

République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
Et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaia Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département : Microbiologie
Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme :

Ingénieur d'état en biologie

Option : Génie biologie

Thème

*Activité antibactérienne des extraits et fractions
chromatographiques des feuilles et écorce de
Fraxinus angustifolia Vahl*

Réalisés par :

-M^{lle} Imine Thinhinane

Jury :

**président : A. Adjaoud.
Examinatrice : O.Tahiri.
Promotrice : K. Ayouni.
Copromotrice : M.Rahmani**

Année Universitaire : 2011/2012

DEDICACES

« TOUT CE QU'ON PEUT FAIRE DANS LA VIE N'EST QUE LE REFLET DE SOIS MEME, APPRENDRE A VIVRE POUR MIEUX SERVIR... »

Avec une profonde gratitude et un grand amour que je dédie ce modeste travail :

Au meilleur, mère et père qu'une fille n'a jamais eu, les mots sont faibles pour exprimer la force de mes sentiments et la reconnaissance que je vous porte, je remercie dieu de vous avoir protégé pour être témoin de ma réussite.

**A mes deux frères :
Ali et Belaid que Dieu veille toujours sur vous.**

A Yaya et Jida, pour tout l'amour et l'affection qu'elles nous ont toujours donnée.

« FAITES QUE LE REVE DEVORE VOTRE VIE, AFIN QUE LA VIE NE DEVORE PAS VOTRE REVE... »

Thinhinane



Liste des figures

Tableau I : Mode d'action de quelques classes d'antibiotiques sur la cellule bactérienne.....	03
Tableau II : Les principales classes de composés phénoliques.....	11
Tableau III : Acides phénoliques de <i>Fraxinus angustifolia</i>	12
Tableau IV : Coumarines retrouvés chez <i>Fraxinus angustifolia</i>	14
Tableau V : Flavonoïdes retrouvés chez <i>Fraxinus angustifolia</i>	17
Tableau VI : Séco-iridoïdes de <i>Fraxinus angustifolia</i>	20
Tableau VII : Activité antibactérienne des extraits de <i>Fraxinus angustifolia</i> sur <i>Klebsiella pneumoniae</i>	31
Tableau VIII : Activité antibactérienne des extraits de <i>Fraxinus angustifolia</i> sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
Tableau IX : Activité antibactérienne des extraits de <i>Fraxinus angustifolia</i> sur <i>Salmonella typhimurium</i>	33
Tableau X : Activité antibactérienne des extraits de <i>Fraxinus angustifolia</i> sur <i>Shigella flexneri</i>	34
Tableau XI : Activité antibactérienne des extraits de <i>Fraxinus angustifolia</i> sur <i>Vibrio cholerae</i>	35
Tableau XII : Activité antibactérienne des extraits de <i>Fraxinus angustifolia</i> sur <i>Bacillus subtilis</i> NCCB1090.....	36
Tableau XIII : Activité antibactérienne des extraits de <i>Fraxinus angustifolia</i> sur <i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633.....	36
Tableau XIV : Activité antibactérienne des extraits de <i>Fraxinus angustifolia</i> sur <i>Staphylococcus aureus</i>	37
.	
Tableau XV : Activité antibactérienne des extraits de <i>Fraxinus angustifolia</i> sur <i>Staphylococcus aureus</i> SARM.....	38
Tableau XIV : Activité antibactérienne des extraits de <i>Fraxinus angustifolia</i> sur <i>Listeria innocua</i>	39

Liste des figures

Figure 1 : Photographie d'ensemble de <i>Fraxinus angustifolia</i> et sa classification.....	08
Figure 2: Parties de <i>Fraxinus angustifolia</i>	09
Figure 3: Structure de base d'un flavonoïde.....	16
Figure 4: Structure 1 : acyle sécoiridoïdes glucosides ; 2 : méthyle sécoiridoïdes glucosides de <i>F. angustifolia</i>	21
Figure 5: Structure(1,2) dimère de sécoiridoïdes ; structure (3) sécoiridoïdes avec noyau arranger de <i>F. angustifolia</i>	21
Figure 6 : Protocole d'extraction des composés de plante.....	24
Figure 7 : aspect des résultats obtenus par <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Anx
Figure 8 : aspect des résultats obtenus par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Anx
Figure 9 : aspect des résultats obtenus par <i>Salmonella typhimurium</i>	Anx
Figure 10 : aspect des résultats obtenus par <i>Shigella flexneri</i>	Anx
Figure 11 : aspect des résultats obtenus par <i>Vibrio cholerae</i>	Anx
Figure 12 : aspect des résultats obtenus par <i>Bacillus subtilis</i> NCCB 1090.....	Anx
Figure 13 : aspect des résultats obtenus par <i>Bacillus subtilis</i> ATTCC 6633.....	Anx
Figure 14 : aspect des résultats obtenus par <i>Staphylococcus aureus</i>	Anx
Figure 15 : aspect des résultats obtenus par <i>Staphylococcus aureus</i> SARM.....	Anx
Figure 16 : aspect des résultats obtenus par <i>Listeria innocua</i>	Anx
Figure 17 : Chromatogramme des standards pulvérisés à la vanilline sulfurique et l'ansaldéhyde .1 : Catéchine. 2 : Rutine. 3 : Acide gallique. 4 : Acide tannique. 5 : Acide cinnamique. 6 : Acide caféïque. 7 : Acide <i>p</i> -coumarique. 8 : Quercétine.....	41
Figure 18 : Chromatogramme de l'extrait aqueux de chloroforme d'écorce et ses fractions pulvérisés à la vanilline sulfurique ; Ext : Extrait aqueux de chloroforme. Fractions chromatographiques : 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 16.Sp : Spot.....	41
Figure N° 19 : Chromatogramme de l'extrait aqueux de chloroforme d'écorce et ses fractions pulvérisés à l'ansaldéhyde. Extrait aqueux de chloroforme. Fractions chromatographiques : 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 16. Sp : Spot.....	42
Figure N°20 : Chromatogramme de l'extrait aqueux de chloroforme des feuilles et ses fractions pulvérisé à la vanilline sulfurique. Ext : extrait aqueux du chloroforme.	

Fractions : 2, 3, 4, 5, 6 et 7 de l'extrait aqueux. Sp : Spot.....	45
Figure N° 21 : Chromatogramme de l'extrait aqueux de chloroforme des feuilles et ses fractions pulvérisé à l'ansaldehyd. Ext : extrait aqueux du chloroforme. Fractions : 2, 3, 4, 5, 6 et 7 de l'extrait aqueux. Sp : Spot.....	45
Figure N°22 : Chromatogramme des standards des deux souches. A : 1:catéchine, 2:acide gallique, 3:acide caféique, 4:acide tannique, 5:acide cinnamique, 6:rutine, 7: acide <i>p</i> -coumarique, 8: quercétine. B : 1: catéchine, 2: rutine, 3: acide gallique, 4: acide tannique, 5: acide cinnamique, 6: acide caféique, 7: acide <i>p</i> -coumarique, 8: quercétine.....	47
Figure N°23 : Chromatogramme des extraits d'écorce de <i>F.angustifolia</i> . 1: éthanolique, 2: acétate d'éthyle, 3: aqueux acétate d'éthyle, 4:chloroforme, 5: aqueux chloroforme. (ZI : A,A2, B,B2, C et D).....	48
Figure N°24 : Chromatogramme des fractions de l'extrait aqueux chloroforme d'écorce de <i>F.angustifolia</i> sur <i>Staphylococcus aureus</i> .Ext : extrait aqueux chloroforme. 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12: fractions.....	48
Figure N°25 : Chromatogramme des fractions de l'extrait aqueux chloroforme d'écorce de <i>F.angustifolia</i> sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Ext : extrait aqueux chloroforme. 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12: fractions.....	49
Figure N°26 : Chromatogramme des extraits de feuilles de <i>F.angustifolia</i> . 1: éthanolique, 2: acétate d'éthyle, 3: aqueux acétate d'éthyle, 4:chloroforme, 5: aqueux chloroforme.....	49
Figure N°27 : Chromatogramme des fractions de l'extrait aqueux chloroforme de feuilles de <i>F.angustifolia</i> . Ext : Extrait aqueux chloroforme. Fraction : 4, 5, 6 et 7.....	50

Sommaire

I.	<i>Introduction</i>	01
II.	<i>Synthèse bibliographique</i>	
II.1.	Antibiotique.....	03
II.1.1.	Classification.....	03
II.1.2.	Mode d'action.....	04
II.1.3.	Résistance aux antibiotiques.....	05
II.1.3.1.	Mécanismes biochimiques de la résistance.....	05
II.1.3.2.	Mécanismes génétiques de la résistance.....	06
II.2.	Généralités et utilisations du frêne	07
II.3.	Espèce <i>Fraxinus angustifolia</i>	08
II.3.1.	Classification.....	08
II.3.2.	Description botanique.....	09
II.3.3.	Aire de répartition du frêne	09
II.3.4.	propriétés et usage thérapeutiques du frêne.....	10
II.4.	Métabolites secondaire	10
II.4.1.	Les composés phénoliques.....	11
II.5.	Les composés phénoliques chez <i>Fraxinus</i>	12
II.5.1.	Acides phénols et leurs dérivés	12
II.5.2.	Coumarines.....	14
II.5.3.	Flavonoïdes	16
II.5.4.	Tannins.....	18
II.6.	Seco-iridoïdes.....	19
III.	<i>Matériels et méthodes</i>	
III.1.	Matériels végétal.....	22
III.2.	Souches utilisées.....	25
III.3.	Test de diffusion sur milieu gélosé.....	25
III.4.	Fractionnement.....	26
III.5.	CCM-bioautographie.....	27
IV.	<i>Résultats et discussions</i>	
IV.1.	Taux d'extraction.....	29
IV.2.	Détermination de l'activité antibactérienne et la nature chimique.....	30
IV.2.1.	Diffusion sur milieu gélosé.....	30
IV.2.2.	Etude phytochimique de l'extrait aqueux chloroforme et ses fractions de l'écorce et des feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i> développés et révélés sur CCM.....	40
IV.2.3.	Activité antibactérienne des extraits et fractions de l'écorce et des feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i> par la méthode de CCM-bioautographie.....	47
V.	<i>Conclusion</i>	51
VI.	Références bibliographiques	

Introduction

L'utilisation des plantes pour se soigner remonte à la préhistoire, toutes les civilisations à travers les continents ont développé une base regroupant les plantes utilisées dans leurs médecines traditionnelles. Les égyptiens furent parmi les premiers peuples à conserver dans des papyrus leurs connaissances sur les vertus des plantes médicinales. Les babyloniens quant à eux ont laissé des tablettes d'argile cuites listant l'ensemble des plantes médicinales et drogues qu'ils ont utilisé (**DUMENAT, 2008**). Les peuples autochtones d'Amérique du nord, pendant près de 10 000 ans, ont utilisé une grande variété de plantes, afin de traiter toutes sortes de maladies. Sans oublier les peuples de l'extrême orient, tels que les chinois et les indous qui ont conservé soigneusement ces connaissances dans des manuscrits tout en faisant usage jusqu'à nos jours.

Pour survivre et pouvoir échapper à l'action létale des antibiotiques, les bactéries ont développé de très nombreux mécanismes biochimiques de résistances, associés à une grande ingéniosité génétique pour pouvoir les acquérir et les diffuser.

Il est acquis que les plantes médicinales sont capables de guérir certaines maladies comme le rhume, les infections ou d'en prévenir d'autres comme l'ulcère, l'infarctus...etc. Les plantes médicinales ont montré à travers plusieurs études leurs pouvoir antibactérien (**Cushine et Lamb, 2005 ; Falleh et al., 2008 ; El-Amraouiet al., 2010 ; Dramane et al., 2010 ; Kempfet al., 2011**). La plupart de ces espèces contiennent des principes actifs, comme les polyphénols, les alcaloïdes et les terpènes.

Le frêne est connu depuis toujours pour ces nombreuses vertus en tant que plante médicinale. Elle est indiquée pour soigner le rhumatisme, l'arthrose et la goutte, sa composition chimique en métabolites secondaires essentiellement substances phénoliques, lui confère ses propriétés

Les études faites sur les extraits bruts des feuilles et écorces de l'espèce *Fraxinus angustifolia* ; au niveau du laboratoire de biochimie appliquée à l'université de Bejaïa ; ont montré une activité antibactérienne de certains extraits vis-à-vis des souches pathogènes testées. Un fractionnement chromatographique s'en est suivi dans le but de caractériser la nature biochimique de cette activité antibactérienne.

Le présent travail, consiste à tester l'activité antibactérienne des extraits de feuilles et d'écorce de *F.angustifolia*, par la méthode classique de diffusion sur disque et celles des fractions par la méthode CCM-bioautographie, sur des souches pathogènes Gram positive et Gram négative. Cela dans le but de pouvoir conclure sur la nature chimique des principes actifs impliqués dans cette activité.

II.1. Antibiotiques :

Bien avant la découverte de l'existence des microbes, l'idée que certaines plantes offrent la possibilité de contenir certaines substances dotées de propriétés curatives, caractérisée de principes antimicrobiens, a été bien acceptée (**Rios et Recio, 2005**). Plusieurs auteurs ont fait la description et l'utilisation de ces plantes en médecine humaine (**Gautier, 1822 ; Fleurentin et al., 2002 ; Sofowara, 2010**).

L'utilisation des plantes et des substances dérivées, pour se soigner a pris un coup de froid depuis la découverte des premiers agents antibactériens, les sulfamides en 1935, puis la pénicilline au lendemain de la seconde guerre mondiale, l'ère des antibiotiques, s'est démarquée par un développement rapide de nouvelles molécules, toujours plus puissantes et la guérison de nombreuses maladies infectieuses.

Un antibiotique est une substance antibactérienne d'origine biologique ou de synthèse chimique, qui est capable d'inhiber la croissance d'autres micro-organismes (bactériostatique) ou de les détruire (bactéricide), elle agit à de faibles concentrations et n'est pas toxique pour l'hôte (**Mouton et al., 2000**).

II.1.1. Classification :

La classification des antibiotiques, selon **Yala et al. (2001a)**, se fait en fonction de :

- **Origine** : élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique)
- **Mode d'action** : paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques.
- **Spectre d'activité** : liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large)
- **Nature chimique** : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle β lactame) sur lequel il y a hémisynthèse.

II.1.2. Mode d'action :

Le tableau ci-dessous englobe le mode d'action de quelques classes d'antibiotiques

Tableau I : Mode d'action de quelques classes d'antibiotiques sur la cellule bactérienne. (**Yala et al., 2001a ; Alami et al., 2005**).

Famille	Cible	Mode d'action
Polymexine	Membrane cellulaire	Agit au niveau de la membrane cytoplasmique bactérienne entraînant l'éclatement de la bactérie.

B-lactamines	La paroi de la cellule	Grace au noyau β -lactame, elles inhibent la PLP (protéine membranaire) responsable de la transpeptidation du peptidoglycane, ce qui entraîne une lyse bactérienne.
Glycopeptides		Ces molécules n'agissent que sur les bactéries à Gram positif, en se liant de façon covalente sur les résidus terminaux D –alanine du peptidoglycane.
Quinolones	Synthèse de l'ARN et l'ADN	Les quinolones inhibent la synthèse de l'ADN de la bactérie en se fixant sur le complexe "ADN-ADN gyrase", empêchant la réplication et transcription de l'ADN bactérien.
Rifamicines		Les Rifamycines agissent en bloquant la transcription par inhibition de l'ARN polymérase ADN dépendante.
Sulfamides		Ils entrent en compétition avec le PAB (acide para benzoïque) pour la synthèse de l'acide folique (précurseur des acides nucléiques).
Aminosides	Synthèse protéiques	Ils perturbent la synthèse des protéines au niveau de la sous unité 30S du ribosome entraînant une destruction bactérienne.
Macrolides		Ils se fixent réversiblement sur l'unité 50S du ribosome et bloquent l'élongation du peptide en formation, de ce fait ils sont bactériostatiques.
Phénicoles		Ils agissent au niveau de la sous unité 50S du ribosome, en se fixant de façon réversible sur leurs sites récepteurs.
Tétracyclines		Les tétracyclines inhibent la synthèse des protéines au niveau de la sous unité 30S du ribosome, en empêchant la liaison de nouveaux aminoacyl-ARNt.

Pendant longtemps, on a pensés que les antibiotiques allaient permettre de traiter la plupart des infections et éradiquer la quasi-totalité des maladies infectieuses, mais véritablement une évolution s'est produite. Les bactéries ont su contrecarrer l'action des antibiotiques, dès lors il y'a u l'émergence et l'extension de résistances aux antibiotiques, chez la quasi-totalité des espèces bactériennes pathogènes (**Bergogne-Bérézin, 2004**).

Il existe deux grands types de résistance aux antibiotiques, la résistance intrinsèque (naturelle) et la résistance acquise.

- **Résistance naturelle :** C'est une insensibilité aux antibiotiques, existant naturellement chez tous les membres d'un genre ou d'une espèce bactérienne. Elle fait partie du patrimoine génétique normal du germe (**Courvalin, 2007**).
- **Résistance acquise :** C'est l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotiques. Ce nouveau gène peut être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome, phénomène rare, soit par transfert d'ADN (plasmides conjugatifs ou transposons) mécanisme le plus fréquent (**Courvalin, 2007**).

II.1.3. Mécanismes de résistance aux antibiotiques :

Les mécanismes conférant la résistance aux antibiotiques peuvent être classés en deux : mécanismes biochimiques et mécanismes génétiques (**Lozniewski et al, 2010**).

II.1.3.1. Mécanisme biochimique de résistance :

Ils peuvent être regroupés en trois grands types de mécanismes.

- Résistance au niveau du transport de l'antibiotique :

Système d'efflux : l'efflux actif repose sur une pompe insérée dans la membrane, capable d'éjecter l'antibiotique hors de la bactérie. Cet efflux conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique. Trois genres de pompes ont été décrits chez *P.aeruginosa* résistante aux fluoroquinolones (**Lomovskaya et al., 2001**), ainsi que chez *K.pneumoniae* pour la résistance aux chloramphénicol (**Hasdemir et al., 2004**).

Absence ou mutation de la porine : retrouvé seulement chez les bactéries Gram (-), une mutation affecte la structure ou la synthèse de la porine, donc l'antibiotique ne parvient pas à entrer dans la cellule, ce qui lui confère une immunité (**Briand, 2009**).

- Résistance au niveau de la cible : on distingue six sortes de mécanismes.

Synthèse d'une nouvelle cible : décrit chez *Staphylococcus aureus*, qui par l'acquisition et l'intégration dans le chromosome d'un gène (*mecA*), induit la synthèse d'une nouvelle PLP, la PLP 2a capable d'assurer à elle seule l'assemblage du peptidoglycane et elle confère une résistance à toutes les bêta-lactamines (**Koch, 2003**).

Cible modifiée par une enzyme : ce mécanisme, décrit chez les staphylocoques, consiste en l'acquisition d'une méthylase qui modifie l'ARN 23S du ribosome et empêche l'action de l'érythromycine (**Briand, 2009**).

Cible modifiée par une mutation : décrit chez les entérocoques résistants à la vancomycine et bacille de Koch résistants à la streptomycine. Ce mécanisme décrit une mutation au niveau du site d'interaction avec l'antibiotique de sorte que ; ce dernier ne reconnaît plus sa cible (**Briand, 2009**). tel que la mutation spécifique au niveau de l'ARN 50S pour la résistance aux macrolides (**Page et al., 1999**).

Protection de la cible : décrit chez *Klebsiella pneumoniae* en 1994, une protéine codée par un gène exporté par la cellule, se lie à la cible ADN gyrase et empêche ainsi l'action de la ciprofloxacine (**Briand, 2009**).

Augmentation du nombre de cibles : la bactérie multiplie le nombre de cible de façons à ce que l'antibiotique n'arrive pas à les saturer, décrit chez les entérobactéries résistantes au triméthoprimine (**Briand, 2009**).

Disparition de la cible : une mutation entraîne la perte d'un gène ou sa fonction, décrit chez *E.coli* résistante aux cotrimoxazole (**Briand, 2009**).

➤ Résistance par inactivation de l'antibiotique :

Ce mécanisme est basé sur la destruction d'un antibiotique avant même que celui-ci pénètre la cellule. Il se produit via la sécrétion par la bactérie d'une enzyme capable de détruire les liens chimiques nécessaires à l'intégrité fonctionnelle de l'antibiotique.

L'inactivation des antibiotiques par l'action des enzymes a été l'un des premiers mécanismes mis en évidence, décrit chez *E.coli* en 1940 par la production de β -lactamases (**Fournier, 2003 ; Briand, 2009**).

Le mécanisme majeur de résistance aux β -Lactamines chez les bactéries Gram (-) est basé sur la synthèse d'une β -lactamase, chromosomique et inductible. c'est le plus souvent une séphalosporinase chez *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Philippon et al., 2002 ; Pitout et al., 2003**). D'autre part, les *Klebsiellas* présentent une résistance naturelle aux aminopénicillines et aux carboxypénicilline par l'action d'une pénicillinase (**Yala et al., 2001b**).

