

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université A. MIRA de Bejaia**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biologie Physico-Chimique**

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

**MAGISTER**  
**En Biologie Moléculaire**

**Thème**

**Caractérisation de l'activité anti-bactérienne des  
extraits de *Pistacia lentiscus* et de *Fraxinus  
angustifolia***

**Par :**  
M<sup>elle</sup> Tahiri Ouahiba

**Devant le jury :**

<b>Président :</b> M <sup>me</sup> Sadoun, D.	( Pr., Université de Bejaia)
<b>Promoteur :</b> M <sup>r</sup> Atmani, D.	(M.C., Université de Bejaia)
<b>Examineurs :</b> M <sup>r</sup> Kecha, M.	(M.C., Université de Bejaia)
M <sup>r</sup> Balla, E.H.	(M.C., Université de Bejaia)

**2007-2008.**

## *Remerciements*

*Au terme de ce travail, il m'est agréable de remercier tous ceux et celles qui m'ont aidée de près ou de loin à avancer.*

*Mes remerciements les plus chaleureux vont d'abord au docteur Atmani. D. Merci pour tout. Pour l'encadrement continu lors la réalisation de ce travail. Pour les qualités scientifiques et humaines dont il ne s'est jamais départi. Je remercie le directeur de la bibliothèque qui 'il est, qui nous a permis d'avoir accès à la documentation et aux données scientifiques les plus récents sans lesquelles ce travail n'aurait pas été ce qu'il est.*

*Merci à Madame le professeur Saadoune. Outre l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider le jury de cette thèse, elle nous a aimablement offert la souche d'Escherichai coliO111 :B4  
Merci à Messieurs le docteur Kecha.M. et le docteur Bala EH qui ont accepté donner de leurs temps pour évaluer ce travail.*

*Merci à Madame Atmani D. Pour sa présence, sa disponibilité et sa sympathie. Travailler à ses cotés a été pour moi une opportunité très enrichissante.*

*Je remercie également Madame Benaïda. N, Melle Boudaoud. H, Melle Ayouni K, Melle Berboucha M, Melle Iounis H, Melle chahir N et Monsieur Boukerouis D Merci pour leurs aides et soutiens pendant toute la période de réalisation de cette étude, Merci aussi pour l'ambiance amicale et détendue qu'ils ont su faire régner au laboratoire. Un climat qui m'était indispensable pour supporter les longues journées de pillasse.*

*Mes remerciements vont aussi au docteur Laaloui, et aux personnels du laboratoire de microbiologie de l'hôpital d'Akhou qui nous ont fourni les souches bactériennes et les disques d'antibiotiques utilisés dans nos tests.*

*Un grand merci à mon père et ma mère. Je les remercie pour tout. Pour l'éducation qu'ils m'ont prodiguée, pour leurs présence permanente et leurs disponibilité sans faille durant tout mon cursus du primaire à l'université.*

## *Dédicace*

*A la mémoire de mes grands parents et de ma tante*

*A ma grand mère*

*A mon père et ma mère*

*A mes frères et soeurs*

*A mes neveux et nièces*

*A ma belle sœur*

*A mes beaux frères*

*A mes amies et amis*

*A tous ceux qui sont morts pour que l'Algérie soit libre et indépendante*

*Que ce travail soit une part de ma reconnaissance envers eux,*

## *Sommaire*

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
---------------------------	----------

### **Chapitre I : Synthèse bibliographique**

<b>I. Les antibiotiques .....</b>	<b>2</b>
<b>I.1. Les principales familles d'antibiotiques et leurs mode d'action .....</b>	<b>2</b>
I.1.1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi .....	2
I.1.2. Antibiotiques ciblant la membrane cytoplasmique .....	4
I.1.3. Antibiotiques inhibant la synthèse protéique.....	5
I.1.4. Antibiotiques inhibant la synthèse de l'ADN .....	9
I.1.5. Antibiotiques inhibant la synthèse de L'ARN .....	11
I.1.6. Antibiotiques inhibant la synthèse du folate.....	11
<b>I.2. La résistance bactérienne aux antibiotiques .....</b>	<b>12</b>
I.2.1. Le support génétique de la résistance .....	12
I.2.2. Mécanismes de la résistance .....	13
<b>I.3. Biofilm et la tolérance aux antibiotiques .....</b>	<b>14</b>
<b>I.4. Les composés phénoliques et l'activité antibactérienne .....</b>	<b>15</b>
I.4.1. Les acides phénols .....	16
I.4.2. Les quinones .....	16
I.4.3. Les coumarines .....	18
I.4.4. Les flavonoïdes .....	20
I.4.5. Les tannins .....	25

### **Chapitre II : Matériel et Méthodes**

<b>II.1. Matériel végétal .....</b>	<b>29</b>
II.1.1. collecte.....	29
II.1.2. séchage.....	29
II.1.3. Broyage et tamisage.....	29
<b>II.2. Extraction.....</b>	<b>30</b>

<b>II.3. Dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins.....</b>	<b>31</b>
II.3.1. Dosage des phénols totaux .....	31
II.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	32
II.3.2. Dosage des tannins .....	32
<b>II.4. Détermination de l'activité antibactérienne .....</b>	<b>33</b>
II.4.1. les souches bactériennes utilisées .....	33
II.4.2. Evaluation de l'activité antibactérienne .....	34
II.4.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice .....	35
<b>II.5 Etude chromatographique .....</b>	<b>35</b>
II.5.1. Chromatographie sur colonne de gel de silice.....	35
II.5.2. Chromatographie sur couche mince .....	36
<b>II.6. Analyses statistiques.....</b>	<b>36</b>

### Chapitre III: Résultats et Discussions

<b>III.1. Collecte, séchage, broyage, tamisage et extraction .....</b>	<b>37</b>
<b>III.2. Dosage des phénols totaux, des flavonoïdes et des tannins .....</b>	<b>39</b>
III.2.1. Dosage des phénols totaux .....	39
III.2.2. Dosage des flavonoïdes .....	40
III.2.3. Dosage des tannins .....	41
<b>III.3. Détermination de l'activité antibactérienne des extraits de <i>Fraxinus angustifolia</i> et de <i>Pistacia lentiscus</i> .....</b>	<b>42</b>
III.3.1. Activité des extraits de <i>F. angustifolia</i> et <i>P. lentiscus</i> sur <i>Salmonella enteritidis</i> .....	44
III.3.2. Activité des extraits de <i>F. angustifolia</i> et de <i>P. lentiscus</i> sur <i>Proteus mirabilis</i> .....	47
III.3.3. Activité des extraits de <i>F. angustifolia</i> et de <i>P. lentiscus</i> sur <i>Escherichia coli</i> O111: B4 .....	50
III.3.4. Activité des extraits de <i>F. angustifolia</i> et <i>P. lentiscus</i> sur <i>Shigella dysenteriae</i> .....	52
III.3.5. Activité des extraits de <i>F. angustifolia</i> et de <i>P. lentiscus</i> sur <i>Staphylococcus aureus</i> .....	55

III.3.6. Activité des extraits de <i>F. angustifolia</i> et de <i>P. lentiscus</i> sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	58
<b>III.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits aqueux .....</b>	<b>64</b>
<b>III.5. Activité antibactériennes de quelques composés phénoliques purs .....</b>	<b>66</b>
<b>III. 6. Etude chromatographique .....</b>	<b>69</b>
<b>III.6.1. Séparation sur colonne .....</b>	<b>69</b>
III.6.1.1. Activité des fractions chromatographiques sur l'espèce <i>Staphylococcus aureus</i> .....	69
III.6.1.2. Activité des fractions chromatographiques sur l'espèce <i>Salmonella enteritidis</i> .....	70
III.6.1.3. Activité des fractions chromatographiques sur l'espèce <i>Shigella dysenteriae</i> .....	71
III.6.1.4. Activité des fractions chromatographiques sur l'espèce <i>Proteus mirabilis</i> .....	72
III.6.1.5. Activité des fractions chromatographiques sur l'espèce <i>Escherichia coli</i> .....	73
III.6.1.7. Activité des fractions chromatographiques sur l'espèce <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	74
<b>III.6.2. Etude chromatographique sur couche mince .....</b>	<b>75</b>
III.6.2.1. Chromatographie sur couche mince des extraits de l'écorce de <i>F. angustifolia</i> .....	75
III.6.2.2. Chromatographie sur couche mince des extraits des feuilles de <i>F. angustifolia</i> .....	77
III.6.2.3. Chromatographie sur couche mince des extraits des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	80
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>82</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>85</b>

## *Liste des figures*

Figure	Titre	Page
1	Structure de l'anneau $\beta$ -lactame et de la pénicilline	3
2	Structure de la vancomycine	4
3	Structure d'un aminoglycoside: Néomycine B	5
4	Structure de la tétracycline	6
5	Structure du chloramphénicol	7
6	Structure de l'érythromycine	8
7	Structure de la clindamycine	8
8	Structure d'une quinolone et d'une fluoroquinolone	10
9	Structure de la novobiocine	10
10	Structure de la rifampicine	11
11	Structure du noyau sulfanilamide	11
12	Structure du trémithoprime	12
13	Structure de l'acide gallique et de l'acide caféique	16
14	Formule de la <i>p</i> -quinone, de la O-quinone et d'une Naphtoquinone	17
15	Structure de quelques coumarines	18
16	A) Cycloaddition bi-fonctionnelle sur la thymine. B): Cycloaddition monofonctionnelle sur la thymine.	19
17	Structures de base des flavonoïdes	20
18	Formules de quelques flavonols	21
19	Formules de quelques flavanol et d'une isoflavone	21
20	Structure d'une chalcone	22
21	Structure d'un tannins hydrolysable: Tellimagrandin	25
22	Structure d'un tannin condensé: polymère de proanthocyanidine	26

Figure	Titre	Page
23	Photographie des parties de plantes utilisées	30
24	Protocole d'extraction des composés phénoliques à partir de la poudre des plantes	31
25	Les teneurs en phénols totaux des extraits de l'écorce et des feuilles de <i>F. angustifolia</i> et des feuilles de <i>P. lentiscus</i>	39
26	Les teneurs en flavonoïdes des extraits de l'écorce et des feuilles de <i>F. angustifolia</i> et des feuilles de <i>P. lentiscus</i>	40
27	Les teneurs en tannins des extraits de l'écorce et de feuilles de <i>F. angustifolia</i> et des feuilles de <i>P. lentiscus</i>	41
28	Activité des extraits sur <i>S. enteritidis</i>	45
29	Activité des extraits sur <i>P. mirabilis</i>	49
30	Activité des extraits sur <i>E. coli</i>	51
31	Activité des extraits sur <i>S. dysenteriae</i>	54
32	Exemples de bordures de zones d'inhibition obtenues avec <i>Staphylococcus aureus</i>	55
33	Activité des extraits sur <i>Staphylococcus aureus</i>	57
34	Activité des extraits sur <i>P. aeruginosa</i>	60
35	Chromatogramme des extraits de l'écorce de <i>F. angustifolia</i> , de quelques standards et de deux fractions issues de la séparation sur colonne dans le système: acétate d'éthyle /acide formique /acide acétique/eau	76
36	Chromatogramme des extraits de l'écorce <i>F. angustifolia</i> et de quelques standards dans le système : Chloroforme/ méthanol/ acide acétique/ eau	76
37	Chromatogramme des extraits de feuilles de <i>F. angustifolia</i> , de quelque standards et de deux fractions issue de la séparation sur colonne dans le système: acétate d'éthyle/ hexane/ acide formique	78
38	Chromatogramme des extraits de feuilles de <i>F. angustifolia</i> et de quelques standards dans le système acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau.	79
39	Chromatogramme des extraits de feuilles de <i>P. lentiscus</i> et de quelques standards dans le système: Acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau	39

