parmi les substances susceptibles de retarder voire d'empêcher l'apparition de certains cancers, tout en réduisant d'une manière spécifique les risques d'en avoir chez les sujets humains (STAGOS *et al.*, 2012)

Les composés phénoliques inhibent la topo isomérase nécessaire à la division cellulaire, ainsi que la prolifération des cellules cancéreuses (DE MAJIA *et al.*, 2010). Cette activité anti-tumorale des polyphénols est due d'après SHI *et al.*, (2009) aux propriétés des tanins à se complexer avec les protéines.

*Partie  
expérimentale*

## Chapitre I : Matériel et méthodes

Le travail expérimental que nous avons réalisé a été effectué au sein du laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologie (LABAB) ainsi que le laboratoire pédagogique des analyses physico-chimiques de la faculté des Sciences Biologique et Agronomiques de l'université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou (UMMTO).

### 1-Matériel

#### 1-1-Matériel végétal

##### 1-1-1-Récolte

Les feuilles d'*Arbutus unedo* ont été collectées en décembre 2022 dans la région de Larbaâ Nath Irathen ( $36^{\circ} 38' 12''$  nord,  $4^{\circ} 12' 24''$  est). Le choix de la zone d'échantillonnage est motivé par son éloignement de la route et de toute exploitation agricole. Dix arbres sains sont sélectionnés et échantillonnés aux quatre expositions de la couronne.



Figure 22 : Localisation géographique de la région de récolte (Larbaâ Nath Irathen).

##### 1-1-2-Séchage

Une fois triées et lavées à l'eau distillée, celles-ci sont séchées à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité pendant 21 jours, ensuite stockées dans des sacs en papier à température ambiante jusqu'à leur utilisation.

### 1-1-3-Broyage

Après le séchage, l'échantillon sec obtenu est broyé à l'aide d'un broyeur électrique de type Siyo lux 220-240 V à 2500 r/m suivi d'un tamisage pour obtenir une poudre très fine qui sera conservée dans un sac en plastique.



(1) Récolte



(2) Séchage



(3) Broyage

### 1-2-Souches bactériennes

L'activité antibactérienne et anti biofilm de l'extrait aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* sont évaluées vis-à-vis les deux souches suivantes : *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Le choix de ces souches est motivé par leur large impact pathologique dû à leur pouvoir pathogène. Celles-ci proviennent de la collection de l'unité de microbiologie appliquée du laboratoire de recherche en biochimie analytique et biotechnologie (LABAB) de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

### 2-Méthodes

#### 2-1- Préparation de l'extrait sec

##### 2-1-1-Macération

10 g de feuilles en poudre sont macérés sous agitation à 296 rpm à température ambiante dans 100 ml d'eau distillée pendant 24 h.



**Figure 23 :** Macération de la poudre végétale (original).

### 2-1-2- Filtration

Le macérât est filtré une première fois sur une passoire afin d'éliminer le maximum de matière végétale puis une deuxième fois sur laine de verre jusqu'à obtenir un liquide limpide et homogène.

### 2-1-3-Evaporation

Le filtrat obtenu est versé dans des cristallisoirs de 15 cm de diamètre, puis disposé dans l'étuve à 42°C pendant 72h.

### 2-1-4-Grattage

Une fois évaporé, on gratte la matière en utilisant un couteau, la poudre récupérée est ensuite répartie dans un petit flacon en plastique stérile et conservée au réfrigérateur à 4°C jusqu'à son utilisation.



**Figure 24:** Grattage (originale).

**10g de poudre dans 100ml de  
l'eau distillée**



**Maceration sous agitation a 296 rpm**



**Filtration**



**Evaporation à 42° C pdt 72h**



**Grattage**



**Conservation au réfrigérateur à 4°C**

### 2-2- Préparation de l'extrait aqueux

500ug de l'extrait sec sont ajoutés à 1ml de l'eau distillée puis agités à l'aide d'un vortex sa concentration est donc = [50mg/ml]. Réaliser une dilution  $\frac{1}{2}$  pour l'extrait aqueux.

### 2-3-Rendement d'extraction

Le rendement représente la masse de l'extrait déterminée après évaporation. Il représente le pourcentage de la poudre finale par rapport à la masse initiale de la poudre soumise à extraction. Il est calculé suivant la formule ci-dessous :

$$R(\%) = (M/M_0) \times 100$$

**R** : Rendement en extrait brut exprimé en %.

**M** : Masse en gramme de l'extrait sec obtenue.

**M<sub>0</sub>** : Masse en gramme de la poudre végétale utilisée.

### 2-4-Préparation des suspensions bactériennes

Les souches bactériennes sont préalablement revivifiées en milieu BHIB (24h à 37°C), isolées en colonies par la méthode des stries sur milieu Mueller Hinton, puis ré-incubées à 37°C pendant 24 h sur le même milieu.

Quelques colonies de chacune- des deux souches bactériennes sont prélevées pour réaliser deux suspensions standardisées dans deux tubes à essai remplis de 10 ml d'eau physiologique ( $10^6 - 10^8$  UFC/ml, à 622 nm,  $D_{0.1} = 0,08$  à 0,1).

Mesure de la DO : La  $DO_{E.Coli} = 0,093$  et la  $DO_{S.aureus} = 0,087$ .

### 2-5- Etude de l'activité antibactérienne :

L'activité antibactérienne de l'EA d'*Arbutus unedo* est évaluée par la méthode décrite par FALLEH *et al.*, (2008) vis-à-vis de deux souches bactériennes *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

### 2-5-1-Ensemencement des boîtes

A partir de cet inoculum préalablement préparé, de nouvelles boîtes sont ensemencées par écouvillonnage par la méthode des stries serrées sur milieu MH. On prépare deux boîtes pour chaque souche (la première pour l'extrait pure et la deuxième pour la dilution  $\frac{1}{2}$ ).

### 2-5-2- Méthode de diffusion sur disque sur milieu Mueller Hinton

L'activité antibactérienne de nos extraits vis-à-vis des 2 souches a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu solide MH (DIB *et al.*, 2013).

- *Escherichia coli*

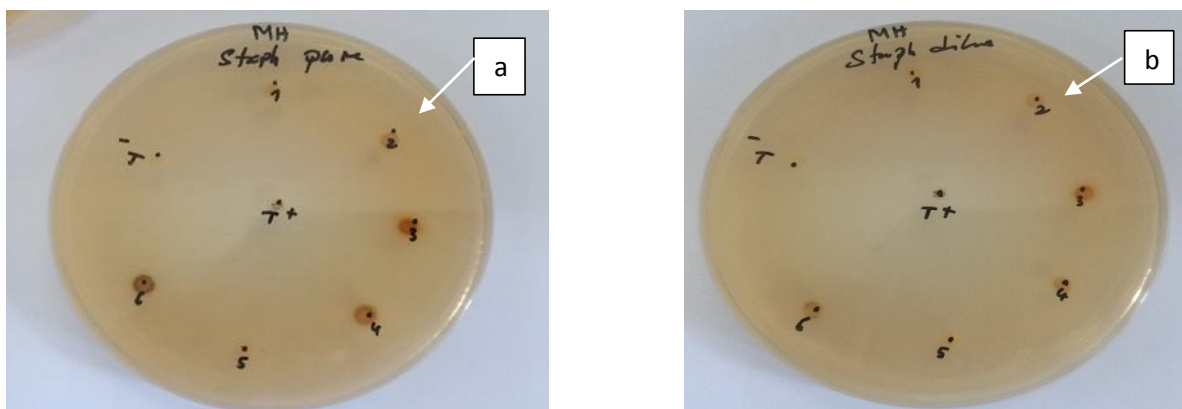
Deux disques de papier Whatman n° 1 de 6 mm de diamètre, stériles, sont déposés sur la surface du milieu MH pour chaque boîte.

Le premier disque de la première boîte est chargé par 15 $\mu$ l de l'EA pure à la concentration de 50mg/ml, et celui de la deuxième boîte par 15 $\mu$ l de l'EA dilué  $\frac{1}{2}$ (25mg/ml).

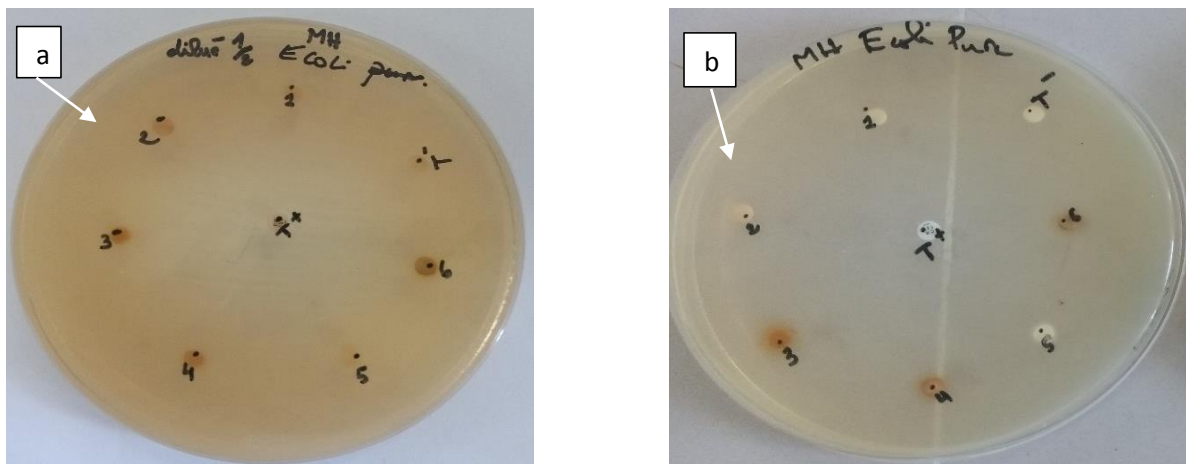
Le deuxième disque sert de témoin négatif (imprégné de 15 $\mu$ l de l'eau distillée), et un disque d'antibiotique (gentamicine) est placé à la surface de chaque boîte comme témoin positif puis laisser le tout au frigo pendant 2-4 h à 4°C dans le but d'avoir une bonne diffusion de l'extrait et d'empêcher les souches de croître puis incubé à 37°C pendant 24h.

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés autour de chaque disque en millimètre après incubation.

- *Staphylococcus aureus* : le même principe que la souche *E. coli* est effectué.



**Figure 25** : Deux boîtes contenues le milieu MH ensemencées par *S. aureus* avant l'incubation ; (a) extrait pure et (b) extrait dilué  $\frac{1}{2}$  (disque n°2).



**Figure 26 :** Deux boîtes contenant le milieu MH ensemencées par *E. coli* avant l'incubation ;  
(a) extrait pure et (b) extrait dilué  $\frac{1}{2}$  (disque n°2).

## 2-6- Etude de l'activité anti biofilm

### 2-6-1-Ensemencement des boîtes

A partir de cet inoculum préalablement préparé, de nouvelles boîtes sont ensemencées par écouvillonnage par la méthode des stries serrées sur milieu Rouge Congo.

- Deux boîtes sont ensemencées : la première par *E. coli* et la deuxième par *S. aureus*, puis incubées à 37°C pendant 24h afin d'évaluer la formation de biofilms. Les souches non formatrices de biofilms donnent des colonies rouges tandis que l'apparition des colonies noires indique formation de biofilms.
- Deux autres boîtes sont ensemencées par *S. aureus* (la première pour l'extrait pure et la deuxième pour la dilution  $\frac{1}{2}$  afin d'évaluer l'activité anti biofilm de notre extrait par la méthode de diffusion sur disque.

### 2-6-2- Méthode de diffusion sur disque sur milieu rouge Congo

L'activité anti biofilm de notre extrait vis-à-vis de deux souches (*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300) a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu Rouge Congo de Freeman *et al.*, 1989.

- *Escherichia coli*

Deux disques de papier Whatman n° 1 de 6 mm de diamètre, stériles, sont déposés sur la surface du milieu RC de chaque boîte.

Le premier disque de la première boîte est chargé par 15µl de l'EA pure à la concentration de 50mg/ml, et celui de la deuxième boîte par 15µl de l'EA dilué ½ (25mg/ml).

Le deuxième disque sert d'un témoin négatif (imprégné de 15µl de l'eau distillée), et un disque d'ATB de la gentamicine est placés à la surface de chaque boîte comme témoin positif, puis laisser le tout au frigo pendant 2-4 h à 4°C dans le but d'avoir une bonne diffusion de l'extrait et d'empêcher les souches de croître puis incubé à 37°C pendant 24h.