II.1.3.2. Mécanismes génétiques de la résistance :

Sur le plan génétique, la résistance peut être acquise par deux voies totalement distinctes, soit par des mutations dans le génome il s'agit alors de transmission verticale à la descendance, soit par l'acquisition d'information génétique exogène, défini comme étant un transfert horizontal ceci par le biais de plasmides (transformation, transduction et conjugaison) ou de transposons (transposition) (**Vaubourdolle, 2007**).

En Algérie, des études montrent que 35% des pneumocoques isolés chez l'enfant sont résistants à la pénicilline (**Ammari et al., 2001**), cette propagation est due au transfert de gènes (PLP) issus des espèces *Streptococcus mitis* et *Streptococcus oralis*, qui accroît la résistance des pneumocoques vis-à-vis des β -lactamine (**Chardon et al., 2002**).

D'autre part, des souches de *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* et *E.coli* porteuses du gène producteur de β -lactamases (plasmide CMY2) ont été isolées dans des hôpitaux en Espagne (Navarro et al., 2001).

Il est certain que la plupart des antibiotiques prescrits dérivent des microorganismes et que chaque antibiotique a une durée de vie effective limitée, au bout de laquelle les microorganismes développent des résistances. De plus, dans les pays en voie de développement ces produits ne sont pas toujours disponibles, ou sont onéreux pour leurs populations.

Il est aussi évident que les agents antimicrobiens d'origine végétal ont démontré leurs efficacités et ceci à juste titre (Karou et al., 2005), entre 1995 et 2004 le nombre d'études visant la recherche de nouvelles molécules à activité antibactérienne issues de plantes à plus que doublé (Rios et Recio, 2005).

Actuellement, en Algérie et partout dans le monde entier des moyens sont mis à la disposition des chercheurs pour avancer sur cette voie ; parmi les plantes médicinales retrouvées chez nous le frêne a été sélectionné dans le cadre de notre étude.

II.2. Généralités et utilisation du Frêne :

Grand arbre majestueux, le frêne est très abondant en Algérie, représenté par deux principales espèces *Fraxinus excelsior* L et *Fraxinus angustifolia* (Quezel et Santa, 1962). Il peut vivre jusqu'à 200 ans, leur croissance est favorable en climat chaud et terres fraîches, argileuses, alcalines et profondes, mais ils sont aussi capables de prospérer dans des terres lourdes, limoneuses et sableuses (Rodzko, 2000 ; Fraxigen, 2005 ; Dobrowolska et al., 2008).

Le frêne est cultivé en Algérie comme arbre d'alignement au bord des routes et avenues, ses feuilles constituent un très bon fourrage, utilisé dans l'alimentation des cheptels dans les régions montagneuses de Kabylie (INRAA, 2006). De plus, elles participent à la préparation de boissons fermentées hygiéniques. Ces feuilles sont cueillies à certaines périodes de l'année (mai, juin à juillet) et prises sous forme d'infusion ou décoction légères (Abdelguerfi et Louar, 1997)

Ajouté à cela, le frêne possède un bois d'excellente qualité, avec une bonne résistance mécanique. Autrefois il était "l'essence" des voitures à chevaux, des membrures de bateaux, des raquettes de tennis (Paul et Degrand, 1839 ; Motel, 1973 ; Duflot, 2002), de même qu'il

est utilisé dans l'industrie papetière (Elmas, 2011). Il se trouve aussi être un excellent bois de chauffage, il brûle aussi bien vert que sec. Les cendres issues de sa combustion sont riches en potasse, donc elles constituent un excellent engrais (Nepveu, 1992).

II.3. Espèce *Fraxinus angustifolia* :

Le genre a été décrit la première fois par Linnaeus en 1753. Depuis lors, plusieurs espèces ont été décrites (H.M.P.C, 2011), leur classification est très divergente, mais tous les auteurs s'accordent à dire qu'elles font partie de la famille des Oléacées (Kostova et Iossifova, 2007).

II.3.1. Classification :

La classification de *Fraxinus angustifolia* rapporté par Gaussen et al. (1982) est illustrée dans la figure N°1.



Règne : Végétal.
Embranchement :
Spermaphytes.
Sous-embranchement :
Angiospermes.
Classe : Dicotylédones.
Sous classe : Asteridaes.
Ordre : Oléales.
Famille : Oléacées.
Genre : Fraxinus.
Espèce : *Fraxinus angustifolia*

Figure N°1 : a) photographie d'ensemble de *Fraxinus angustifolia* (Amizour, Bejaia), b) : sa classification.

II.3.2. Description botanique :

Fraxinus angustifolia est un arbre moyen à grand de 15 à 25 mètre de haut, avec une couronne ovoïde un peu irrégulière de 10 à 15 mètre de large et un tronc de 1,5 mètre de diamètre. C'est un arbre à croissance rapide et une espèce de plein soleil (Rameau et al., 2008).

L'écorce est longue, lisse, de couleur brunes puis grises, et ce fissure avec l'âge, les bourgeons ne dépassent pas 6 mm de long, sans poil, de couleur brun jaunâtre à un brun ferrugineux. Les feuilles sont caduques, opposées, imparipennées, 4 à 7 cm de long avec 7 ou 9 folioles étroites, très longuement pointues, aux dents très écartées et irrégulières (**Quezel et Santa, 1962**). Les fleurs quant à elles, sont de couleur brunâtre, apparaissent avant les feuilles, de mars à mai, hermaphrodites, dépourvues de calice ou de corolle et se positionnent en grappes latérales (**Quezel et Santa, 1962 ; Motel, 1973**) Figure N°3.

Enfin, les fruits sont des samares aux formes très variables, pointues aux deux extrémités, et arrivent à maturité en septembre. La graine dépasse le milieu du fruit ; c'est un caractère d'identification de l'espèce type (**Quezel et Santa, 1962**) figure N°3.



Figure N°2 : parties de *Fraxinus angustifolia* ; (a) : écorce, (b) : fruits, (c) : feuilles, (d) : fleurs, (e) : bourgeons.

II.3.3. Aire de répartition de *Fraxinus angustifolia* :

Le frêne est présent en région méditerranéenne dans le sud de l'europe, l'ouest de l'Asie et dans le Nord de l'Afrique, notamment le nord de l'Algérie et du Maroc (**Delille, 2007**). Dans l'ensemble de l'Europe, sa distribution s'étend de l'Espagne au nord en Slovaquie et en Moravie méridionale, et vers l'Est en Turquie, en Syrie, Caucase, en Iran et en Russie méridionale. Mais aussi, dans le bassin de Pannonian et aux Balkans. Il se répartie principalement dans les forêts tout au long des grands fleuves (tels que le Drava, le Sava,...etc.), ou associées aux lacs (lac Balaton).Il peut être trouvé sur des emplacements plus secs à des altitudes plus élevées (500 à 2000 mètre), aussi bien dans les forêts riveraines (**Fraxigen, 2005 ; Hinsinger, 2010**).

II.3.4. Propriétés et usage thérapeutiques du Frêne :

Le frêne est utilisé en médecine populaire, ses feuilles sont efficaces pour la régulation des selles et contre les parasites intestinaux. Elles ont une action anti-inflammatoire reconnue en plus des propriétés antirhumatisme et antigoutteuse, donc sont toutes indiquées pour traiter les douleurs articulaires et la goutte, comme elles se trouvent être utilisées contre la lithiase rénale et biliaire, les problèmes de rétention d'eau et d'œdèmes (**D.U.M.E.N.A.T, 2008 ; Debuigie et Couplan, 2009 ; Beloued, 2009**). De plus, celles-ci ont un effet laxatif dû à la présence de mucilage et diurétique généralement associée au mannitol et aux sels de potassium (**Belouad, 1998 ; Rodzko, 2000**).

L'écorce, constitue un excellent fébrifuge employée contre les fièvres intermittentes, les hémorragies passives. Elle pressante aussi une action diurétique et purgative. La graine quant à elle est indiquée dans le traitement d'affections rénales (**Motel, 1973 ; Schauenberg et Paris, 2006 ; D.U.M.E.N.A.T, 2008**).

Les différentes propriétés thérapeutiques du frêne sont étroitement liées à sa composition chimique en métabolites secondaires. Les feuilles du genre *Fraxinus* contiennent la fraxoside, le fraxinol, de faibles quantités de coumarines, des acides phénols, des quinones, des tannins catéchiques et galliques et des flavonoïdes (**Tissut et Egger, 1972 ; Carnat et al., 1990 ; Beloued, 2009 ; Debuigie et couplan, 2009 ; Dubray, 2010**). L'écorce quant à elle, renferme des glucosides : la fraxine, isofraxidine, le fraxetol et de la rutine, en outre elle contient d'importantes quantités d'hétérosides de coumarines (esculoside et fraxoside), des résines, des tannins et des principes amers (**Mendez et al., 1968 ; Beloued, 1998 ; Schauenberg et Paris, 2006 ; Delille, 2007 ; Debray, 2010**).

II.4. Métabolites secondaires:

Historiquement, les composés produits par les plantes ont été séparés en métabolites primaires et secondaires. Les métabolites primaires sont des molécules présentes dans toutes les cellules végétales et nécessaires à la vie de la plante (les glucides, acides aminés...etc). D'autre part, les métabolites secondaires sont importants pour la survie et la propagation des plantes qui les produisent. Les trois classes principales de métabolites secondaires chez les plantes sont les alcaloïdes, les terpénoïdes et les substances phénoliques (**Raven et al., 2007**).

II.4.1. Les composés phénoliques:

Les substances phénoliques sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, qui participent à leurs défense, plus de 8000 structures sont connues (**Lugasi et al., 2003 ; Macheix et al., 2005**). bien qu'elles soient très diversifiées, elles ont toutes en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (**Vermerris et Nicholson, 2009**). Les polyphénols sont par définition, des composés phénoliques de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines (**Chira et al., 2008**).

II.4.1.1. Classification des composés phénoliques :

regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C₆ à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de substitution de ce squelette (méthylation, d'oxydation et d'hydroxylation) et enfin par les liaisons possibles de ces molécules de bases avec d'autres molécules (**Macheix et al., 2005**). Les principales classes de composés phénoliques selon Harborne et Simmonds sont rapportées dans le tableau suivant :

Tableau N°II : Les principales classe de composés phénoliques (Ribéreau-Gayon, 1968).

Formule chimique	Nomenclature
C ₆	Phénols simples
C ₆ -C ₁	Acides benzoïques et composés voisins
C ₆ -C ₂	Acétophénone et acides phénylacétiques
C ₆ -C ₃	Acides cinnamiques et composés voisins
C ₆ -C ₃	Coumarines, isocoumarines et chromones
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavones
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavanones
C ₆ -C ₃ -C ₆	Isoflavones et composés voisins
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonols, dihydroflavonols et composés voisins
C ₆ -C ₃ -C ₆	Anthocyanidines
C ₆ -C ₃ -C ₆	Chalcones, aurones, dihydrochalcones
C ₃₀	Biflavonyles
C ₆ -C ₁ -C ₆ ; C ₆ -C ₂ -C ₆	Benzophénone, xanthone, stilbène
C ₆ ; C ₁₀ ; C ₁₄	Benzoquinone, naphthoquinone, anthraquinone.
C ₁₈	Bétacyanines et bétaxantines

II.4.1.2. Biosynthèse des substances phénoliques :

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux voies biogénétiques dites : la voie shikimate et la voie polyacétate (**Bruneton, 2009**). La diversité structurale des composés phénoliques est due à cette double origine biosynthétique et à la possibilité d'une

interaction entre l'acide shikimique et l'acétate pour donner des composés mixtes (Lugasi et al., 2003).

II.5. Composés phénoliques chez Fraxinus :

II.5.1. Acides phénols et leurs dérivés :

II.5.1.1. Généralités :

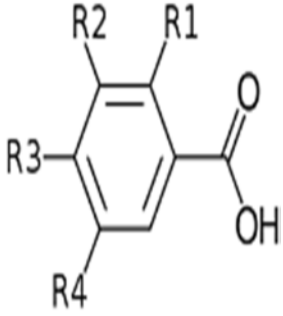
Cette classe englobe les acides benzoïques (C_6-C_1), les acides cinnamiques (C_6-C_3) et les coumarines. En générale, ils sont combinés à d'autres molécules organiques par le biais de la fonction carboxyle formant ainsi des esters (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Macheix et al., 2005). Chez *F.angustifolia*, l'acide caféique est retrouvé sous forme d'ester O-*trans*-caffeoyle- β -D-glucopyranoside (Kostova et Iossifova, 2007).

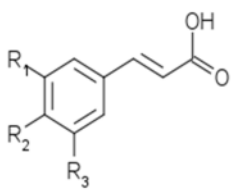
II.5.1.2. Biosynthèse et structures :

Les composés de type C_6-C_3 sont des dérivés de l'acide cinnamique, métabolites de l'acide shikimique, et ceux de type C_6C_1 sont des dérivés de l'acide benzoïque (Chira et al., 2008), qui proviennent, en générale, de la dégradation de la chaîne latérale de l'acide cinnamique correspondant (bruneton, 2009).

Les acide phénols, dérivés de l'acide benzoïque et l'acide cinnamique retrouvées chez Fraxinus (Kostova et Iossifova, 2006 ; H.M.P.C, 2011) sont cités dans le tableau suivant.

Tableaux N°III : Acides phénoliques de Fraxinus.

Classes	Structure générale	Exemples de composés	Substitutions	Références
Acides hydroxybenzoïques		Acide <i>para</i> -hydroxybenzoïque	R1=R2=R4=H ; R3=OH	(Bruneton, 2009)
		Acide vanillique	R1=R4=H ; R2=OCH3 ; R3=OH	
		Acide gallique	R1=H ; R2=R3=R4=OH	
		Acide protocatéchique	R1=R4=H ; R3=R2=OH	
		Acide syringique	R1=H ; R2=R4=OCH3 ; R3=OH	
		Acide 2,4-	R1=R3=H ;	

		dihydroxybenzoïque	R2=R4=OH
Acides hydroxy-Cinnamiques		Acide para coumarique	R1=R3=H ; R2=OH
		Acide caféique	R1=R2=OH ; R3=OH
		Acide férulique	R1=OCH3 ; R2=OH ; R3=H
		Acide synapique	R1=R3=OCH3 ; R2=OH

(Manchado et Cheyner, 2006)

II.5.1.3. Activité antibactériennes des acides phénols :

Les plantes médicinales contenant les acides phénols ont montré un effet antibactérien remarquable (Wong et Kitts, 2006 ; Chanwitheesuk et al., 2007 ; Rivero-Cruz, 2008 ; Gutiérrez-Larraínzar et al., 2012) . Les acides caféique et gallique ont montré une bonne activité contre les bactéries Gram (+) tels que des souches de *Staphylococcus aureus* (Vaquero et al., 2007b) et *Bacillus subtilis* (Rivero-Cruz, 2008), contrairement à des souches Gram (-) tel que *Escherihia coli*, *Salmonella enterica* et *Pseudomonas aeruginosa* (Vaquero et al., 2007b). L'acide gallique inhibe *S.tiphy* et *S.aureus* avec des CMI de 2500µg/ml et 1250 µg/ml (Chanwitheesuk et al., 2007). De plus, l'acide 4-hydroxycinnamique et l'acide caféique présentent un très bon effet inhibiteur sur les souches de *Streptococcus mutans* avec des CMI de 23,6 µg/ml et 17,8 µg/ml, successivement (Rivero-Cruz, 2008).

Il a été montré que la position et le nombre de groupement OH des acides phénols sont déterminants pour leur activité antibactérienne (Cowan, 1999 ; Kuete et al., 2007) .L'acide gallique et l'acide protocatéchique ont trois et deux groupement OH, respectivement, alors que l'acide vanillique n'en a qu'un seul. Cela pourrait expliquer le faible effet inhibiteur de ce dernier (Vaquero et al., 2007b).

Les acides hydroxycinnamiques sont moins polaires que les acides hydroxybenzoïques, du fait de la présence de la chaîne latérale propanoïque, en théorie ceci faciliterait le transport des acides hydroxybenzoïques à travers la paroi bactérienne, ce qui pourrait expliquer qu'ils soient plus actifs comparés aux acides hydroxycinnamiques (Vaquero et al., 2007b).

II.5.2. Les coumarines :

II.5.2.1. Généralités :

Isolées pour la première fois en 1820 de la *Dipteryx odorata Willd* (Fabacées), les coumarines sont des 2H-1-benzopyran-2-ones (C₆-C₃), portant un noyau benzopyrone qui leur confère une grande fluorescence (**Hongqi et al., 2011**). Elles peuvent être considérées comme des lactones des acides 2-hydroxy-Z-cinnamiques (**Lake, 1999**). Elles se trouvent sous forme libre ou liée ; par le biais de ses hydroxyles formant ainsi des hétérosides tel que la scopoline et la cichoriine (**Riberau-Gayon, 1968 ; Fomine et al., 1998**), ou encore sous forme de polymères (**Ravisé et Kirkiachar, 1976**) ou d'isomère, les isocoumarines, qui diffèrent des coumarines par l'inversion de la position du CO et O liés à l'hétérocycle (**Vermerris et Nicholson, 2009**).

II.5.2.2. Biosynthèse et structures des coumarines :

Elles sont issues du métabolisme de la phénylalanine via l'acide cinnamique. Lors de cette biosynthèse, l'acide *trans*-cinnamique est transformé en acide *trans-o*-coumarique, qui est estérifié en β-glucoside (composé en *cis*), sous l'action de la lumière (UV). Ensuite, cette forme se convertit en coumarine par cyclisation (**Paris et Hurabielle, 1981 ; Richter, 1993**).

Les coumarines isolées de *F. angustifolia* (**Iossifova et al., 1997 ; Kostova, 2001 ; Santamour, 2002 ; Kostova et Iossifova 2007 ; HMPC, 2011**) sont citées dans le tableau IV .

Tableau N°IV : coumarines retrouvés chez *Fraxinus angustifolia*.

	Structure générale	R1	R2	R3	R4	Nom	Référence
Hétérosi des de coumari		H	OCH ₃	OH	OGlc	Fraxine	(Kostova et Iossifova 2006)
		H	OGlc	OH	H	Esculine	
		H	OH	OGlc	H	Cichoriine	
Coumarines simples		H	OCH ₃	OH	H	Scopoletine	
		H	OH	OCH ₃	H	Isoscooletine	
		H	OCH ₃	OH	OH	Fraxetine	
		H	OH	OH	H	Esculetine	
		OCH ₃	OH	OCH ₃	H	Fraxinol	

II.5.2.3. Activité antibactérienne des coumarines :

L'activité antibactérienne des coumarines a été rapportée par différentes études sur des extraits de plantes médicinales à coumarines (**Tada et al., 2002 ; Wong et Kitts, 2006 ; Maleki et al. 2008**). **Gautam et al. (2007)** ont noté des valeurs de CMI de 17,5 à 25 µg/ml à

l'égard des souches de *Mycobacterium*. Par ailleurs la fraxitine à 100 µg/ml inhibe *S.aureus* (Marquez et al., 2005), alors que paepalantine a exhibé activité antibactérienne avec des valeurs de CMI des valeurs de 15,6, 3,9,15,6 et 4 500 µg/ml contre *S.aureus*, *S. epidermis*, *E. faecalis* et *E. coli*, les dérivés de la paepalantine portant des substituants en C9 et C10 se sont avérés moins actif (Devienne et al., 2005).

La psoralen et ses dérivés (furanocoumarine) ont un très bon effet inhibiteur sur des souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Citrobacter freundii* (Ngameni et al., 2009). Les furanocoumarines ont montré un effet inhibiteur sur des souches Gram (+) *Listeria sp* et *Micrococcus sp* et des souches Gram (-) *E.Coli* et *Erwinia sp* (Wong et Kitts, 2006). Certaines furocoumarines (psoralènes) associées à des rayonnements UV se sont révélées être mutagènes ou même létales sur des micro-organismes fongiques ou bactériens (Bruneton, 2009).

D'après Dall'Acqua et al. (1969), l'activation des furocoumarines linéaires conduit à des réactions de photocycloaddition avec les bases pyrimidiques de l'ADN (Wong et Kitss, 2006) et celle de ARN au niveau des carbones C3, C4 et/ou C4', C5', donc l'ADN polymérase se retrouve bloquée, ainsi la duplication des brins d'ADN et la traduction des ARN seront entravées. Cette propriété est souvent invoquée pour expliquer les caractères mutagènes et carcinogènes de ces molécules (Edwards et al., 2000 ; Gravot, 2002). Les travaux de Veronese et al. (1981) cité par Gravot. (2002) ont montré que les furocoumarines activées par UV ont la faculté d'inhiber la protéine Kinase C (enzyme régulatrice), ce qui peut participer à l'inhibition de la synthèse d'ADN.

D'après l'étude de Kuete et al. (2007) sur la relation structure-activité antibactérienne et antifongique des coumarines, un cycle furo supplémentaire augmente l'activité antimicrobienne, de ce faite, les coumarines à trois cycles ont une meilleure activité antibactérienne que celles ayant deux cycles. Cependant, une méthylation de cette structure en trois cycles décroît considérablement son pouvoir antibactérien (Esterhuizen et al. .2006 ; Kalkhambkar et al. 2008).