## *Liste des tableaux*

Tableau	Titre	Page
1	Origine des différentes souches bactériennes	33
2	Taux d'extractions des différents solvants	38
3	Activité des extraits de <i>F. angustifolia</i> et <i>P. lentiscus</i> sur <i>Salmonella enteritidis</i>	44
4	Activité des extraits de <i>F. angustifolia</i> et <i>P. lentiscus</i> sur <i>Proteus mirabilis</i>	47
5	Activité des extraits de <i>F. angustifolia</i> et <i>P. lentiscus</i> sur <i>Escherichia coli</i>	50
6	Activité des extraits de <i>F. angustifolia</i> et <i>P. lentiscus</i> sur <i>Shigella dysenteriae</i>	53
7	Activité des extraits de <i>F. angustifolia</i> et <i>P. lentiscus</i> sur <i>Staphylococcus aureus</i>	56
8	Activité des extraits de <i>F. angustifolia</i> et <i>P. lentiscus</i> sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
9	Concentrations minimales inhibitrices des extraits aqueux	64
10	Effet antibactérien de quelques composés phénoliques purs	66
11	Activité des fractions chromatographique sur <i>Staphylococcus aureus</i>	69
12	Activité des fractions chromatographiques sur <i>Salmonella enteritidis</i>	70
13	Activité des fractions chromatographiques sur <i>Shigella dysenteriae</i>	71
14	Activité des fractions chromatographiques sur <i>Proteus mirabilis</i>	72
15	Activité des fractions chromatographiques sur <i>Escherichia coli</i>	73
16	Activité des fractions chromatographiques sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	74
17	les rapports frontaux des différentes fractions séparés par les systèmes; Acétate d'éthyle/Acide formique/Acide acétique/Eau et Chloroforme/Méthanol/Acide acétique/ Eau	75

Tableau	Titre	Page
18	Les rapports frontaux des différentes fractions des extraits de feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i> séparées dans les systèmes ; Acétate d'éthyle/ Hexane/Acide formique et Acétate d'éthyle /Acide formique/Acide acétique/ Eau	80
19	Les rapports frontaux des composés des extraits de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> dans le système: acétate d'éthyle/ acide formique/ acide acétique/ eau	80

## *Liste des abréviations*

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- Amp10 : Ampicilline.
- ARNm: Acide ribonucléique messenger
- ARNt: Acide ribonucléique de transfert
- ATP: Adénosine triphosphate
- B. subtilis: Bacillus subtilis*
- BSA: Bovine sérum albumine
- CCM Chromatographie sur couche mince.
- Cg: Catéchine gallate
- C30 : chloramphénicol à 30µg/disque.
- CMI: Concentration minimale inhibitrice
- Da: Dalton.
- E. coli : Escherichia coli*
- ECg : Epicatechin gallate
- EGCg : Epigallocatechin gallate
- F. angustifolia : Fraxinus angustifolia*
- G10 : Gentamicine à 10µg/disque.
- MDRs : Multi-drugs résistance
- MLS: Les macrolides, les lincosamides et les streptogramines.
- NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
- NT: Non testé.
- P. aeruginosa : Pseudomonas aeruginosa*
- P. lentiscus : Pistacia lentiscus*
- P. mirabilis: Proteus mirabilis*
- PBP: Pénicilline Binding Protein.
- PLP: Protéines Liant la Pénicilline.
- S. aureus : Staphylococcus aureus*
- S. dysenteriae : Shigella dysenteriae*
- S. enteritidis : Salmonella enteritidis*
- S: Sviedberg.
- SARM: *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline.



# *INTRODUCTION*

## *Introduction*

Bien qu'ils aient permis l'un des progrès les plus spectaculaires de la médecine, les antibiotiques, qualifiés de médicaments miracles, tendent à perdre de leur efficacité. A l'origine de ce «déclin»: le développement de phénomènes de résistance par les bactéries. Afin de palier à ces derniers, actuellement les recherches se sont accentuées sur la découverte de nouvelles molécules actives.

Les végétaux supérieurs ont développé au cours de leur évolution des mécanismes de défense contre l'infection. Ils opposent des barrières mécaniques ; dépôts de cutine, paroi cellulaire rigide...etc, et des barrières chimiques principalement par synthèse de métabolites secondaires dont les alcaloïdes, les composés phénoliques et les terpénoïdes (Levins, 1976). Avec plusieurs milliers de structures identifiées, répartis entre différentes classes; flavonoïdes, tannins, coumarines, quinones et autres, les composés phénoliques constituent la classe de métabolites secondaires la plus impliquée dans les mécanismes de défense aussi bien inductibles (phytoalexines) que constitutifs (phytoanticipines) chez les plantes. Le potentiel antimicrobien des végétaux supérieurs a été mis à profit par l'industrie pharmaceutique ; en 1967, 12% des antibiotiques sont extraits des végétaux supérieurs (Martini et Eloff, 1998). Néanmoins l'usage traditionnel des plantes dans le traitement des infections prédomine dans plusieurs parties du monde.

En Algérie, pays avec 3000 espèces dont 15% endémiques (Gausson et Leroy, 1982), la médication par les plantes est une composante des traditions, ainsi de nombreuses espèces végétales sont utilisées dans le traitement des maladies infectieuses. Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à la caractérisation *in vitro* de l'activité antibactérienne de deux plantes : *Pistacia lentiscus* et *Fraxinus angustifolia* utilisées dans notre médecine traditionnelle pour traiter plusieurs pathologies, y compris les maladies infectieuses. Notre objectif est l'établissement des bases scientifiques de cette médication pour en justifier l'usage.



*SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES*

## **I. Les antibiotiques**

A l'origine, le mot « antibiotique » désigne tout produit microbien qui, même à de très faibles concentrations, inhibe ou tue certains micro-organismes. On l'emploie maintenant dans un sens plus large qui inclut, en outre, toute substance synthétique dotée de ces propriétés (Singleton, 2005). Les antibiotiques peuvent avoir un effet bactéricide, c'est à dire détruire les bactéries, ou simplement un effet bactériostatique en inhibant la croissance bactérienne. La spécificité d'action des antibiotiques repose sur les différences métaboliques et structurales qui existent entre les cellules procaryotes et eucaryotes. Les antibiotiques efficaces contre de nombreuses espèces bactériennes à gram positif et à gram négatif sont dits à «large spectre»; ceux qui sont actifs uniquement sur un petit nombre d'espèces sont dits à «spectre étroit».

La classification des antibiotiques est principalement basée sur leurs différents modes d'action. Cependant les antibiotiques présentant une parenté structurale interfèrent avec les mêmes processus biologiques des bactéries. Les antibiotiques sont donc classés en familles au sein desquelles existent des groupes et sous groupes (Duval et Soussy, 1999).

### **I.1. Les principales familles d'antibiotiques et leurs mode d'action**

#### **I.1.1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi**

##### **I.1.1.1. Les $\beta$ -lactamines**

La famille des  $\beta$ -lactamines est composée de quatre groupes de molécules: les pénames, les pénèmes, les céphèmes, et les monolactames, auxquels il faut ajouter les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases dont certaines structures sont incluses dans ces groupes. La structure de base des  $\beta$ -lactamines est le noyau  $\beta$ -lactame qui contient la structure carbonyle lactame (figure1) indispensable à l'activité de ces molécules (Bryskier, 1999a). Elles sont apparentées d'un point de vue stéréochimique au motif D-alanyl-D-alanine qui est un substrat de la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane, à savoir la réaction de transpeptidation. D'une façon très schématique, les  $\beta$ -lactamines interagissent avec les sites catalytiques de plusieurs protéines enzymatiques appelées; Protéines Liant la Pénicilline (PLP) ou; Pénicilline Binding Protein (PBP) impliquées dans le métabolisme des pontages peptidiques du peptidoglycane. Ce mécanisme est commun à toutes les  $\beta$ -lactamines mais selon les espèces bactériennes, les  $\beta$ -lactamines n'agissent pas toutes sur les même PBP (Massova et Mobashery, 1998). Ces antibiotiques ne sont actifs que sur les bactéries en phase de croissance.



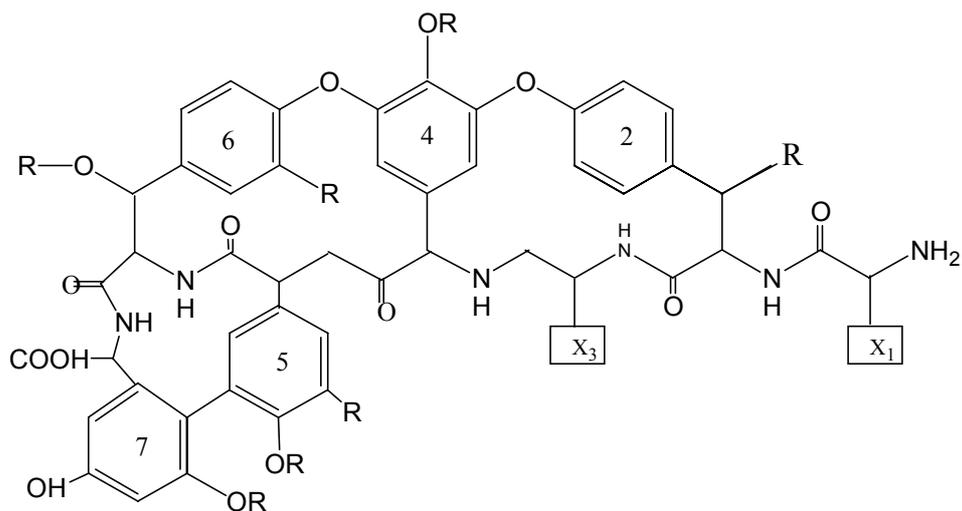


Figure N°2 : Structure de la vancomycine

Néanmoins il existe d'autres antibiotiques, comme la bacitracine, la cyclosérine et la fosfomycine. Agissant sur la paroi des bactéries, elles sont considérées comme «orphelins» car elles n'appartiennent pas aux principales familles d'antibiotiques. L'activité de la bacitracine réside dans sa capacité à inhiber la régénération du lipide C55, qui reste dans la membrane cytoplasmique sous forme biphosphorylée inutilisable. La cyclosérine est un analogue structural de la D-alanine, ce qui lui permet d'inhiber de façon compétitive la racémase qui convertit la L-alanine en D-alanine, ainsi que la synthase qui lie deux molécules de D-alanine. La fosfomycine agit en inhibant la pyruvate transférase, enzyme dont la fonction est de condenser le phosphoénolpyruvate et le N-acétylglucosamine pour former l'acide N-acétylmuramique (Doublet, 2004).

### I.1.2. Antibiotiques ciblant la membrane cytoplasmique

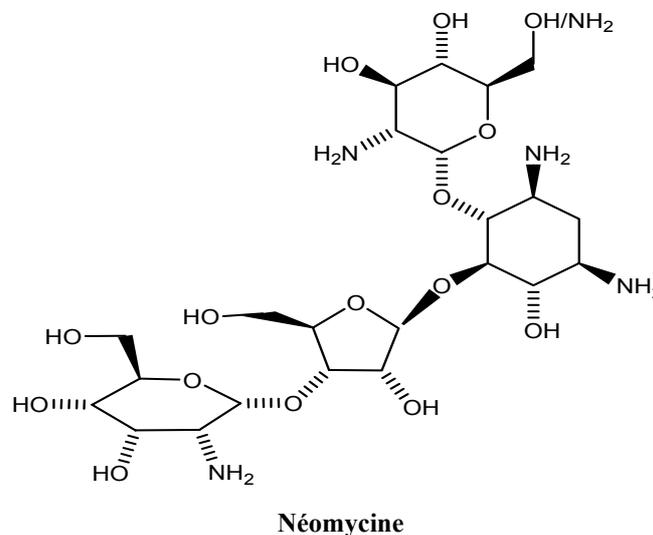
Parmi les peptides cationiques, les polymyxines constituent le seul groupe réellement considéré comme une famille d'antibiotiques agissant au niveau des membranes. Les polymyxines sont constituées de 10 acides aminés dont 7 constituent un cycle et un acide gras formant une extension hydrophobe (Doublet, 2004). Ces antibiotiques pénètrent au travers de la paroi des bactéries à gram négatif par un mécanisme qu'elles auto-induisent en chélatant les cations divalents. Elles déstabilisent la paroi dans laquelle elles peuvent s'insérer. Elles agissent sur les membranes cytoplasmiques des bacilles à gram négatif qui sont riches en phosphatidyléthanolamine. Elles sont inactives sur les bactéries à gram positif qui sont pauvres en phosphatidyléthanolamine (Bryskier et Agouridas, 1999). La mort des cellules bactériennes dans le cas de la polymyxine B semble être liée à la dépolarisation de la membrane cytoplasmique. La polymyxine B est capable d'induire une

fusion locale entre la membrane externe et interne et une formation de pores entre les deux membranes (Dougelava *et al.*, 2000).