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés autour de chaque disque en millimètre après incubation.

- *Staphylococcus aureus* : le même principe que la souche *E.coli* est effectué.



**Figure 27** : Deux boîtes contenant le milieu RC ensemencées par *S. aureus* avant incubation ;  
(a) extrait pure et (b) extrait dilué ½ (disque n°2)

### 2-7- Screening phytochimique

La mise en évidence des différentes classes des métabolites secondaires constituant la poudre des feuilles d'*Arbutus unedo* a été faite selon les méthodes standards de screening phytochimique.

C'est une analyse qualitative basée sur des réactions de précipitation et / ou de coloration qui permettent la révélation des métabolites secondaires.

### 2-7-1-Préparation de l'infusé

5g de la poudre de feuilles sont ajoutés à 25 ml d'eau distillée, le mélange est porté à l'ébullition pendant 15 min puis on filtre. Le filtrat obtenu est ajusté à 100 ml d'eau distillée pour l'utiliser dans l'analyse phytochimique.

### 2-7-2-Testes phytochimiques

#### ➤ Anthocyanes

Dans un Erlenmeyer introduire 5 mL d'infusé, puis ajouter quelques gouttes d'HCl. La présence d'anthocyanes est indiquée par l'apparition d'une coloration rouge.

#### ➤ Tanins

2,5 mL d'infusé auquel on ajoute quelques gouttes de la solution  $\text{FeCl}_3$  (5 %). La coloration bleu noir implique la présence des tanins.

#### ➤ Tanins galliques

Saturer le filtrat par l'acétate de Sodium ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), ajouter par la suite quelques gouttes de  $\text{FeCl}_3$ . Une réaction positive donne une coloration bleu foncée.

#### ➤ Quinones libres

Ajouter 1mL d'HCl (1N) à 1g de poudre végétale, ensuite ajouter 10 mL de chloroforme et laisser reposer pendant 3 heures puis filtrer. 2,5 mL d'ammoniaque ( $\frac{1}{2}$ ) sont ajoutés. La réaction est dite positive lorsqu'une coloration rouge violette apparaît.

#### ➤ Saponosides

Prendre 2 tubes à essai fermés :

On ajoute au premier tube 2,5 mL d'HCl (0.1N) et dans le deuxième 2,5 mL de NaOH (0.1 N).

Introduire dans chacun des tubes 2 à 3 gouttes d'infusé, puis agiter bien verticalement pendant quelques secondes et laisser reposer pendant 15 min. La présence des Saponosides est indiquée par l'apparition d'une mousse persistante. Il y a deux cas probables :

**1<sup>er</sup> cas :** si on obtient dans les deux tubes le même volume de mousse, cela indique la présence des Saponosides stéroïdiennes.

**2<sup>ème</sup> cas :** s'il y aura la formation d'une mousse plus grande par stabilité et par volume en milieu basique, cela indique la présence des saponines tri-terpéniques.

### ➤ Glucosides

Quelques gouttes d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  sont ajoutées à 1g de poudre végétale. L'apparition d'une couleur rouge brique puis violette indique la présence des glucosides.

### ➤ Flavonoïdes

Ajouter 2,5 mL d' $\text{HCl}$  à 2,5 mL de l'infusé puis un copeau de magnésium (Mg) et 0,5mL de l'alcool iso-butanol. La réaction est dite positive lorsqu'une coloration rouge orangé apparaît.

### ➤ Coumarines

1 mL de l'infusé auquel on ajoute 1,5 mL de  $\text{NaOH}$  (10 %). L'apparition d'une coloration jaune indique une réaction positive.

### ➤ Stéroïdes

Ajouter à 5 mL d'infusé, 5 mL de l'anhydride acétique, puis 5 mL de l'acide sulfurique  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . L'apparition d'une couleur verte indique la présence des stéroïdes.

## 2-8- Dosage des sucres

On met en évidence trois catégories de sucres : les sucres totaux, les sucres réducteurs et le saccharose. Avant de commencer les dosages, on prépare les deux filtrats [1] et [2] de compositions suivantes.

### 2-8-1- Préparation de deux filtrats

Avant de commencer les dosages, on prépare les deux filtrats [1] et [2] de compositions suivantes.

- **Filtrat [1]**

Dans un bicher de 100 ml, 2,5ml d'acétate de plomb sont ajoutés à 10g de l'échantillon, remplir ensuite jusqu'au 2/3 du volume de bécher avec l'eau distillée et agiter le mélange. Après un repos de 15 min on ajuste avec l'eau distillée jusqu'à 100 ml puis on filtre avec un papier filtre et on récupère le filtrat.

- **Filtrat [2]**

2,5ml d'HCl concentré sont ajoutés à 25ml du filtrat [1], le mélange est ensuite chauffé au bain marin à 70°C pendant 5 min puis neutraliser avec NaOH (10N) en présence de phénolphtaléine à 1%.

### 2-8-2-Dosage des sucres totaux

➤ **Mode opératoire**

- Prélever 2,5ml de la solution Fehling A et 2,5ml de la solution Fehling B ;
- Ajuster jusqu'à 50ml avec l'eau de robinet ;
- Chauffer le contenu jusqu'à ébullition durant 2mn ;
- Titrer par le filtrat [2] obtenu jusqu'à la disparition de la couleur bleue ;
- Ajouter quelques gouttes de bleue de méthylène jusqu'à ce que la coloration bleue soit remplacée par une coloration marron cuivrée ;
- Noter le volume de filtrat [2] V2.

➤ **Expression des résultats**

La quantité des sucres totaux dans la prise d'essai est donnée par la formule suivante :

$$S_T = \frac{500}{V \times (V2 - 0,05)} \times 10$$

**ST** : quantité des sucres totaux (g/100ml).

**V** : volume de la prise d'essai.

**V2** : volume du filtrat [2] dépensé pour le titrage (ml).

### 2-8-3- Dosage des sucres réducteurs

➤ **Mode opératoire**

- Introduire 2,5ml de la solution Fehling A et 2,5ml de la solution Fehling B dans un bécher de 250ml ;

- Ajuster jusqu'à 50ml avec l'eau de robinet ;
- Chauffer le contenu jusqu'à l'ébullition durant 2mn ;
- Titrer par le filtrat [1] jusqu'à ce que la teinte bleue disparaisse ;
- Ajouter quelques gouttes de bleu de méthylène et continuer le titrage jusqu'à ce que la coloration bleue devienne rouge brique ;
- Arrêter le titrage et noter le volume du filtrat [1] dépensé V1.

### ➤ Expression des résultats

La quantité de sucres réducteurs dans la prise d'essai est donnée par la formule suivante :

$$S_R = \frac{240}{V \times (V1 - 0,05)}$$

**SR** : quantité des sucres réducteurs (g/100ml).

**V** : volume de la prise d'essai (ml).

**V1** : volume du filtrat [1] utilisé au titrage (ml).

### 2-8-4-Le taux de saccharose

La quantité de saccharose est calculée selon la formule suivante :

$$S = (S_T - S_R) \times 0,95$$

**S** : quantité de saccharose en g/l.

**ST** : quantité des sucres totaux en g/l.

**SR** : quantité des sucres réducteurs en g/l.

### 2-9-Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux est effectué selon la méthode utilisant le réactif Folin-Ciocalteu (LI *et al.*, 2008).

Le réactif Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (HP<sub>3</sub>MO<sub>12</sub>O<sub>40</sub>). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène qui induit un virage de couleur du jaune vers le bleu (BOIZOT et CHARPENTIER, 2006). L'intensité de cette coloration bleue produite est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans l'extrait végétal.

200 µL de l'extrait végétal de concentration 400ug/mL sont introduites dans des tubes à essai et mélangées avec 1ml de réactif Folin-Ciocalteu fraîchement préparé dilué 10 fois dans l'eau distillé. Ce mélange est ensuite additionné de 800 µl d'une solution de carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 75mg/mL puis incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes. La mesure de l'absorbance est effectuée avec un spectrophotomètre (UV, visible) à 760 nm. Le blanc est préparé avec la même concentration en remplaçant l'extrait végétal par de l'eau distillée.

Suivant le même protocole et dans les mêmes conditions opératoires une gamme d'étalonnage d'acide gallique est réalisée à des concentrations allant de 10 à 100 µL. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g).

Le taux de polyphénols totaux contenu dans l'extrait est estimé en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique à différentes concentrations, les dilutions sont préparées à partir de la SM (Tableau V). 3000 µL de chaque dilution est traité dans les mêmes conditions que l'extrait.

**Tableau V** : Préparation de la gamme de dilution de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

<b>Concentration (<math>\mu\text{g} / \text{mL}</math>)</b>	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
<b>Volume SM (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	0	300	600	900	1200	1500	1800	2100	2400	2700	3000
<b>Volume d'ED (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	3000	2700	2400	2100	1800	1500	1200	900	600	300	0

## Chapitre II : Résultats et discussion

### 1-Rendement d'extraction

Le rendement en extrait sec obtenu est :  $R(\%) = (2/10) \times 100 = 20 \%$

- Masse en gramme de l'extrait après évaporation, M= 2g.
- Masse en gramme de la poudre végétale utilisée, M0 = 10g.

Dans une étude comparative réalisée par CHORFI (2022), le pourcentage de rendements de l'extrait brut de feuilles d'*Arbutus unedo* obtenu R= 6,9% est très faible par rapport à notre résultat. La masse de l'extrait brut utilisée est M=6,9g extraite à partir de 100g du matériel végétal sec initial, 10 fois la masse qu'on utilise dans notre étude.

Le rendement en extrait varie en fonction de différents facteurs comprenant la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée, de l'espèce et l'origine géographique de la plante, des conditions et de la durée de stockage ainsi que de la période de récolte (MOKDAD *et al.*, 2020).

### 2-Résultats de screening phytochimique des feuilles d'*Arbutus unedo*

L'analyse qualitative de la poudre de la partie aérienne de la plante étudiée est une étape importante puisqu'elle met en évidence la présence de certains constituants bioactives responsables de différentes activités biologiques. L'analyse a été faite par des réactions de colorations. Les résultats sont portés dans le tableau suivant ;

**Tableau VI:** Résultats de screening phytochimique effectué sur la poudre de feuilles d'*Arbutus unedo*.

Test	Résultat
Anthocyanes	–
Tanins	+
Tanins galliques	+
Flavonoïdes	+
Saponosides	–

Quinones libres	-
Glucosides	+
Coumarines	+
Stéroïdes	+

Signification des symboles : (+) présence ; (-) absence.

Les résultats montrent la présence des **tanins, tanins galliques, flavonoïdes, glucosides, coumarines et les stéroïdes**. Néanmoins, les autres composés sont quasiment absents.

Sur l'ensemble des résultats obtenus, nous remarquons que la poudre des feuilles d'*Arbutus unedo* est riche en composés phénoliques. Les tests phytochimiques réalisés nous ont permis d'avoir une idée générale sur la composition chimique de notre échantillon étudiés.



Dans une étude comparative réalisée par CHORFI (2022) sur les feuilles d'*Arbutus unedo*, les résultats ont montré l'absence des quinones libres dans la poudre de la plante tandis que les anthocyanines, saponosides sont présents contrairement à nos résultats.

MRABTI *et al.*, (2017) a évalué l'analyse phytochimique de feuilles d'*Arbutus unedo* récoltés au Maroc dans la région de Beni Mellal. Les résultats enregistrés ont montré une teneur en concentration enlevées des tanins et flavonoïdes bien que la présence de quinones libres, par contre le test de saponosides était négatif. Ces résultats sont similaires avec ceux de nos tests.

En effet, la composition chimique varie suivant diverses conditions de l'environnement climatique, la localisation, l'origine géographique et la période de récolte (SVOBODA et HAMPSON, 1999).

### 3-Détermination de la teneur en sucres

Tableau VII: Résultat de la teneur en sucres.

Sucres	Résultats	Indicateur	La quantité
Totaux		Apparition de la couleur marron cuivrée.	64,51g/100ml
Réducteurs		Apparition de la couleur rouge brique.	0,96g/100ml
Saccharoses	/	/	60,3725 g/l

Les résultats obtenus démontrent que la poudre des feuilles d'*Arbutus unedo* est riche en sucres totaux en particulier le saccharose.