Il a été rapporté aussi l'activité antibactérienne des isocoumarines à un rapport avec La position et le nombre d'hydroxyle libre, le mécanisme inclue l'inhibition d'enzymes par des composés oxydés, probablement par interactions non spécifiques avec protéines (Devienne et al., 2005).

II.5.3. Flavonoïdes :

II.5.3.1. Généralités :

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques possédant un squelette de base à 15 atomes de carbones (C6-C3-C6). Ils constituent un groupe d'une extrême diversité, environ 3000 structures connues (Narayana *et al.*, 2000), retrouvées essentiellement dans les feuilles. Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau Flavone ou de 2-phenyl chromone, leurs structure de base est constituée de deux noyaux aromatiques A et B (Richter, 1993). Figure N°4.

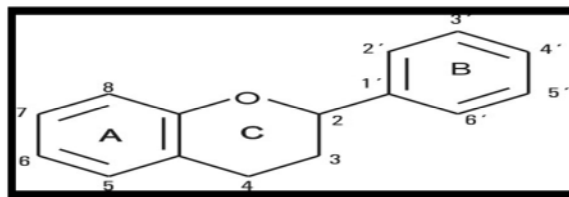


Figure N°3 : structure de base d'un flavonoïde (Trueba, 2003).

II.5.3.2. Biosynthèse et structures :

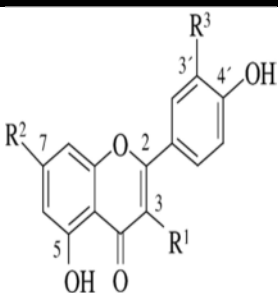
Les flavonoïdes sont la fusion de produits issus des deux voies biosynthétiques, un triacétate est condensé pour former le cycle A et un acide cinnamique est à l'origine du cycle B. Ces deux voies sont alors condensées pour engendrer un précurseur commun le 4, 2', 4', 6' tétrahydroxychalcone, ce pigment jaune est métabolisé en différentes classes des flavonoïdes sous l'action d'enzymes spécifiques (Chira *et al.*, 2008 ; Bruneton, 2009).

Selon le nombre, la position et la nature des substituants sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle intermédiaire C, les flavonoïdes sont subdivisés en quinze familles, dont les plus importantes sont les suivantes : flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, isoflavones, isoflavanones, chalcones, aurones et anthocyanes.

Les flavonoïdes se rencontrent à la fois sous forme libre ou lié, à des oses en position C3 ou C7 avec la plupart du temps un L-rhamnose, D-glucose, Arabinos et galactose, ou à des groupements méthyles, comme ils peuvent être aussi hydrolysés en C3, 5, 7, 2', 3', 4' et 5' (Narayana, 2001 ; Ghedira, 2005).

Les flavonoïdes retrouvés chez *Fraxinus angustifolia* (Kostova et Iossifova, 2007 ; Lee *et al.*, 2012) sont cités dans le tableau ci-dessous.

Tableau N°V : Flavonoïdes retrouvés chez *Fraxinus angustifolia*.

Classe	Structure	Substituants	Nom	Références
Flavonols		R3=R2=OH, R1=o-Glc ^o -Rha	Rutine	(Kostova et
		R3=H, R2=OH, R1=o-Glc	Astragaline	Iossifova 2006 ;
		R3=H, R2=OH, R1=o-Glc ^o -Rha	Nicotiflorine	Lee et al., 2012)
		R3=R2=OH, R1=o-Glc	Quercétine3-o-Glucoside	
		R3=R2=OH, R1=o-Rha	Quercétine3-o-Rhamnoside	
		R3=OH, R2=OH, R1=o-Gal	Kaempférol3-o-galactoside	

II.5.3.3. Activité antibactérienne :

La littérature a rapporté le rôle protecteur des flavonoïdes produits par les plantes contre l'invasion microbienne (**Ribereau-Gayon, 1968 ; Rouxel, 1989**). L'activité antibactérienne des plantes riches en flavonoïdes a été rapportée par plusieurs auteurs (**Bruneton, 1999 ; Chacha et al., 2005 ; Kuete et al., 2008**).

Une étude sur des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthiciline (SARM) a montré que des flavonoïdes (catéchines, epicatéchine gallate et catéchine gallate) à des concentrations de 25mg/ml sont capable de réduire la CMI de l'oxacilline au minimum 64 fois, la présence de flavone et dihydroxyflavone à 50µg/ml restaure l'activité des β-lactamines vis-à-vis de SARM avec une CMI de 4µg/ml, celle de l'oxacilline est réduite de 512 fois, 8000 fois pour la céphapirin et 32000 fois pour la panipenem (**Sato et al., 2004**).

La lutéoline a montré un très bon effet inhibiteur sur la croissance des souche de *Morganella morgani*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* avec des diamètres d'inhibition de 20,2 mm, 21,5 mm et 19 mm, respectivement (**Kuete et al., 2008**). D'autres études on rapportées le pouvoir inhibiteur de la rutine, quercitine et catéchine (flavonoïdes isolées dans le genre *Fraxinus*) à l'égard de *Listeria monocytogenes* à différentes concentrations (**Vaquero et al., 2007a**) *Escherichia coli* et *Serratia marcescens*, et seulement la quercitine vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis* (**Vaquero et al., 2007b**).

Chaque type de flavonoïdes peut avoir plusieurs modes d'action sur une cellule bactérienne, c'est-à-dire plusieurs cibles pour le même composé. Selon **Cushnie et Lamb, (2005)** ces mécanismes cibleraient la synthèse des acides nucléiques, la membrane cytoplasmique et le métabolisme énergétique.

Il a été avancé que le cycle B des flavonoïdes pourrait jouer un rôle dans l'intercalation ou la liaison entre les acides nucléiques. Plaper et ses collaborateurs ont montré que la quercétine se lie à l'ADN gyrase de *E. coli* et empêche l'action de l'ATPase. Bernard et ses collaborateurs ont montré que la rutine est un puissant inhibiteur de la Topoisomérase IV d'*E. coli* (Cushnie et Lamb, 2005).

Il est très clair que le nombre et la position des groupements hydroxyles ont un effet sur le pouvoir antibactérien des flavonoïdes (isoflavonoïde et flavanones), pour les chalcones la présence de l'unité prényl a augmenté leur activité, pour les flavanones hydroxylées en position C3 et C4 ainsi que la prénylation en C5 étaient essentiels pour leur activité (Chacha et al., 2005). Sato et ses collaborateurs ont démontré que les chalcones peuvent induire la fuite de substances absorbant à 260nm chez *S. mutans*, ils ont avancé que ces flavonoïdes modifient la perméabilité de la membrane cellulaire et perturbent sa fonction (Cushnie et Lamb, 2005).

II.5.4. Tannins :

II.5.4.1. Généralités :

Ce sont des composés phénoliques responsables de l'astringence de nombreux fruits et légumes, de formule $(C_6-C_3-C_6)_n$. Ils participent à la défense des plantes contre les pathogènes (Paris et Hurabielle, 1981 ; Manchado et Cheynier, 2006). Par définition, les tannins sont des composés phénoliques solubles dans l'eau, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da, et ayant outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité à précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines (Cowan, 1999). On distingue deux types :

➤ Tannins hydrolysables

Ce sont des esters de glucose, c'est-à-dire un noyau central de glucose sur lequel se fixe des acides, l'acide gallique (gallotannins) et l'acide éllagique (ellagitannins), ils peuvent être hydrolysés (acide, alcaline et enzymatique) et libérés ainsi le glucose et les acides correspondants (Jacob et Pignal, 1972).

➤ Tannins condensés :

Les tannins condensés sont des polymères de polyhydroxy-flavan-3-ol, en général ils ne dépassent pas 10 unités, cette classe de composés est caractérisée par une immense hétérogénéité due à la présence de divers groupements fonctionnels (Bruneton, 2009 ; Hagerman, 2002).

II.5.4.2. Biosynthèse et structures :

La synthèse des tannins hydrolysable à partir de l'acide gallique passe tout d'abord par l'ajout de groupement galloyles au noyau de l'acide gallique pour former les pentagalloyle glucose, par l'addition d'autres groupements galloyles se forment les gallotannins. Une réaction oxydative de deux groupes galloyl convertie les gallotannins en ellagitannins, ceux-ci sont des esters d'acide ellagique et de D-glucose (**Hagerman, 2002 ; Vermerris et Nicholson, 2009**). Le composé de la classe des tannins identifier chez *Fraxinus*, en général, est le pyrocatechol (**Kostova, 2000 ; Kostova et Iossifova, 2006**).

II.5.4.3. Activité antibactérienne :

L'activité antibactérienne de plantes à tanins a été démontré vis-à-vis de plusieurs pathogènes à savoir, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157, *Pseudomonas fragi*, *Lactobacillus plantarum* et *Salmonella Typhimurium* (**Chung et al., 1998 ; Amarowicz et al., 2008**), les tanins de l'écorce de *Psidium guajava* L. ont montré un effet inhibiteur sur *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Abdelrahim et al., 2002**).

Ces composés agissent par inhibition des activités enzymatiques de la protéine-kinase C (**Derbel et ghedira, 2005**) ce qui pourrait empêcher l'activation des acides aminés et entraver la synthèse protéique. Ils ont aussi la faculté de lier les protéines de la paroi cellulaire, ce qui entraîne une diminution de sa perméabilité laissant ainsi la cellule en manque de substances essentielles à sa croissance. Selon **Cowan (1999)** et **Karou et al. (2005)**, le mode d'action des tannins peut être lié à leur capacité d'inactiver les adhésines microbiennes, les enzymes et les protéines de transport membranaire.

Il a été mis en évidence que l'acide tannique et propyl gallate inhibent la croissance des bactéries portées par les aliments, mais pas l'acide gallique (**Chung, 1998a**). L'étude de la relation structure-activité a montré que la liaison ester était déterminante pour l'activité antibactérienne des tannins (**Chung, 1998b**).

II.6. Les séco-iridoïdes :

II.6.1. Généralités :

Les études photochimiques des plantes de la famille des oléacées, particulièrement le genre *Fraxinus* ont été motivées par la découverte des sécoiridoïdes (**Hosny, 1998**). plusieurs variantes structurales de sécoiridoïdes glucosides ont été isolées et identifiées des plantes appartenant à ce genre, celle-ci sont caractérisées par une liaison ester avec différent

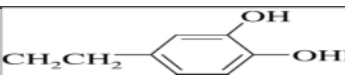



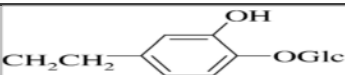
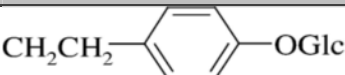
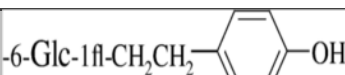
composés phényléthanoïdes (**Takenaka et al., 2000**), ils sont retrouvés méthylés, sous forme de dimère ou bien glucosylés (**Kostova et Iossifova, 2007**). En général, les séco-iridoïdes se retrouvent dans les parties feuilles et écorces de toutes les espèces de *Fraxinus* étudiées (**Iossifova, 1997**).

II.6.2. Biosynthèse et structures :

Les séco-iridoïdes sont des monoterpènes avec un squelette de base 7,8-secocyclopenta-c-pyranoid, dérivés des iridoïdes par ouverture du cycle cyclopentanique sous l'action enzymatique (**Dinda, 2007 ; Arrif, 2009**). La voie de biosynthèse des séco-iridoïdes passe via les iridodials, iridotrials, acide deoxy-loganique aglycone et acide deoxy-loganique, pour aboutir au 7-ketologanin (précurseur des séco-iridoïdes) (**Damtoft et al., 1995**).

Les structures des différents séco-iridoïdes retrouvés chez *F.angustifolia* (**Calis, 1996 ; Hosny, 1997 ; Kostova et Iossifova, 2007 ; HMPC, 2011**) sont représentées dans le tableau VI et les figures N°6, 7 et 8.

Tableau N° VI : sécoiridoïdes glucoside de *F.angustifolia* (Kostova et Iossifova, 2007).

R1	R2	R3	nom
H	OCH3	OCH3	Oléoside-7,11 diméthylester
H	OCH3		Oleuropein
H	OCH3		Ligstroside
OH	OCH3		10-Hydroxyligstroside
OH	OCH3		10-Hydroxyoleuropein
H	OCH3		Angustifolioside A
H	OCH3		Angustifolioside B
H	OCH3		Neuzhenide

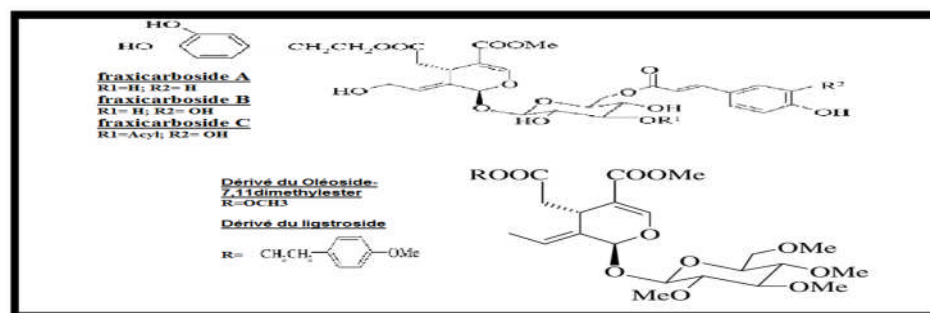
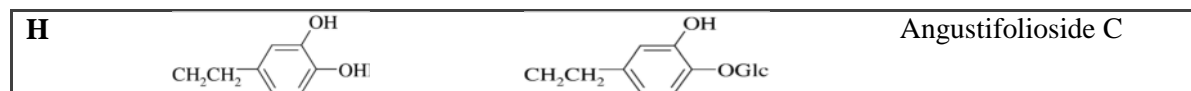


Figure N° 4 : structures de 1 : acyl sécoiridoïdes glucosides ; 2 : méthyle sécoiridoïdes glucosides de *F.angustifolia* (Kostova et Iossifova, 2007).

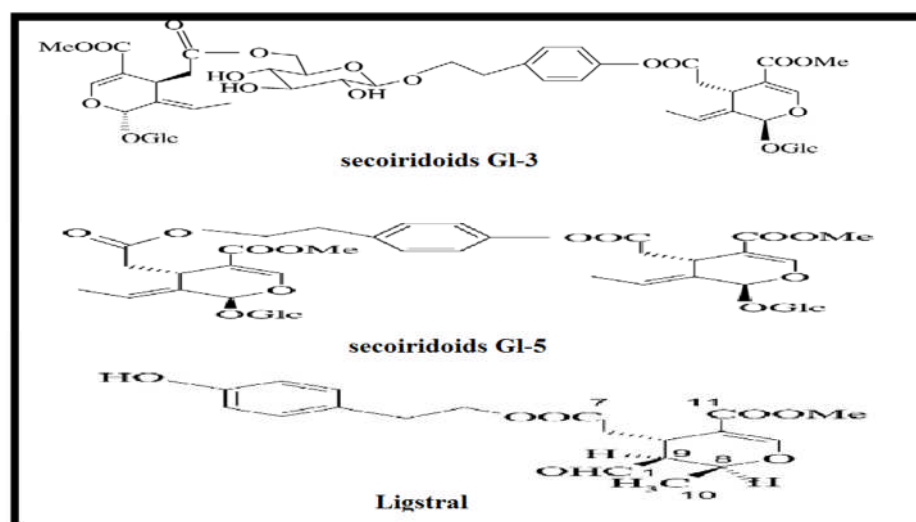


Figure N° 5 : structure (1,2) dimère de sécoiridoïdes ; image(3) sécoiridoïdes avec noyau arranger de *F.angustifolia* (Kostova et Iossifova, 2007).

II.6.3. Activité antibactérienne des séco-iridoïdes :

Deux seco-iridoïdes, swertiamarin et sweroside isolés de *Centaurium erythraea* (Gentianaceae), inhibent la croissance de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter freundii* et *Escherichia coli*. Swertiamarin est aussi actif sur *Proteus mirabilis* et *Serratia marcescens*, comme l'est le sweroside sur la souche de *Staphylococcus epidermidis* (Dinda et al., 2007). Peu d'études ont rapporté l'activité antibactérienne des séco-iridoïdes.

III.1. Matériels végétal :

Notre étude a été réalisée sur les feuilles et écorce d'une plante très utilisée en médecine traditionnelle locale *Fraxinus angustifolia*.

III.1.1. Récolte et identification de la plante :

Les feuilles et écorces de *Fraxinus angustifolia* ont été récoltées en juillet 2011 dans la forêt d'Azru n Bechar loin de tout impact de pollution ; un site situé dans la localité d'Amizour, wilaya de Bejaia.

L'identification de l'espèce *Fraxinus angustifolia* a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie végétal (bloque N°9), faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Bejaia.

III.1.2. Séchage, broyage et tamissage :

Les parties à étudier de *Fraxinus angustifolia* ont été séchées à température ambiante et à l'abri de la lumière vive pendant deux mois, ensuite broyées par un broyeur électrique (Kika Labortechnik) et tamisées afin d'obtenir une poudre de granulométrie inférieur à 63 µm.

III.1.3. Extraction :

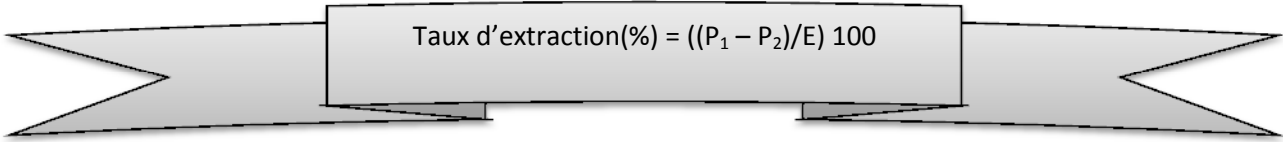
Une extraction sélective à plusieurs solvants a été effectuée selon le protocole de **Chiang *et al.* (1994)** avec quelques modifications.

400g de la poudre fine ont été macérées dans de l'éthanol (95%) à un rapport de 1g de poudre pour 4 ml d'éthanol pendant 24 heures, sous agitation. Après décantation pendant 12 heures, une centrifugation du surnageant (1500/min) a été effectuée pendant 10 minutes par une centrifugeuse (Sigma), puis l'extrait a été récupéré soigneusement et soumis au séchage à l'air libre jusqu'à stabilisation du poids sec de l'extrait.

La deuxième étape de l'extraction consiste à solubiliser l'extrait sec éthanolique obtenu, dans un mélange d'acétate d'éthyle et eau distillée avec un rapport 3 : 1 (v/v). Après macération et décantation, deux phases distinctes (organique et aqueuse) ont été séparées et laissées pour sécher.

Dans la dernière étape de l'extraction, la phase organique a subi une extraction dans un mélange chloroforme/eau selon le rapport volumique 3/1, respectivement. Les phases obtenues ont été séparées et séchées, jusqu'à stabilisation du poids sec des extraits, le protocole est résumé dans la figure N° 6.

Le taux d'extraction de chaque étape est déterminé par la formule suivante :


$$\text{Taux d'extraction(\%)} = ((P_1 - P_2)/E) 100$$

P_1 : Représente le poids du cristalliseur contenant l'extrait après évaporation.

P_2 : Représente le poids vide du cristalliseur.

E : Représente le poids de l'échantillon initial (poudre ou extrait sec de la phase précédent.