### I.I.3. Antibiotiques inhibant la synthèse protéique

#### I.I.3.1. Les aminoglycosides

Ce sont des sucres aminés de poids moléculaire allant de 500 à 800 D, basiques et hydrosolubles (Veyssier, 1999a). Les aminoglycosides sont de puissants bactéricides (Tor, 2006), agissant surtout sur les bacilles à gram négatif aérobie, les staphylocoques et les bacilles à gram positif (Veyssier, 1999a),



**Figure N°3:** Structure d'un aminoglycoside: Néomycine B (Tor, 2006).

Le ribosome a été identifié comme la cible principale de tous les aminosides, leurs actions s'exercent principalement suite à leur fixation au niveau du site A (decoding A-site) de l'ARNr 16S de la sous unité 30S du ribosome bactérien, une fixation qui induit des erreurs de lecture produisant des protéines aberrantes (Thuresson *et al.*, 2007). La liaison de l'antibiotique au site A se fait principalement par interaction électrostatique. La structure tridimensionnelle du complexe formé est stabilisée par la présence d'ions mono- ou divalents, elle implique les adénines en position 1492 et 1493 (Tor, 2006). Les études cristallographiques révèlent pour certains aminosides la présence d'autres sites de fixation aussi bien sur la sous unité 30S que sur la sous unité 50S (Vaiana *et al.* 2006). Les effets des aminosides comprennent non seulement la production de protéines défectueuses, mais aussi des altérations des enveloppes bactériennes et des dégradations de l'ARN. Cette pléiotropie suggère que l'activité des aminosides pourrait ne pas être limitée à

l'inhibition de la synthèse protéique, la létalité induite par les aminosides pourrait être liée à la multitude de leurs effets (Mingeot-leclercq et *al.*, 1999).

### I.1.3.2. Les tétracyclines

Les tétracyclines furent le premier groupe d'antibiotiques à large spectre à être décrit, leurs spectres recouvrent les bactéries à gram positif et à gram négatif, chlamydia, mycoplasme, rickettsies et les protozoaires comme *Plasmodium falciparum* (Chopra et Roberts, 2001). La structure des tétracyclines est faite d'un noyau tétracyclique. Les variations structurales parmi ces cyclines sont minimales. À partir de la molécule de référence; la tétracycline (figure N°4), différents substituants peuvent être fixés sur les carbones en position C5, C6 et C7 (Bryskier, 1999b), les tétracyclines sont de puissants agents chélateurs, leurs propriétés antimicrobienne et pharmacocinétique sont influencées par cette propriété (Chopra et Roberts, 2001).

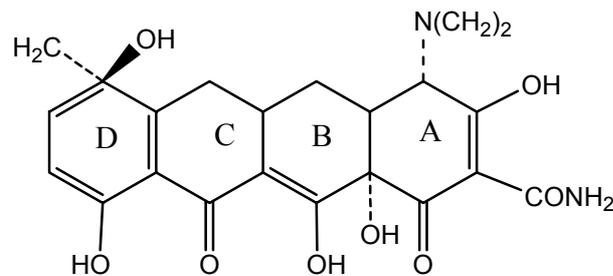


Figure N°4: Structure de la tétracycline (Chopra et Roberts, 2001)

L'inhibition de la synthèse protéique est due à la fixation de l'antibiotique sur un site localisé sur la sous unité 30S. L'interaction codon/anti-codon entre l'ARNt et l'ARNm est perturbée, ce qui bloque la phase d'élongation. Au niveau du site de fixation sont présentes les protéines ribosomales S3, S7 et S19. Les tétracyclines se fixeraient directement sur la protéine S7 et sur la région 892-1054 de l'ARN 16S. Cette fixation étant réversible, l'effet n'est que bactériostatique (Bryskier, 1999b)

### I.1.3.3. Les phénicolés

La famille des phénicolés comprend le chloramphénicol, le thiamphénicol, l'azidamfénicol et le florfénicol. Le chloramphénicol isolé de *Streptomyces venezuelae* en 1947 est un antibiotique à large spectre, et en raison de la relative simplicité de cette molécule,

il fut le premier antibiotique à être produit exclusivement par synthèse chimique. La molécule consiste en un squelette nitrophénylsérine sur lequel le groupement amino a été acétylé par un groupe dichloracétyl. Des substitutions réalisées sur cette molécule ont conduit aux différents analogues du chloramphénicol, dont le florfénicol, où le groupement hydroxyle en position C3 a été remplacé par un groupement fluore. Le groupement (-NO<sub>2</sub>) en position para du cycle phényl qui est considéré comme responsable de la toxicité médullaire est remplacé par un groupement sulfoxy-méthyl (-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) dans la molécule de thiamphénicol (Doublet, 2004).

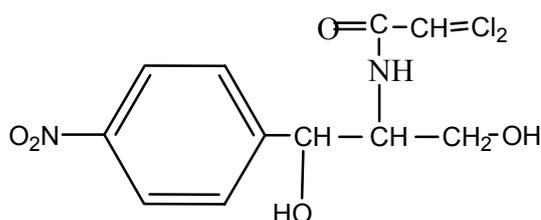


Figure N°5: Structure du chloramphénicol (Doublet, 2004).

Le spectre d'activité du chloramphénicol inclut les bactéries aérobies et anaérobies à gram positif ou à gram négatif, les spirochètes, les chlamydias, les mycoplasmes et les rickettsies. Ces antibiotiques inhibent la synthèse protéique, en ciblant la peptidyl-transférase de l'ARN 23S de la sous unité 50S du ribosome bactérien (Long et Porse, 2003), réduisent l'efficacité catalytique de la peptidyl-transférase, inhibent la formation de la liaison peptidique et bloquent la traduction de l'ARN messager. Cette fixation est réversible, ce qui explique l'effet bactériostatique sur la plupart des bactéries (Fisch, 1999).

### I.3.4. Les macrolides, lincosamides et streptogramines

On regroupe dans le même groupe d'antibactériens, les macrolides, les lincosamides et les streptogramines (MLS), car bien que ces molécules aient des structures différentes, elles ont une cible commune et un spectre d'activité similaire (Nakajima, 2002).

#### I.1.3.4.1. les macrolides

Ce sont des molécules composées d'un macrocycle lactonique à 14, 15 ou 16 chaînons sur lequel sont greffés plusieurs sucres aminés ou neutres (Nakajima, 2002). Initialement isolé à partir de la fermentation de plusieurs espèces de *Streptomyces*, par la suite des dérivés semi-synthétique,

dont récemment les kétolides, principalement à partir de l'érythromycine, ont été développés (Ackermann et Rodloff, 2003).

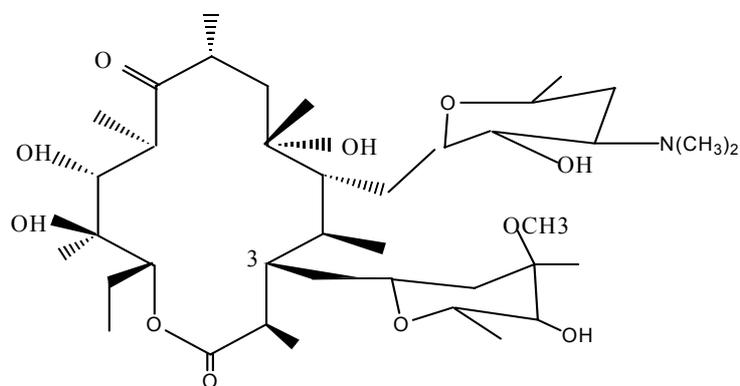


Figure N°6 : Structure de l'érythromycine (Wright, 2003).

#### I.1.3.4.2. les lincosamide

Ces molécules sont constituées d'un acide aminé, une L-proline substituée par une chaîne alkyl en position 4', et d'un sucre, le lincosamine, reliés entre eux par une liaison amide. Cette famille est composée de deux molécules : l'une d'origine naturelle, la lincomycine, isolé de la fermentation de *Streptomyces lincolensis* et son dérivé chloré la clindamycine (Bryskier, 1999c).

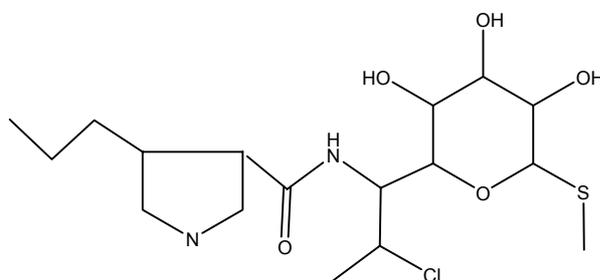


Figure N°7 : Structure de la clindamycine (Tonson et al., 2003).

#### I.1.3.4.3. Les streptogramines

Les streptogramines sont composées d'un mélange d'au moins deux composés appartenant à deux groupes différents, les streptogramines A qui sont des macrolactones cycliques polyinsaturées et les streptogramines B, qui sont des hétérodécapéptides cycliques substitués (Bryskier, 1999c).

Les macrolides, les lincosamides et les streptogramines (MLS) ont un spectre limité principalement aux bacilles, cocci à gram positif, cocci à gram négatif et bactéries à développement

intracellulaire. Ils sont bactériostatiques. Dans le groupe des streptogramines chaque composant est bactériostatique mais l'association des composants de type A et B est synergique et bactéricide (Bryskier, 1999c).

Les MLS inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous unité 50S du ribosome bactérien. Leur site de fixation est complexe, localisé au niveau de la boucle centrale du domaine V (domaine peptidyl-transférase) de l'ARNr 23S et implique les adénines en position 2058, 2059 et 2062 (numérotation d'*Escherichia coli*), et des protéines ribosomales. Les données cristallographiques récentes montrent que ce site se situe à proximité de l'entrée du tunnel par lequel la chaîne peptidique en cours d'élongation quitte le ribosome. Au final la fixation des macrolides entraînerait un blocage de l'élongation de la chaînes peptidique naissante en obstruant le tunnel de sortie du ribosome (Tonson et al., 2003). L'inhibition de l'assemblage des sous unités ribosomales a été observée chez *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* en présence de certains macrolides (Nakijam, 2002).

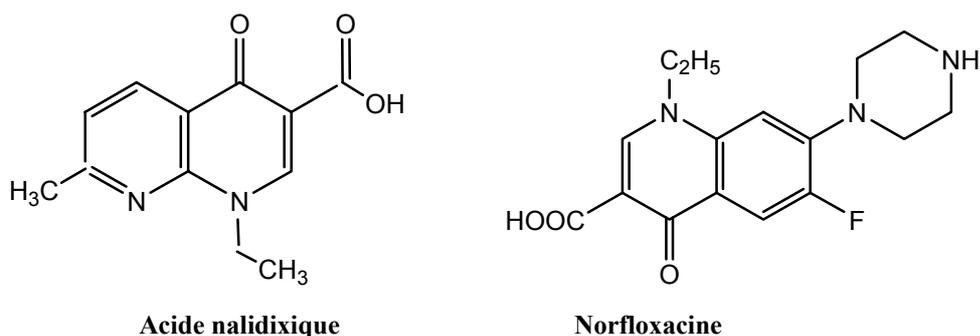
#### **I.1.3.5. Oxazolidones**

Les oxazolidones sont une nouvelle famille d'antibiotiques totalement synthétiques, dont le spectre d'activité inclut les cocci et les bacilles à gram positif, les bactéries à développement anaérobie et *mycobacterium tuberculosis*. Le linzolid est le premier agent de cette famille à être utilisé en médecine humaine (Dutronc et al., 2005). Il bloque la synthèse protéique par fixation sur le site P de la sous unité 50S et empêche son attachement sur la sous unité 30S elle-même associée à l'ARNt portant le premier acide aminé, méthionine, ce qui aboutit au défaut de formation du ribosome 70S d'où l'inhibition de la synthèse protéique. (Dutronc et al., 2005).

#### **I.1.4. Antibiotiques inhibant la synthèse de l'ADN**

##### **I.1.4.1. Les quinolones et fluoroquinolone**

Groupe d'agents antibactériens dont la structure de base commune et la présence de deux cycles aromatiques accolés, les fluoroquinolones (quinolone de deuxième génération) sont obtenues par l'addition d'un atome de fluore en position 6 et d'un groupement pépirazinyle ou méthylpépirazinyl en position 7 de l'acide nalidixique. Les quinolones de première génération ont un spectre d'activité limité à certaines bactéries à gram négatif, alors que les quinolones de deuxième génération et troisième génération ont un spectre plus étendu (Andersson et MacGowan, 2003).