Une étude comparative réalisé par LARBI (2018) sur les feuilles de *vigne muscat d'Alexandrie* a enregistré une faible quantité en sucres totaux ( $3,37 \pm 0,152$ ) g/l, et en saccharose ( $2,98 \pm 0,141$ g/l) contrairement à nos résultats, ainsi qu'une quantité plus élevé en sucres réducteurs ( $0,23 \pm 0,137$ ) g/l.

DOUKANI *et al* (2014) a réalisé une étude sur deux échantillons de fruit d'*Abutus unedo*, on remarque que les teneurs en sucres totaux de ces derniers sont de l'ordre de 8.89g/100mL et 14.01g/100mL respectivement, plus faibles que nos résultats, tandis que les teneurs en sucres réducteurs sont de l'ordre de ( $9.27\text{g}/100\text{g} \pm 1.881$ ) et ( $6.98\text{g}/100\text{g} \pm 1.024$ ) supérieures que ceux qu'on a enregistrées.

Ces variations peuvent être attribuées à plusieurs facteurs tels que l'âge de la plante, la charge de l'arbre, le stade de maturation, la région de récolte, l'état physiologique des feuilles lors de l'analyse.

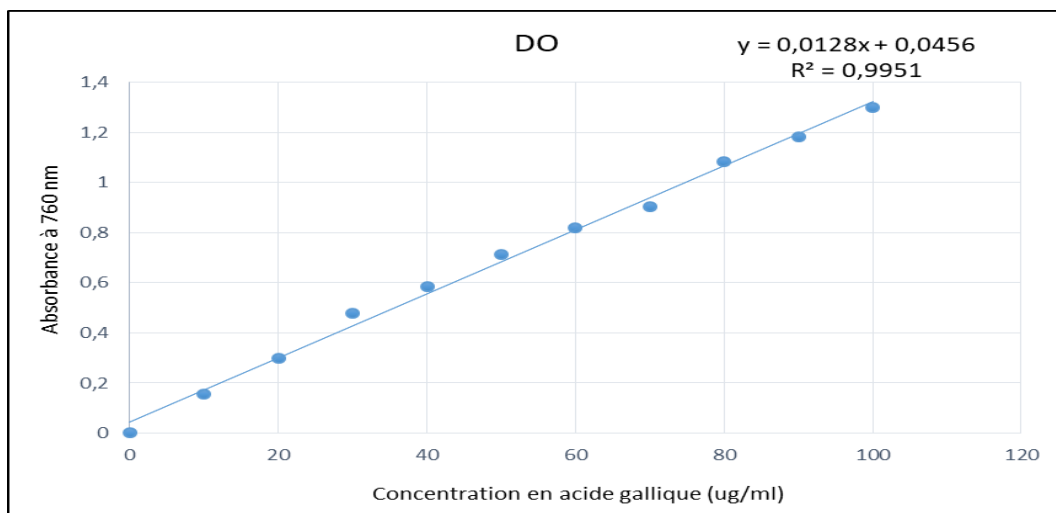
#### 4- Détermination de la teneur en polyphénols totaux

La détermination de la teneur en polyphénols totaux de l'extrait aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* a été effectuée suivant la méthode colorimétrique au réactif de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et ROSSI, 1965).

L'extrait brut obtenu par macération dans de l'eau distillée a subi une analyse quantitative par dosage spectrophotométrie de la teneur en polyphénols. Les résultats obtenus sont exprimés respectivement en équivalent acide gallique par gramme d'extrait.

L'apparition de la couleur bleue confirme la présence des polyphénols chez *Arbutus unedo*. La coloration obtenue varie selon la concentration l'extrait en composés phénoliques.

La Concentration en polyphénols de l'extrait a été calculée en utilisant l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage établie grâce à des concentrations précises d'acide gallique comme standard ( $y = 0,0128x + 0,0456$ ) et coefficient de corrélation :  $R^2 = 0,9951$ .



**Figure 28** : Courbe étalon de l'acide gallique.

Les résultats obtenus montrent que la teneur moyenne en polyphénols totaux de l'extrait aqueux d'*Arbutus unedo* est de  $49,79 \pm 0,88$  mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait.

D'après les résultats obtenus par MOUALEK *et al.*, (2018) et ORAK *et al.*, (2011) les teneurs moyennes en PPT de l'EA de feuilles d'*Arbutus Unedo* est respectivement de ( $207,84 \pm 15,03$  mg), ( $394,32 \pm 1,43$  mg) équivalent acide gallique par gramme d'extrait, plus importantes que celle que nous avons enregistrés.

MENDES (2011) a également déterminé le contenu phénolique total de l'EA de feuilles d'*A. unedo*. L'extrait a montré une teneur élevée en composés phénoliques = (170,3 ± 1,4 mg EAG/g) supérieure à notre résultat.

Dans une étude similaire réalisée par MRABTI (2017), l'EA de feuilles d'*A. unedo* (50g de poudre dans 500ml d'eau distillée) récoltées à Beni Mellal au Maroc a montré une teneur moyenne en PPT de 37,30 ± 0,19 mg EAG/g inférieure au résultat de notre travail.

La distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante. Ceci peut être lié aux conditions climatiques dures (la température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols (FALLEH *et al.*, 2008). En effet, les variations de valeurs obtenues pourraient s'expliquer par plusieurs facteurs tels que la nature du sol, la saison de récolte, le degré de maturité etc. (MOUALEK *et al.*, 2018).

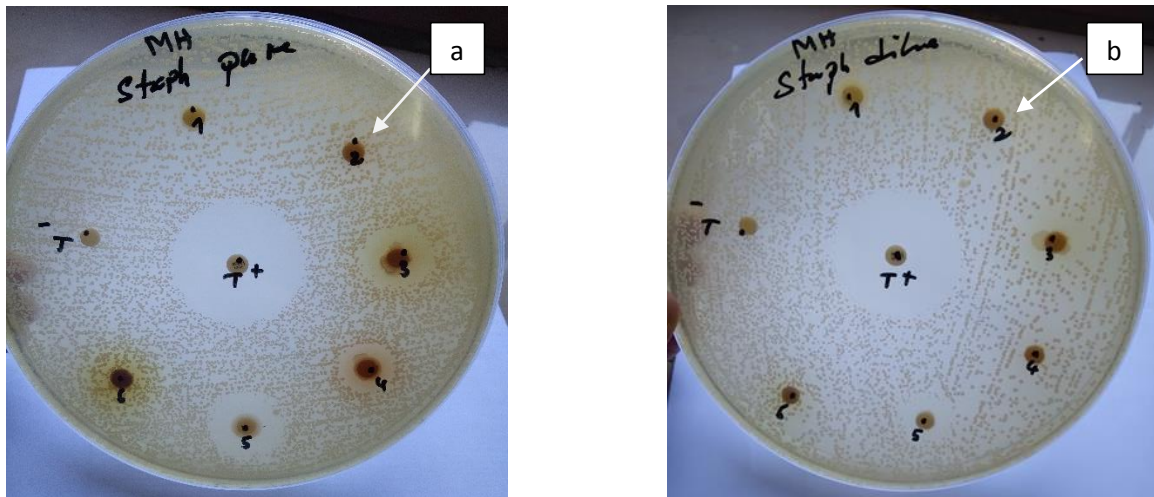
Plusieurs études ont montré l'effet du solvant d'extraction, sur la concentration des PPT dans les extraits des plantes.

Les extraits végétaux possèdent un large éventail d'activités biologiques, celles-ci sont étroitement liées à la teneur et à la composition en polyphénols (CABRAL *et al.*, 2012).

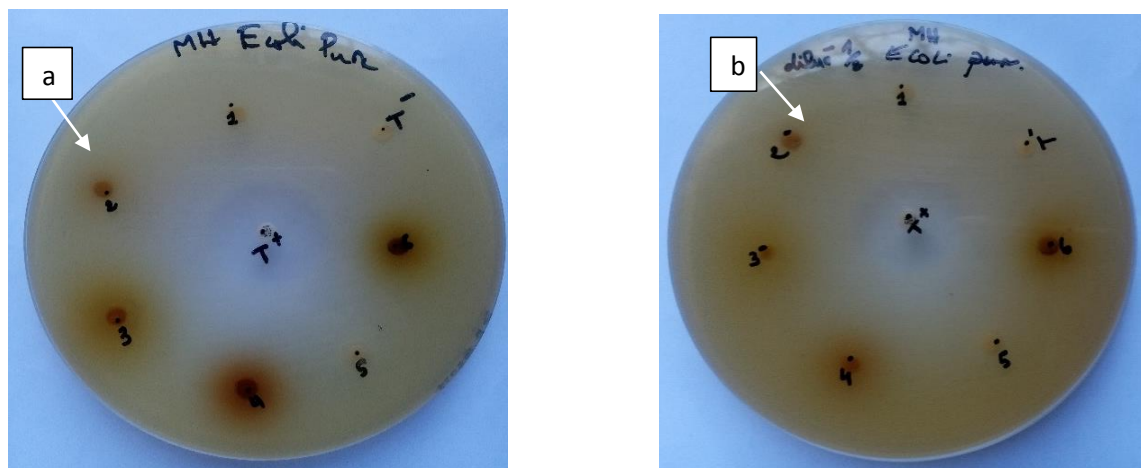
### 5-Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'extrait des feuilles d'*Arbutus unedo* a été testée par la méthode de diffusion sur gélose Muller Hinton (DIB *et al.*, 2013) vis-à-vis de deux souches bactériennes : une de Gram – (*E. coli*) et l'autre de Gram + (*S. aureus*).

L'effet antibactérien de l'extrait aqueux pur et dilué sur les deux souches bactériennes *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922 se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des disques. Les résultats sont exprimés par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition.



**Figure 29 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne de l'extrait pure (a) et dilué  $\frac{1}{2}$  (b) de feuilles d'*Arbutus unedo* vis-à-vis de la souche *S.aureus* (originale).



**Figure 30 :** Résultats du test de l'activité antibactérienne de l'extrait pure (a) et dilué  $\frac{1}{2}$  (b) de feuilles d'*Arbutus unedo* vis-à-vis de la souche bactérienne *E. coli* (originale).

**Tableau VIII:** Résultats des diamètres des zones d'inhibition

Souche	ATB (gentamicine) mm	EA pure (mm)	EA dilué $\frac{1}{2}$ (mm)	Sensibilité des souches
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	35	0	0	–
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	38	0	0	–

Signification des symboles : (+) sensible ;(-) résistante.

D'après les résultats présentés dans le tableau, l'extrait aqueux de feuilles de la plante étudiée aux deux concentrations ne présente aucune activité antibactérienne vis-à-vis de deux bactéries testées.

En effet, l'absence de zone d'inhibition pour l'extrait dans les boîtes ensemencées avec *E. coli* et *S.aureus* traduit leur résistance à l'extrait étudié.

L'apparition des zones d'inhibition autour des disques de la gentamicine d'un diamètre de 35mm pour *S.aureus* et 38mm pour *E. coli* indique une forte sensibilité de ces deux bactéries à cet antibiotique.

Une étude réalisée par KOUMARE et BOUGOUDOGO en (1993) sur la résistance aux antibiotiques de 2187 souches bactériennes isolées au Mali, a montré qu'aucune souche de *S. aureus* n'était résistante à la gentamicine, de plus la résistance de *E. coli* au même antibiotique était nulle.

Il existe dans la littérature peu d'études sur l'effet antibactérien de l'extrait aqueux de feuilles de la plante étudiée, ce qui rend difficile la comparaison de nos résultats

Une étude comparative effectuée par MOUALEK *et al.*, (2018) a évalué l'activité antibactérienne de l'EA de feuilles d'*Arbutus unedo* en suivant la méthode de diffusion en milieu solide décrite par FALLEH *et al.*, (2008), vis-à-vis de huit souches bactériennes dont *E.coli* ATCC 25922 et *S.aureus* ATCC 43300.

Les résultats obtenus ont montré que l'EA de feuilles d'arbousier présente une activité antibactérienne vis-à-vis de *S.aureus* avec un diamètre d'inhibition=  $17.3 \pm 0,6$  mm contrairement à notre résultat. Par contre aucun effet n'a été enregistré pour le même extrait vis-à-vis d'*E.coli*.