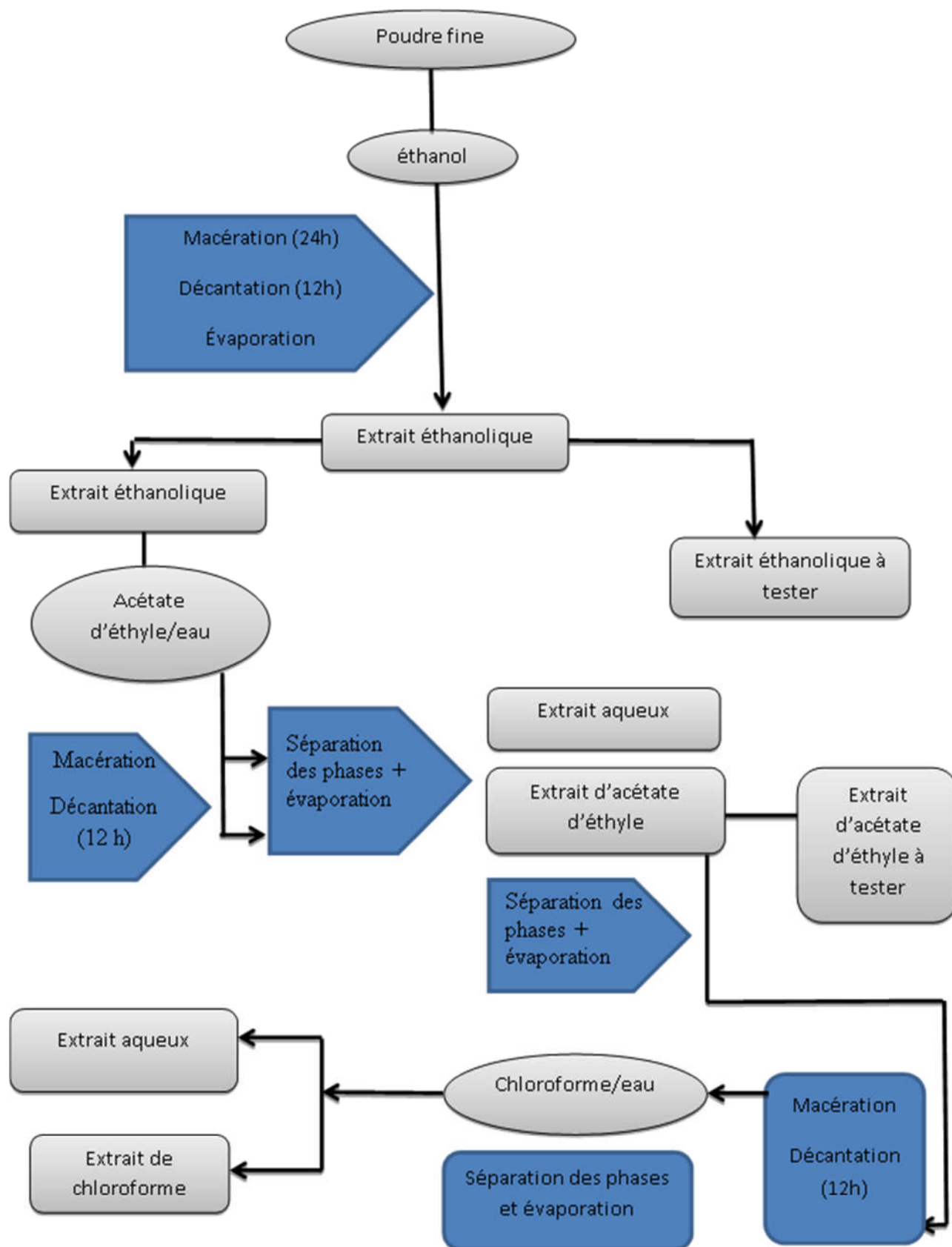


Figure N°6: Protocole d'extraction des composés de plante (chiang et al., 1994)

III.2. souches utilisées :

Dans cette étude dix souches bactériennes pathogène référenciées ont fait l'objet d'une investigation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur gélose (méthode des disques), cinq souches Gram négatives, *Vibrio cholerae* ; *Shigella flexneri* (NCCB 1406) ; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27854) ; *Klebsiella pneumoniae* résistante aux quinolones (E47) ; *Salmonella typhimurium* (NCCB 1808) et cinq souches Gram positive, *Staphylococcus aureus* (NCCB 89163) ; *Staphylococcus aureus* méticiline résistante S.A.R.M (ATCC 43300) ; *Listeria innocua* ; *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) ; *Bacillus subtilis* (NCCB 1090).

III.3. Test de diffusion sur gélose :

Cette méthode, appelé aromatogramme, est basée sur la diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu de culture formant ainsi un gradient décroissant de la source vers la périphérie. Le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque de l'antimicrobien est corrélée avec la concentration minimale inhibitrice (CMI).

III.3.1. Préparation du standard de turbidité McFarland :

Pour le contrôle de la turbidité de l'inoculum un standard de McFarland 0,5 a été préparé en ajoutant 0,5 ml de dihydrate de chlorures de baryum ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,175 %) et 99,5 ml d'acide sulfurique (1 %), cette solution est fermée hermétiquement et réfrigérée **(B.B.L, 2005)**.

III.3.2. Préparation de l'inoculum :

Chaque culture doit êtreensemencée en stries sur une gélose non inhibitrice et bouillon nutritif. Ceci pour obtenir des colonies isolées et ainsi confirmer la pureté de l'échantillon, mais aussi, maintenir la vitalité du microorganisme.

La pré-culture utilisée pour l'inoculum estensemencée par inondation et incubée une nuit à 37°C. Des colonies sont prélevées avec une anse stérile et transférées dans un tube d'eau physiologique stérile jusqu'à ce que la turbidité de celle-ci avoisine celle du standard McFarland 0,5 (10^8 UFC/cm^3). Cette comparaison est faite par spectrophotomètre. Les solutions obtenues sont diluées selon le standard correspondant à chaque souche **(Michel, 2004)**.

III.3.2.3. Ensemencement :

L'ensemencement a été effectué directement à partir de la dilution obtenue à l'aide d'un écouvillon stérile immergé dans la suspension et pressé fermement contre la paroi intérieure du tube, puis tourner l'écouvillon pour enlever les liquides excédentaires. L'étalement a été réalisé par stries serrées à trois reprises sur la surface entière de la gélose, en tournant la boîte à environ 60°, après chaque application pour obtenir une distribution égale de l'inoculum. Enfin, écouvillonner autour du bord de la surface de la gélose.

III.3.2.4. Dépôt des disques :

Après 15 minutes de l'inoculation, les disques de papier wattman (6mm de diamètre) stériles ont été déposés individuellement avec une pince contre la gélose, chaque disque est imprégné de 20µl de la solution de l'extrait (50mg/ml), à l'aide d'une micropipette. Un disque témoin négatif est imprégné de 20µl de méthanol. Chaque test est effectué en trois répliques.

III.3.2.5. Lecture :

Après 18 à 24 heures d'incubation à 37C°, le diamètre de chaque zone d'inhibition (diamètre du disque compris) exprimé en millimètres est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse. Chaque valeur est une moyenne de trois mesures prises de différents angles. Le résultat final pour chaque extrait est exprimé par la moyenne des trois répliques.

Des travaux antérieurs aux niveaux du laboratoire de biochimie appliqué ont montré de meilleur activité biologiques, suite à cela un fractionnement de l'extrait aqueux chloroforme a été réalisé pour caractérisé ces différentes activité et l'étudier pour son éventuelle activité antibactérienne.

III.4. Fractionnement par chromatographie sur colonne Sephadex LH20 :

Les extraits aqueux chloroforme de l'écorce et de feuilles ont fait l'objet d'un fractionnement sur colonne ouvert (1,5m, 1,5cm de diamètre) de gel de Sephadex LH20 (Sigma-aldrich). Un échantillon de 200 mg d'extrait préparées dans 2 ml de méthanol a été déposé délicatement sur la surface du gel Sephadex LH20 contenu dans une colonne, préalablement préparé, tassé et extensivement lavé avec du méthanol. L'élution a été réalisée par du méthanol. Des fractions de 10ml ont été récupérées, séchées, puis dissoutes dans de petits volumes de méthanol (400µl), puis déposées sur des plaques de chromatographie sur

couche mince de gel de Silice, les fractions présentant les même profils chromatographiques, aussi bien sous UV (254, 366nm), révélation par la vanilline sulfurique et les mêmes vis-à-vis du DPPH ont été combinés, donnant ainsi suite à 16 fractions pour les feuilles et 16 fractions pour les écorces.

Toutes ces fractions ont été séchées pour des tests ultérieurs à savoir l'activité antibactérienne vis-à-vis de deux souches pathogènes et une investigation CCM bioautographie.

III.5. CCM-Bioautographie :

La bioautographie appartient aux méthodes de criblage microbiologiques à aspect qualitatif pour la détection de l'activité antimicrobienne. Doté d'une grande sensibilité, c'est un test confirmatif de la présence ou absence de l'analyte et qui ne nécessite pas un lourd matériel. Généralement combiné à la CCM, on la retrouve sous le nom de CCM-bioautographie, elle est décrite par plusieurs auteurs pour l'étude de l'activité antibactérienne et antifongique vis-à-vis de substance naturelles (**Eloff et al., 2005 ; Rangasamy et al., 2007**).

III.5.1. Procédure de réalisation :

A l'aide d'une micropipette on dépose au bas d'une plaque préfabriquée (Silica gel 60 F254 TLC plates, 10×10 cm) 20µl de la fraction à une concentration de 5mg/ml. Ensuite, cette plaque est développée dans un système d'élution : EtOAc/AF/AAc/H₂O (100 :11 :11 :26). Après développement et séchage dans une étuve (37C°) 18 à 24h, la plaque est couverte d'une couche de 4mm de gélose Muller Hinton inoculé avec une suspension bactérienne de turbidité 10⁶/cm³ enfin, la plaque est incubé dans une boîte de Pétrie (d=10cm) à 37C° pendant 24H.

III.5.2. Révélateurs :

- **De croissance microbienne :**

La plaque est vaporisée avec un (spray) de *para*-iodonitrotetrazolium violet préparé à une concentration de 2mg/1ml d'eau distillé, la réaction est immédiate avec l'apparition d'une couleur rouge témoin de la croissance et les zones d'inhibitions sont sous forme de taches claires (**Martini et Eloff, 1998**).

- De la nature chimique des fractions :

Deux plaques sont développées en parallèle de la même façon que celle utilisé pour la bioautographie. Tout de suite après séchage elles sont vaporisées par ces deux révélateurs suivant :

Réactif d'anisaldéhyde sulfurique : utilisé pour la détection des terpénoïdes, propylpropanoïdes, principes piquant et amers et saponines, ce révélateur est préparé en diluant 0.5 ml d'anisaldéhyde 10 ml d'acide acétique glaciale, suivie directement par 85 ml de méthanol et finalement 5ml d'acide sulfurique concentré. on asperge 5ml de cette solution sur la plaque, après on l'incube à 100C° 5 à 10mn (www.emdchemicals.com).

Réactif de vanilline sulfurique: utilisé pour la détection des terpénoïdes et dérivés phenylpropanoïdes. Ce révélateur est constitué par deux solutions ; solution(1) : vanilline dilué dans l'éthanol (1%) et solution (2) une dilution d'acide sulfurique éthanol d'acide sulfurique. On vaporise uniformément 5ml de la solution(1) suivie de 5ml solution (2) sur la plaque, ensuite on l'incube 5 à 10 min à 110 C°, puis on observe les résultats (www.emdchemicals.com).

IV.1. Taux d'extraction :

Le matériel végétal, le type de solvant, les conditions thermiques, la taille des molécules à extraire constituent les principaux paramètres influençant sur la nature et le taux des composés à extraire (**Ribéreau-Gayon, 1968 ; Lim et Murtijaya, 2007**). Ces derniers ont été optimisés de façon à avoir le maximum de composés phénoliques dans les extraits en vue d'évaluer leurs activités antibactériennes.

La concentration en métabolites secondaires chez les végétaux varie en fonction du stade de développement (**Raven et al., 2007**). De plus, en se référant à une étude faite sur l'influence de la période de collecte sur l'activité antibactérienne des extraits de plantes (**Buwa et Staden, 2007**), les parties de plantes à utiliser ont été collectées durant la période où le pic en composés phénoliques est atteint.

D'après **De-Rijke et al. (2006)**, les hydrolases contenues dans le matériel végétal frais peuvent provoquer la dégradation de certains composés phénoliques. C'est pour cela que le séchage du matériel végétal a été réalisé à l'air libre et à l'abri de la lumière.

Ajouté à cela, la procédure du séchage est aussi un paramètre important. En effet si le séchage est mal conduit, le matériel végétal risque d'être sujet de contaminations fongiques qui vont influencer sur la composition chimique et l'activité biologiques des extraits de plantes. En parallèle, des études comparatives de l'activité antibactériennes des extraits par différentes techniques de séchages ont montré que les meilleures activités sont obtenues par séchage à température ambiante (**Eloff et McGaw, 2006**).

Le broyage et tamisage ont été réalisés de façon à pouvoir récupérer le maximum de poudre fine ayant un diamètre inférieur à 63 μ m, ceci pour augmenter la surface de contact avec le solvant donc améliorer le taux d'extraction (**Sipgno et al., 2007**).

L'extraction sélective, méthode utilisée, a pour but de garantir un maximum de composés phénoliques extraits. L'éthanol, employé comme solvant de départ car il est considéré parmi les meilleurs pour extraire le plus grand nombre de classes de composés phénoliques (**Bruneton, 2009**). Par la suite, on a continué en utilisant un système binaire de solvant, ayant pour effet la répartition des composés à extraire entre deux phases polaire et apolaire (**Naczek et Shahidi, 2004**).

IV.2. Détermination de l'activité antibactérienne et nature chimique des extraits de *Fraxinus angustifolia* :

IV.2.1. Diffusion sur milieu gélosé :

L'aromatogramme, n'est que l'antibiogramme classique, utilisée en bactériologie médicale, et qui a été modifié pour les besoins de la phytothérapie par le docteur M. Girault. À l'instigation de l'OMS, un groupe d'experts a défini les principes qu'il convient de respecter pour la standardisation de l'antibiogramme, ceux-ci doivent être transposés à l'aromatogramme dans la mesure du possible (**Belaïche, 1979 ; Cheryl et al., 2002**). L'antibiogramme, méthode de diffusion sur milieu gélosé ou encore méthode des disques est une méthode biologique de criblage à aspect qualitatif, décrite par différents auteurs dans l'étude de l'activité antibactériennes tel que (**Lopez et al., 2001 ; Falleh et al., 2008 ; El Amraoui et al., 2010 ; Athamena et al. 2010 ; Anja Klancnik et al., 2010**).

Cette partie de notre travail a pour but de tester l'activité antibactérienne des cinq extraits/ éthanolique, acétate d'éthyl, aqueux acétate d'éthyl, chloroforme et aqueux chloroforme de *F.angustifolia*, ceci vis-à-vis de 5 souches Gram (+) et 5 souches Gram (-). Pour cela on a choisi la méthode de diffusion sur milieu gélosé (disques) couramment utilisée pour la mise en évidence de la présence ou absence d'une activité antibactérienne des extraits de plantes médicinales (**Choma et Grzelak, 2011**).

Afin de garantir la diffusion de l'agent antibactérien et une bonne croissance du microorganisme. La gélose Mueller-Hinton à pH=7.2-7.4 avec une couche d'épaisseur de 4mm ont été utilisés, selon les recommandations du NCCLS (**Cheryl et al., 2002**).

Une solution standard McFarland 0.5 est utilisée pour ajuster la turbidité de l'inoculum de chaque souche (**Michel, 2004**), un inoculum trop dense peut masquer l'effet antibactérien et mener à un résultat faussement négatif d'autre part un inoculum trop faible peut donner un tapis irrégulier et conduire à un résultat faussement positif (**Cheryl et al., 2002**).

Le choix du solvant est aussi important, selon l'étude comparative entre différents solvants utilisés habituellement lors du criblage de l'activité antibactérienne à partir des extraits de plantes (**Eloff, 1998**), il s'est avéré que le méthanol a l'avantage d'être plus volatil et moins toxique pour la cellule bactérienne. Pour ceux, les extraits *F.angustifolia* ont été dissous dans du méthanol à raison de 5mg/ml.

Les boîtes de Pétri fin prêtes, sont mise à 4C° pendant 2h avant incubation, ceci pour optimiser la diffusion des extrait à travers la gélose.

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits de *F.angustifolia* sur les différentes souches sont exprimés en termes de diamètre de zones d'inhibition et représentés sous forme de tableau pour chacune d'elles.

IV.2.1.1. Effet antibactérien des extraits de *F.angustifolia* sur *Klebsiella pneumoniae*

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont donnés dans le tableau VII et leurs aspects sont montrés dans la figure N°7 en annexes.

Tableau VII : Activités des extraits de *F. angustifolia* sur *Klebsiella pneumoniae*.

Extraits (5mg/ml)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
	Ecorce	Feuilles
Ethanolique	12,06 ± 0,11	11,67 ± 0,57
Ethyle acétate	12,33 ± 0,57	11,00 ± 0,2
Aqueux éthyle acétate	10,00 ± 1	10,10 ± 0,1
Chloroforme	11,67 ± 1,52	11,00 ± 1
Aqueux chloroforme	11,33 ± 1,52	10,00 ± 1
Méthanol (blanc)	10,67 ± 1,15	09,33 ± 0,57

Les résultats du tableau ci-dessus démontrent le faible pouvoir inhibiteur des extraits de *F.angustifolia* à l'égard de *Klebsiella pneumoniae* avec des zones de 12,33 mm et 12,06 mm des extraits acétate d'éthyle et éthanolique de l'écorce, respectivement, qui correspondent à 1,66 et 1,39mm de différence avec le la zone du méthanol, de même, pour les extraits chloroforme et acétate d'éthyle des feuilles avec une valeur de 11mm (1,67mm) pour chacun. Par contre on a noté que l'extrait éthanolique des feuilles est le seul à avoir donné un effet considérable sur *K.pneumoniae* avec un diamètre de 11,67 (2,34mm). Suite à ces résultats obtenus on peut apprécier l'effet inhibiteur de la partie feuille de *F.angustifolia* vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae*.

Certains extraits ont montré un petit halo de croissance de 1 à 2mm autour du disque identique au reste du tapis bactérien, suivi d'une nette zone d'inhibition, ceci s'explique par le fait que ces extraits soient un mélange de plusieurs composés, actifs ou non, de poids moléculaires variables qui diffusent à travers la gélose vers des points différents.

Les extraits méthanoliques de *Jangsusu*, *Bulkeunchalsusu* et *Neulsusu* à 5mg/ml, ont montré des zones d'inhibition allant de 9 à 10,5 mm de diamètre envers *K.pneumoniae* (Kil et al., 2009). Comparés aux résultats obtenus, les extraits éthanoliques des feuilles et écorce de *Fraxinus angustifolia* se sont avérés être plus actifs envers la même souche.

IV.2.1.2. Effet antibactérien des extraits de *F.angustifolia* sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont donnés dans le tableau N°VIII et leurs aspects sont montrés dans la figure N°8 en annexes.

Tableau N°VIII : Activité antibactérienne des extraits de *F.angustifolia* vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*.

Extraits (5mg/ml)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
	Ecorce	Feuilles
Ethanolique	11,67 ± 1,52	13,00 ± 1,73
Acétate d'éthyle	12,33 ± 0,57	12,00 ± 1,73
Aqueux acétate d'éthyle	10,67 ± 1,15	11,00 ± 2
Chloroforme	12,00 ± 1	12,67 ± 1,52
Aqueux chloroforme	11,33 ± 1,52	11,33 ± 1,52
Méthanol (blanc)	10,33 ± 1,54	10,33 ± 1,52

En tenant compte de l'effet inhibiteur du méthanol, seuls les extraits éthanolique et chloroforme des feuilles ainsi que celui l'acétate d'éthyle de l'écorce ont donné un effet inhibiteur significatif sur *Pseudomonas aeruginosa*, avec des zones d'inhibitions de 13mm (2,67mm), 12,67 mm (2,34mm) et 12,33mm (2mm), successivement. On a aussi noté un faible pouvoir inhibiteur des extraits chloroforme de l'écorce et acétate d'éthyle des feuilles avec un diamètre d'inhibition de 12mm (1,67mm) pour chacun d'eux. Ceci nous mène à déduire que les extraits organiques de *Fraxinus angustifolia* présentent un meilleur effet inhibiteur sur *Pseudomonas aeruginosa* comparés aux extraits aqueux.

La quercétine et catéchine isolées des extraits de plantes Finlandaises, testées 5mg/ml, ont donné un effet inhibiteur considérable sur *P.aeruginosa* (1 à 3mm > méthanol) (Rauha et al., 2000), comparable à celui obtenu par *F.angustifolia*, dont la composition chimique en métabolites secondaires rapporte l'existence de ces molécules. De plus, l'étude rapportée par Kostova. (2001) sur différents extraits et composés majeurs de l'écorce de *F.ornus L.*,

(coumarines), a montré que ces derniers n'avaient aucun effet inhibiteur sur *P.aeruginosa*. Ce qui nous laisse supposer que les résultats obtenus sur *P.aeruginosa* seraient dus à d'autres constituants.

IV.2.1.3. Effet antibactérien des extraits de *F.angustifolia* contre *Salmonella typhimurium*.

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont donnés dans le tableau VIX et leurs aspects sont montrés dans la figure N°9 en annexes.

Tableau VIX : Activité antibactérienne des extraits de *F.angustifolia* vis-à-vis de *Salmonella typhimurium*.

Extraits (5mg/ml)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
	Ecorce	Feuilles
Ethanolique	11,33 ± 1,15	08,00 ± 1,41
Acétate d'éthyle	12,67 ± 1,15	11,67 ± 1,15
Aqueux éthyle acétate	10,67 ± 1,15	10,33 ± 1,15
Chloroforme	12,33 ± 1,15	11,33 ± 1,15
Aqueux chloroforme	13,00 ± 1,15	12,67 ± 2,08
Méthanol (blanc)	11,67 ± 0,57	11,67 ± 0,57

Les résultats du tableau montrent une nette résistance de *Salmonella* à l'égard de la majorité des extraits des deux parties de la plante, on a seulement noté de faibles diamètres d'inhibition par les extraits acétate d'éthyle et aqueux chloroforme de l'écorce avec des zones 12,67mm (1mm) et 13mm (1,33mm) respectivement, ainsi que celui de l'aqueux chloroforme de la partie feuille avec 12,67mm (1mm).