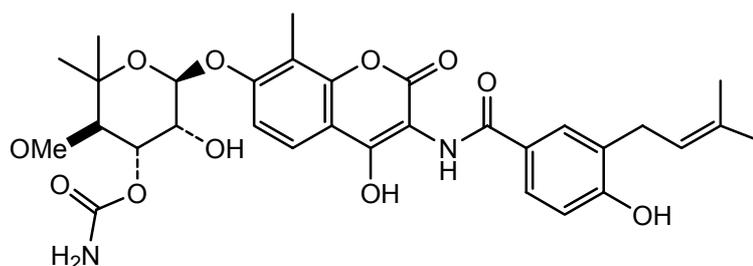


**Figure N°8:** Structure d'une quinolone (Drilca et Zhao, 1997) et d'une fluoroquinolone d'après Katzung, 1998 in Cushnie et Lamb (2006).

L'ADN gyrase, et la topoisomérase IV sont des enzymes impliquées dans la régulation de l'enroulement et de la topologie de l'ADN (Drilca et Zhao, 1997). Elles sont les cibles des quinolones. Les fluoroquinolones exercent leur effet inhibiteur en se liant via des liaisons hydrogène au complexe ADN gyrase-ADN bactérien et au complexe topoisomérase IV-ADN bactériens. D'une manière schématique, les fluoroquinolone empêchent la relégation des deux brins ADN coupés par les topoisomérases et stabilisent le complexe topoisomérase-ADN coupé (Hawkey, 2003), ce complexe bloque alors la réplication de l'ADN de manière réversible.

#### I.1.4.2. Les antibiotiques coumariniques

C'est un groupe d'antibiotiques contenant un noyau coumarinique, ils diffèrent par les autres constituants moléculaires fixés sur ce noyau, les antibiotiques coumariniques sont actifs sur les cocci et les bacilles à gram positif et inactifs sur les bacilles à gram négatif fermentaires. Ils inhibent la synthèse de l'ADN en inhibant l'activité ATPasique de l'ADN gyrase, la novobiocine se fixe au niveau de la partie protéique de 24 KD de la sous unité B de l'ADN gyrase, où le site de fixation de l'ATP et des dérivés coumariniques et voisins chevauchent (Bryskier et Klich, 1999; Bellon *et al.*, 2004).



**Figure N°9:** Structure de la novobiocine (Wigle et Singleton, 2007)

### I.1.5. Antibiotiques inhibant la synthèse de L'ARN

Les ansamycines sont une série de dérivés qui possèdent un noyau aromatique et une chaîne aliphatique qui lui est fixé de part et d'autre. En fonction de ce noyau aromatique on distingue les ansamycines de type naphthalène et les ansamycines de type benzénique. Les molécules du premier groupe sont des antibactériens ou des anti-viraux, tandis que les molécules du second groupe sont principalement des anti-tumoraux, des antifongiques et des anti-protazoaires (Bryskier, 1999d). Les rifamycines sont généralement actifs sur les bactéries à gram positif et contre certaines bactéries à gram négatif (Singleton, 2005) et inhibent la synthèse de l'ARN à partir de l'ADN par leur fixation sur la sous unité  $\beta$  de l'ARN polymérase ADN-dépendante, cette fixation étant réversible l'effet n'est que bactériostatique (Bryskier, 1999d).

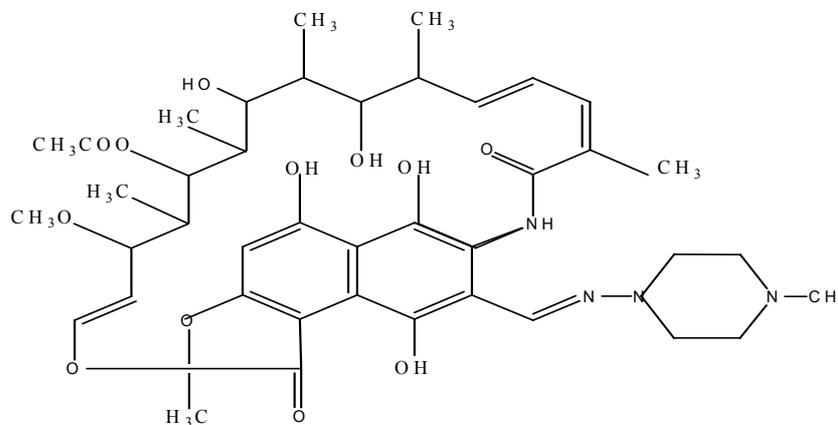


Figure N°10: Structure de la rifampicine

### I.1.6. Antibiotique inhibant la synthèse du folate

#### I.1.6.1. Les sulfamides

Les sulfamides utilisés en thérapeutique anti-infectieuse sont des dérivés sulfanilamides (Veyssier, 1999b). Ils interfèrent avec une étape précoce de la synthèse de l'acide folique, la condensation par la dihydroptéroate synthétase de l'acide *P*-aminobenzoïque (dont ils sont des analogues structuraux) avec la dihydropteridine qui donne naissance à l'acide dihydropéroïque. Les intermédiaires réactionnels ainsi formés par condensation avec les sulfamides sont inutilisables par les réactions ultérieures conduisant au folates (Perry et al., 2004).

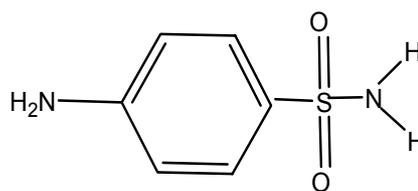


Figure N°11: Structure du noyau sulfanilamide (Singleton, 2005).

### I.1.6.2. Les diaminopyrimidines

Sont également des analogues de substrats. Le triméthoprime est le représentant le plus important de cette famille. Analogue de la pyrimidine, il inhibe la conversion du dihydrofolate en tétrahydrofolate en agissant sur la dihydrofolate réductase (Singelton, 2005).

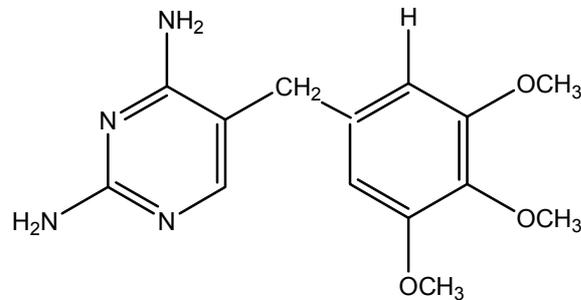


Figure N°12: Structure du triméthoprime (Veyssier, 1999b).

Pour faire face aux effets délétères des antibiotiques, les bactéries ont développées des stratégies de défense.

## I.2. La résistance bactérienne aux antibiotiques

A coté de la résistance naturelle (intrinsèque) de certaines espèces bactériennes à certains antibiotiques, il existe une résistance acquise des souches à l'intérieur d'une espèce théoriquement sensible (Duval et Soussy, 1990). Une souche est dite résistante lorsque la concentration de l'antibiotique qu'elle est capable de supporter est notablement supérieure à la concentration utilisée en thérapeutique (Cloete, 2003). L'expression de la résistance est un phénomène contrôlé génétiquement.

### I.2.1. Le support génétique de la résistance

#### I.2.1.1. La résistance par mutation

Le terme « mutators » désigne des bactéries qui présentent un taux de mutation plus élevé que la normale. Ces bactéries jouent un rôle important dans l'émergence et la propagation de phénomènes de résistance (Chopra et *al.*, 2003) ces mutations peuvent affecter la conformation ou le niveau de production d'une protéine importante pour l'activité de l'antibiotique (Andermont, 2002). Dans certains cas une seule mutation ponctuelle suffit pour conférer à la bactérie un niveau de résistance élevé, dans d'autres cas plusieurs mutations sont nécessaires pour la manifestation de la résistance (Li, 2005).

### **I.2.1.2. La résistance par acquisition de gènes**

Elle est due à un phénomène d'addition d'informations génétiques permettant à la bactérie d'acquérir de nouveaux caractères. Les plasmides et les transposons sont connus pour être d'importants agents de dissémination rapide et globale des gènes de résistance aux antibiotiques (Hogane et Kolter, 2002). Souvent les différents gènes de résistance sont portés par le même élément transférable. Un plasmide donné possède un assortiment variable de caractères de résistances qui lui permet de rendre la bactérie qui l'héberge résistante à plusieurs antibiotiques (Duval et Soussy, 1999). Il se transmet horizontalement et verticalement, parfois entre espèces très éloignées du point de vue phylogénétique (Andermont, 2002).

### **I.2.2. Mécanisme de la résistance**

Les différents processus de résistance peuvent être groupés en trois grands mécanismes : modification de l'antibiotique, modification de la cible et de la concentration intracellulaire de l'antibiotique (défaut d'accumulation) (Pages, 2003)

#### **I.2.2.1. Modification de l'antibiotique**

De nombreuses enzymes sont connues pour inactiver les antibiotiques. Certaines enzymes détruisent directement la molécule d'antibiotique, d'autres se contentent de l'inactiver en ajoutant directement sur la molécule différents groupements chimiques. Le spectre de ces enzymes est généralement limité à une famille d'antibiotique, voire uniquement à certaines molécules d'une famille. Les  $\beta$ -lactamines sont inactivées par les  $\beta$ -lactamases qui ouvrent le noyau  $\beta$ -lactame, les aminosides sont inactivés par divers phosphorylases, adénylases et acétylases, le chloramphénicol par des acétylases (Duval et Soussy, 1999).

#### **I.2.2.2. Modification de la cible de l'antibiotique**

Cette modification peut être liée à une modification du gène codant la cible ou à des enzymes qui vont modifier la cible native, ce qui peut rendre la cible de l'antibiotique inaccessible ou non reconnaissable. Ainsi des protéines liant la pénicilline modifiées PBP2' ou PBP2a codées par le gène *mecA* sont associées à la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (Matsushashi et al., 1986). Ces protéines ont une affinité plus faible pour les  $\beta$ -lactamines et restent fonctionnelles à de fortes concentrations (Hartam et thomasz, 1984)

### **I.2.2.3. Modification de la concentration intracellulaire de l'antibiotique**

Pour qu'un antibiotique soit efficace, il doit atteindre sa cible à des concentrations suffisantes (Cloete, 2003). La résistance par défaut d'accumulation de l'antibiotique peut être due à une imperméabilité et/ou à un transport actif vers l'extérieur de la cellule.

#### **I.2.2.3.1. Modification de la perméabilité membranaire**

Deux composants principaux déterminent la perméabilité de la membrane externe des bactéries à Gram négatif : le lipopolysaccharide (LPS) qui forme une barrière efficace de faible perméabilité qui empêche l'entrée directe et rapide des molécules lipophiles (Nikaido, 2003) et les porines qui sont des protéines transmembranaires qui forment des canaux aqueux permettant le passage des molécules hydrophiles (les  $\beta$ -lactamines, fluoroquinolones) (Pages, 2004). Les porines non spécifiques permettent la diffusion des molécules polaires de poids moléculaire inférieur à 600 Da. Chez les bactéries à gram positif, le peptidoglycane empêche le passage des molécules dont le poids moléculaire est supérieur à 50.000 Da (Hogane et Kolter, 2002). L'entrée des antibiotiques dans la cellule peut donc être diminuée suite à une modification de la structure de la paroi cellulaire (Cui *et al.*, 2000; Pfeltz *et al.*, 2000).

#### **I.2.2.3.2. Efflux actif de l'antibiotique**

Après avoir pénétré à l'intérieur de la bactérie, l'antibiotique peut être rejeté à l'extérieur par un système de transport membranaire actif appelé, pompe d'efflux. Ces protéines peuvent être spécifiques d'une classe d'antibiotique ou non spécifiques et être responsables de phénomène de multi-résistance aux antibiotiques (multi drug resistance) (Cattoir, 2004). Les pompes d'efflux sont classées en fonction de la source d'énergie nécessaire à leur changement de conformation qui peut être fournie soit par dissipation d'un gradient de pH ou d'ion  $\text{Na}^+$ , ou par hydrolyse de l'ATP (Borges-Walmsley *et al.*, 2003).

La plupart des familles d'antibiotiques sont touchées par la résistance par efflux, excepté les glycopeptides.