Une étude réalisée par MALHEIRO *et al.*, (2012), où ils ont testé l'effet des extraits aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* vis-à-vis de six souches bactériennes dont *S.aureus* et *E.coli*. Les résultats obtenus ont permis de calculer la CMI de l'extrait contre les deux souches :

CMI *S. aureus* = 2.5 mg/mL      Et      CMI *E. coli* ATCC 25922 = 5 mg/mL

La zone d'inhibition augmente considérablement en fonction de la charge du disque, ce qui a été constaté aussi par ORAK (2011) qui a évalué l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux des feuilles d'*Arbutus unedo* vis-à-vis de plusieurs souches dont *S.aureus* en utilisant

la méthode de diffusion en milieu solide. Une zone d'inhibition a été apparue avec un diamètre de :

10.5 mm (10 µL/disc), 13.8 mm (20 µL/disc), 21.1 mm (40 µL/disc).

La résistance des souches peut être attribuée à la capacité de l'agent antibactérien de diffusé uniformément dans l'agar (HAYOUNI *et al.*, 2007).

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne influe aussi les résultats (NATARAJAN *et al.*, 2005) et (FQZELI *et al.*, 2007) ont constaté que la méthode de diffusion à partir des puits sur gélose est plus adaptée pour étudier l'activité des extraits aqueux de l'*Euphorbia fusiformis* et Hydro-ethanoliques de *Rhus coriaria* et *Zataria multiflora* que la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Les bactéries Gram- offrent un système complexe de barrière aux biocides (DENYER et MAILLARD, 2002), elles possèdent une couche additionnelle la membrane externe, qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules.

Les bactéries à Gram+ tel que *S. aureus* possèdent une paroi cellulaire perméable qui ne limite généralement pas la pénétration des antimicrobiens. Cependant, une résistance due à une pénétration restreinte peut se produire (LAMBERT, 2002).

## **6-Evaluation de l'activité anti biofilm**

### **6-1-Evaluation de la formation de biofilm**

Pour détecter la production de biofilms plusieurs méthodes ont été établies, dont la méthode qualitative du Rouge Congo (FREEMAN *et al.*, 1989). Cette méthode a une faible précision, mais elle est peu coûteuse et facile à réaliser et le critère d'évaluation est basé sur une analyse visuelle de la couleur des colonies qui poussent sur la gélose, de couleurs rouges pour les souches non formatrices de biofilm et noir pour les souches formatrices de biofilm (KAISER *et al.*, 2013).



**Figure 31:** Résultat de la formation de biofilms par *E. coli* et *S.aureus* sur milieu RC.

Le criblage de la production de biofilms par la méthode Gélose RC a montré que la souche étudiée *S.aureus* est fortement formatrice de biofilms, ce résultat est exprimé par la formation de colonies noires avec un cristallin de consistance sèche sur gélose RC. Cet aspect est dû à la production des exo-polysaccharides(EPS) qui réagissent avec le RC. L'apparition des colonies rouge sur la boîte ensemencée par *E. coli* indique l'absence de biofilms, la souche est donc dite non formatrice de biofilms.

**Tableau IX:** Résultats de formation de biofilms

Souche	Formation de biofilms
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+

Signification des symboles : (+) formatrice ;(-) non formatrice.

Une étude comparative a été réalisée par REWATKAR et WADHER (2013) en suivant la méthode de FREEMAN *et al.*, 1989 par culture des isolats sur le milieu RCA. Les résultats ont révélé la présence de colonies noires pour la souche *S.aureus* qui indique la formation de biofilm.

Une étude comparative réalisée par TALBI (2021) en utilisant la technique de plaque de culture de tissu. La formation du biofilm est révélée par lecteur de l'intensité de la coloration du Crystal violet dans la microplaque. Les résultats démontrent que la souche *E.coli* est moyennement formatrice de biofilm contrairement à nos résultats.

Des études ont démontré que cette méthode a une faible précision (KAISER *et al.*, 2013). DEKA (2014), a comparé la formation de biofilm par deux techniques, dans la méthode en tube il y a eu 83% de souches formatrices de biofilm contre seulement 20% par la technique

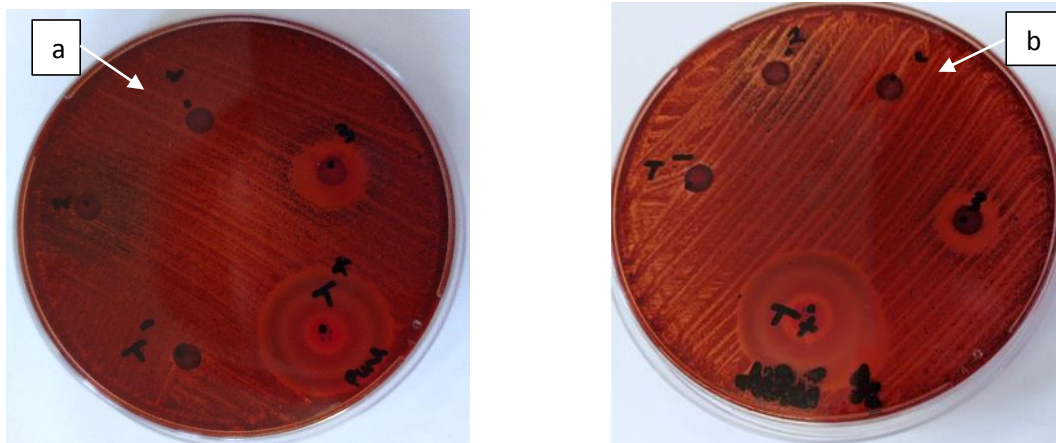
de RCA. MATHUR *et al.*, (2006) n'ont également pas trouvé les mêmes résultats entre la méthode en tube et la méthode de RC, contrairement à FREEMAN *et al.*, (1989).

Les structures de surface cellulaire telles que les fimbriae, d'autres protéines, le LPS, l'EPS et les flagelles jouent clairement un rôle important dans le processus d'attachement aux surfaces et formation de biofilms (DONLAN, 2002).

### 6-2-Evaluation de l'activité anti biofilm de l'extrait aqueux de la plante étudiée

L'activité anti biofilm de l'extrait des feuilles d'*Arbutus unedo* a été testée par la méthode de diffusion sur gélose Rouge Congo vis-à-vis d'une souche bactérienne de *S.aureus*.

L'effet anti biofilm de l'extrait aqueux pure et dilué vis-à-vis de la souche bactérienne *S.aureus* ATCC 25923 se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour de disque. Cette dernière est donc mesurée et les résultats sont exprimés en mm.



**Figure 32:** Résultat du test de l'activité anti biofilm de l'extrait pure (a) et dilué (b) de feuilles d'*Arbutus unedo* vis-à-vis de la souche bactérienne *S.aureus* (originale)

**Tableau X:** Résultats des diamètres des zones d'inhibition.

Souche	ATB (gentamicine) mm	EA pure (mm)	EA dilué 1/2 (mm)	Sensibilité de la souche
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	28	6	6	+

Signification des symboles : (+) sensible ;(-) résistante.

D'après les résultats exprimés dans le tableau nous remarquons que l'EA de feuilles d'*Arbutus unedo* aux deux concentrations a exercé une faible activité anti biofilm contre *staphylococcus aureus*.

De plus, l'apparition d'une zone d'inhibition autour de disque de la gentamicine d'un diamètre de 28mm pour *S. aureus* indique la sensibilité de cette dernière à l'ATB.

Il existe dans la littérature peu d'études sur l'effet anti biofilm de l'extrait aqueux de feuilles de la plante étudiée, ce qui rend difficile de comparer nos résultats.

L'effet anti biofilm de l'extrait est dû à la teneur de ce dernier en composés phénoliques en particulier les tanins. Une étude de DONG *et al.*, (2018) a évalué l'effet inhibiteur sur la formation de biofilm de l'acide tannique contre *Staphylococcus aureus*. Les résultats ont montré que l'acide tannique pourrait réduire la formation de biofilm par la destruction de l'intégrité de la paroi cellulaire.

KIM *et al.*, 2016 a rapporté que les extraits de plantes médicinales de *Cocculus trilobus* et *Coptis chinensis* pourraient bloquer l'adhérence des bactéries Gram+ aux surfaces recouvertes de fibronectine.

Des recherches récentes sur les feuilles de *Cotinus coggygria* riches en gallotanins tels que l'acide gallique et le gallate de méthyle, ont montré une bonne activité contre *S. aureus* dans les formes de croissance planctonique et de biofilm (SLOBODNÍKOVÁ *et al.*, (2016). L'extrait de méthanol à 60 % a montré une activité bactéricide contre toutes les souches de *S. aureus* testées, y compris les souches poly résistantes, et a éradiqué les bactéries dans le biofilm de 24h déjà établi (RENDEKOVÁ *et al.*, 2016).

Les effets inhibiteurs augmentent considérablement avec la concentration des extraits et la charge des disques. Ainsi, l'activité d'un extrait peut être le résultat de constituants actifs mais en faibles proportions (ATHAMENA, 2009). Le faible effet anti biofilm de l'extrait peut-être également attribué à la capacité de ce dernier de diffuser dans le milieu.

L'inhibition de la formation de biofilm sur les surfaces recouvertes de produits végétaux peut être importante dans les futures techniques qui préviennent les infections associées au biofilm des dispositifs médicaux. Une telle activité a été décrite dans plusieurs études sur l'activité anti biofilm des polyphénols végétaux (SLOBODNÍKOVÁ *et al.*, 2016).

*Conclusion*

Certaines plantes médicinales peuvent être bénéfiques pour la santé humaine en vue de leur richesse en substances naturelles bioactives responsables de plusieurs propriétés thérapeutiques et pharmacologiques particulière. L'objectif assigné à cette étude a été d'évaluer l'activité antibactérienne et anti biofilm de feuilles d'arbousier collectées dans la région de Tizi-Ouzou ainsi leur composantes phytochimiques.

Dans un premier temps nous avons réalisé une analyse qualitative des feuilles d'arbousier par des tests basé sur des réaction de précipitation et / ou de coloration qui permettent la révélation des métabolites secondaires, les résultats ont montré la présence des molécules bioactives à savoir les tannins, les tannins galliques, les glucosides et les stéroïdes, les coumarines, les quinones libres et l'absence d'autres molécules dont les flavonoïdes et les saponosides dans la poudre des feuilles d'*Arbutus unedo*. Ces biomolécules jouent un rôle essentiel pour la survie de la plante.

Dans un deuxième temps nous avons quantifié la totalité des polyphénols par la méthode de Folin- Ciocalteu, notre résultat montre que l'extrait aqueux présente une teneur élevée en polyphénols de  $49,79 \pm 0,88$  mg EAG/g MS.

D'autre part les résultats de dosage de sucres montrent la présence de sucres totaux et saccharose en quantité élevée de 64,51(g/l) et 60,3725(g/l) respectivement, ainsi que la présence des sucres réducteurs en très faible quantité 0,96(g/l) dans l'extrait des feuilles d'*Arbutus unedo*.

L'évaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur disques sur milieu gélosé Mueller Hinton effectuée contre deux souches bactériennes *S. aureus* et *E. coli* n'a montré aucun effet antibactérien vis-à-vis les deux souches.

L'évaluation de l'activité anti biofilm par diffusion sur milieu gélosé Rouge Congo, effectuée sur les mêmes souches a montré que *S. aureus* qui est une souche formatrice de biofilms, contrairement à *E. coli* ainsi que l'extrait aqueux présente une zone d'inhibition d'un diamètre de 6mm vis-à-vis *S. aureus*, donc l'extrait a exercé une faible activité anti biofilm vis-à-vis de la souche.

L'ensemble de ces résultats justifient l'utilisation traditionnelle de l'arbousier et démontrent son potentiel comme source de biomolécules aux multiples applications thérapeutiques. L'exploitation des extraits de cette plante pour la recherche de molécules à activité antibactérienne et anti biofilm semble donc être une voie intéressante.

Notre travail reste préliminaire et mérite d'être complété par ;

- L'étude de la toxicité de l'extrait brut.
- La détermination de la concentration minimale inhibitrice et élargir le test sur d'autres microorganismes pathogènes.
- L'étude de l'effet antioxydant, antivirale, antipaludique et anti-inflammatoire.
- L'étude de la partie racinaire, fleurs et fruits de cette plante.
- Réalisation des études sur les huiles essentielles de cette plante.