En soustrayant la zone d'inhibition du solvant utilisé comme contrôle, **Proestos et al., (2006)** ont conclu que les extraits de la fleur de *Jasminum officinalis* (Oleaceae) contenant (acide gallique, l'acide *p*-coumarique et la quercétine) n'ont montré aucun effet inhibiteur sur la croissance de *S.enteridis* PT4. Ce qui nous permet de dire que *F.angustifolia* a exercé un petit effet inhibiteur sur cette souche comparé à *J.officinalis*.

IV.2.1.4. Effet antibactérien des extraits de *F.angustifolia* sur *Shigella flexneri*.

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont donnés dans le tableau X et leurs aspects sont montrés dans la figure N°10 en annexe.

Tableau X : Activité antibactérienne des extraits de *F.angustifolia* contre *Shigella flexneri*.

Extraits (5mg/ml)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
	Ecorce	Feuilles
Ethanolique	13,33 ± 1,52	12,26 ± 0,64
Ethyle acétate	13,50 ± 0,70	12,67 ± 0,57
Aqueux éthyle acétate	10,67 ± 1,52	11,26 ± 0,64
Chloroforme	16,00 ± 2	12,33 ± 0,57
Aqueux chloroforme	10,67 ± 1,15	11,00 ± 1
Méthanol (blanc)	11,00 ± 1	10,67 ± 0,57

Les résultats du tableau X indiquent clairement, que parmi tous les extraits des feuilles de *F.angustifolia* seul l'extrait acétate d'éthyle a montré un effet considérable sur *S. flexneri* avec une zone 12,67mm (2mm) alors que les extraits éthanolique et chloroforme ont montré de faibles activités avec 12,26mm (1,59mm) et 12,33mm (1,66mm), respectivement.

L'extrait du chloroforme de l'écorce de *F.angustifolia* a révélé une très bonne activité vis-à-vis de cette souche avec une zone d'inhibition de 16mm (5mm), et ceux de l'acétate d'éthyle et éthanolique ont montré un effet antibactérien considérable avec des zones d'inhibitions de 13, 50mm (2,5mm) et 13,33mm (2,33mm), respectivement. Ces résultats permettent déduire que les extraits organiques de l'écorce de *F.angustifolia* sont les plus actifs sur *Shigella flexneri*.

Les résultats obtenus correspondent à ceux décrits par **Ngameni et al.(2009)**, qui a mis en évidence l'effet antibactérien des furocoumarines de *Dorstenia turbinata* (Moraceae) sur autre espèce *S.dysenteriae*, avec des zones d'inhibition allant de 8 à 15mm, ce qui pourrait relier les résultats obtenus, à des composés de la classe des coumarines probablement concentré dans l'extrait chloroforme de *F.angustifolia*. D'autres part, les extraits de feuilles de *Camellia sinensis* et *Lawsonia inermis* ont montré des zones d'inhibition de 14 et 12 mm respectivement, vis-à-vis de souches de *Shigella* résistantes aux β -lactamase (**Iqbal et Farrukh, 2006**),

IV.2.1.5. Effet antibactérien des extraits de *F.angustifolia* à l'égard de *Vibrio cholerae*.

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont donnés dans le tableau XI et leurs aspects sont montrés dans la figure N°11 en annexes.

Tableau XI: Activité antibactérienne des extraits de *F.angustifolia* à l'égard de *Vibrio cholerae*

Extraits (5mg/ml)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
	Ecorce	Feuilles
Ethanolique	12,00 ± 1,73	12,25 ± 0,35
Ethyle acétate	11,16 ± 0,28	12,67 ± 1,15
Aqueux éthyle acétate	09,00 ± 1	09,33 ± 0,57
Chloroforme	10,33 ± 1,52	12,33 ± 0,57
Aqueux chloroforme	12,00 ± 1	12,33 ± 1,15
Méthanol (blanc)	11,00 ± 1	10,00 ± 1

Les résultats du tableau ci-dessus démontrent la résistance de *Vibrio cholerae* envers tous les extraits de *F.angustifolia* écorce. En effet, on a noté une faible activité des extraits éthanoliques et aqueux chloroforme avec des zones d'inhibition de 12mm (1mm) pour chacun d'eux.

Cependant les extraits de feuilles de *F.angustifolia* se sont révélés considérablement actifs envers cette souche avec des zones de 12,67mm (2,67mm) et 12,25mm (2,25mm) de diamètre pour les extraits d'acétate d'éthyl et d'éthanol, successivement et de 12,33mm (2,33mm) pour les extraits chloroforme et aqueux chloroforme.

IV.2.1.6. Activité antibactérienne des extraits de *F.angustifolia* à l'égard de *Bacillus subtilis* (NCCB 1090).

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont donnés dans le tableau XII et leurs aspects sont montrés dans la figure N°12 en annexes.

Tableau XII : Activité antibactérienne des extraits de *F.angustifolia* sur *Bacillus subtilis* (NCCB 1090).

Extraits (5mg/ml)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
	Ecorce	Feuilles
Ethanolique	12.00 ± 1	11.67 ± 1.52
Acétate d'éthyle	11.00 ± 1.73	13.33 ± 0.57
Aqueux éthyle acétate	10.66 ± 1.52	11.00 ± 1
Chloroforme	12.67 ± 1.52	12.00 ± 2
Aqueux chloroforme	12.00 ± 1	12.33 ± 0.57
Méthanol (blanc)	10.67 ± 1.52	13.67 ± 1.52

Les résultats du tableau ci-dessus montrent qu'aucun des extraits des feuilles de *F.angustifolia* n'a un effet inhibiteur sur *Bacillus subtilis*. Par contre, les extraits de **l'écorce** ont montrés un pouvoir inhibiteur sur la croissance de cette souche, bien qu'ils soient que significatif, l'effet le plus important est attribués à l'extrait chloroforme avec 12.67mm (2mm), suivi de l'extrait aqueux chloroforme et éthanolique avec 12mm (1.33 mm) pour les deux.

IV.2.1.7. Effet antibactérien des extraits de *F.angustifolia* à l'égard de *Bacillus subtilis* (ATTCC 6633).

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont donnés dans le tableau XIII et leurs aspects sont montrés dans la figure N°13 en annexes.

Tableau XIII : Activité antibactérienne des extraits de *F.angustifolia* sur *Bacillus subtilis* (ATTCC 6633).

Extraits (5mg/ml)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
	Ecorce	Feuilles
Ethanolique	10.03 ± 0,15	13.33 ± 0.57
Ethyle acétate	10.67 ± 0.57	13.00 ± 1
Aqueux acétate d'éthyle	11.67 ± 0.57	13.00 ± 1
Chloroforme	13.33 ± 0.57	13.67 ± 0.57
Aqueux chloroforme	12.00 ± 1.73	13.00 ± 1.73
Méthanol (blanc)	11.00 ± 0,2	12.00 ± 1.73

B.subtilis s'est montré résistant à l'égard de tous les extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*, sauf pour les extraits éthanolique et chloroforme ou on a noté une faible activité

inhibitrice avec des zones 13,33mm (1,33mm) et 13,67mm (1,67mm) successivement .Sur tous les extraits d'écorce, seul l'extrait chloroforme a donné une activité antibactérienne significative vis-à-vis de *Bacillus subtilis* avec une zone d'inhibition de 13,33mm (2,33mm).

IV.2.1.8. Effet antibactérien des extraits de *F.angustifolia* à sur *Staphylococcus aureus*.

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont donnés dans le tableau XIV et leurs aspects sont montrés dans la figure N°14 en annexes.

Tableau XIV: Activité antibactérienne des extraits de *F.angustifolia* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Extraits (5mg/ml)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
	Ecorce	Feuilles
Ethanolique	10.33 ± 0.35	12.70 ± 1.75
Acétate d'éthyle	10.50 ± 0.7	11.00 ± 1.73
Aqueux acétate d'éthyle	11.33 ± 1.52	11.00 ± 1
Chloroforme	14.67 ± 1.15	12.33 ± 1.52
Aqueux chloroforme	12.60 ± 0.52	12.50 ± 0.7
Méthanol (Blanc)	11.67 ± 0.68	11.67 ± 0.57

Les résultats du tableau traduisent la sensibilité de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis de l'extrait chloroforme de la partie écorce avec un diamètre de 14,67mm (3mm). Contrairement aux extraits de feuilles qui n'ont montré qu'une faible activité, avec une zone de 12,70 mm (1mm) pour l'extrait ethanolique.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Kostova et Iossifova. (2007)**, qui a exposé l'effet des extraits aqueux de l'écorce de *F.orinus* et *Excelsior* L avec un diamètre d'inhibition de 13mm vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. Selon **Kostova. (2001)**, la fraxine et fraxetine retrouvées chez *F.ornus* L (écorce) ont exhibé un effet inhibiteur sur *S.aureus* ; ces composés rapportés dans la composition phytochimique de *F.angustifolia* laissent supposés qu'ils sont impliqués dans cette effet inhibiteur des extraits de *F.angustifolia*.

IV.2.1.9. Effet antibactérien des extraits de *F.angustifolia* à l'égard *Staphylococcus aureus* (SARM).

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont rapportés dans le tableau XV et leurs aspects sont montrés dans la figure N°15 en annexes.

Tableau XV : Activité antibactérienne des extraits de *Fraxinus angustifolia* à l'égard de la SARM.

Extraits (5mg/ml)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
	Ecorce	Feuilles
Ethanolique	13,00 ± 1.41	11,00 ± 1
Ethyle acétate	12.67 ± 1.52	10.33 ± 1.15
Aqueux éthyle acétate	09.33 ± 1.52	10,00 ± 1
Chloroforme	15.50 ± 0,5	10.67 ± 0.57
Aqueux chloroforme	11.67 ± 0.57	10,00 ± 1
Méthanol (blanc)	10.33 ± 1.15	10,00 ± 1

Les résultats du tableau ci-dessus reflètent la sensibilité de *S.aureus* (SARM) vis-à-vis de l'extrait chloroforme de l'écorce avec un diamètre de 15,5mm (5,17mm). Les extraits acétate d'éthyle et éthanolique se sont révélés moins actifs avec des zones de 12,67mm (2,34mm) et 13mm (2,67mm) successivement. En revanche, les extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia* n'ont aucun effet inhibiteur sur *S.aureus* méticilline résistante.

Selon l'étude menée par **Moghadam et al. (2010)**, toutes les souches de *S.aureus* (methicilline et cefixine résistantes) se sont montrées insensibles à l'extrait éthanolique (50mg/ml, partie aérienne) de *Oliveira decumbens* (*Umbelliferae*) et *Salvia officinalis* (*Lamiaceae*) ainsi que celui de *Vitex pseudo negundo* (*Lamiaceae*, graines).

Les travaux de **Pesewu et al. (2008)**, sur l'activité antibactérienne des plantes médicinales du Ghana ont montré que l'extrait chloroforme de *Psidium guajava* (*Myrtaceae*) a donné une zone d'inhibition de 16mm vis-à-vis de *S.aureus* (SARM), comparable à celui obtenu par *F.angustifolia*. Cependant l'extrait éthanolique de *P.guajava* s'est révélé plus actif avec une zone d'inhibition de 20 mm de diamètre.

IV.2.2.0. Activité antibactérienne des extraits de *F.angustifolia* à l'égard *Listeria innocua*.

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont donnés dans le tableau XVI et leurs aspects sont montrés dans la figure N°16 en annexes.

Tableau XVI : Activité antibactérienne des extraits de *F.angustifolia* sur *Listeria innocua*.

Extraits (5mg/ml)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
	Ecorce	Feuilles
Ethanolique	13.00 ± 1	11.00 ± 1.73
Acétate d'éthyle	12.00 ± 1.73	11.67 ± 0.57
Aqueux éthyle acétate	12.33 ± 0.57	12.33 ± 1.52
Chloroforme	14.67 ± 1.15	11.50 ± 0,7
Aqueux chloroforme	13.00 ± 1	13.00 ± 1
Méthanol (Blanc)	11.67 ± 0.57	11.33 ± 1.15

Listeria innocua s'est montrée résistante à la plupart des extraits de *Fraxinus angustifolia*. On a noté de faibles zones d'inhibition des extraits aqueux chloroforme de la feuille 13mm (1,67mm), ethanolique et aqueux chloroforme de l'écorce avec 13mm (1,33mm) chacun. Par contre, l'extrait chloroforme (écorce) a inhibé la croissance de *L.innocua* en montrant une zone de 14,67 mm (3mm) de diamètre.

Ces résultats vont en accord avec ceux obtenus par **Proestos et al.(2006)**, en effet ils ont mis en évidence l'effet inhibiteur des extraits de *J.officinalis* (Oleaceae) sur la croissance de *Listeria monocytogenes*.

La variation de l'activité inhibitrice vis-à-vis des Gram (+) et Gram (-) est généralement attribuées à la différence de composition de leurs paroi, de sorte que celle des Gram(-) soit plus complexe et moins perméable. les Gram (-) sont plus résistantes aux antibiotiques et causent de sérieuses infection pour l'Homme (**Esterhuizen et al., 2006**)

IV.2.2. Nature chimique de l'extrait aqueux chloroforme et ses fractions chromatographiques, de l'écorce et feuilles de *Fraxinus angustifolia* développés et révélés sur CCM :

Des chromatographies sur couche mince (CCM) des extraits aqueux de chloroforme ainsi que leurs fractions chromatographiques des deux parties de la plante, collectées par une chromatographie sur colonne de gel de Sephadex LH-20 et de quelques standards ont été réalisées ; la pulvérisation de la vanilline sulfurique ainsi que la *p*-anisaldéhyde ont permis de visualiser les différentes bandes.

Le gel de sephadex LH-20 est utilisé pour la séparation et la purification des substances naturelles qui nécessitent des solvants organiques pour rester à l'état soluble, il a une forte sélectivité pour des composés aromatiques. Le gel LH-20 est un polymère de dextrane hydroxypropyle, il a la particularité de gonfler dans l'eau et les solvants organiques, ainsi le diamètre moyen des billes sèches est de 18-111µm, sa limite d'exclusion est 4KDa (**Wagman et cooper, 1989**).

Pour séparer les différents composants de cette extrait aqueux de chloroforme des écorces et feuilles de *Fraxinus angustifolia* et leurs fractions respectives, un système à quatre solvants a été choisi : Acétate éthyle / Acide formique / Acide acétique / Eau : (100/11/11/26), car la qualité de la séparation de ce système était meilleure.

IV.2.2.1. Résultats de la CCM de l'extrait de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*, ses fractions chromatographiques et quelques standards révélés à la vanilline sulfurique et l'anisaldéhyde sulfurique.

Les chromatogrammes sont montrés dans les figures N°17, N°18 et N°19:

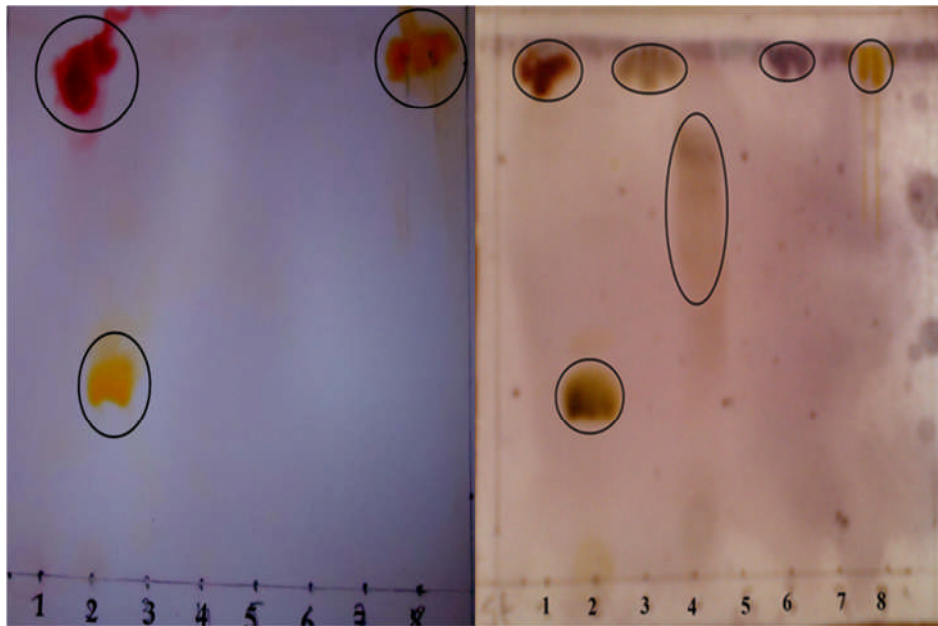


Figure N° 17 : Chromatogramme des standards pulvérisés à la vanilline sulfurique et l’anisaldéhyde .1 : Catéchine. 2 : Rutine. 3 : Acide gallique. 4 : Acide tannique. 5 : Acide cinnamique. 6 : Acide caféique. 7 : Acide *p*-coumarique. 8 : Quercétine.

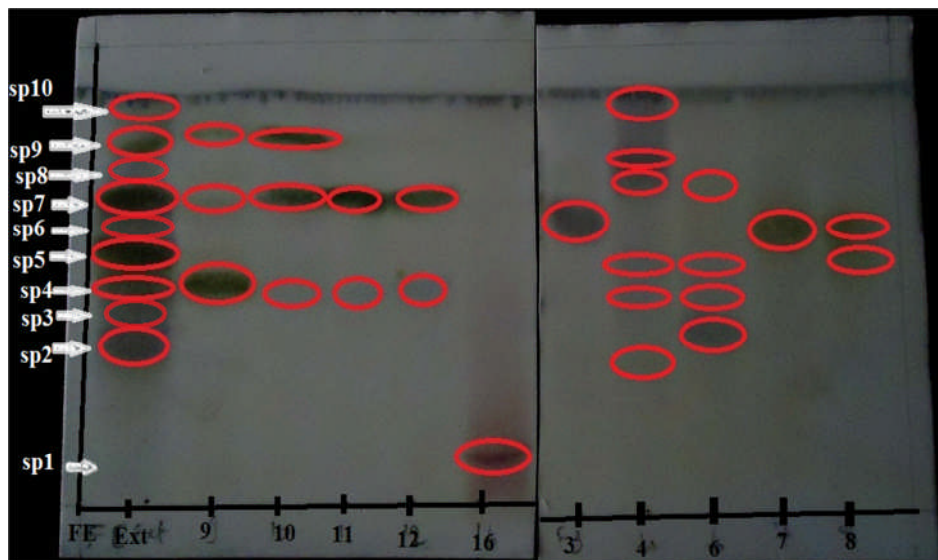


Figure N° 18 : Chromatogramme de l’extrait aqueux de chloroforme d’écorce et ses fractions pulvérisés à la vanilline sulfurique ; Ext : Extrait aqueux de chloroforme. Fractions chromatographiques : 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 16.Sp : Spot.

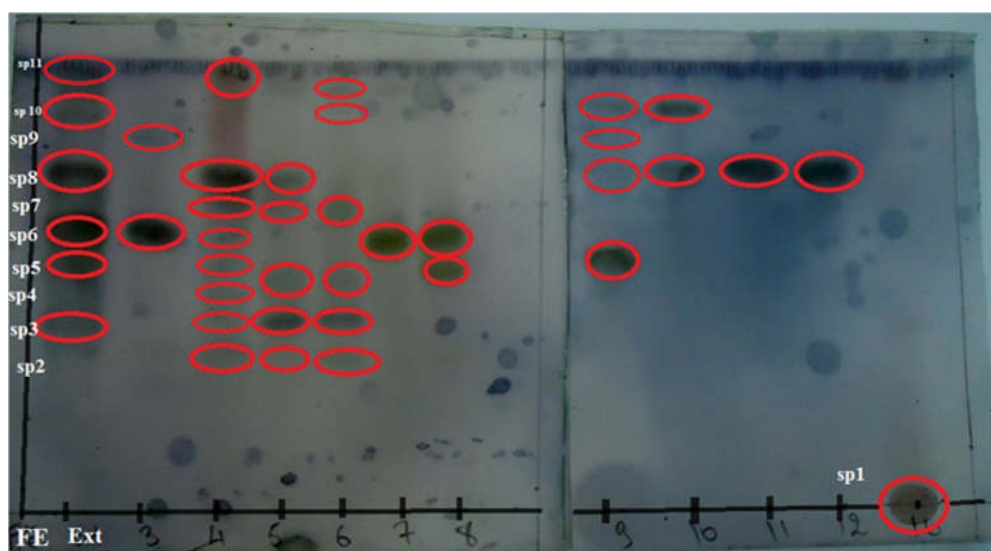


Figure N° 19 : Chromatogramme de l'extrait aqueux de chloroforme d'écorce et ses fractions pulvérisés à l'anisaldehyde. Extrait aqueux de chloroforme. Fractions chromatographiques : 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 16. Sp : Spot

La figure N°17 montre que trois standards parmi les huit utilisés ont été mis évidence par la vanilline sulfurique, à savoir : la catéchine, la rutine et la quercétine avec de différents rapports frontaux et différentes couleurs : rouge, jaune et orange, respectivement.

L'image N°18 montre que l'extrait aqueux de chloroforme après vaporisation de la vanilline sulfurique possède 10 spots de divers rapports frontaux, ce qui implique sa richesse en composés, qui se sont séparés par le gel de séphadex LH-20 à travers les différentes fractions un nombre moindre de spots. La fraction N° 4 montre 6 spots, la N°6 montre 4 spots, les fractions N°9 et N° 10 montrent 3 spots chacune, les N°11, N°12 et N°8 montrent deux spots et les N°3, N°7 et N°16 ne montrent qu'un seul spot.