### **I.3. Biofilm et la tolérance aux antibiotiques**

Le biofilm se définit comme une population bactérienne adhérente à une surface et enrobée d'une matrice d'exopolysaccharide (Filloux et Vallet, 2003). Les biofilms peuvent se développer sur des surfaces inertes comme les cathéters et les implants ou sur du matériel vivant comme la cavité buccale et les yeux. En général, les bactéries enfouies à l'intérieur du biofilm tolèrent des concentrations en antibiotiques plus élevées que leurs semblables planctoniques (Hogane et Kolter,

2002 ; Parsek et Fuqua, 2004). Sa formation est partiellement contrôlée par un système de communication intra-bactérien dépendant de la densité bactérienne «le quorum sensing» (Fux et *al.*, 2005). Dans ce système la communication repose sur la synthèse et la diffusion de bactérie à bactérie de petites molécules appelées acylhomosérines lactones (AHL) (Ruimy et Andremont, 2004).

Longtemps considéré comme marginal l'activité des antibiotiques issue des végétaux supérieurs a suscité un intérêt par le passé, mais face aux limites thérapeutiques des antibiotiques classiques, on assiste ces dernières années à un regain d'intérêt pour les molécules antibactériennes d'origine végétal (Taylor et *al.*, 2002)

#### **I.4. Les composés phénoliques et l'activité antibactérienne**

Les composés phénoliques forment un vaste ensemble de substances dont l'élément structural fondamental caractéristique est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction; éther, ester ou hétéroside (Bruneton, 1999). Dans la nature la synthèse de noyau aromatique est le fait des seuls végétaux et micro-organismes; pour cela deux voies sont mise en oeuvre :

-la voie la plus courante est celle qui, *via* le shikimate (acide shikimique), conduit des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acides benzoïques, lignanes, lignines, coumarines, etc. (Schéma en annexe).

-l'autre voie part de l'acétate et conduit à des poly- $\beta$ -cétoesters de longueur variable; les polyacétates qui engendrent par cyclisation des composés polycycliques: isocoumarines, quinones, etc... (Bruneton, 1999) (Schéma en annexe)

La pluralité structurale des composés phénoliques due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité, très fréquentes, d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composés d'origine mixte (Bruneton, 1999). Les composés phénoliques constituent la classe de métabolites secondaires la plus impliquée dans les mécanismes de défense constitutifs et inductibles chez les plantes (Levin, 1976).

### I.4.1. Les acides phénols

Par convention le terme acide phénol désigne les dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (Shahidi et Naczk, 2004)

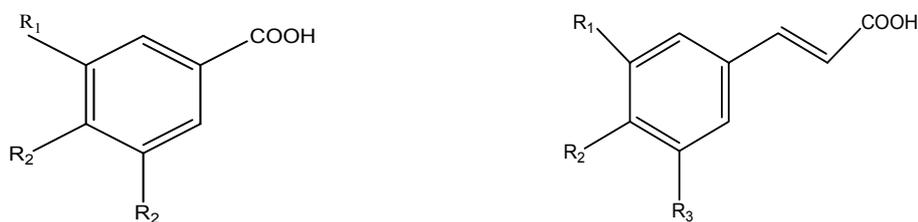


Figure N°13: Structure des acides phénols. A) acides cinnamiques. B) acides benzoïques (Handique et Baruah, 2002).

#### I.4.1.1. L'activité antibactérienne des acides phénols

La littérature rapporte l'effet inhibiteur de l'acide caféique sur les espèces du genre *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Clostridium* et *Bacteroides* et sur *Escherichia coli*, (Lee et al., 2006), de l'acide rosmarinique sur *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori* (Shetty et Lin, 2006), *Pseudomonas fluorescens* et *Erwinia carotovora* (Bais et al., 2002), des acides protocatéchique, p-hydroxy-benzoïque, vanillique, p-coumarique et caféique vis-à-vis d'*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Bacillus cereus* (Aziz et al., 1998). Il a été également démontré que l'éthyle gallate et les alkyles gallates agissent en synergie avec les  $\beta$ -lactamines et sensibilisent des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (Shibata et al., 2005).

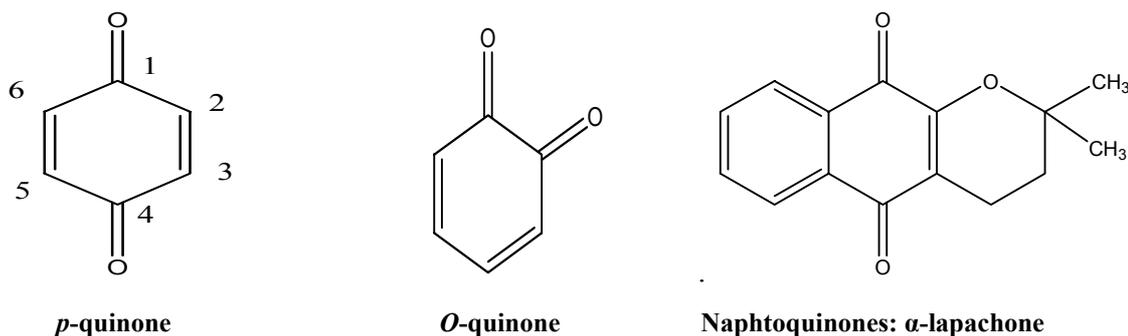
#### I.4.1.2. Mode d'action des acides phénols sur la cellule bactérienne

L'acide benzoïque et l'acide rosmarinique peuvent provoquer une hyper acidification du cytosol, affecter la force protonotrice et induire une perturbation du potentiel membranaire menant à la mort cellulaire (Shetty et Lin, 2006). Bais et ses collaborateurs (2002) ont observé des dommages du nucléoïde et une condensation du matériel génétique ainsi que des changements morphologiques chez *Pseudomonas aeruginosa* traitée par l'acide rosmarinique, suggérant que l'action antibactérienne de cet acide s'exercerait à un niveau génique.

### I.4.2. Les quinones

Ce sont des cycles aromatiques avec deux substitutions cétones (Shetty et Lin, 2006). Ils correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques et sont caractérisés par un motif 1,4-dicétocyclohexa-2,5-diéniq; *para*-quinones, ou éventuellement, par un motif 1,2-dicétocyclohexa-3,5-diéniq; *ortho*-quinones. Les quinones naturelles ont leur dione conjuguée

aux doubles liaisons d'un noyau benzénique; benzoquinones, ou à celles d'un système aromatique polycyclique condensé comme le noyau naphthalène; naphtoquinones, (Bruneton, 1999).



**Figure N°14:** Formule de la *p*-quinone, de la *O*-quinone (Bruneton, 1999) et d'une Naphtoquinone (Priera et al., 2006).

#### I.4.2.1. Activité antibactérienne des quinones

Les quinones issus de l'oxydation des composés phénoliques sont d'excellents bactéricides et fongicides (Levin, 1976). En effet, lors d'un dommage tissulaire, l'une des premières barrières chimiques que le végétal met en place pour contenir le dégât est l'oxydation des composés phénoliques par les polyphénoloxydases et les peroxidases (Angeh, 2006). *In vitro* les benzoquinones naturelles: 2-méthyl-6-(-3 -méthyl-2-butenyl) benzo-1,4-quinone et le (3-hydroxy-2-méthyl-5,3-méthyl-2-butényl) benzoquinones, extraites des feuilles de *Gumera perpera* inhibent *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermis* (Drewes et al., 2005). Les naphtoquinones naturelles exhibent également des propriétés antibactériennes. Priera et al (2006) ont rapporté l'effet inhibiteur du lapachol,  $\alpha$ -lapachone et  $\beta$ -lapachone sur différentes espèces de Staphylocoque résistantes à la méthicilline.

#### I.4.2.2. Mode d'actions des quinones sur la cellule bactérienne

Les quinones sont connues pour leur capacité à se complexer de façon irréversible avec les groupements nucléophile des protéines. Il semblerait que c'est la raison pour laquelle les quinones sont dotées d'un pouvoir antimicrobien, et ce par des phénomènes d'adhésion aux polypeptides de la paroi, ou aux enzymes membranaires, ou par réduction de la biodisponibilité des nutriments (Cowan, 1999).

### I.4.3. Les coumarines

Les coumarines, substances rattachées aux acides cinnamiques, sont constituées par un élément en C6-C3 dans lequel la chaîne en C3 est sous forme d'hétérocycle oxygéné (Ribereau-Gayon, 1968). Elles peuvent être rencontrées à l'état libre ou sous forme d'hétéroside. On distingue les coumarines simples et les pyrano et furanocoumarines linéaires et angulaires qui résultent d'une prénylation intervenant aux niveaux des carbones C6 ou C8 (Bruneton, 1999). Il existe aussi des isocoumarines qui diffèrent des coumarines par la position de O et de CO de l'hétérocycle (Ribereau-Gayon, 1968). Les coumarines sont des phytoalexines dont le taux de production augmente dans les tissus végétaux suite à une infection par un pathogène, ou à une exposition aux différents stress (Gravot, 2002).

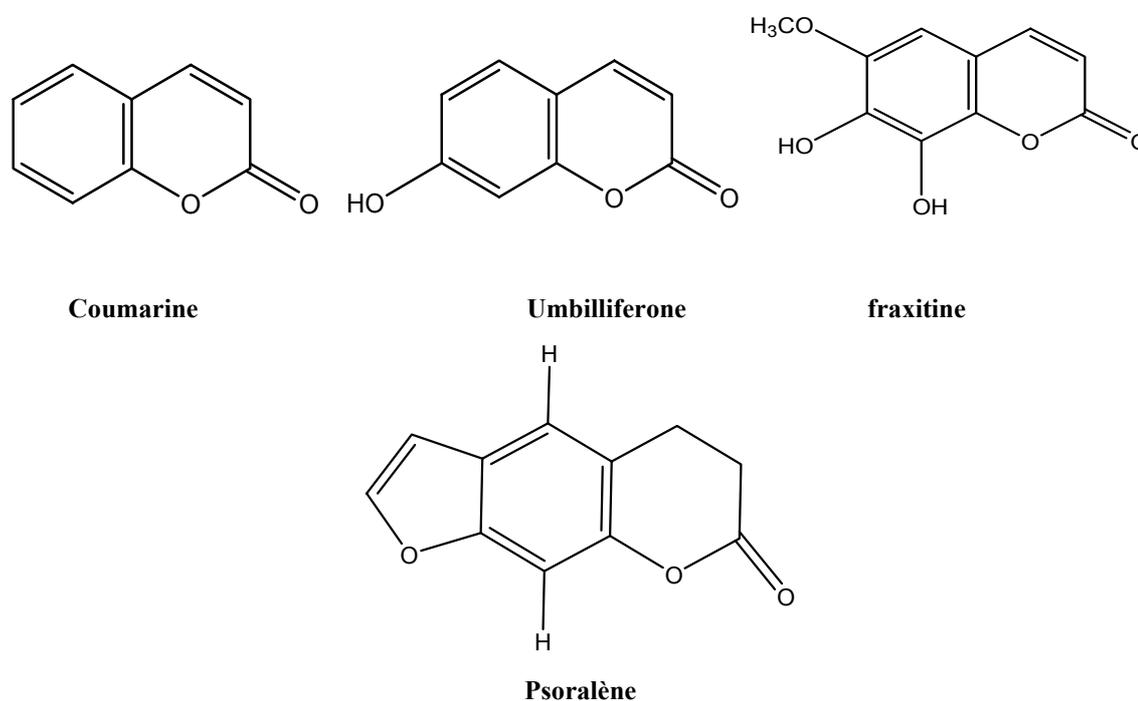


Figure N°15 : Structure de quelques coumarines (Kaneko et al., 2003)