*Références*

*Bibliographiques*

### A)

- **Abaza, Rachid, & Yacine Sedrati.** "Qualité microbiologique des aliments prêts-à-manger utilisés en restauration collective." (2018).
- **Abbayes, H., clautres, G., Corillion, R. & Dupont, P.** (1971). Flore et végétation du Massif Armoricaïn, Tome 1. Presses Universitaires de Bretagne, Saint-Bleuc. 1226 p.
- **Afkir, S., Nguielefack, T. B., Aziz, M., Zoheir, J., Cuisinaud, G., Bnouham, M., ... & Ziyat, A.** (2008). Arbutus unedo prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats: Part I: Cardiovascular and renal hemodynamic effects of Arbutus unedo in L-NAME-induced hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(2), 288-295.
- **Ait-youssef M.** (2006). Les plantes médicinales en kabylie. Ed: Ibis press, Paris.349p
- **A. Khelfallah.** (2013). Etude comparative du contenu phénolique et du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales et des céréales alimentaires. Mémoire de Magister. Université Constantine 1.
- **Alarcão-E-Silva, M. L. C. M. M., Leitão, A. E. B., Azinheira, H. G., & Leitão, M. C. A.** (2001). The Arbutus Berry: Studies on its color and chemical characteristics at two mature stages. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14(1), 27-35.
- **Alibert, G.** (1977). Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques.
- **Ali-Delille, L.** (2013). Les plantes médicinales d'Algérie. 3ème Édition, BERTI, 239 p.
- **Alkur, A., Hamed, T. R. & Al-Sayyed, H.,** (2008).Tannin contents of selected plants used in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 4, 265 – 274.
- **Alnnasouri, M.** (2010). *Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau* (Doctoral dissertation, Éditeur inconnu).
- **Anonyme** (2004) L'ambrosie voyage en sac ... de tournesol. La Garance Voyageuse, 65 p.47.
- **Aruoma, O. I., Spencer, J. P. E., Rossi, R., Aeschbach, R., Khan, A., Mahmood, N., ... & Halliwell, B.** (1996). An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and Provençal herbs. *Food and Chemical Toxicology*, 34(5), 449-456.

- **Athamena, S.** (2009). Etude quantitative des flavonoïdes des graines de *Cuminum cyminum* et les feuilles de *Rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique (Doctoral dissertation, Université de Batna 2).
- **Ayaz, F. A., Kucukislamoglu, M., & Reunanen, M.** (2000). Sugar, non-volatile and phenolic acids composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L. var. *ellipsoidea*) fruits. *Journal of food Composition and Analysis*, 13(2), 171-177.

### B)

- **Bahaz, M., & Rachdi, H.** (2010). Quantification des principes actifs (Les composés phénoliques) de *Rhinolepis Lonadoides* Coss (Tichert). *Mémoire de fin d'étude d'ingénieur (université d'Ouargla)*.
- **Bahorun, T.** (1997). Substances Naturelles actives: La flore Mauricienne, Une Source d'Approvisionnement Potentielle. *Food and Agricultural Research*, 83-94.
- **Barton, G M.**, 2008. A calculated response: control of inflammation by the innate immune System. *J Clin Invest*, 118(5),413-420.
- **Bellakhdar, J.** (1997). La Pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine Arabe ancienne et savoirs populaires. Edition Ibis Press, Paris, 766 p.
- **Beloued A.** (2001). Plantes médicinales d'Algérie. Office des Publications Universitaires, alger.277p.
- **Benyahia A.** (2014). Contribution à l'étude phytochimique et activité biologiques de deux plantes médicinales *Inula viscosa* et *Inula montana*. Mémoire de Master. Université Aboubekr Belkaid. Tlemcen. Algérie.
- **Bierhaus, A., Ilmer, T., Kasper, M., Luther, T., Quehenberger, P., TRITSCHLER, H., WAHL, P., ZIEGLER, R., MÜLLER, M. & NAWROTH, P.P.** (1997). Le produit final de glycation avancée (AGE) - Induction Médie du facteur tissulaire dans les cellules endothéliales cultivées dépend du RAGE, 965(8), 2262-2271.
- **Billing, J., & Sherman, P. W.** (1998). Antimicrobial functions of spices: why some like it hot. *The Quarterly review of biology*, 73(1), 3-49.
- **Bizouard, P., & Favier, J. C.** (1992). Contribution à l'étude de la valeur nutritive de quelques plantes naturellement abondantes en Corse. *Corse Historique*, 8, 1-14.

- **Bla, K. B., Trebissou, J. N. D., Bidie, A. P., Assi, Y. J., Zihiri-Guede, N., & Djaman, A. J.** (2015). Étude ethnopharmacologique des plantes antipaludiques utilisées chez les Baoulé-N'Gban de Toumodi dans le Centre de la Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, 85, 7775-7783.
- **Boudet, A. M.** (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2722-2735.
- **Boullard B.** (2001). Plantes médicinales du monde Croyance et réalités. Ed ESTM. Paris ,636p.
- **Bossard R. & CUISANCE P.** (1984). Arbres et arbusres d'ornement des regions tempérées et méditerranéennes. Ed : Tec & Doc Lavoisier.458p.
- **Brianceau S.** (2015). Vers une amélioration quantitative et qualitative de l'extraction des composés phénoliques du marc de raisin rouge à l'aide d'électrotechnologies. Th. Doc. Université de technologie Compiègne. France.
- **Brosse J. & PELT J.M.** (2000).Larousse des arbres. Ed Larousse. Paris.576p.
- **Bouziid, K.** (2015). Contribution à l'étude des options de valorisation de l'espèce *Arbutus unedo* L. dans l'Ouest Algérien. Thèse de Doctorat 3ème Cycle en Science de l'Environnement, option : Gestion, Valorisation des Ressources Naturelles et Développement Durable. Université Djillali Liabés, Sidi Bel-Abbés, Algérie, 168 p.

### C)

- **Cabral, I. S. R., Oldoni, T. L. C., Alencar, S. M. D., Rosalen, P. L., & Ikegaki, M.** (2012). The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48, 557-564.
- **Carcache-Blanco, E. J., Cuendet, M., Park, E. J., Su §, B. N., Rivero-Cruz, J. F., Farnsworth, N. R., ... & Douglas Kinghorn §, A.** (2006). Potential cancer chemopreventive agents from *Arbutus unedo*. *Natural product research*, 20(04), 327-334.
- **Casarin E., Dall'acqua S., Smejkal K., Šlapetova T., Innocenti, G. & Carrara M.** (2014). Molecular mechanisms of antiproliferative effects induced by Schisandra-derived dibenzocyclooctadiene lignans deoxyschisandrin and gomisin N in human tumour cell lines. *Fitoterapia*, 241–247.

- **Celikel, G., Demirsoy, L., & Demirsoy, H.** (2008). The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey. *Scientia Horticulturae*, 118(2), 115-119.
- **Characklis, W.G. and Cooksey, K.C.** 1983. Biofilm and microbial fouling. *Adv. Appl. Microbiol.* 29, 93-139.
- **Chalvet et Rochemonteix A.** (2009). Les biofilms et la peau. Doctoral dissertation, École vétérinaire de Maisons-Alfort.
- **Chira, K., Suh, J. H., Saucier, C., & Teissèdre, P. L.** (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6(2), 75-82.
- **Christensen, B. E., Trønnes, H. N., Vollan, K., Smidsrød, O., & Bakke, R.** (1990). Biofilm removal by low concentrations of hydrogen peroxide. *Biofouling*, 2(2), 165-175.
- **Chorfi, Z. E.** (2022). *Etude de l'activité biologique et inhibitrice de la corrosion d'une plante «Arbutus unedo»* (Doctoral dissertation, Université Larbi Tébessi-Tébessa).
- **Comte, S., Guibaud, G., & Baudu, M.** (2007). Effect of extraction method on EPS from activated sludge: an HPSEC investigation. *Journal of hazardous materials*, 140(1-2), 129-137.
- **Cornara, L., La rocca, A., Marsili, S. & Mariotti, M.G.** (2009). Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). *Journal of Ethnopharmacol.* 125(1), 0–30.
- **Costerton J.W.** 1999. Introduction to biofilm. *Inter J Antimicrobial Agents.* 11, pp 217-721.
- **Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G.** (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.
- **Cowan, M.M.** (1999). Plant products as anti-microbial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.

### D)

- **Daglia, M.** (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 174-181.
- **Degenhardt, J., Köllner, T. G., & Gershenzon, J.** (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 70(15-16), 1621-1637.
- **Delille L.** (2007) .les plantes médicinales d'Algérie. Édition BERTI, 148p.
- **Delille L.** (2013). Les plantes médicinales d'Algérie ; 3ème Ed ; Edition BERTI.240p.

- **De Mejia, E.G., Song, Y.S., Heck, C.I., & Ramirez-Mares, M.V.** (2010). Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*) : Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. *Journal of Functional Foods*, 2(1), 23-34.
- **Denyer, S. P., & Maillard, J. Y.** (2002). Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram- negative bacteria. *Journal of applied microbiology*, 92(s1), 35S-45S.
- **Dib, M. E. A., Allali, H., Bendiabdellah, A., Meliani, N., & 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 flavonoids de l'Arbutus unedo L. et du Daphne gnidium L. de la region de Tlemcen, Mémoire pour l'Obtention de Diplôme de Magister, Université Aboubekr Belkaïde-Tlemcen.
- **Dixon, R. A., Xie, D. Y., & Sharma, S. B.** (2005). Proanthocyanidins—a final frontier in flavonoid research?. *New phytologist*, 165(1), 9-28.
- **Djerdane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Vidal, N., Lesgards, JF., & Stocker, P.** (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compound and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 224, 801-809.
- **Dong, G., Liu, H., Yu, X., Zhang, X., Lu, H., Zhou, T., & Cao, J.** (2018). Antimicrobial and anti-biofilm activity of tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Natural product research*, 32(18), 2225-2228.
- **Donlan, R. M.** (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881.
- **Doukani, K., & Tabak, S.** (2015). Profil Physicochimique du fruit " Lendj"(*Arbutus unedo* L.). *Nature & Technology*, (12), 51.
- **Doukain, K., & Tabak, S.** (2014). Profil Physicochimique du Fruit « Lenj » (*Arbutus unedo* L.). *Nature & Technology*, 7(1), 51-64.
- **DuBois, G. E., Crosby, G. A., & Saffron, P.** (1977). Nonnutritive sweeteners: taste-structure relationships for some new simple dihydrochalcones. *Science*, 195(4276), 397-399.

### E)

- **El Haouari, M., López, J. J., Mekhfi, H., Rosado, J. A., & Salido, G. M.** (2007). Antiaggregant effects of *Arbutus unedo* extracts in human platelets. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(2), 325-331.
- **El-Hilaly, J., Hmammouchi, M., & Lyoussi, B.** (2003). Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). *Journal of Ethnopharmacology*, 86(2-3), 0–158.
- **Elqaj, M., Ahami, A., & Belghyti, D.** (2007). La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. *Journée scientifique" ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.*

### F)

- **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C.** (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes rendus biologies*, 331(5), 372-379.
- **Fazeli, M. R., Amin, G., Attari, M. M. A., Ashtiani, H., Jamalifar, H., & Samadi, N.** (2007). Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food control*, 18(6), 646-649.
- **Fonseca, D. F., Salvador, Â. C., Santos, S. A., Vilela, C., Freire, C. S., Silvestre, A. J., & Rocha, S. M.** (2015). Bioactive phytochemicals from wild *Arbutus unedo* L. berries from different locations in Portugal: Quantification of lipophilic components. *International journal of molecular sciences*, 16(6), 14194-14209.
- **Ferard P.** (2003). La nature est une source d'inspiration importante dans la pratique photographique. Thème : Végétal, N° 1256 :1-2.
- **Ferreira, S., Santos, J., Duarte, A., Duarte, A. P., Queiroz, J. A., & Domingues, F. C.** (2012). Screening of antimicrobial activity of *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* extracts. *Natural product research*, 26(16), 1558-1560.
- **Fiorentino, A., Castaldi, S., D'Abrosca, B., Natale, A., Carfora, A., Messere, A., & Monaco, P.** (2007). Polyphenols from the hydroalcoholic extract of *Arbutus unedo* living in a monospecific Mediterranean woodland. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(11), 809.

- **Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., & Macheix, J. J.** (2005). Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes*, 121, 216.
- **Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T.** (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of clinical pathology*, 42(8), 872-874.

### G)

- **Guignard J.L.** (2001). Botanique systématique moléculaire. Ed: Masson. Paris.290 p
- **Guignard, J. L.** (1996). *Biochimie végétale : Jean-Louis Guignard*. Masson.
- **Gurib-Fakim, A.** (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine*, 27(1), 1-93.