Certains spots se sont révélés communs à différentes fractions avec une même couleur mais d'intensité variable indiquant une différence de concentration de ce composé dans ces fractions, tel est le cas du spot 4 dans les fractions N°4, N°6, N°9, N°10, N°11 et N°12 .

Le spot 5 qui est retrouvé dans les fractions N°4, N°6, N°7 et N°8 avec des rapports frontaux proches et montre la même couleur sous la vanilline ceci indique que ce spot s'est retrouvé plus concentré dans la fraction N°8.

Le spot 7 s'est caractérisé dans les fractions N°9, N°10, N°11, et N°12 avec le même rapport frontal et une intensité maximale dans la fraction N°11. Le spot 8 est commun aux fractions N°4 et N°6 avec de légères variations de rapports frontaux et d'intensité.

Le spot 9 s'est caractérisé dans les fractions N°9 et N°10 avec la même couleur et rapport frontal mais d'intensité différente. Cependant, le spot 10 s'est seulement révélé être présent dans la fraction N°4, il en est de même pour les spots 2, 3 et 6 qui se sont distingués dans les fractions N°4, N°6 et N°3, successivement.

Le spot 1 quant à lui s'est révélé dans la fraction N°16 mais n'est pas retrouvé dans l'extrait, il se trouve correspondre en couleur (rouge) avec la catéchine (figure N°17) mais différant en rapport frontal de celle-ci ; ce qui nous laisse supposer que ce soit un dérivé de la catéchine.

Les couleurs mise en évidence par la vanilline sulfurique correspondent respectivement aux terpènes (Violet), les cardénolides aglycones (bleu) et flavonoïdes (jaunes à vert) (**Jork et Wimmer, 2004**) le spot 4 de couleur jaune vert et de même rapport frontal que la rutine (figure N°17) laisse alors supposé la présence de la rutine et/ou ses dérivés dans les fractions N°4, N°6, N°9, N°10, N°11 et N°12 et par conséquent dans l'extrait aqueux chloroforme de l'écorce de *F.angustifolia* .

Les bandes de couleur violette révélés par la vanilline au niveau des fractions N°4 et N°6 ainsi que dans l'extrait, peuvent correspondre aux terpènes (**Jork et Wimmer, 2004**). Il a été rapporté par la littérature la présence de séco-iridoïdes qui sont des monoterpènes dans la partie écorce de *Fraxinus angustifolia* .Ceci permet de supposer que ces bandes violettes soient des composés de cette classe.

La figure N°17 montre que six standards ont été mis évidence par l'anisaldéhyde, à savoir : la catéchine, la rutine, l'acide gallique, l'acide tannique, l'acide caféique et la quercétine, comparé à la vanilline.

La figure N°19 montre que l'extrait aqueux de chloroforme des écorces de *Fraxinus angustifolia*, après révélation par l'anisaldéhyde, six spots de divers rapports frontaux, moins que ce qu'on a obtenu par révélation à la vanilline sulfurique. La fraction N° 4 de cette extrait a montré un plus grand nombre de spots (8 spot), la fraction N° 6 avec 6 spots, la fraction N°5 et la fraction N°9 ont montrées 5 et 4 spots, respectivement d'intensité et de couleur variable.

Les fractions N°3, N°8 et N°10 ont montré deux spots chacune, et enfin les fractions N°7, N°11 et N°12 n'ont montré qu'un seul spot chacune. Certains spots se sont répété dans plusieurs fractions avec les mêmes rapports frontaux et d'intensité de couleur variable, tel que le spot 3 dans la fraction N°4, N°5, et N°6

Les fractions N°4, N°5, N°6, N°7, N°8, et N°9 présentent toutes des bandes de couleurs vert jaune d'intensité différentes ce qui laisse supposer qu'elles soient riches en flavonoïdes ; le spot 2 a révélé trois bandes dans les fractions N°4, N°5 et N°6 de couleur vert clair à jaune et de même rapport frontal que la rutine, ceci associé aux résultats de la révélation par la vanilline suggère fortement la présence de la rutine dans la fraction N°4 .

La fraction N°4 a montré une bande (spot 11) de même couleur et rapport frontal que la catéchine ce qui inclue une forte probabilité que ce soit la catéchine. De même que pour la révélation par la vanilline celles par l'anisaldéhyde à désigner la fraction N° 16 comme susceptible de contenir de la catéchine. En comparant avec les résultats de **Males et al. (1998)**, sur l'étude des flavonoïdes de *Guiera senegalensis* sur CCM avec le système acétate d'éthyle: acide formique: acide acétique : Eau (100:11:11:27), on remarque une très nette ressemblance des rapports frontaux obtenus par les composés 6 et 7 qui correspondent à des flavonoïdes glycosylés avec le spot 10, ce qui laisse suggérer que ce soit des dérivés de flavonoïdes. Le spot 8 présent dans l'extrait et la plus part des fractions, a donné des bandes de même couleur et rapport frontal à différentes concentrations que celle de l'acide tannique (figure N°17), révélé par l'anisaldéhyde, ce qui permet de suggérer que ce spot corresponde à un dérivé de l'acide tannique.

IV.2.2.2. Résultats de la CCM de l'extrait des feuilles de *Fraxinus angustifolia*, ses fractions chromatographiques et quelques standards révélés à la vanilline sulfurique et l'anisaldéhyde:

Le chromatogramme de l'extrait aqueux de chloroforme des feuilles de *Fraxinus angustifolia* et ses fractions chromatographiques révélés par la vanilline sulfurique et l'anisaldéhyde sont montrés dans les figures N°20 et N°21.

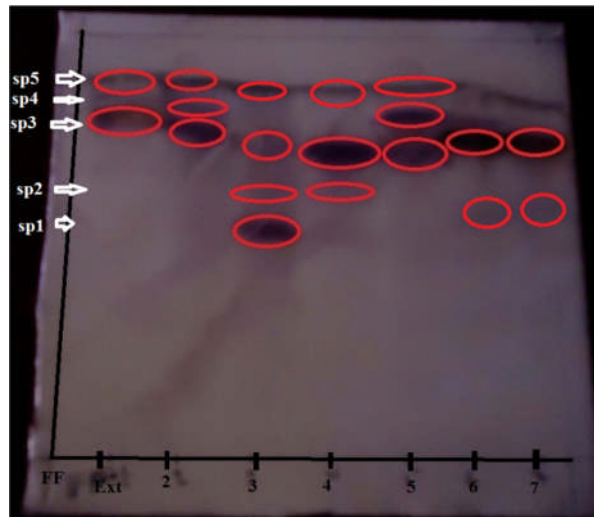


Figure N°20 : Chromatogramme de l'extrait aqueux de chloroforme des feuilles et ses fractions pulvérisé à la vanilline sulfurique. Ext : extrait aqueux du chloroforme. Fractions : 2, 3, 4, 5, 6 et 7 de l'extrait aqueux. Sp : Spot.

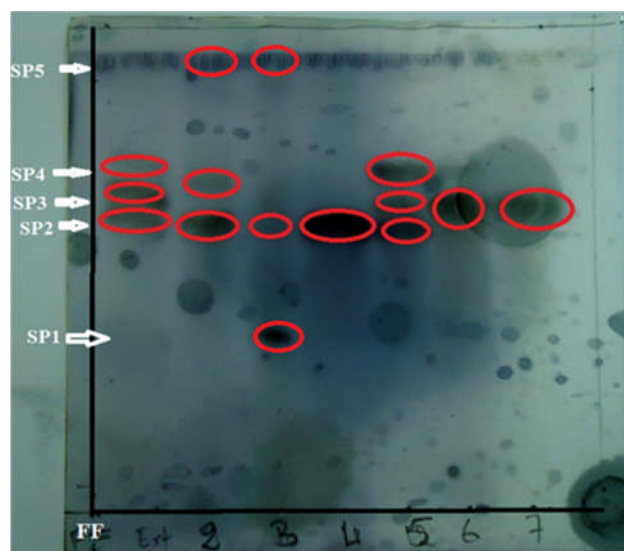


Figure N° 21 : Chromatogramme de l'extrait aqueux de chloroforme des feuilles et ses fractions pulvérisé à l'anisaldehyd. Ext : extrait aqueux du chloroforme. Fractions : 2, 3, 4, 5, 6 et 7 de l'extrait aqueux. Sp : Spot.

La figure N°20 montre que l'extrait aqueux chloroforme de la feuille de *F.angustifolia*, après vaporisation par la vanilline sulfurique, ne révèle que deux bandes d'intensité et de couleur différentes.

La fraction N°3 présente 4 spots de diverses intensités. De même que pour les fractions N°2, N°4 et N°5, qui montrent trois bandes caractéristiques à chacun. Pour finir, on a noté que les fractions 6 et 7 n'ont montré que deux spots.

Le spot 3 s'est révélé dans toutes les fractions avec différentes intensités de couleur, mais avec un même rapport frontal. Ainsi que pour le spot 5 qui a été relaté dans les fractions N°2, N°3, N°4 et N°5.

Le spot 2 révélé par la vanilline n'est pas présent dans l'extrait, il a été seulement révélé dans les fractions N°3 N°4 N°6 et N°7 avec la même couleur et rapport frontal. Ceci est dû à la concentration de ce spot dans les fractions respectives. Il est de même pour le spot 1 non révélé dans l'extrait, mais présent dans la fraction N°3, ainsi que le spot 4 qui s'est révélé dans les fractions N°2 et N°5.

La figure N° 20 montre que le spot 3 présent dans l'extrait et la fraction N°7 semble avoir à peu près la même couleur que la quercétine du standard (figure N°17) avec le même rapport frontal. Ce qui laisse supposé la présence de dérivé quercétine dans les feuilles de *Fraxinus angustifolia* été rapportée par quelques auteurs (**Kostova et Iossifova, 2007 ; Lee et al., 2012**).

Les Cinq spots obtenus par l'extrait de feuilles possèdent des bandes caractéristiques de couleur violette semblables à celle décrites dans le chromatogramme de l'écorce mais en nombre plus important, quant à la nature de ces composés on peut donc apporter les mêmes suggestions, il s'agirait de monoterpènes, notamment de séco-iridoïde. Selon **Sharma et (1998)** le catéchol (pyrocatechol) donne une couleur violette par la vanilline sulfurique, avec le même rapport frontal que le spot 1 dans la fraction N°3, ceci peut être une indication de la présence de ce type de composé dans cette fraction et l'extrait aqueux.

La figure N° 21 montre que l'extrait aqueux chloroforme révélé par l'anisaldéhyde possède que trois spots caractéristiques. Les fractions N°2, N°3 et N°5 ont révélé chacune trois spots de couleur et d'intensité variable avec des rapports frontaux bien distincts.

Le spot 3 de l'extrait et fraction N°5, N°6 et N°7 ont montré des bandes de même couleur et rapport frontal que le l'acide tannique révélé par l'anisaldéhyde ce qui nous laisse suggéré que ce spot soit un acide phénol.

IV.2.3. Etude de l'activité antibactérienne des extraits et des fractions chromatographiques de l'écorce et des feuilles de *Fraxinus angustifolia* par la méthode bioautographique :

La méthode de bioautographie pressante d'avantage d'être rapide, mais elle a aussi ses limites comme toute autres méthodes de criblages de l'activité antibactérienne, l'influence de la nature du microorganisme testé, pH et composition du milieu ainsi que la difficulté de la standardisé (Choma et Grzelak, 2011) ce qui augmente la difficulté de ça mis au point.

Bioautographie sur les souches *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* : Les figures ci-dessous montrent les profils bioautographiques obtenus avec les deux souches et pour les molécules standards (figure N°22), des extraits (figure N°23 et N°26) et les fractions (Figure : N°24, N°25 et N°27) des deux parties étudiées de *Fraxinus angustifolia*. Les chromatogrammes utilisés sont préparés de la même façon que ceux utilisés pour l'étude phytochimique.

- Bioautographie sur la partie écorce :

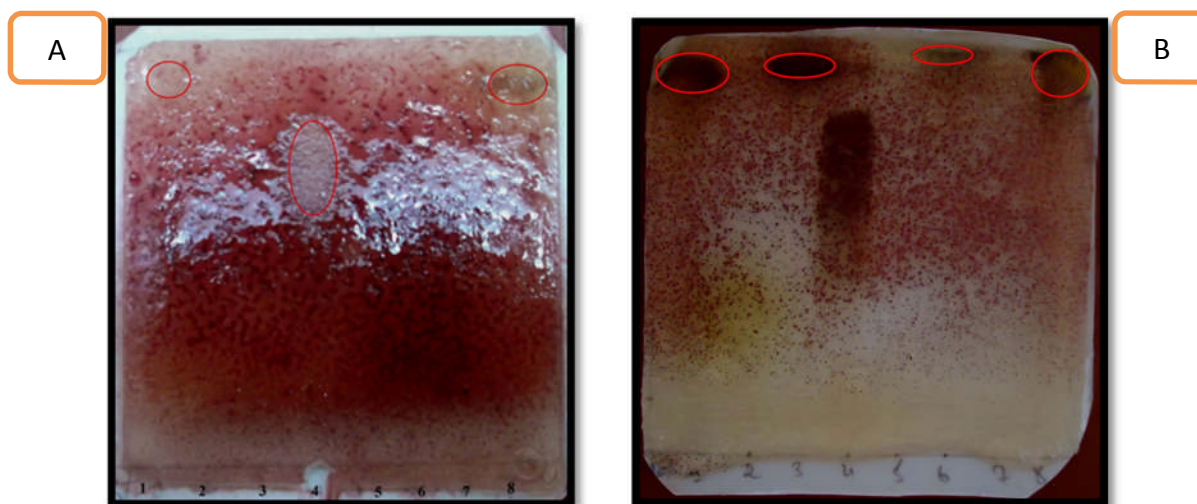


Figure N°22 : Chromatogramme des standards des deux souches. A : 1:catéchine, 2:acide gallique, 3:acide caféique, 4:acide tannique, 5:acide cinnamique, 6:rutine, 7: acide *p*-coumarique, 8: quercétine. Sur *P. aeruginosa*. B : 1: catéchine, 2: rutine, 3: acide gallique, 4: acide tannique, 5: acide cinnamique, 6: acide caféique, 7: acide *p*-coumarique, 8: quercétine. Sur *S.aureus*.

La figure N°22 B permet de voir que les standards catéchine, acide gallique, acide caféique et quercétine ont montré un effet inhibiteur vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, et les standards catéchine, acide tannique et quercétine sur *Pseudomonas aeruginosa* (figure N°22 : A), s'exprimant par une zone claire qui indique une absence de croissance.

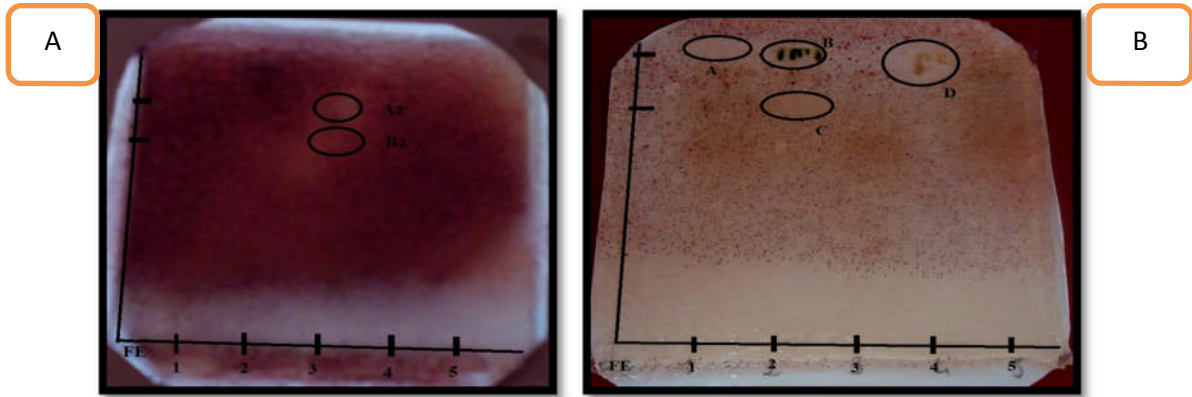


Figure N°23 : Chromatogramme des extraits d'écorce de *F.angustifolia*. 1: éthanolique, 2: acétate d'éthyle, 3: aqueux acétate d'éthyle, 4:chloroforme, 5: aqueux chloroforme. (ZI : A,A2, B,B2, C et D).

La figure (N°23 B) montre que les extraits éthanolique, acétate d'éthyle et chloroforme ont exhibé des zones d'inhibition vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, contrairement aux extraits aqueux acétate d'éthyle et aqueux chloroforme qui n'ont montré aucun effet inhibiteur.

La figure (N°23 A) peut interpréter une certaine sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis de l'extrait aqueux acétate d'éthyle et aqueux chloroforme, mais elle indique clairement sa résistance à l'égard des autres extraits.

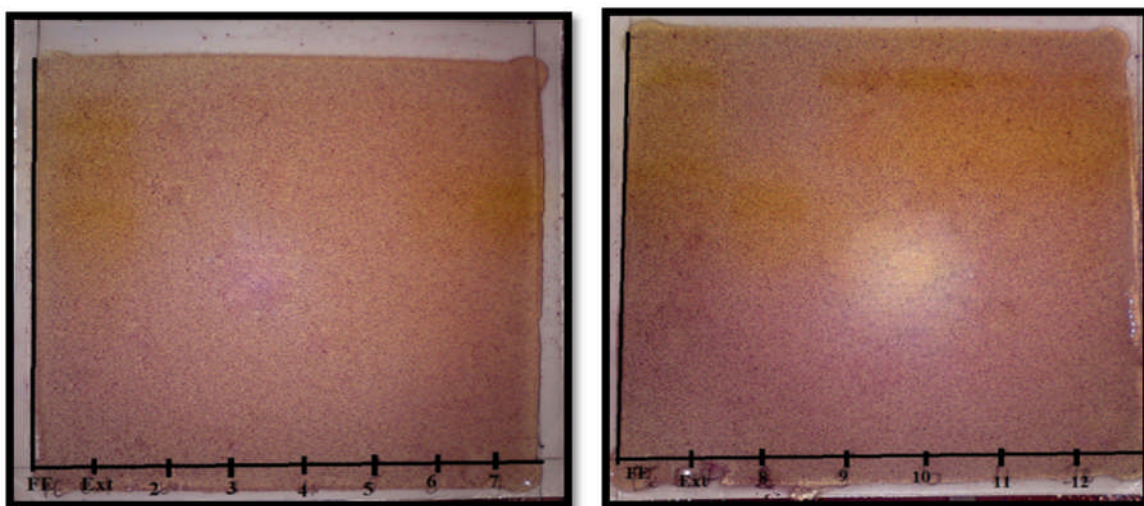


Figure N°24 : Chromatogramme des fractions de l'extrait aqueux chloroforme d'écorce de *F.angustifolia* sur *Staphylococcus aureus*.Ext : extrait aqueux chloroforme. 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12: fractions.

La figure N°24 traduit une insensibilité totale de *S.aureus* envers les fractions issues de l'extrait aqueux chloroforme de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

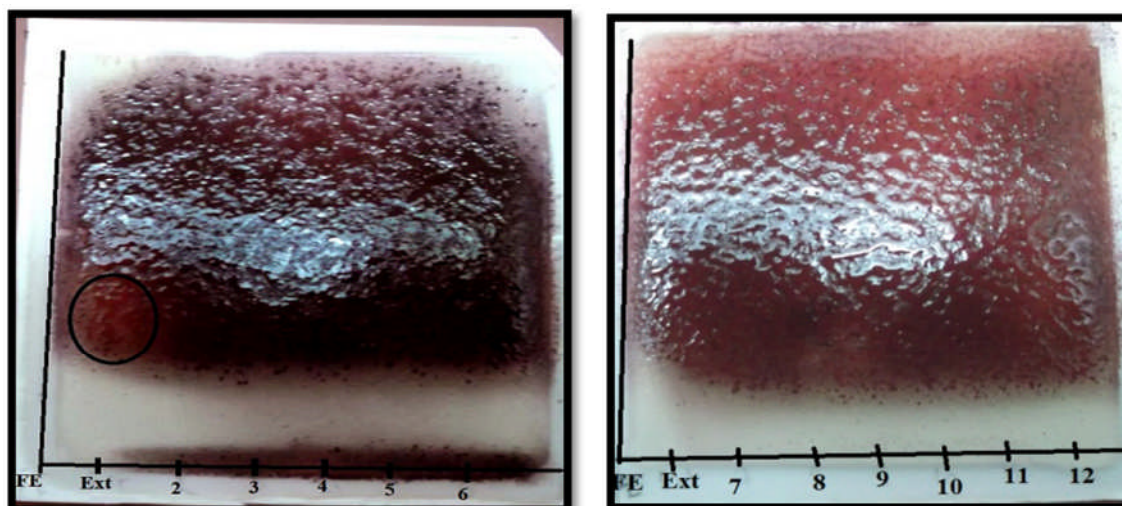


Figure N°25 : Chromatogramme des fractions de l'extrait aqueux chloroforme d'écorce de *F.angustifolia* sur *Pseudomonas aeruginosa*. Ext : extrait aqueux chloroforme. 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12: fractions.