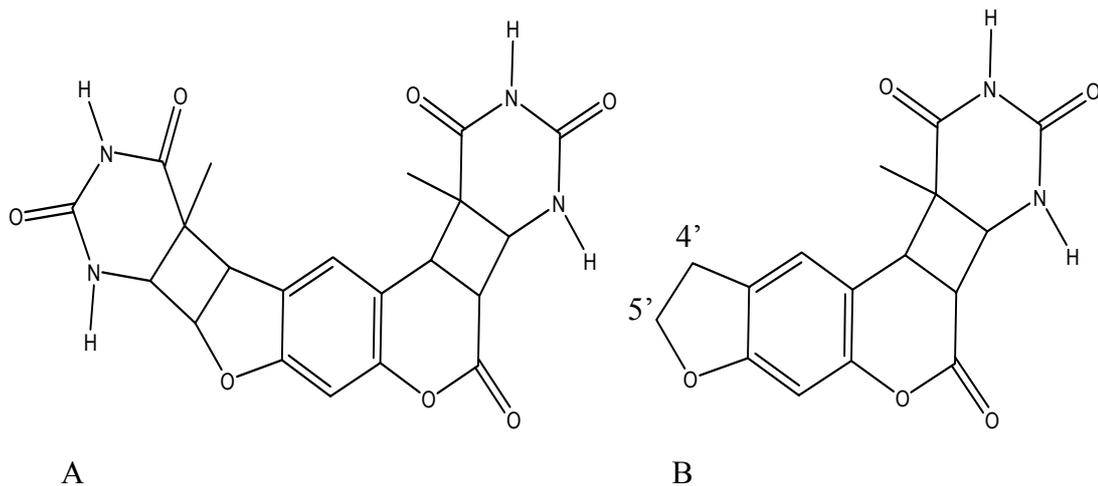
#### I.4.3.1. L'activité antibactérienne des coumarines

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'effet antibactérien d'extraits de plantes riches en coumarines et de coumarines pures (Tada et al., 2002; Chowdhury, 2003; Yasunaka et al., 2005; Wong et Kitts, 2006). La 8-méthoxy psoralène inhibe *Mycobacterium tuberculosis* (Figuroa et al., 2007) et l'association de psoralène et de bergapten inhibe *Escherichia coli* à une concentration de 25µg/ml, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella erogenes* et *Staphylococcus aureus* à une concentration de 50µg/m (Rham et Gary, 2002) alors que la fraxitine à 100ug/ml inhibe *S. aureus* (Marquez et al., 2005). L'effet inhibiteur de l'umbelliférone sur *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et

*Staphylococcus epidermidis* a été rapporté par Ojala et ses collaborateurs (2002) qui ont également montré l'effet inhibiteur de la xanthotoxine sur *Bacillus subtilis* et *S. aureus*. L'inhibition d'*E. coli* et *B. subtilis* par le fraxinol a été démontré par Abou Zeid (2002); l'inhibition par l'acétylumbelliférol et la daphnortin de *Bacillus lentus* ont été mis en évidence par Cottiglia et ses collègues (2001).

#### I.4.3.2. Mode d'action des coumarines sur la cellule bactérienne

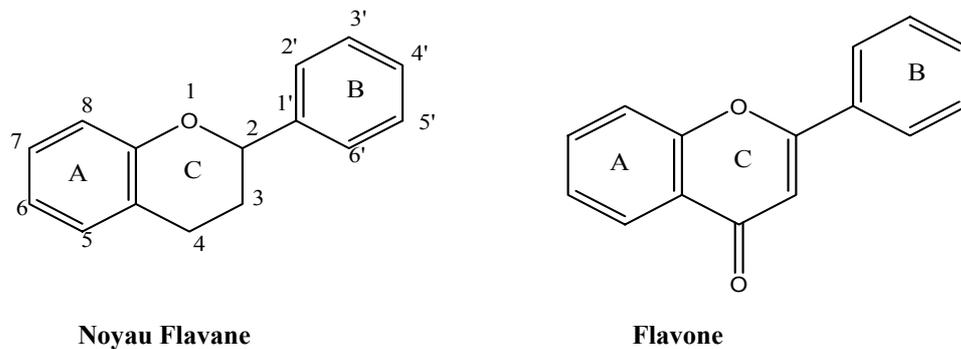
L'action antibactérienne des coumarines repose principalement sur leur capacité d'interaction avec l'ADN, (Kuethe et al., 2007a ; Wong et Kitts, 2006). Les furanocoumarines peuvent après activation par UV interagir avec des macromolécules (Gravot, 2002). L'activation des furanocoumarines linéaires conduit à des réactions de photocycloaddition avec les bases pyrimidiques de l'ADN ou d'ARN (Dall'Acqua et al., 1969 cité par Gravot, 2002). Ces cycloadditions peuvent avoir lieu sur le carbone C3 et C4 et/ou C4' et C5' avec les bases pyrimidiques de l'ADN et peuvent être mono ou bifonctionnelles et dans ce dernier cas établir des liaisons croisées entre les paires de bases des acides nucléiques et induire ainsi des lésions du génome (Bruneton, 1999). L'activation des dérivés du psoralène conduit également à des cycloadditions sur des acides gras insaturés membranaires (Dall'Acqua et Martelli, 1991 cités par Gravot, 2002). L'étude de la relation structure-activité a montré que les coumarines à trois cycles (furano et pyranocoumarines) possèdent une meilleure activité antibactérienne que les coumarines à deux cycles (Kuethe et al., 2007a).



**Figure N°16:** A): Cycloaddition bi-fonctionnelle sur la thymine. B): Cycloaddition monofonctionnelle sur la thymine. (Bruneton, 1999).

#### I.4.4. Les flavonoïdes

Ce terme désigne un ensemble de plus de 45.000 composés qui peuvent être sous forme d'oligomères, dimères ou de polymères (Croteau et *al.*, 2002). Leur structure chimique commune est le motif flavone dérivant lui-même du motif flavane constitué de deux noyaux aromatiques A et B et d'un hétérocycle oxygéné central C (figure N°17).



**Figure N°17:** Structures de base des flavonoïdes (Heim et *al.*, 2002)

Les flavonoïdes sont classés selon la nature de l'hétérocycle oxygéné, son état d'oxydation, le nombre d'hydroxylation et leur position. Ils peuvent se présenter sous forme d'aglycone (entité dépourvue du reste osidique) ou d'hétéroside portant un ou plusieurs résidus osidiques (Havsteen, 2002). Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles, jouent parfois un rôle de signalisation modulant les interactions symbiotiques entre les plantes et les microorganismes (Croteau et *al.*, 2002) et sont également susceptibles d'assurer une protection contre les radiations UV et les attaques d'insectes et de microorganismes (Onyilagha et Grotewold, 2004).

##### I.4.4.1. Les flavones et les flavonols

Caractérisés par la présence d'une double liaison entre les atomes de carbone 2 et 3, les flavonols se différencient des flavones par l'existence d'un groupe OH en position 3 (hydroxy-3 flavones) (Havsteen, 2002). La distribution des flavones et flavonols et de leurs hétérosides est universelle chez les végétaux, mais certains schémas de substitution sont restreints à certaines familles (Bruneton, 1999).

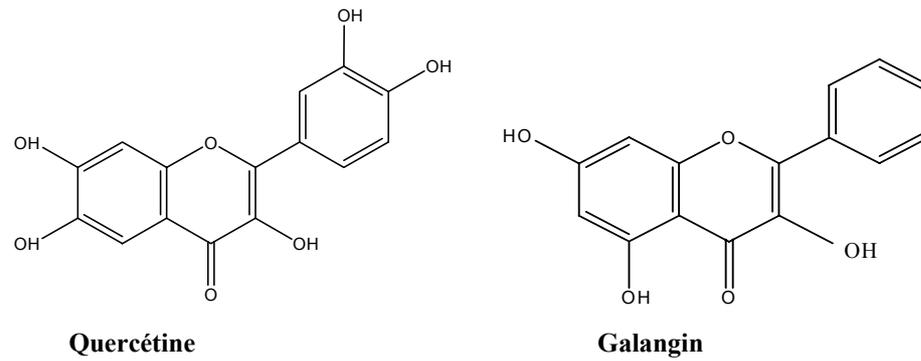
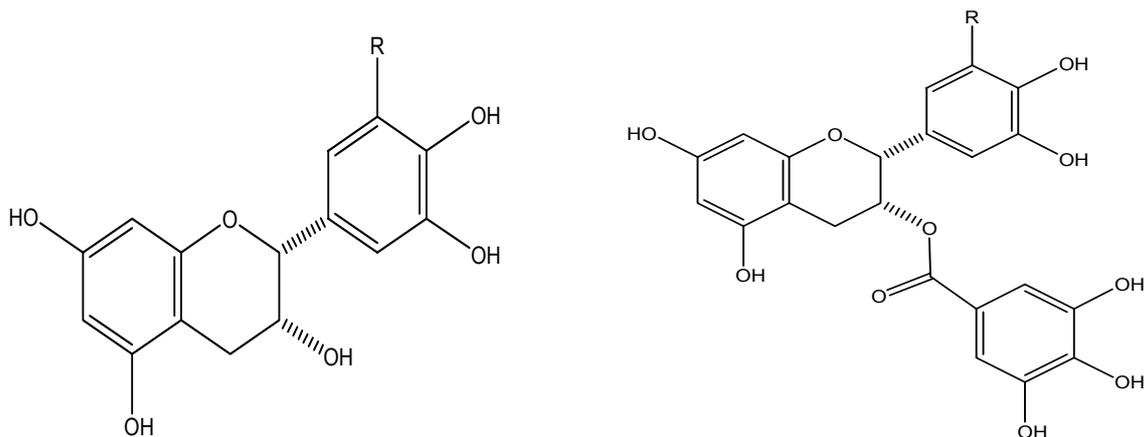


Figure N°18: Formules de quelques flavonols (Cushnie et Lamb, 2006)

#### I.4.4.2. Les flavanes, flavanones et les isoflavones

Les flavanes ont leur hétérocycle central entièrement saturé. Les flavanones dérivent des flavones par disparition de la double liaison au niveau de l'hétérocycle centrale, les isoflavones proviennent d'une transposition du noyau aromatique du carbone C2 vers le carbone C3 (Havsteen, 2002).



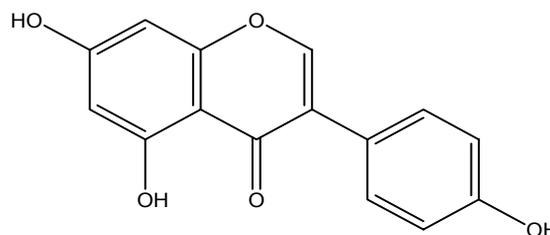
#### Catéchines

R= H(-) épicatechine (EC).

R= OH(-)- epigallocatechine (EGC).

R=H(-)-epicatechine gallate (ECg).

R= OH(-)-epigallocatechin gallate (EGCg).



#### Genisteine

Figure N°19: Formules de quelques flavanols (Anderson et al., 2005) et d'une isoflavone (Heim et al., 2002)

#### I.4.4.3. Les chalcones

Les chalcones sont dépourvues de l'hétérocycle central et sont caractérisés par la présence d'un chaînon tricarboné (Bruneton, 1999).

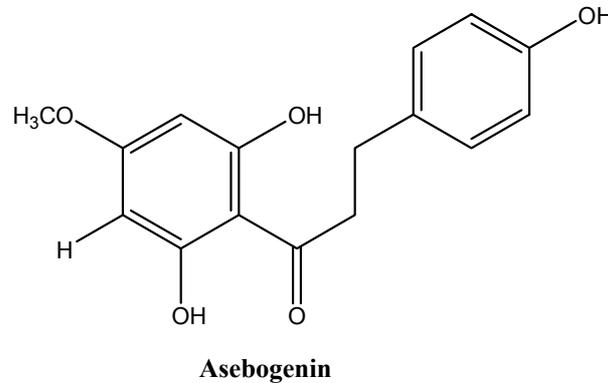


Figure N°20: Structure d'une chalcone (Nowakowska, 2006).

#### I.4.4.4. Activité anti-bactérienne des flavonoïdes

L'activité antibactérienne de plantes riches en flavonoïdes et de flavonoïdes pures a été rapportée par plusieurs auteurs (Hamilton-milleur, 1995; Basil *et al.*, 1999; Chacha *et al.*, 2005; Pepeljnjak *et al.*, 2005; Yenesew *et al.*, 2005). La sensibilité des espèces bactériennes dépend de la souche étudiée et du flavonoïde en question. Aussi, plusieurs études ont rapporté l'effet inhibiteur des flavones sur quelques espèces de genre *Streptococcus* (Yamamoto et Ogawa, 2002), *Listeria monocytogenes*, (Rodriguez-Vaquero *et al.*, 2007a), des catéchines sur *Vibrio parahaemolyticus* et *Staphylococcus aureus* (Hara, 2001), des chalcones sur *Mycobacterium tuberculosis* (Lin *et al.*, 2002), sur différentes espèces des genres *Bacillus* et *Enterococcus* (Tsukiyama *et al.*, 2002) et sur quelque espèces du genre *Legionella* (Friis-Moiller *et al.*, 2002 cités par Nowakowski, 2007). La familles des entérobactéries et les pseudomonas présentent différent degré de susceptibilité vis-à-vis des différentes classes de flavonoïdes (Sqzgec *et al.*, 2005; Kuete *et al.*, 2007 b). Hara (2001) a rapporté l'effet bactéricide de différentes catéchines isolées du thé vert (*Camellia sinensis*) sur les formes végétatives et sporulées de *Clostridium botulinum*, et a rapporté également que ces catéchines sont létales vis-à-vis des formes sporulés de *Desulfotomaculum nigrificans*, (espèce bactérienne impliquée dans la putréfaction du poissons).