### H)

- **Hadacek, F.** (2002). Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(4), 273-322.
- **Hadim Katia & Ben Aissou Chabha**, 2018, Effet de traitement thermique sur l'activité antioxydante, anti inflammatoire et antimicrobienne de l'extrait aqueux d'Arbutus unedo L,
- **Halliwell, B.** (1994). Free Radicals and Antioxydants : a Personal View. *Nutrition Reviews*, 52(8), 253-265.
- **Hamitouche, O., & Zabchi, R.** (2016). *Évaluation de l'influence de la température de séchage sur l'activité antioxydante et antibactérienne des feuilles d'arbutus unedo L* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- **Hans, W. K.** (2007). 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition, 6-7p.
- **Harborne, J. B.** (1967). Comparative biochemistry of the flavonoids-VI: Flavonoid patterns in the bignoniaceae and the gesneriaceae. *Phytochemistry*, 6(12), 1643-1651.
- **Hartmann, T.** (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2831-2846.
- **Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M., & Hamdi, M.** (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian Quercus coccifera L. and Juniperus phoenicea L. fruit extracts. *Food chemistry*, 105(3), 1126-1134.

- **Heinonen, M.** (2007). Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics—a Finnish perspective. *Molecular nutrition & food research*, 51(6), 684-691.
- **Hemingway, R. W., Ohara, S., Steynberg, J. P., Brandt, E. V., & Ferreira, D.** (1992). CH Hetcor NMR studies of proanthocyanidins and their derivatives. *Plant polyphenols: synthesis, properties, significance*, 321-337.
- **Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F.** (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3-6
- **Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F.** (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2, 3-6.
- **Hou, W., Sun, X., Wang, Z., & Zhang, Y.** (2012). Biofilm-forming capacity of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* from ocular infections. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(9), 5624-5631.
- **Huang, G., Jiang, J. & Dai, D.** (2008). Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of *Artemisia anomala* S. Moore. *African Journal of Biotechnol.* 7 (9), 1335-1338.
- **Humphrey, B. A., Dickson, M. R., & Marshall, K. C.** (1979). Physicochemical and in situ observations on the adhesion of gliding bacteria to surfaces. *Archives of Microbiology*, 120, 231-238.

### I)

- **Ichai, C., Quintard, H., Orban, J. C., VINCENT, J. L., & MARTIN, C.** (2011). *Désordres métaboliques et réanimation : de la physiopathologie au traitement* (pp. 427-428). Springer-Verlag France.
- **Iserin, P.** (2001). *Encyclopédie des Plantes Médicinales. Identification, préparations, soins.* 2ème Édition, Larousse, Dorling Kindersiety Limited, Londres, 170 p.
- **Ito, C., Itoigawa, M., Onoda, S., Hosokawa, A., Ruabgrungsi, N., Okuda, T., Tokuda, H., Nishino, H., & Furukawa, H.** (2005). Chemical constituents of *Murraya siamensis* : three coumarins and their anti- tumor promoting effect. *Phytochemistry*, 66(5), 567 -572.

- **Iwueke, A. V., & Nwodo, O. F. C.** (2008). Antihyperglycaemic effect of aqueous extract of *Daniella oliveri* and *Sarcocephalus latifolius* roots on key carbohydrate metabolic enzymes and glycogen in experimental diabetes. *Biokemistri*, 20(2).

### J)

- **Jouad, H., Haloui, M., Rhiouani, H., El Hilaly, J. & Eddouks, M.** (2001). Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). *Journal of Ethnopharmacology*, 77(2-3), 0–182
- **JÜRGEN, R., PAUL, S., ULRIKE, S., & REINHARD, S.** (2009). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties— an Overview: *ForschKomplementmed*.16 (2), 79–90.

### K)

- **Kachkoul, R., Housseini, T. S., Mohim, M., El Habbani, R., Miyah, Y., & Lahrichi, A.** (2019). Chemical compounds as well as antioxidant and litholytic activities of *Arbutus unedo* L. leaves against calcium oxalate stones. *Journal of integrative medicine*, 17(6), 430-437.
- **Kaiser, T. D. L., Pereira, E. M., Dos Santos, K. R. N., Maciel, E. L. N., Schuenck, R. P., & Nunes, A. P. F.** (2013). Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 75(3), 235-239.
- **Kampranis, S. C., Ioannidis, D., Purvis, A., Mahrez, W., Ninga, E., Katerelos, N. A., & Johnson, C. B.** (2007). Rational conversion of substrate and product specificity in a *Salvia* monoterpene synthase: structural insights into the evolution of terpene synthase function. *The Plant Cell*, 19(6), 1994-2005.
- **Karikas, G. A., Euerby, M. R., & Waigh, R. D.** (1987). Constituents of the stems of *Arbutus unedo*. *Planta medica*, 53(02), 223-224.
- **Khadhri, A., ELMOKNI, R., & SMITI, S.** (2013). Composés phénoliques et activités antioxydantes de deux extraits de chardon à glu: *Atractylis gummifera*. *Revue Soc. Sci. Nat de Tunisie*, 39, 44-52.

- **Kim, T.L.** *Arbutus unedo*. In *Edible Medicinal and Noin-Medicinal Plants*; Springer: Dordrecht, The Netherlands; Heidelberg, Germany; London, UK; New York, NY, USA, 2012; Volume 2, pp. 444–451.
- **Kim, Y., Keogh J.B., & Clifton, P.M.** (2016). Polyphenols and Glycemic Control. *Nutrients*, 8, 17.
- **Kosalec, I., Pepeljnjak, S., Bakmaz, M., & Vladimir-Knežević, S. A. N. D. A.** (2005). Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharmaceutica*, 55(4), 423-430.
- **Kouider, H. A. D. J. A. D. J., Mohammed, B., Mohammed, M., Abdelkader, O., & Abdelkarim, R. A. H. M. O. U. N. E.** (2019). Importance des plantes médicinales pour la population rurale du parc national de Djebel Aissa (Sud ouest algérien). *Lejeunia, Revue de Botanique*.
- **Koumare, B., & Bougoudogo, F.** (1993). Résistance aux antibiotiques de 2187 souches bactériennes isolées au Mali entre 1980 et 1991. *Médecine et maladies infectieuses*, 23(5), 367-369.
- **Kravchenko, L.V., Morozov, S.V., & Tutel 'yan, V.A.** (2003). Effects of Flavonoids on the Resistance of Microsomes to Lipid Peroxidation In Vitro and Ex Vivo. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 136(6), 572-575.
- **Krüssmann G** (1982) *Roses*. B. T. Batsford, London.
- **Kumar, U., Kumar, B., Bhandari, A., & Kumar, Y.** (2010). Phytochemical investigation and comparison of antimicrobial screening of clove and cardamom. *Int J Pharm Sci Res*, 1(12), 138-147.

### L)

- **Lambert, P. A.** (2002). Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram- positive bacteria and mycobacteria. *Journal of applied microbiology*, 92(s1), 46S-54S.
- **Lango-Yaya et al., J. Appl. Biosci.** 2020 Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques des écorces de racines de *Paullinia pinnata* et des feuilles de *Petaclethra macrophylla*.
- **Larbi, D., & Amrous, S.** (2018). *Extraction et caractérisation des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de vigne muscat d'Alexandrie* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).

- **Lau, Helen Y., Gary B. Huffnagle, and Thomas A. Moore.** "Host and microbiota factors that control *Klebsiella pneumoniae* mucosal colonization in mice." *Microbes and infection* 10.12-13 (2008): 1283-1290.
- **Lazli, A., Beldi, M., Ghouri, L., & Nouri, N. E. H.** (2019). Étude ethnobotanique et inventaire des plantes médicinales dans la région de Bougous (Parc National d'El Kala, - Nord-est algérien). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*.
- **Leonti, M., Casu, L., Sanna, F., & Bonsignore, L.** (2009). A comparison of medicinal plant use in Sardinia and Sicily—De Materia Medica revisited?. *Journal of ethnopharmacology*, 121(2), 255-267.
- **Lhuillier, A.** (2007). *Contribution à l'étude phyt\ (Monimiaceae) et Embelia concinna Baker (Myrsinaceae)* (Doctoral dissertation).
- **Li, H. B., Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F., & Jiang, Y.** (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*, 102(3), 771-776.
- **Li, H. B., Wong, C. C., Cheng, K. W., & Chen, F.** (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Science and Technology*, 41(3), 385-390.

### M)

- **Maberley, D. J.** (1987). *The Plant-book: A portable dictionary of the higher plants*.
- **Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C.** (2005). *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR presses polytechniques.
- **MAHAMAT, O. O., Tidjani, A., Savadogo, A., MAHAMAT, A. A., Somda, M. K., & Traore, A. S.** (2013). Isolement et caractérisation des bactéries productrices des biofilms issues des produits alimentaires. *Review of Industrial Microbiology Sanitary and Environmental*, 7(2), 187-210.
- **Maleš, Ž. Plazibat, M., Bilušić Vundać, V., & Žuntar, I.** (2006). Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree-*Arbutus unedo* L.(Ericaceae). *Acta pharmaceutica*, 56(2), 245-250.
- **Malgras, D.** (1992). Arbres et arbustes guérisseurs des savanes maliennes.

- **Malheiro, R., Sá, O., Pereira, E., Aguiar, C., Baptista, P., & Pereira, J. A.** (2012). Arbutus unedo L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 473-478.
- **Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L.** (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
- **Mariotto, S., Ciampa, A. R., de Prati, A. C., Darra, E., Vincenzi, S., Segal, M., ... & Suzuki, H.** (2008). Aqueous extract of Arbutus unedo inhibits STAT1 activation in human breast cancer cell line MDA-MB-231 and human fibroblasts through SHP2 activation. *Medicinal Chemistry*, 4(3), 219-228.
- **Mariotto, S., Esposito, E., Di Paola, R., Ciampa, A., Mazzon, E., de Prati, A. C., ... & Cuzzocrea, S.** (2008). Protective effect of Arbutus unedo aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. *Pharmacological research*, 57(2), 110-124.
- **Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D. J., Fatma, T., & Rattan, A.** (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian journal of medical microbiology*, 24(1), 25-29.
- **Mazari, K., Bendimerad, N., Bekhechi, C., & Fernandez, X.** (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian Juniperus phoenicea L. and Cupressus sempervirens L. *J Med Plants Res*, 4(10), 959-964.
- **Mekhfi, H., ElHaouari, M., Bnouham, M., Aziz, M., Ziyat, A., & Legssyer, A.** (2006). Effects of extracts and tannins from Arbutus unedo leaves on rat platelet aggregation. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(2), 135-139.
- **Mendes, L., de Freitas, V., Baptista, P., & 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., & Antunes, M. D.** (2014). Arbutus unedo L.: chemical and biological properties. *Molecules*, 19(10), 15799-15823.
- **Mokdad, O. S., & Zadi, S.** (2020). Extraction par solvant assistée par ultrasons des saponines à partir des rhizomes de Carduncelle bleue «Carthamus caeruleus L.».

- **Morand, C., & Milenkovic, D.** (2014). Polyphénols et santé vasculaire: mise en évidence du rôle direct des polyphénols dans les effets bénéfiques des agrumes dans la protection vasculaire. *Carrefours de l'Innovation Agronomique CIAG: Phytomicronutriments de la plante au consommateur.*(42) 2014; *Carrefours de l'Innovation Agronomique CIAG: Phytomicronutriments de la plante au consommateur*, Avignon, FRA, 2014-12-16-2014-12-16, 11-26.
- **Morgado, S., Morgado, M., Plácido, A. I., Roque, F., & Duarte, A. P.** (2018). Arbutus unedo L.: From traditional medicine to potential uses in modern pharmacotherapy. *Journal of ethnopharmacology*, 225, 90-102.
- **Moualek, I.** (2018). *Activités biologiques de l'extrait aqueux de feuilles d'Arbutus unedo de la région de Tizi-Ouzou* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- **Mrabti, H. N., Bouyahya, A., Ed-Dra, A., Kachmar, M. R., Mrabti, N. N., Benali, T., ... & Faouzi, M. E. A.** (2021). Polyphenolic profile and biological properties of Arbutus unedo root extracts. *European Journal of Integrative Medicine*, 42, 101266.
- **Mrabti, H. N., Marmouzi, I., Sayah, K., Chemlal, L., El Ouali, Y., Elmsellem, H., ... & Faouzi, M. A.** (2017). Arbutus unedo L aqueous extract is associated with in vitro and in vivo antioxidant activity. *J. Mater. Environ. Sci*, 8(1), 217-224.
- **Muanda, F. N.** (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. *Université Paul Verlaine-Metz*, 238.
- **Muylaert, A., & Mainil, J.** (2013). Résistance bactériennes aux antibiotiques, les mécanismes et leur " contagiosité". In *Annales de Médecine vétérinaire* (Vol. 156). ULg-Université de Liège, Liège, Belgium.