La figure N° 25 traduit nettement la résistance de *P.aeruginosa* ; envers toutes les fractions testées issues de l'extrait aqueux chloroforme.

De ce faite, on peut conclure que les fractions testées issues de l'extrait aqueux chloroforme de la partie écorce n'ont exhibé aucun effet inhibiteur vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Ceci confirme les résultats de la bioautographie des extraits (figure N° 23).

- Bioautographie sur la partie feuille :

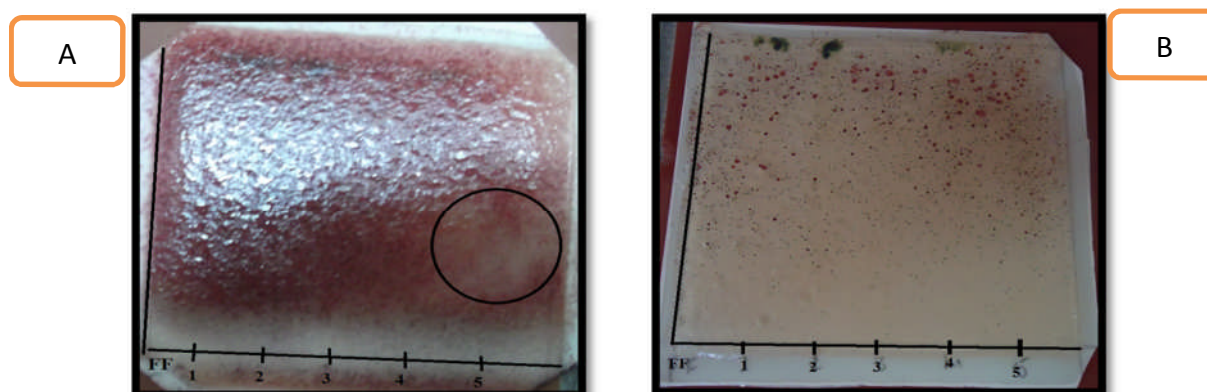


Figure N°26 : Chromatogramme des extraits de feuilles de *F.angustifolia*. 1: éthanolique, 2: acétate d'éthyle, 3: aqueux acétate d'éthyle, 4:chloroforme, 5: aqueux chloroforme.

La figure N°26 A, met en évidence la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis des quatre premiers extraits des feuilles de *F.angustifolia*, on remarque seulement une faible zone clair au niveau de l'extrait aqueux chloroforme qui pourrait être mal interprétés par une zone d'inhibition.

La figure N°26 B, ne montre aucune zone d'inhibition, ce qui traduit la résistance de *S.aureus* vis-à-vis des extraits de feuilles de *F.angustifolia*.

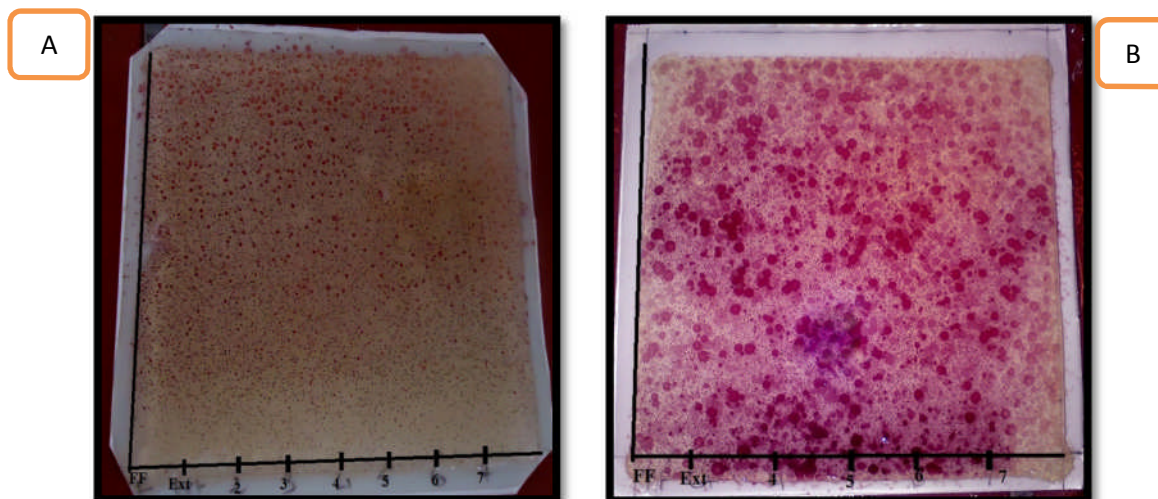


Figure N°27 : Chromatogramme des fractions de l'extrait aqueux chloroforme de feuilles de *F.angustifolia*. Ext : Extrait aqueux chloroforme. Fraction : 4, 5, 6 et 7.

Les chromatogrammes en figure N°27 A et B mettent clairement en évidence la résistance des deux souches vis-à-vis des fractions issues de l'extrait aqueux chloroforme.

Les résultats de la bioautographie des fractions issues de l'extrait aqueux chloroforme des feuilles *Fraxinus angustifolia* démontre la résistance des deux souches *S. aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, Ceci vérifie les résultats obtenu par bioautographie des extraits.

Les résultats des bioautographie pour les fractions et extraits confirment ceux obtenus par le teste de diffusion sur disque (tableau N°VIII et tableau N°XIV), indiquant une nette activité antibactérienne des extraits organiques comparativement aux extraits aqueux.

Aux cours de notre travail, nous avons entrepris l'étude de l'activité antibactérienne des extraits de l'écorce et feuilles de *Fraxinus angustifolia*, ainsi que des fractions chromatographiques issues de l'extrait aqueux chloroforme. Pour cela la méthode des disques a été appliquée aux extraits (5mg/ml) sur dix souches référenciées, cinq souches Gram négatif, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* et cinq souches Gram positif, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* méticilline résistante, *Listeria innocua*, *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus subtilis* (NCCB 1090). La méthode de CCM-bioautographie pour les fractions récupérées sur colonne chromatographique de gel séphadex LH-20 (5mg/ml) et les extraits de feuilles et d'écorce (5mg/ml) sur deux souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Selon les résultats obtenus par la méthode de diffusion sur milieu gélosé, nous avons estimé que seuls les extraits organiques (chloroforme, acétate d'éthyle et éthanolique) ont exhibé un effet antibactérien à différent, variable selon les souches testées avec des zones d'inhibition importantes envers toutes les souches testés 15,5 mm, 14,67 mm et 16 mm pour *S.aureus* méticilline résistante, *L.innocua* et *S. flexneri*, successivement. L'extrait aqueux chloroforme à montrer que de faibles activités antibactériennes envers *Staphylococcus aureus* (12,60 mm) et *Pseudomonas aeruginosa* (11,33mm).

L'étude phytochimique de l'extrait aqueux chloroforme de l'écorce et feuilles par révélations à la vanilline sulfurique et l'anisaldéhyde à montre leurs richesse en substances phénoliques. Plusieurs spots de différentes couleurs et rapports frontaux ont été caractérisés, leurs interprétation nous ont mené à supposer la présence de dérivés de la rutine, monoterpènes et pyrocatechol dans les parties écorce et feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

Les résultats obtenus à partir de l'étude de l'activité antibactérienne par la méthode de bioautographie, ont montré que l'extrait aqueux chloroforme n'a exhibé aucun effet inhibiteur sur les deux souches testées, ceci s'est confirmé par les tests effectuées sur les fractions chromatographiques dans les même conditions. Ce qui nous mène à dire que l'extrait aqueux du chloroforme de *Fraxinus angustifolia* (écorce et feuilles) n'a pas d'effet antibactérien.

- Abdelguerfi, A. et Louar, M. (1997)**. Le Frêne (*Fraxinus ssp*) et le pistachier de l'atlas (*Pistacia atlantica*) : Ecologie et utilisation en Algérie. *Biology and ecology of fodder shrubs* 2,385-389.
- Abdelrahim, S.I.; Almagboul, A.Z.; Omer, M.E.A.; Elegami, A. (2002)**. Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. *Fitoterapia* 73(2002)713–715.
- Alami, M.; Barret, R; Brion, J.D.; Gueiffier, C.E.; Folit, P.; Gaudy, C.; Gerondeau, N.; Gueiffier, A.; Lanotte, P.; Astruc, V.L.; Mereghetti, L.; Peyrat, J.F.; Ratsimbazafy, V.; Tandé, D. (2005)**. Antibiotiques: Pharmacologie et thérapeutique. Edition: Elsevier SAS. p: 15-20.
- Amarowicz, R.; Dykes, G.A.; Pegg, R.B. (2008)**. Antibacterial activity of tannin constituents from *Phaseolus vulgaris*, *Fagopyrum esculentum*, *Corylus avellana* and *Juglans nigra*. *Fitoterapia* 79 (2008) 217–219.
- Ammari, H. ; Ramdani-Bouguessa, N., et Bellouni, R. (2001)**. Antibiothérapie dans les infections ORL. *Médecine du Maghreb* 2001 n°91.
- Arrif, S. (2009)**. Etude des métabolites secondaires de deux scrophulariacées du genre *Verbascum*: *V. ballii* et *V. dentifolium*. Thèse doctorat présenté à l'université El Hadj Lakhdar-Batna, faculté des sciences.
- Athamena, I.; Chalghem1, S.; Kassah-Laouar, A.; Laroui, S. et Khebri, S. (2010)**. Activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *CUMINUM CYMINUM* L. *Lebanese Science Journal*, Vol. 11, No. 1, 2010.
- B.B.L (2005)**. McFarland turbidity standard N° 0,5 . 8808421JAA.
- Belaiche, P. (1979)**. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie (l'aromatogramme).Edition Maloine s.a.Tome1.p122.
- Beloued A. (2009)**. Plantes médicinales d'Algérie.5eme Edition, Office des publications (Alger).p100.
- Bergogne-Bérézin , E (2004)**. Après l'ère des antibiotiques, l'ère de la résistance. Edition : Masson, Paris. *Presse Med* 2004; 33: 772-4.
- Briand, Y.M. (2009)**. Une histoire de la résistance aux antibiotiques, à propos de six bactéries. Edition l'Harmattan.
- Bruneton, J. (2009)**. Pharmacognosie, photochimie, plantes médicinales. Edition TEC et DOC.p267-707.
- Buwa, L.V. et Staden, J. Van (2007)**. Effects of collection time on the antimicrobial activities of *Harpephyllum caffrum* bark. *South African Journal of Botany* 73 (2007) 242–247.
- Calis, I.; Hosny, M. and Lahloub, M.F. (1996)**. A secoiridiod glucoside from *Fraxinus Angustifolia*. *Phytochemistry*, Vol. 41, N°6, pp:1557-1562, 1996.

- Carnat A, Lamaison J, Duband F. (1990).** Teneur en principaux constituants de la feuille du frêne (*Fraxinus excelsior L.*). Plantes médicinales et phytothérapie. p24 ; p145.
- Chacha, M.; Bojase-Moleta, G.; Majinda, R.R.T. (2005).** Antimicrobial and radical scavenging flavonoids from the stem wood of *Erythrina latissima*. *Phytochemistry* 66 (2005) 99–104.
- Chanwitheesuk, A.; Aphiwat Teerawutgulrag, A.; Kilburn, J.D.; Rakariyatham, N. (2007).** Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides Lamk.* *Food Chemistry* 100 (2007) 1044–1048.
- Chardon, H.; Varon, E.; Bensaid, T.; Bellon, O.; Lagier, E. et Gutmann, L. (2002).** Epidémiologie de la résistance du pneumocoque aux antibiotiques. *Méd Mal Infect* 2002 ; 32 Suppl 1: 2 1-3 1.
- Cheryl A. Bopp, M.S. Allen A. Ries, M.D., M.P.H. Joy G. Wells, M.S. (2002).** Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la dysenterie épidémique et du choléra, Chap 9 : Sensibilité aux agents antimicrobiens (méthode de diffusion en milieu gélosé).
- Chiang, H.S.; Juilo, Y et Lin, F.J. (1994).** Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophila losa*. *Journal of enzyme inhibition* 8(1): 61-71.
- Chira, K. ; Suh, J.H. ; Saucier, C. et Teissèdre, P.L. (2008).** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6 :75-82.
- Choma, I.M., and Grzelak, E.M. (2011).** Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 2684–2691.
- Chung, K.T.; Lu, Z. and Chou, M.W. (1998b).** Mechanism of Inhibition of Tannic Acid and Related Compounds on the Growth of Intestinal Bacteria. *Food and Chemical Toxicology* 36 (1998) 1053-1060.
- Chung, K.T.; Wei, C and Johnson, M.G. (1998a).** Are tannins a double-edged sword in biology and health. *Trends in Food Science & Technology* 9 (1998) 168-175.
- Committee on Herbal Medicinal Products, H.M.P.C. (2011).** Assessment report on *Fraxinus excelsior L.* and *Fraxinus angustifolia Vahl*, folium. European Medicines Agency. EMA/HMPC/239269/2011.
- Courvalin, P (2007).** La Résistance des bactéries aux antibiotiques: combinaison de mécanismes biochimiques et génétiques. Communication présentée le 4 octobre 2007.
- Cowan, M.M. (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, Oct. 1999, p. 564–582 Vol. 12, N°4.
- Cushnie, T.P.T.; Lamb, A.J. (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26 (2005) 343–356.
- Damtoft, S.; Franzyk, H. and Jensen, R.S. (1995).** Biosynthesis of iridoids in *Syringa* and *fraxinus* : carbocyclic iridoid precursors. *Phytochemistry*, Vol. 40, N°3, pp : 785-792, 1995.

- De- Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W.M.A.; Ariese, F.; Gooijer, C. and Brinkman, U.A.T. (2006).** Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of chromatography* 1112:31-63.
- Debuigie G et Couplan F. (2009).** Petit Larousse des plantes médicinales. Edition Larousse.
- Delille L. (2007).** Les plantes médicinales d'Algérie. Berti Editions.p118.
- Derbel, S.; Ghedira, k. (2005).** Phytothérapie et nutrition. Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie* (2005) Numéro 1: 28-34.
- Devienne, K.F.;Raddi, M.S.G.; Coelho, R.G.; Vilegas, W. (2005).** Structure–antimicrobial activity of some natural isocoumarins and their analogues. *Phytomedicine* 12 (2005) 378–381.
- Dinda, B.; Debnath, S.; and Harigaya, Y. (2007).** Naturally Occurring Secoiridoids and Bioactivity of Naturally Occurring Iridoids and Secoiridoids. A Review, Part 2. *Chem. Pharm. Bull.* 55 (5) 689—728 (2007).
- Dobrowolska D, Hein S,Oosterbaan A, Skovsgaard J.P et Wagner S. (2008).** Ecology and growth of European ash (*Fraxinus excelsior* L). *Valbro Cost*.p:35.
- Dramane, S.; Witabouna, K.M., et Kagoyire, K. (2010).** Evaluation des Activités Antimicrobiennes et Anti-Radicaires Libres de Quelques Taxons Bioactifs de Côte D'ivoire. *European Journal of Scientific Research.* ISSN 1450-216 ,Vol:40 N°2.
- Dubray M. (2010).** Guide des contre indications des plantes médicinales. Edition Lucien Souny.p132.
- Dufлот, H. (2002).** Le frêne en liberté.2eme edition.p14.
- Dulaut, C et Laporte, V. (2001).** Larousse des plantes médicinales, identification, préparation et soins.2eme Edition.p10-30, p212.
- Edwards, A.J.; Price, R.J.; Renwick, A.B. and Lake, B.G. (2000).** Lack of effect of Coumarin on Unscheduled DNA Synthesis in the In Vivo Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. *Food and Chemical Toxicology* 38 (2000) 403-409.
- El-Amraoui, B.; Biard, J.F.;Uriz, M.J.; Rifai, S.; Fassouane, A. (2010).** Antifungal and antibacterial activity of Porifera extracts from the Moroccan Atlantic coasts. *Journal de Mycologie Médicale* (2010) 20, 70-74.
- Elmas, G.M. (2011).** Comparison of various pulping characteristic of *Fraxinus angustifolia* Vahl. *Wood. African Journal of Biotechnology* Vol. 10(48), pp. 9812-9816, 29.
- Eloff, J.N. (1998).** Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. *Journal of Ethnopharmacology* 60 (1998) 1–8.
- Eloff, J.N. (1998).** Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. *Journal of Ethnopharmacology* 60 (1998) 1–8.

- Eloff, J.N.; Famakin, J.O. and Katerere, D.R.P. (2005).** *Combretum woodii* (Combretaceae) leaf extracts have high activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *African Journal of Biotechnology* Vol. 4 (10), pp. 1161-1166, October, 2005.
- Enseignants du D.U.M.E.N.A.T (2008).** Les plantes médicinales. Edition^{2ème}.
- Equipe des enseignants du DUMENAT. (2008).** Les Plantes Médicinales. 2ème édition. p103.
- Esterhuizen, L.L.; Meyer, R.; and Dubery, I.A. (2006).** Antimicrobial Compounds from *Coleonema album* (Rutaceae). *Z. Naturforsch.* 61c, 489D498 (2006).
- Falleh, H.; Ksouri, R.; Chaieb, K.; Najoua K.B.; Trabelsi, N.; Boulaaba, M.; Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies* 331 (2008) 372–379.
- Fleurentin, J.; Pelt, J.M. et Mazars, G. (2002).** Des sources du savoir aux médicaments future. IRD Edition. 2-7099-1504-9.
- Fomine, S.; Rivera, E.; Fomina, L.; Ortiz, A. and Ogawa, T. (1998).** Polymers from coumarines: 4. Design and synthesis of novel hyperbranched and comblike coumarin-containing polymers. *Polymer* Vol. 39 N°15, p : 3551-3558, 1998.
- Fournier, V. (2003).** La résistance bactérienne aux antibiotiques. *International Journal of Antimicrobial Agents* 34 (2003) 60–66.
- FRAXIGEN. (2005).** Ash species in Europe: biological characteristics and practical guidelines for sustainable use: *F. angustifolia* (narrow-leaved ash). Published by Oxford Forestry Institute. P 65-75.
- Gaussen, H. ; Leroy, J.F. et Ozenda, P. (1982).** Précis de botanique. Végétaux supérieurs. 2^{ème} édition. Masson, Paris. p: 417.
- Gautam, R.; Saklani, A.; Jachak, S.M. (2007).** Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. *Journal of Ethnopharmacology* 110 (2007) 200–234.
- Gautier, A. (1822).** Manuel des plantes médicinales (description, usage et culture des végétaux indigènes employés en médecine. AUDOT, Libraire-Editeur, Ru des Maçons-Sorbonne n°11.
- Gerard P. (2006).** Isolement reproducteur et dispersion en zone hybride forestière: l'exemple des frênes (*Fraxinus excelsior* L et *Fraxinus angustifolia* Vahl). Thèse doctorat en Sciences Forestières, à l'Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et Forêts(Paris).
- Ghedira, K. (2005).** Pharmacognosie, Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* (2005) Numéro 4: 162-169.
- Gravot, A. (2002).** Etude de P450s impliqués dans la biosynthèse des furocoumarines chez *Ruta graveolens*. Thèse de doctorat présentée à Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL).

- Gravot, A.; Larbat, R.; Hehn, A.; Lievre, K.; Gontier, E.; Goergen, J.L. and Bourgaud, F.(2004).**Cinnamic acid 4-hydroxylase mechanism-based inactivation by psoralen derivatives: cloning and characterization of a C4H from a psoralen producing plant (*Ruta graveolens*) exhibiting low sensitivity to psoralen inactivation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 422 (2004) 71–80.
- Gutiérrez-Larraínzar, M.; Rúa, J.; Caro, I.; Castro, C.; Arriaga, D.; García-Armesto, M.R.; del Valle, P. (2012).** Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control* 26 (2012) 555-563.
- Hagerman, A.E. (2002).** Tannin chemistry.
- Hasdemir, O.U.; Chevalier, J.; Nordmann, P. and Page, J.M. (2004).** Detection and Prevalence of Active Drug Efflux Mechanism in Various Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains from Turkey. *Journal of clinical microbiology*. p 2701–2706 Vol. 42, n° 6.
- Hinsinger D. (2010).** Diversité et évolution du genre *Fraxinus*. Thèse doctorat faculté de foresterie géographie et génomique, Université Laval.
- Hongqi, L.; Cai, L.; Jinxing, L.; Yixin, H.; Pingping, Z.; Zhang, J. (2011).** Novel coumarin fluorescent dyes: Synthesis, structural characterization and recognition behavior towards Cu(II) and Ni(II). *Dyes and Pigments* 91 (2011) 309-316.
- Hosny, M. (1998).** Secoridoid glucosides from *Fraxinus oxycarpa*. *Phytochemisto'*. Vol. 47, N°8, pp : 1569-1576, 1998.
- INRA Algérie. (2006).** 2eme rapport nationale sur l'état des ressources phytogetnetques.
- Iossifova, T.; Kostova, I and Evstatieva, L.N. (1997).** Secoiridoids and Hydroxycoumarins in Bulgarian *Fraxinus* Species. *Biochemical Sysrematics and Ecology*, Vol. 25, No. 3, pp. 271-274.
- Iqba, A.; Farrukh, A. (2006).** In vitro efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ES β L-producing multidrug-resistant enteric bacteria. *Microbiological Research*.
- Jacob, F.H.; et Pignal, M.C. (1972).** Interactions levures-tanins. I-croissance et survie de diverses levures dans des solutions tannantes. *Mycopathologia et Mycologia applicata*, vol. 48, 2-3, pag. 121-142, 1972.
- Jork, F. et Wimmer, F. (2004).** Thin layer chromatography: Reagent detection methods; Edition VCH.1 : 352-446.
- Kalkhambkar, R.G.; Kulkarni, G.M. ; Kamanavalli, C.M. ; Premkumar, N.; Asdaq, S.M.B. ; Sun, C.M. (2008).**Synthesis and biological activities of some new fluorinated coumarins and 1-aza coumarins. *European Journal of Medicinal Chemistry* 43 (2008) 2178-2188.
- Karou, D.; Dicko, M.H.; Simporé, J.; Yameogo, S.; Sanon, S. et Traoré, A.S. (2005).** Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso.