Le pouvoir de sensibiliser des souches résistantes aux antibiotiques a aussi été étudié (Yam *et al.*, 1998 ; Hamilton-Miller et Shah, 2000; Hu *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004a). Stapleton et ses collaborateurs (2004a) ont montré que la présence des catéchines ; (-)-epicatechin gallate (ECg) et de (-)-catechin gallate (Cg) à des concentrations de 25 mg/l dans des cultures de *S. aureus* résistantes à la méthicilline réduit la CMI de l'oxacillin de 256 à 64 fois, respectivement. La

présence de flavone et 6,7-dihydroxyflavone à une concentration de 50µg/ml rétablit l'activité des β-lactamines à l'égard de *S. aureus* résistant à la méthicilline ; la CMI de la méthicilline passe de 1024 µg/ml à 4 µg/ml, celle de l'oxacillin est réduite de 512 fois, celle de la céphapirin est réduite de plus de 8000 fois et celle de la panipenem de 32000 fois (Sato et al., 2004 b).

#### I.4.4.5. Mode d'action des flavonoïdes sur la cellule bactérienne

L'action des flavonoïdes sur la cellule bactérienne est pléiotropique, c'est à dire qu'un même composé peut agir sur différentes cibles (Cushnie et Lambes, 2005 a). A la manière des antibiotiques les flavonoïdes peuvent cibler la paroi bactérienne, la membrane cytoplasmique, inhiber la synthèse de l'ADN et interférer avec des voies métaboliques.

L'action des flavonoïdes sur la paroi bactérienne a été confirmée par les travaux de Zhao et ses collègues en 2001, après avoir observé un effet synergique entre les β-lactamines et l'epigallocatechin gallate (EGCg). Entre la DL-cyclosérine et l'EGCg. En plus, ces auteurs ont mis en évidence l'interaction directe de l'EGCg avec le peptidoglycane (Zhao et al., 2001). Encore plus récemment, Stapleton et ses collaborateurs ont rapporté l'apparition de paroi cellulaire très fine lorsque des cultures *Staphylococcus aureus* sont incubées en présence de concentration sub-inhibitrice d'EGCg (Stapleton et al., 2004 b).

Grâce à un modèle de membrane bactérienne artificiel, Caturla et ses collaborateurs (2003) ont montré que les catéchines s'intercalent entre les phospholipides membranaires et provoquent une réduction de la fluidité de la membrane, générant une inhibition de certaines fonctions membranaires. Ainsi l'EGCg interfère avec les voies de signalisations médiées par l'acyl-homoserine-lactone, et inhibe la formation de biofilms bactériens (Huber et al., 2003). Ces auteurs ont aussi montré que l'addition de 40µg/ml d'EGCg réduit significativement la mobilité de *Burkholderia cepacia*. L'inhibition de la pompe d'efflux Tet (K) par l'EGCg est à l'origine de la restauration de la sensibilité aux tétracyclines chez des souches de *S. aureus* dont la résistance aux tétracyclines implique la pompe Tet (K) (Sudano-Roccaro et al., 2004). Récemment, Cushnie et Lambes ont montré que la galangin endommage la membrane cytoplasmique de *S. aureus* et provoque des fuites importantes de potassium dans le milieu (Cushnie et Lamb, 2005 b).

La synthèse de l'ADN peut être inhibée par certains flavonoïdes. Bernard et ses collaborateurs (1997) ont montré que la rutine (flavone glycosylé) est un puissant inhibiteur spécifique de la topoisomerase IV d'*E. coli*, enzyme impliquée dans la décaténation.

Plus récemment, Palper et al (2003) ont montré que la quercétine inhibe la topoisomerase II (ADN gyrase) d'*E. coli* en se liant à la sous unité GyrB (domaine de 24 KD). Le site de fixation de l'ATP et de la quercétine est chevauchant, il en résulte une inhibition de son activité ATPasique. La

galangin (flavonol), un analogue structural de la 4-quinolone (figure N°8), semble également avoir la topoisomerase IV comme cible. Cushnie et Lambe ont montré que des mutants de *S. aureus* résistants aux quinolones exhibant une mutation au niveau du gène *grlB* de la topoisomerase IV (une asparagine remplacée par un acide aspartique en position 470 de la sous unité GrIB) sont hyper-sensibles à la galangin, (Cushnie et Lamb, 2006). Bernard et ses collaborateurs ont également rapporté que des dérivés de la quercétine glycosylées en position C3 (rutine, quercétrine) induisent des coupures spécifiques au niveau du gène de la résistance à la tétracycline du plasmide artificiel pBR322 (Bernard et *al.*, 1997).

Les flavonoïdes interfèrent avec la voie de biosynthèse des acides gras, l'EGCg inhibent les enzymes bactériennes de synthèse des acides gras de type G et I (bacterial fatty acid synthase ; FabG et FabI), les deux enzymes sont inhibées de façon compétitive par l'EGCg qui se lie probablement au site de fixation du cofacteur (NAD(P)H), l'EGCg inhibe aussi le complexe FabG-NADPH déjà formé (Zhang et Rock, 2004). D'autres enzymes et toxines bactériennes sont également inhibées par les flavonoides. La galangin inhibe la L1 métallo- $\beta$ -lactamase (Denny et *al.*, 2002), la pénicillinase est inhibée par l'EGCg (Zhao et *al.*, 2002), la toxine VacA sécrétée par *Helicobacter pylori* est inhibée de façon réversible par certains flavonoides (Tombola et *al.*, 2003). EGCg réduit significativement la production du slime chez *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, et inhibe de ce fait la formation du biofilm bactérien (Blanco et *al.*, 2005).

Les études de relation structure-activité ont montré que l'affinité des catéchines pour les bicouches lipidiques est plus importante en présence du résidu galloyle (Caturla et *al.*, 2003). Alcaraz et ses collaborateurs (2000), en analysant l'activité anti-staphylococcique de plusieurs flavonoïdes, ont conclut que la présence d'un groupement OH en position 2' des chalcones, en position 5 des flavanones, ou flavones ainsi que le nombre et la position des groupement OH du cycle B est déterminante pour l'activité (Anderson et *al.*, 2005).

### I.4.5. Les tannins

Bath-Smith et Swain ont défini les tannins comme étant des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire compris entre 300 et 3000 D, et qui en plus des propriétés classiques des phénols précipitent les alcaloïdes, la gélatine et les protéines. Cette définition est devenue à l'heure actuelle trop restrictive puisque des structures dépassant 50.000 D ont été isolées et identifiées comme étant des tannins (Khanbabaee et Van Ree, 2001).

Leur aptitude à précipiter les protéines parfois appelé astringence est à la base de leur propriété tannante, c'est à dire, de leur capacité à transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible (Bruneton, 1999).

Les tannins sont retrouvés dans presque toutes les parties de la plante ; tige, bois, feuilles et racines ; on distingue chez les végétaux supérieurs deux groupes différents de tannins :

#### I.4.5.1. Les tannins hydrolysables

Ce sont des oligo ou des polyesters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté), est d'un nombre variable de molécules d'acide phénols, le sucre est généralement le glucose. Les tannins hydrolysables sont scindés en deux groupes : les tannins galliques ou gallotannins qui donnent par hydrolyse des sucres et uniquement de l'acide gallique, et les tannins éllagiques dont l'hydrolyse donne en plus des sucres et de l'acide gallique, de l'acide éllagique ( Richeter, 1993).

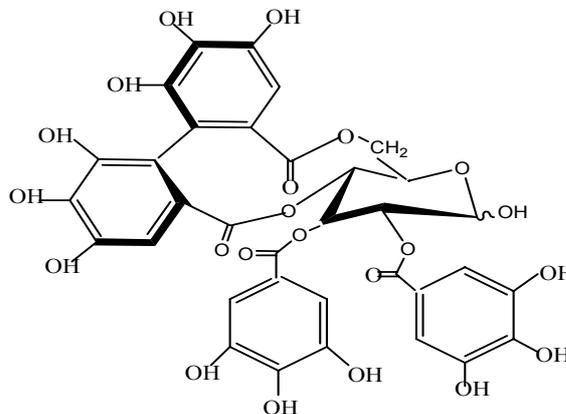


Figure N° 21: Structure d'un tannins hydrolysable: Tellimagrandin (Hatano et *al.*, 2005).

#### I.4.5.2. Les tannins condensés ou proanthocyanidines

Ils sont constitués par la polymérisation de molécules élémentaires qui possèdent des structures générales des flavonoïdes dont les plus importantes sont les flavan-3-ols (catéchines), et les flavan-3-4-diols (leucoanthocyanidines) (Hagerman, 2002). La copolymérisation des catéchines et leucoanthocyanidines est également possible (Nazck et Shahidi, 2004).

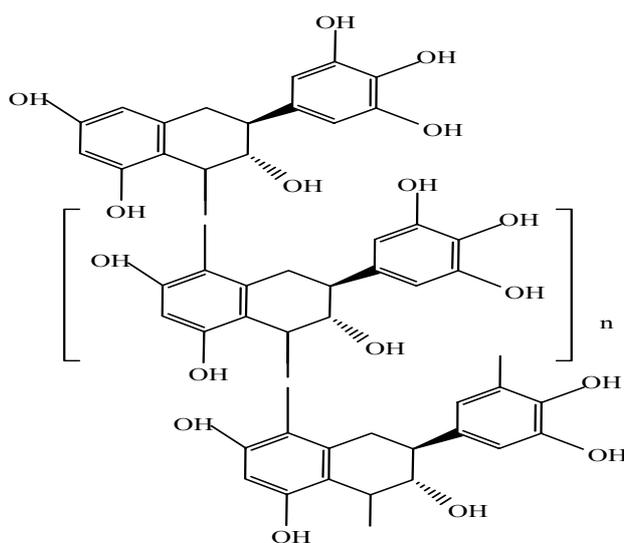


Figure N°22 : Structure d'un tannin condensé: polymère de proanthocyanidine

La plupart des activités biologiques des tannins sont du à leur capacité de former des complexes avec les macromolécules, en particulier les protéines (Bruneton, 1999 ; Okuda, 2005). Ils établissent en solution protéique concentrée des liaisons entre les molécules protéiques (Bruneton, 1999). L'affinité des tannins pour les protéines est d'autant plus marquée que celles-ci sont riches en proline et de conformation flexible (Hagerman et Butler, 1981), une affinité qui dépend également de la masse moléculaire du tannin et de sa structure. En effet, une taille minimale de 300D est nécessaire pour qu'une molécule de tannin précipite une protéine ; pour les tannins condensés cela correspond à un dimère de flavan-3ols, et pour les tannins hydrolysables à un minimum de deux acides galliques, ou d'un acide éllagique, jusqu'à un certains seuil. Cette propriété augmente avec l'augmentation du poids moléculaire du tannin (Singelton et Rossi, 1966 cités par Chung, 1998).

#### I.4.5.3. Activité antibactérienne des tannins

Il a été démontré que les tannins peuvent être bactériostatiques ou bactéricides à l'égard de *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium accolans*, *Erwinia carotovora* (Fogliani et al., 2005), d'*Escherichia coli*, *Listeria monocytogene*, *Salmonella arizonae*, *Salmonella antum*, *Clostridium perfringins*, *Bacillus cereus*, *Clostridium aminophilum*, *Klebsiella pneumoniae* (Taguri et al., 2006), *Campylobacter jejuni*, *Vibrio parahaemolyticus* (Nagayama et al., 2002), *Streptococcus bovis*, *Butyrivibrio fibrisolvens* (Jones et al., 1994) et *Helicobacter pylori* (Funatogawa, 2004). Il a également été démontré que la sensibilité aux antibiotiques de souches résistantes peut être rétabli

remarquablement grâce aux tannins. Shimizu et ses collaborateurs (2001) ont montré sur des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) que l'addition de 16µg/ml de corilagin, un tannin hydrolysable extrait d'*Arctostaphylos uva-urisy* réduisait la CMI de différents antibiotiques de la famille des β-lactamines (oxacilline et cefmetazole) de 100 à 2000 fois. Plus récemment, Hatano et al (2005) ont montré la restauration de la sensibilité des souches de SARM aux antibiotiques de la famille des β-lactamines par des proanthocyanidines d'extraits de *Zizyphus jujuba var. inermis* et d'extraits de *Zanthoxylum piperitum*. Les auteurs ont montré qu'à des concentrations de 64µg/ml (inférieures à leurs CMI), les proanthocyanidines dimériques réduisaient les CMI de l'oxacilline de 1/2 et de 1/16, respectivement tandis que les proanthocyanidines polymériques les réduisait de 64 à 512 fois.