## N)

- **N'guessan, K., Tra, B., & Koné, M. W.** (2009). Étude ethnopharmacologique des plantes antipaludiques utilisées en médecine traditionnelle chez les Abbey et Krobou d'Agboville (Côte-d'Ivoire). *Ethnopharmacologia*, 44, 42-50.
- **Natarajan, D., Britto, S. J., Srinivasan, K., Nagamurugan, N., Mohanasundari, C., & Perumal, G.** (2005). Anti-bacterial activity of Euphorbia fusiformis—A rare medicinal herb. *Journal of ethnopharmacology*, 102(1), 123-126.
- **Nathan, C.** 2002. Points of control in inflammation. *Nature*, 420(8), 846-852.

- **Newman, D. J., & Cragg, G. M.** (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75(3), 311-335.
- **Nielsen, P. H., Jahn, A., & Palmgren, R.** (1997). Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Water Science and Technology*, 36(1), 11-19.
- **Nitsch, J. P., & Nitsch, C.** (1961). Synergistes naturels des auxines et des gibberelines. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 108(9), 349-362.

### O)

- **Okamura, H., Mimura, A., Yakou, Y., Niwano, M., & Takahara, Y.** (1993). Antioxydant Activity of Tannins and Flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry*, 33, 557-561.
- **Oliveira, I.; Baptista, P.; Bento, A.; Pereira, J.A.** *Arbutus unedo* L. and its benefits on human health. *J. Food Nutr. Res.* **2011**, 50, 73–85.
- **Orak, H. H., Yagar, H., Isbilir, S. S., Demirci, A. Ş., Gümüş, T., & Ekinci, N.** (2011). Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf. *Food Science and Biotechnology*, 20, 1249-1256.
- **Özcan, M. M., & Haciseferoğulları, H.** (2007). The strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: chemical composition, physical properties and mineral contents. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 1022-1028.

### P)

- **Pabuçcuoğlu, A., Kivçak, B., Baş, M., & Mert, T.** (2003). Antioxidant activity of *Arbutus unedo* leaves. *Fitoterapia*, 74(6), 597-599.
- **Pallauf, K., Rivas-Gonzalo, J. C., Del Castillo, M. D., Cano, M. P., & de Pascual-Teresa, S.** (2008). Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(4), 273-281.
- **Pan, Y., Zhang, Y., Hou, M., Xue, J., Qin, R., Zhou, M., & Zhang, Y.** (2023). Properties of polyphenols and polyphenol-containing wastewaters and their treatment by Fenton/Fenton-like reactions. *Separation and Purification Technology*, 123905.
- **Paolini, Virginie, Philippe Dorchies, and Hervé Hoste.** "Effets des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre." *Revue Alter Agri* 61 (2003): 17-19.

- **Pavlović, D. R., Branković, S., Kovačević, N., Kitić, D., & Veljković, S.** (2011). Comparative study of spasmolytic properties, antioxidant activity and phenolic content of *Arbutus unedo* from Montenegro and Greece. *Phytotherapy Research*, 25(5), 749-754.
- **Pawlowska, A. M., De Leo, M., & Braca, A.** (2006). Phenolics of *Arbutus unedo* L.(Ericaceae) fruits: Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(26), 10234-10238.
- **Pinent, M., Castell-Auvi, A., Genovese, M.I., Serrano, J., Casaova, A., Blay, M., & Ardévol, A.** (2016). Antioxidant effects of proanthocyanidin-rich natural extracts from grape seed and cupuassu on gastrointestinal mucosa. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 96(1), 178-182.
- **Polese J.M.** (2010). Arbres et arbustes de Méditerranée. Ed EDISUD, Imprimé en UE .135p.

### R)

- **Reguieg, L.** (2011). Using medicinal plants in Algeria. *Am J Food Nutr*, 1(3), 126-127.
- **Rendeková, K.; Fialová, S.; Jánošová, L.; Mučaji, P.; Slobodníková, L.** The activity of *Cotinus coggygria* Scop. leaves extract on *Staphylococcus aureus* strains in planktonic and biofilm growth forms. *Molecules* 2016, 21, 50.
- **Rewatkar, A. R., & Wadher, B. J.** (2013). *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilm formation Methods. *J Pharm Biol Sci*, 8(5), 36-40.
- **Riaz, M., Zia-ul-haq, M., & Saad, M.** (2016). Anthocyanins Effects on Carcinogenesis, Immune System and the Central Nervous System. In: *Anthocyanins and Human Health: Biomolecular and therapeutic aspects*. Springer Briefs in Food, Health, and Nutrition. eBook. Springer, 125-138.
- **Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G.** (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4), 152-159.
- **Roberts, M. F. (Ed.)**. (2013). *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications*. Springer Science & Business Media.

### S)

- **Salem, I. B., Ouesleti, S., Mabrouk, Y., Landolsi, A., Saidi, M., & Boulilla, A.** (2018). Exploring the nutraceutical potential and biological activities of *Arbutus unedo* L.(Ericaceae) fruits. *Industrial Crops and products*, 122, 726-731.
- **Sanjust, E., Mocci, G., Zucca, P., & Rescigno, A.** (2008). Mediterranean shrubs as potential antioxidant sources. *Natural Product Research*, 22(8), 689-708.
- **Santo, D. E., Galego, L., Gonçalves, T., & Quintas, C.** (2012). Yeast diversity in the Mediterranean strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits' fermentations. *Food Research International*, 47(1), 45-50.
- **Sarni-Manchado, P., & Cheynier, V. (Eds.).** (2006). *Les polyphénols en agroalimentaire*. Techniques & documentation.
- **Scazzocchio, F., D'auria, F. D., Alessandrini, D., & Pantanella, F.** (2006). Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological research*, 161(4), 327-333.
- **Schauenberg P., & Paris F.** 1977. Guide des plantes médicinales. Ed., Delachaux et Niestlé, Paris, pp.7-291.
- **Seidemann, J.** (1995). Knowledge of little-known exotic fruits. 5. Strawberry tree (*Arbutus unedo* L.). *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 91(4), 110-113.
- **Serakta, M., Djerrou, Z., Mansour-Djaalab, H., Kahlouche-Riachi, F., Hamimed, S., Trifa, W., & Pacha, Y. H.** (2013). Antileishmanial activity of some plants growing in Algeria: *Juglans regia*, *Lawsonia inermis* and *Salvia officinalis*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(3), 427-430.
- **Shao, Y., Hu, Z., Yu, Y., Mou, R., Zhu, Z., & Beta, T.** (2018). Phenolic acids, anthocyanins, proanthocyanidins, antioxidant activity, minerals and their correlations in non-pigmented, red and black rice. *Food Chemistry*, 239, 733-741.
- **Shi, J., Gong, J., Liu, J., Wu, X., & Zhang, Y.** (2009). Antioxidant capacity of extract from edible flowers of *Prunus mume* in China and its active components. *LWT- Food Science and Technology*, 42(2), 477-482.
- **Shimizu, H., Kiyohara, Y., Kato, I., Kitazono, T., Tanizaki, Y., Kubo, M., & Iida, M.** (2004). Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study. *Stroke*, 35(9), 2072-2077.
- **Singleton, V. L., & Rossi, J. A.** (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

- **Slobodníková, L., Fialová, S., Rendeková, K., Kováč, J., & Mučaji, P.** (2016). Antibiofilm activity of plant polyphenols. *Molecules*, 21(12), 1717
- **Smyth, T., Ramachandran, V. N., & Smyth, W. F.** (2009). A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(5), 421 - 426.
- **Spichiger R.E., SAVOLAINEN V.V., FIGEAT M., et MONOD J.D.** (2004). Botanique systématique des plantes à fleur. 3ème Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes. 413 pp.
- **Stagos, D., Amoutzias, G. D., Matakos, A., Spyrou, A., Tsatsakis, A. M., & Kouretas, D.** (2012). Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. *Food and Chemical Toxicology*, 50(6), 2155-2170.
- **Stevens, P. F., Luteyn, J., Oliver, E. G. H., Bell, T. L., Brown, E. A., Crowden, R. K., & Weiller, C. M.** (2004). Ericaceae. *Flowering Plants· Dicotyledons: Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales*, 145-194.
- **Stewart, P. S., & Costerton, J. W.** (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The lancet*, 358(9276), 135-138.
- **Stewart, P. S., & Franklin, M. J.** (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 199-210.
- **Stöckigt, J., Sheludko, Y., Unger, M., Gerasimenko, I., Warzecha, H., & Stöckigt, D.** (2002). High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic–electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of chromatography A*, 967(1), 85-113.
- **Sutherland, I. W.** (2001). The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology*, 9(5), 222-227.
- **Sutradhar, R. K., Rahman A. K. M. M., Ahmad M. U., & Bachar S. C.** (2008). Bioactive flavones of *Sida cordifolia*. *Phytochemistry Letters*, 1(4), 179-182.
- **Svoboda, K. P., & Hampson, J. B.** (1999). Bioactivity of essential oils. *Aromatopia*, 36, 87-93.
- **Swain, T.** (1979). Tannins and lignings. Herbivorts, their interaction with secondary

T)

- **Talbi, K. E., & Gouita, R.** (2021). Etude de la formation de biofilm par des souches d'entérobactéries responsables des mammites chez les bovins (Doctoral dissertation).
- **Tardio, J., Pascual, H., & Morales, R.** (2002). Alimentos silvestres de Madrid: Guía de plantas y setas de uso alimentario tradicional en la Comunidad de Madrid. Ediciones La Librería. Madrid.
- **Taylor, T.A., Unakal, C.G.,** 2021. Staphylococcus aureus. StatPearls Internet.16, 13-64.
- **Torres, J.A.; Valle, F.; Pinto, C.; Garcia-Fuentes, A.; Salazar, C.; Cano, E.** *Arbutus unedo* L. communities in southern Iberian Peninsula mountains. *Plant Ecol.* 2002, 160, 207–223.
- **Trik, S.** (2020). *Synthèse sur les activités biologiques d'Arbutus unedo L* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- **Tsai, H. Y., Ho, C. T., & Chen, Y. K.** (2017). Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene. *Journal of food and drug analysis*, 25(1), 134-147.

### V)

- **Vinson, J. A., Proch, J., & Bose, P.** (2001). Determination of quantity and quality of polyphenol antioxidants in foods and beverages. *Methods in Enzymology*, 335, 103-114.

### Z)

- **Zenk, M. H., & Juenger, M.** (2007). Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2757-2772.
- **Ziebuhr, W., Loessner, I., Krimmer, V., & Hacker, J.** (2001). [18] Methods to detect and analyze phenotypic variation in biofilm-forming staphylococci. In *Methods in Enzymology* (Vol. 336, pp. 195-IN7). Academic Press
- **Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., & Benjelloun, W.** (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of Ethnopharmacology*, 58(1), 45-54.
- **Ziyyat, A., & Boussairi, E. H.** (1998). Cardiovascular effects of *Arbutus unedo* L. in spontaneously hypertensive rats. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 12(2), 110-113.

# *Annexes*

## ANNEXE 1 : Matériels du laboratoire.

Appareils	Réactifs	Verreries et autres
- Spectrophotomètre (UV, visible)	- Folin-ciocalteu	- Béchers
- Etuve	- Carbonate de sodium	- Boîtes pétri
-Bec benzène	- H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	- Pipettes Pasteur
- Balance de précision (0,0001)	- HCl	- Lames
- Agitateur	- Chloroforme	- Micropipette
- Vortex	- FeCl <sub>3</sub>	- Ecouvillon
-Bain marie	- NaOH	- Papier Wattman
-Broyeur	- Acétate de sodium	- Eprouvettes graduées
-Hotte	- Ammoniaque 1/2	- Tubes à essais à vis stérile
-Plaque chauffante	- Magnésium	- Erlenmeyers
	- Alcool iso-butanol	- Pipettes graduée
	- Anhydride acétique	- Flacons
	- Méthanol	- Spatule
	-Acétate de plomb	- Support
	- Phénolphtaléine	- Barreaux magnétiques
	- Fehling A et B	- Verres de montres
	- Bleu de méthylène	- Entonnoir
	- Amidon	- Papiers filtres
		- Cristallisoirs
		- Burette de graduation
		- Passoir
		- Pince stérile

		- Eau distillée
--	--	-----------------

**ANNEXE 2 : Eau physiologique stérile.**

Composition en g/l :

Chlorure de sodium (NaCl) ..... 9g  
 Eau distillée ..... 1000ml  
 pH=7

Stérilisation à 120°C/15min

**ANNEXE 3 : Les milieux de cultures solides et leur composition.**

**Milieu Mueller Hinton (MH)**

La gélose Mueller-Hinton est un milieu standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries peu exigeantes.