- Kempf, M.; Eveillard, M.; Kowalczyk, F. ; Rossines, E.; Panhelleux, G.; Joly-Guillou, M.L. (2011). Etude de la sensibilité de 224 bactéries isolées d'infections hospitalières vis-à-vis des composées JCA 250 et JCA 251 à base d'huiles essentielles issus de la recherche Aroma Technologies. *Pathologie Biologie* 59 (2011) 39–43.
- Kil, H.Y., Seong, E.S., Ghimire, B.K.; Chung, I.M, Kwon, S.S., Goh, E.J.; Heo, K.; Kim, J.M. ; Lim, M.J. ; Lim, J.D. ; Lee, D. ; Yu, C.Y. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of curde sorghum extract. *Food chemistry* 115 (2009) 1234-1239.
- Kil, H.Y.; Seong, E.S.; Ghimire, B.K.; Chung, I.M.; Kwon, S.S.; Goh, E.J.; Heo, K.; Kim, M.J.; Lim, J.D.; Lee, D.; Yu, C.Y. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food chemistry* 115(2009)1234-1239.
- Klančnik, A.; Piskernik, S.; Jeršek, B.; Možina, S.S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods* 81 (2010) 121–126.
- Koch, A.L. (2003). Bacterial Wall as Target for Attack: Past, Present, and Future Research. *Clinical Microbiology Reviews*. p 673–687 Vol. 16, N°4.
- Kostova, I (2001). *Fraxinus ornus* L. *Fitoterapia* 72(2001)471-480.
- Kostova, I and Iossifova, T. (2007). Chemical components of *Fraxinus* species. *Fitoterapia* 78 (2007) 85–106.
- Kuate, V., Ngameni, B.; Simo, C.C.F.; Tankeu, R.K, Ngadjui, B. T.; Meyer, J.J.M.; Lall, N.; Kuate, J.R. (2008). Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 120 (2008) 17–24.
- Lake, B.G. (1999). Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. *Food and Chemical Toxicology* 37 (1999) 423-453.
- Lee, H.S.; Park, S.H.; Wallander, E.; Chang, C.S. (2012). A flavonoid survey of *Fraxinus* (Oleaceae) in eastern Asia, and the overlooked species *Fraxinus hopeiensis* T. Tang in northern China. *Biochemical Systematics and Ecology* 41 (2012) 150–156.
- Lim, Y.Y., et Murtijaya, J. (2007). Antioxidant proprieties of *phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. *Food science and technology* 401664-1669.
- Lomovskaya, O.; M.S Warren, M.S.; Lee, A.; Galazzo, J.; Fronko, R.; Lee, M.; Blais, J.; Cho, D.; Chamberland, S.; Renau, T.; Leger, R.; Hecker, S.; Watkins, W.; Hoshino, K.; Ishida, H. and Lee, V.J. (2001). Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents for Combination Therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p: 105–116 Vol. 45, N°1.
- Lopez, A.; Hudson, J.B.; Towers, G.H.N. (2001). Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 77 (2001) 189–196.
- Lozniewski A., RABAUD C., Nancy (2010). Infections associées aux soins : Résistance bactérienne aux antibiotiques. Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux.

- Lugasi, A., Hovari, J., Sagi, K.V et Biro, L. (2003). The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. *Acta biologica szegediensis*.47(4):119-125.
- Macheix, J.J. ; Fleuriet, A. et Allemand, J. (2005). Composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolite secondaire d'importance économique. Edition presses polytechniques et universitaires romandes.p1-27.
- Maleki, S.; Seyyednejad, S.M., Damabi, N.M. and Hotamedi. (2008). Antibacterial activity of fruits of Iranian *Torilis leptophylla* against some clinical pathogens. *Pakistan journal of biological sciences* 11(9):1286-1289.
- Males, Z.; Medic-Saric, M. and Bucar, F. (1998). Flavonoids of *Guiera senegalensis* J. F. GMEL. Thin-layer Chromatography and Numerical Methods. *Croatica chemica acta* ccacaa 71 (1) 69-79 (1998).
- Manchado, S.M., et Cheynier, V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Edition TEC et DOC.p1-13.
- Marquez, B.; Neuville, L.; Moreau, N.J.; Genet, J.P.; Santos, A.F.; Andrade, M.C.C.; Sant_Ana, A.E.G. (2005). Multidrug resistance reversal agent from *Jatropha elliptica*. *Phytochemistry* 66 (2005) 1804–1811.
- Martini, N. et Eloff, J.N. (1998). The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *Journal of ethnopharmacology* 62(1998) 225-263.
- Mendez J, Gesto M, Vasquez A, Vieitez E et Seoane E. (1968). Growth substances isolated from woody cutting of *Alnus glutinosa medic* and *fraxinus excelsior L.* *phytochemistry*.7,575-579.
- Michel, L. (2004). AntibioGramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé. D'après Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie – Janvier 2004.
- Moghadam, M.S.; Maleki, S.; Darabpour, E.; Motamedi, H.; Mansour, S.; Nejad, S. (2010). Antibacterial activity of eight Iranian plant extracts against methicillin and cefixime resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* (2010)262-265.
- Motel, G. (1973). Le frêne. Edition Paris.
- Mouton, Y. ; Bingen, E. ; Deboscker, Y. et Dubreuil, L. (2000). Antibiotiques antiviraux anti-infectieux. Edition: John Libbey Eurotext, Paris.2-7420-0308-8.
- Naczk, M. et Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054 (2004) 95–111.
- Naczk, M., et Shahidi, F (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054 (2004) 95–111.
- Narayana, K.R.; Reddy, M.S.; Chaluvadi, M.R.; Krishna, D.R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology* 2001; 33: 2-16.

- Navarro, F.; Trallero, E.P.; Marimon, J.M.; Aliaga, R.; Gomariz, M. and Mirelis, B. (2001). CYM-2-producing *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* and *E. coli* strains isolated in Spain (October 1999 - December 2000). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48, 383-389.
- Nepveu G. (1992). L'utilisation des bois de frêne et de merisier : aptitude technologique et facteur de variabilité. *Rev. For. Fr.* XLIV - n° sp .1992.
- Ngameni, B.; Kuete, V.; Simo, I.K.; Mbaveng, A.T.; Awoussong, P.K.; Patnam, R.; -Ngameni, B.; Kuete, V.; Simo, I.K.; Mbaveng, A.T.; Awoussong, P.K.; Patnam, Roy, R.; Ngadjui, B.T. (2009). Antibacterial and antifungal activities of the crude extract and compounds from *Dorstenia turbinata* (Moraceae). *South African Journal of Botany* 75 (2009) 256-261.
- Ngameni, B.; Kuete, V.; Simo, I.K.; Mbaveng, A.T.; Awoussong, P.K.; Patnam, R.; Roy, R. and Ngadjui, B.T. (2009). Antibactériale and antifungal activities of the crude extract and compounds from *Dorstenia turbinata* (Moraceae). *South African Journal of Botany* 75 (2009) 256-261.
- Ojala, T.; Remes, S.; Haansuu, P.; Vuorela, H.; Hiltunen, R.; Haahtela, K.; Vuorela, P. (2000). Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *Journal of Ethnopharmacology* 73 (2000) 299-305.
- Page, C.P.; Curtis, M.J.; Sutter, M.C.; Walker, M.J. et Hoffman, B.B. (1999). *Pharmacologie intégrée*. Edition : De Boeck Université. 2-7445-0015-1.
- Paris, M., et Hunrabielle, M. (1981). *Abrégé de matière médicale (pharmacognosie)*. Tome 1 généralités et monographies. Edition Masson. p 76-89 et 102-107.
- Paul, P et Degrand, F. (1839). *Encyclopédie des gens du monde*. Tome 11. Harvard college library .p :669-670.
- Pesewu, G.A.; Cutler, R.R.; Humber, D.P. (2008). Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. *Journal of Ethnopharmacology* 116 (2008) 102-111.
- Philippon, A.; Arlet, G. and Jacoby, G.A. (2002). Plasmid Determined Amp C-Type β -Lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. p 1-11, Vol. 46, No 1.
- Pitout, J.D.D.; Reisbig, M.D.; Venter, E.C.; Church, D.L. and Hanson, N.D (2003). Modification of the Double-Disk Test for Detection of *Enterobacteriaceae* Producing Extended-Spectrum and AmpC β -Lactamases. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 41, n°8.
- Proestos, C.; Boziaris, I.S.; Nychas, G.-J.E.; Komaitis, M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry* 95 (2006) 664-671.

- Proestos, C.; Boziaris, I.S.; Nychas, G.-J.E.; Komaitis, M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry* 95 (2006) 664–671.
- Quezel, P. et Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition du Centre Nationale de la Recherche Scientifique, Paris. Tome 2, p739.
- Rameau, J.C., Mausion D, Dumé G. (2008). Flore forestières des régions méditerranéennes. Edition Forêt privé française.p635-636.
- Rangasamy, O.; Raelison, G.; Rakotoniriana, F.E.; Cheuk, K.; Ratsimamanga, S.U.; Quetin-Leclercq, J.; Gurib-Fakim, A.; Subratty, A.H.(2007). Screening for anti-infective properties of several medicinal plants of the Mauritian flora. *Journal of Ethnopharmacology* 109 (2007) 331–337.
- Rauha, J.P.; Remes, S.; Heinonen, M.; Hopia, A.; Kahkonen, M.; Kujala, T.; Pihlaja, K.; Vuorela, H.; Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology* 56(2000) 3-12.
- Rauha, J.P.; Remes, S.; Heinonen, M.; Hopia, A.; Kahkonen, M.; Kujala, T.; Pihlaja, K.; Vuorela, H.; Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International journal of food microbiology* 56(2000) 3-12.
- Raven, P.H., Evert, R.F. et Eichhorn, S.E. (2007). Biologie végétal. Edition Boeck s.a.p27-31.
- Ravisé, A et Kirkiacharlan, B.S. (1976).Influence de la structure de composés phénoliques sur l'inhibition du *Ph3tophthloru purusitica* et d'enzymes participant aux processus parasitaires, ChapII : Coumarines. *Phytopath. Z.*, 86,314-326 (1976).
- Ribereau-Gayon, P. (1968).Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod (Paris).
- Richter, G. (1993). Métabolisme des végétaux : les composés phénoliques (physiologie et biochimie).Edition Dunod.p317-339.
- Rios, J.L and Recio, M.C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 100 (2005) 80–84.
- Rivero-Cruz, J.F. (2008). Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *Journal of Ethnopharmacology* 119 (2008) 99–103.
- Rodriguez Vaquero, M.J.; Alberto, M.R.; M.C.; Nadra, Manca. (2007b). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 18 (2007) 93–101.
- Rodriguez Vaquero, M.J.; Alberto, M.R.; M.C.; Nadra, Manca. (2007a).Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18 (2007) 587–593.
- Rodzeko, V. (2000). Frêne. Abécédaire de phytothérapie.
- Rouxel, T. (1989). Les phytoalexines et leur intervention dans la résistance hypersensible aux champignons phytopathogènes. *Agronomie* (1989).9, 529-545.

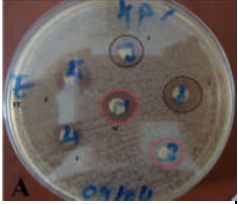
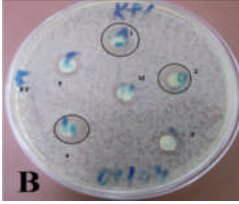
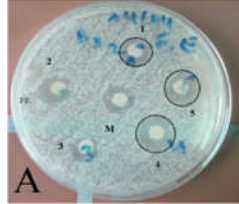
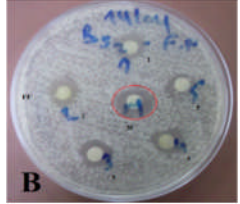
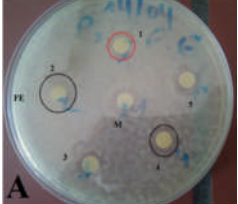
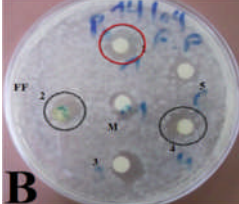
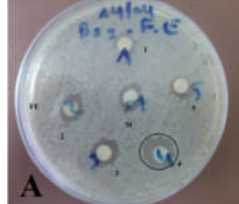
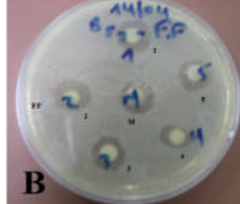
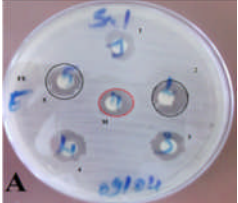


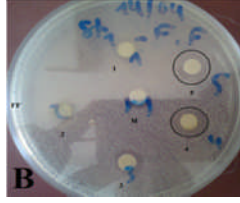
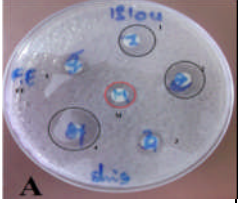

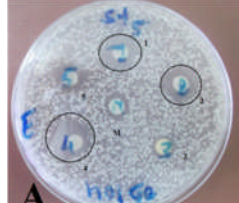
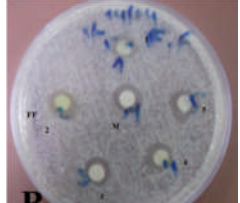

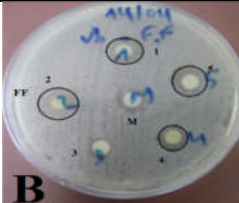
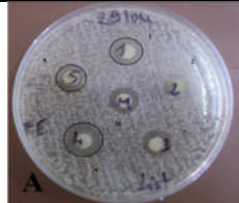

- Roy, R.; Ngadjui, B.T.(2009).** Antibacterial and antifungal activities of the crude extract and compounds from *Dorstenia turbinata* (Moraceae). *South African Journal of Botany* 75 (2009) 256–261.
- Santamour, F.S (2002).** Flavonoids and Coumarins in fraxinus and their potential utility in hybrid verification. Jr., research geneticist, U.S. National Arboretum, USDA, SEA, Washington, D.C.
- Sato, Y.; Shibata, H.; Arai, T.; Yamamoto, A.; Okimura, Y.; Arakaki, N.; Higuti, T.(2004).** Variation in synergistic activity by flavone and its related compounds on the increased susceptibility of various strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to B-lactam antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents* 24 (2004) 28–35.
- Sharma, O.P.; Bhat, T.K.; Singh, B. (1998).** Thin-layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid. *Journal of Chromatography A* 822 (1998) 167-171.
- Shauenberg P et Paris F. (2006).** Analyse, description, et utilisation de 400 plantes médicinales.p123.
- Sofowara, S. (2010).** Plantes médicinales et médecine traditionnelle d’Afrique .Edition Karthala. 978-2-8111-0330-9.
- Spigno, G.; Tramelli, L.; Faveri, D.M. (2007).** Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* 81 (2007) 200–208.
- Tada, Y.; Shikishima, Y.; Takaishi, Y.; Shibata, H.; Higuti, T.; Honda, G.; Ito, M.; Takeda, Y.; Kodzhimatov, O.K.; Ashurmetov, O.; Ohmoto, Y. (2002).** Coumarins and g-pyrone derivatives from *Prangos pabularia*: antibacterial activity and inhibition of cytokine release *Phytochemistry* 59 (2002) 649–654.
- Takenaka, Y.; Tanahashi, T.; Shintaku, M.; Sakai, T.; Nagakura, N.; Parida. (2000).** Secoiridoid glucosides from *Fraxinus Americana*. *Phytochemistry* 55 (2000) 275-284.
- Tissut M, et Egger K. (1972).** Les glycosides flavonoïques foliaires de quelques arbres, au cours du cycle végétatif. *phytochemistry*.11, 631-634.
- Trueba, L.G.P. (2003).** Los Flavonoides: antioxidante o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed* 2003:22(1):48-57.
- Vaubourdolle, M. (2007).** Infectiologie. Editon Wolters Kluwer sa.
- Vermerris, W et Nicholson, R. (2009).** Phenolic Compound Biochemistry. Edition Springer Science Business Media B.V.
- Wagman, G.H.; Cooper, R. (1989).** Natural Products Isolation: Separation Methods for Antimicrobials, antivirals, and enzymes inhibitors. *Journal of chromatography library-* V43.
- Wong, P.Y.Y and Kitts, D.D.(2006).** Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chemistry* 97 (2006) 505–515.

-
- Yala, D.; Merad, A.S.; Mohamedi, D. et Ouar Korich, M.N. (2001a).** Classification et mode d'action des antibiotiques. Médecine du Maghreb 2001 n°91.

 - Yala, D.; Merad, A.S.; Mohamedi, D. et Ouar Korich, M.N. (2001b).** Résistance bactérienne aux antibiotiques. Médecine du Maghreb 2001 n°91.

 - Zahalka, J.F. (2009).** Les plantes en pharmacie. Edition du Dauphin.

Aspect des résultats du test de diffusion sur milieu gélosé.

	Gram(-)			Gram(+)	
Figure N°07			Figure N°12		
Figure N°8			Figure N°13		
Figure N°9			Figure N°14		
Figure N°10			Figure N°15		
Figure N°11			Figure N°16		

Partie de *F.angustifolia* A : écorce ; B : feuille. Extraits de *F.angustifolia* à 5mg/ml 1 : éthanolique, 2 : acétate d'éthyl, 3 : aqueux acétate d'éthyl, 4 : chloroforme, 5 : aqueux chloroforme, M : méthanol.

Gélose Mueller Hinton (pH = 7,4)

Composition	Quantité g/l
Extrait de viande	3 g
Hydrolysate acide de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar	20 g

Bouillon nutritif (pH = 7,4)

Composition	Quantité g/l
Peptone	10 g
Extrait de viande	5 g
Na Cl	5 g

Résumé :

Fraxinus angustifolia, une plante médicinale répandue en Kabylie. Ses utilisations en médecine traditionnelle et les nombreuses vertus qu'elle présente (fébrifuge, antiparasitaire,...etc.), ont fait d'elle le choix pour une étude de l'activité antibactérienne. Ce travail s'est basé sur deux grands axes ; en premier, l'activité antibactérienne des extraits de l'écorce et de feuilles a été déterminée par la méthode classique de diffusion sur milieu gélosé, ceci vis-à-vis de dix souches pathogènes référenciées. Les meilleurs résultats obtenus ont été attribués aux extraits organiques des deux parties. En seconde phase, les fractions issues de l'extrait aqueux chloroforme de l'écorce et feuilles ont fait l'objet d'une étude phytochimique sur CCM révéla à la vanilline sulfurique et l'ansaldéhyde, en parallèle nous avons entrepris l'étude de l'activité antibactérienne des extraits et fractions chromatographiques par la méthode de CCM-bioautographie, envers deux souches ; *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats obtenus montrent l'insensibilité de ces deux dernières aux fractions testées.

Mot clé : *Fraxinus angustifolia*, methode de diffusion sur milieu gélosé, CCM-bioautographie, Activité antibactérienne.

Abstracts:

Fraxinus angustifolia, widespread medicinal plant in Kabylie. It's traditional uses in medicine and many virtues (febrifuge, antiparasitic... ect.), were the basis of its selection for antibacterial activity study. This work based on two large parts; first, antibacterial activity of bark and leaves extracts was determined by agar disk diffusion method. Best obtained results were attributed to organic extracts. In second part, the obtained fractions from aqueous chloroform extract of the bark and leaves were the subject of phytochemical study on thin layer chromatography, revealed by vanillin-sulphuric acid reagent and anisaldehyde-sulphuric acid reagent. Beside we have studied the antibacterial activity of fractions and extracts by TLC-bioautography method, towards *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, obtained results showed resistance of these pathogenic species to studied fractions.

Key words: *Fraxinus angustifolia*, agar disk diffusion method, TLC-bioautography, antibacterial activity.