➤ **Composition**

Composition en g/l :

Extrait de viande..... 3g  
 Hydrolysate acide de caséine ..... 17,5g  
 Amidon ..... 1.5g  
 Agar .....18g  
 pH=7,4

Stérilisation à 120°C/15 min.

**Milieu Rouge Congo Agar (CRA)**

Le milieu Congo Red Agar (CRA) est un milieu solide utilisé pour la détection de la formation de biofilm par la production de slim. Les souches exprimant PIA (polysaccharide intercellulaire adhésin) ont produit des colonies noires avec des surfaces rugueuses pour les souches PIA-positives tandis que des colonies rouges et des surfaces lisses pour les souches PIA-négatives (ZIEBUHR *et al.*, 2001).



➤ **Composition**

BHIB.....	37 g
Saccharose. ....	50 g
Agar.....	10 g
Rouge Congo.....	0.8 g
Eau distillée .....	1000 ml
pH= 7,4	

Stérilisation à l'autoclave : 121°C pendant 15 minutes.

**Gélose nutritive BHIB**

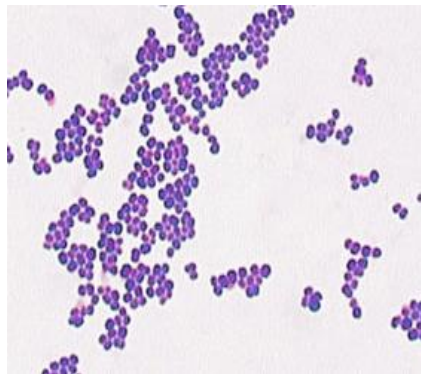
Est non sélectif enrichi à usage général. C'est est une base hautement nutritive qui répond aux besoins de croissance de nombreux types de micro-organismes, notamment les bactéries, les levures et les moisissures.

➤ **Composition**

Extrait Cœur-cervelle .....	17.5g
Peptone pancréatique de gélatine .....	10.0g
Chlorure de sodium .....	05.0g
Phosphate di sodique .....	02.5g
Glucose .....	02.0g
Eau distillée .....	1000 ml
pH= 7.4	

**ANNEXE 4** : souches bactériennes.***Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* est une bactérie à gram positif. C'est un coccus, de forme arrondie, qui se présente sous la forme de diplocoques (des cocci associés par deux) ou sous la forme d'amas ayant la forme de grappes de raisin ABAZA et SEDRATI(2018). Les colonies sont de couleur jaune (relatif à *aureus* qui signifie doré), elles peuvent se développer en milieu aérobie ou anaérobie facultative a des températures comprises entre 18°C et 40°C.

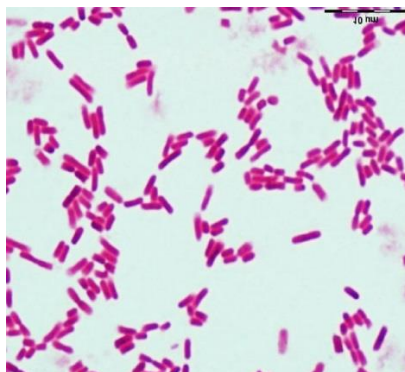


Quelques caractéristiques des bactéries *Staphylococcus aureus* (TAYLOR et UNAKAL, 2021).

<b>Forme</b>	Cocci
<b>Gram</b>	Positif
<b>Culture</b>	aérobie-anaérobie facultatif
<b>Genre</b>	<i>Staphylococcus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Aureus</i>
<b>Nom courant</b>	staphylocoque doré
<b>Morphologie</b>	diplocoques ou amas
<b>Habitat</b>	peau, muqueuses et fosses nasales et le pharynx en majorité

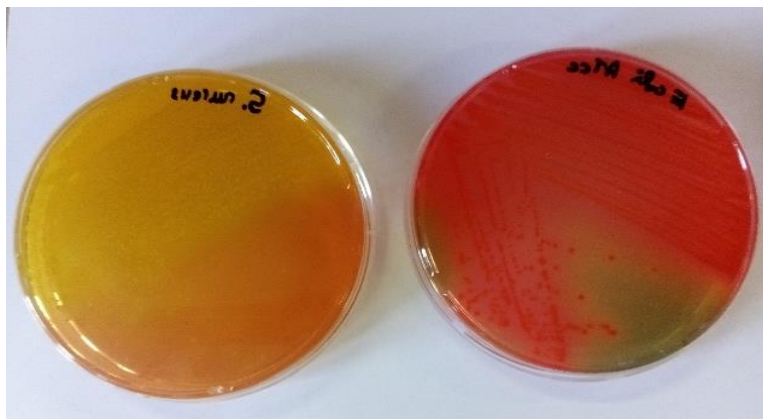
***Escherichia coli***

*Escherichia coli*, autrement appelé colibacille, est une bactérie à gram négatif. C'est un bacille, qui se présente sous la forme de bâtonnets allongés. Dotée d'une mobilité conférée par ses flagelles, cette bactérie mesure entre 2 à 6µm de longueur.



Quelques caractéristiques des bactéries *Escherichia coli* (LAU et al., 2008).

<b>Forme</b>	Bacille
<b>Gram</b>	Négatif
<b>Culture</b>	Aérobie
<b>Genre</b>	<i>Escherichia</i>
<b>Espèce</b>	<i>Coli</i>
<b>Nom courant</b>	Colibacille
<b>Habitat</b>	constitue la majorité de la flore intestinale aérobie; peut se retrouver également au niveau des muqueuses de l'homme et de l'animal.



**ANNEXE 5 :** Aspect macroscopique de *S.aureus* et *E. coli* sur gélose MH.

**ANNEXE 6 :** La DO de différentes concentrations d'acide gallique.

Concentration	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
DO	0	0,156	0,3	0,48	0,586	0,712	0,82	0,904	1,085	1,183	1,301



**ANNEXE 7 :** L'extrait aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* utilisé pour le dosage des polyphénols totaux.



**ANNEXE 8 :** Les trois essais réalisés pour la détermination de la teneur en PPT de l'extrait (originale).


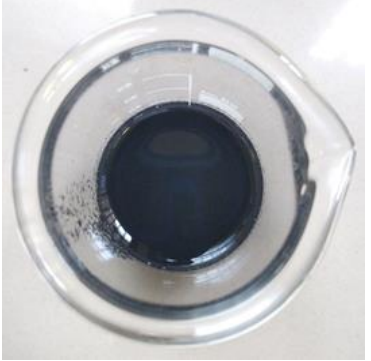
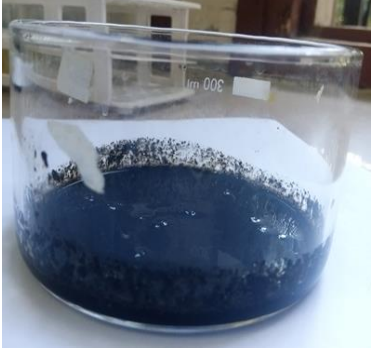



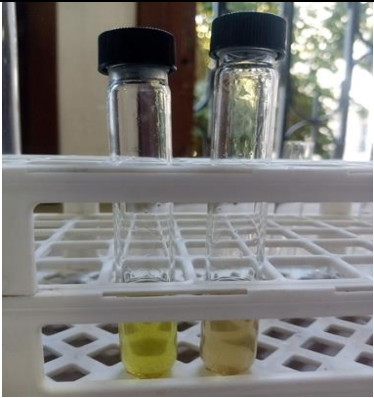


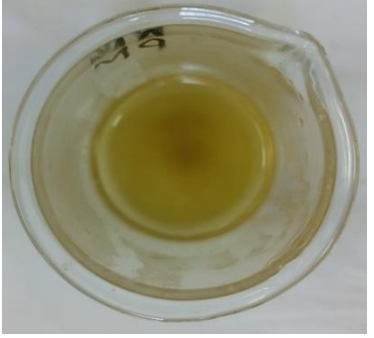

**ANNEXE 9 :** Les dilutions d'acide gallique

**ANNEXE 10 :** la DO des deux essais réalisés pour le dosage des polyphénols totaux de l'extrait aqueux des feuilles d'*Arbutus unedo*.

<b>Tube</b>	<b>DO</b>
01	0,675
02	0,691

**ANNEXE 11 : Résultats de screening phytochimique effectué sur la poudre de feuilles d'*Arbutus unedo*.**

Test	Image	Indicateur
Anthocyanes		Pas d'apparition de la couleur rouge
Tanins		Apparition de la couleur bleu noir.
Tanins galliques		Apparition de la couleur bleu foncé.
Flavonoïdes		Apparition de la couleur rouge orangé.

Saponosides		Pas de formation de mousse.
Quinones libres		Pas d'apparition de la couleur rouge violette.
Glucosides		Apparition de la couleur rouge brique puis violette.
Coumarines		Apparition de la couleur jaune
Stéroïdes		Apparition de la couleur vert.

*Arbutus unedo* est une plante d'intérêt médicinal au regard des nombreuses études rapportées par la littérature spécialisée et de nombreuses molécules bioactives qui rentrent dans la composition des différentes parties de cette plante. Dans ce contexte, cette étude a pour objectif d'évaluer l'effet antibactérien et anti biofilm de l'extrait aqueux de feuilles d'arbousier de la région de Tizi-Ouzou.

Une caractérisation de certains composés actifs (coumarines, flavonoïdes, tanins ...) des feuilles d'arbousier a été réalisée, ainsi que le dosage des sucres.

La teneur totale de composés phénoliques déterminée par la méthode colorimétrique pour l'extrait est de  $49,79 \pm 0,88$  mg EAG/g MS.

L'étude de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* a montré l'absence d'effet antibactérien vis-à-vis *S. aureus* et *E. coli*.

L'évaluation de formation de biofilms par la méthode de rouge Congo a révélé que la souche *S. aureus* est formatrice de biofilms contrairement à *E. coli*.

Dans le cadre de l'évaluation de l'activité anti biofilm, l'extrait aqueux étudié a montré un effet anti biofilm vis-à-vis *S. aureus*.

La somme des résultats obtenus au cours de cette étude montre clairement que l'extrait aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* est potentiellement bioactif et il semble que cette espèce possède une variété de composés métaboliques pouvant être utilisés à des fins thérapeutiques.

**Mots clés :** *Arbutus unedo*, polyphénols, activité antibactérienne, activité anti biofilm.

*Arbutus unedo* is a plant of medicinal interest in view of the numerous studies reported by the specialized literature and numerous bioactive molecules, which are part of the composition of the different parts of this plant. In this context, this study aims to evaluate the antibacterial and ant biofilm effect of the aqueous extract of strawberry tree leaves from the Tizi-Ouzou region.

A characterization of certain active compounds (coumarins, flavonoids, tannins...) of strawberry tree leaves was carried out, as well as the dosage of sugars.

The total content of phenolic compound determined by the colorimetric method for the extract is  $49.79 \pm 0.88$  mg EAG/g DM.

The study of the antibacterial activity of the aqueous extract of *Arbutus unedo* leaves showed the absence of antibacterial effect against *S. aureus* and *E. coli*.

The evaluation of biofilm formation by the Congo red method revealed that the strain *S. aureus* is biofilm-forming unlike *E. coli*.

As part of the evaluation of ant biofilm activity, the aqueous extract studied showed an ant biofilm effect against *S.aureus*.

The sum of the results obtained during this study clearly shows that the aqueous leaf extract of *Arbutus unedo* is potentially bioactive and it seems that this species has a variety of metabolic compounds that can be used for therapeutic purposes.

**Key words:** *Arbutus unedo*, polyphenols, antibacterial activity, ant biofilm activity.