#### **I.4.5.4. Mode d'action des tannins sur la cellule bactérienne**

La toxicité des tannins pour la cellule bactérienne est principalement attribuée à leur pouvoir astringent (Scalbert, 1991). Mais les mécanismes d'action précis sont loin d'être bien compris, l'extrême différence de sensibilité entre les espèces bactériennes laisse supposer que plusieurs mécanismes sont mis en jeu (Chung, 1998). Cette action s'expliquerait par une inhibition d'enzymes bactériennes, une action sur la paroi ou la membrane cytoplasmique et/ou une réduction de la disponibilité des nutriments. En effet, Jones et ses collaborateurs ont montré que les tannins condensés du sainfoin inhibent la protéase de *Streptococcus bovis* et de *Butyrivibrio fibrisolvens* (Jones et al 1994). Tombola et ses collaborateurs (2003) ont rapporté l'inhibition irréversible de la toxine VacA de *Helicobacter pylori* par l'acide tannique. La pénicillinase et les PBP2a sont également inhibées par les tannins (Shiota, 2004).

L'action des tannins sur la paroi expliquerait la synergie observée avec les β-lactamines (Hatano et al., 2005). Elle expliquerait aussi les observations faites par Henis et al en 1964 qu'à des concentrations sub-inhibitrices en poudre de caroube, un changement drastique dans la morphologie de *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* et la formation de protoplaste chez *Cellvibrio fulvus* sont constatées (Henis et al., 1964). L'intégrité et la fonction de la membrane plasmique peuvent être aussi affectée par les tannins, à des concentrations sub-inhibitrice d'acide tannique la respiration de *Cellvibrio fulvus* est inhibée (Henis et al., 1964).

A leur propriété astringente s'ajoute leur propriété de chélater les métaux (fer, cuivre..), deux propriétés impliquées dans leurs capacité à réduire la biodisponibilité d'éléments indispensables (Chung., 1998). Ainsi, à des concentrations suffisamment élevées en tannins la dégradation de certains polymères naturellement biodégradables est réduite (Benoit et Starkey, 1968

cités par Scalbert 1991; Mutsbrouka et *al.*, 2007 ). L'étude de la relation structure-activité indique que pour les tannins hydrolysables la liaison ester est déterminante pour l'activité (Chung, 1998).

### **Quelques données sur les deux espèces**

#### ***Fraxinus angustifolia***

Espèce euro méridionale commune dans les régions humides de toute l'Algérie septentrionale (Baba, 1999), le genre *Fraxinus* appartient à la famille des Oléacées (Jensens et *al.*, 2002), on trouve au niveau de cette espèce trois sous espèces ; *Fraxinus angustifolia* Vahl. ssp. angustifolia, *Fraxinus angustifolia* Vahl. ssp. oxycarpa, *Fraxinus angustifolia* Vahl. ssp. Syriaca cette dernière sous espèce a une aire de distribution limitée à la Turquie, le Pakistan, la Russie et l'Algérie (Wallander, 2006). Aslen et Dardar sont l'appellation locale de cette espèce très anciennement utilisée comme diurétique, laxatif et antirhumatisme (Baba.1999).

#### ***Pistacia lentiscus***

Espèce appartenant à la famille des Anacardiacees, localement appelé Amadagh, elle est très commune dans les forêts et les maquis de toute l'Algérie septentrionale. La tradition méditerranéenne lui attribue des propriétés anti-diarrhéique, antiseptique et diurétique (Baba, 1999).

Les composés phénoliques des végétaux peuvent constituer une source intéressante de substances à activité antibactérienne. La présente étude a pour objectif la caractérisation de l'activité antibactérienne de deux plantes; *Fraxinus angustifolia* et *Pistacia lentiscus* utilisées dans notre médecine traditionnelle.



*MATERIEL ET METHODES*

## II.1. Matériel végétal

### II.1.1. collecte

Sur la base de leur utilisation en médecine traditionnelle locale, deux plantes ont été choisies pour la réalisation de notre étude ; *Fraxinus angustifolia* dont nous avons utilisé les feuilles et l'écorce et *Pistacia lentiscus* dont nous avons utilisé uniquement les feuilles. Le matériel végétal sain (exempt de toute attaque fongique ou d'insecte) a été récolté en juillet 2006 dans un endroit naturel (Azru N'Bechar à Amizour dans la willaya de Bejaia) loin de la pollution et ce pour écarter toute modification dans la composition chimique des deux espèces.

### II.1.2. séchage

Les feuilles de *Pistacia lentiscus* et l'écorce et les feuilles de *Fraxinus angustifolia* ont été séchées entre juillet et août 2006 à une température ambiante dans un endroit aéré et ombragé.

### II.1.3. Broyage et tamisage

Les feuilles et l'écorce séchées ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique (kika Labortechnik M20), les poudres obtenues ont été tamisées et une poudre fine d'un calibre inférieur à 63  $\mu\text{m}$  a été récupérée.



**Figure N°23:** Photographie des parties de plantes utilisées ; s, **A** : écorce de *Fraxinus angustifolia*, **B**: feuilles de *Fraxinus angustifolia*. **C**: feuilles de *Pistacia lentiscu*.

## II.2. Extraction

Nous avons adopté la méthodologie d'extraction des polyphénols décrite par Chiang et ses collaborateurs (Chiang et *al.*, 1994) avec de légères modifications. 300g de poudre ont été mélangés avec de l'éthanol avec un rapport de 1g: 4 ml ; le mélange a été macéré durant 24 heures sous agitation continue à l'abri de la lumière puis transféré dans une éprouvette et laissé décanter pendant 12 heures. Le surnageant a été récupéré, versé dans des cristallisoirs et laissé sécher à l'air libre jusqu'à obtention d'un résidu sec. Il s'en est suivi une étape d'extraction avec des partitions liquide-liquide. L'extrait éthanolique a été dissout dans un mélange d'éthyle acétate/eau (3 :1) et laissé décanter pendant 24h. Les phases aqueuse et organique ont été séparées pour subir une évaporation à l'air libre. Une partie de la phase organique d'éthyle acétate a été partagée en deux : une partie a été dissoute dans un mélange hexane/eau (3 :1) et l'autre dans un mélange chloroforme/eau (3 :1). Les mélanges ont été laissés décanter pendant 24h, puis les phases organique et aqueuse ont été séparées et séchées à la température ambiante. Tous les solvants utilisés sont de marque prolabo.

Le pourcentage d'extraction de chaque étape est calculé par la formule suivante :

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

**P<sub>0</sub>** : poids du récipient vide (g).

**P<sub>1</sub>** : poids du récipient après évaporation du solvant.

**E** : poids de l'échantillon initial (poudre ou extrait sec de la phase précédente).

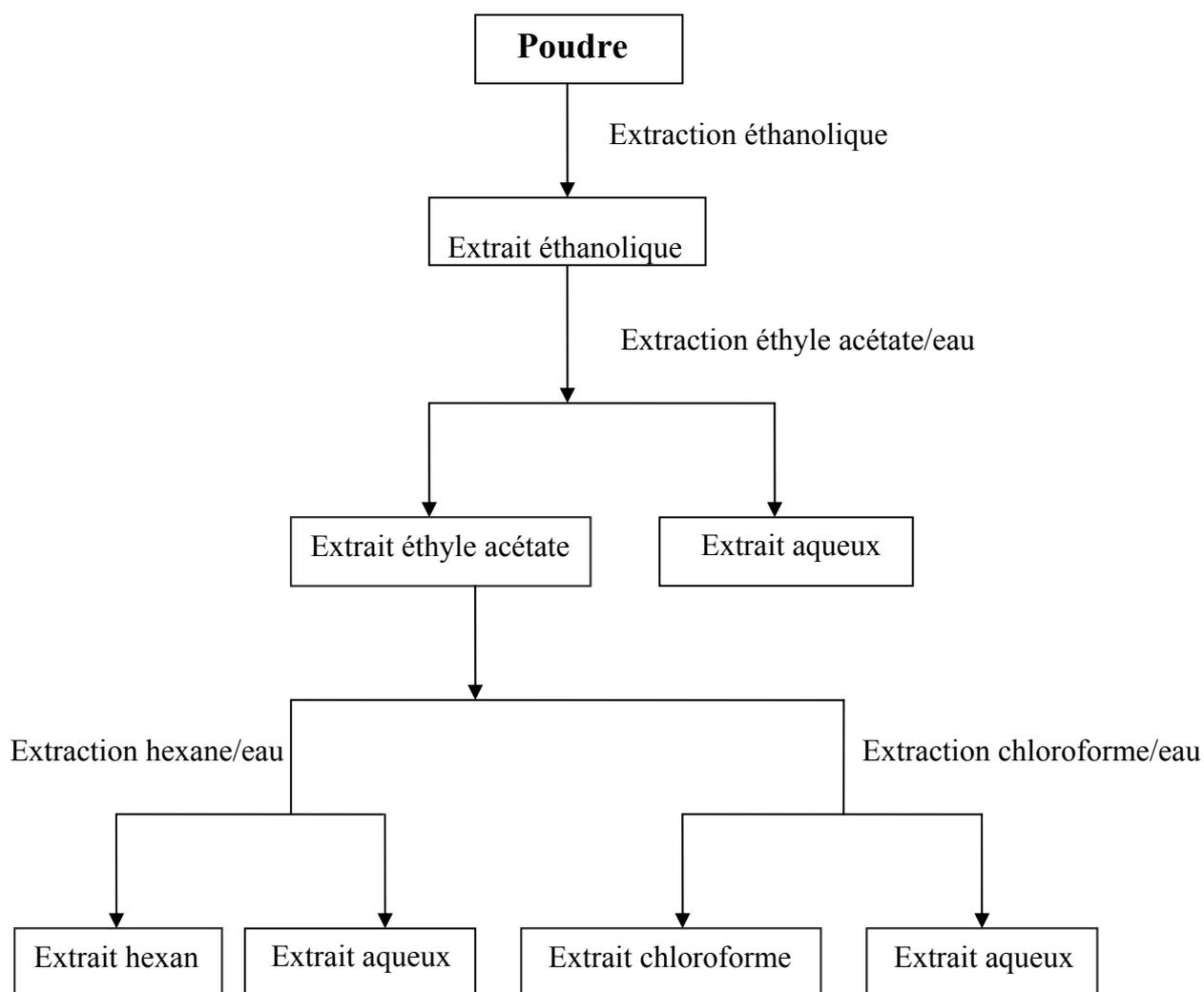


Figure N°24: Protocole d'extraction des composés phénoliques à partir de la poudre des plantes (Chiang *et al.*, 1994).

## II.3. Dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins

### II.3.1. Dosage des phénols totaux

Le réactif de folin-ciocalteu est un mélange de l'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) de l'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_2O_{40}$ ) (Follin et Ciocalteu, 1927), en présence de polyphénols. Ce réactif est réduit en un mélange d'oxyde bleu de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène et l'intensité de la coloration bleue produite est proportionnelle au taux des composés phénoliques présent dans le milieu réactionnel (Ribéreau-Gayon, 1968)

La teneur en composés phénoliques des extraits a été évaluée par la méthode Lowman et Box (1983) in Owen et Johns (1999). Les différents extraits sont bouillis dans du méthanol 50%, filtrés et ajustés à 100ml avec du méthanol 50%. Par la suite 2,5ml de l'échantillon ont été dilués dans de l'eau distillé et 1,5 ml de bicarbonate ( $Na_2CO_3$ ) à 200g/l et 0,5ml de réactif de folin-ciocalteu y sont ajoutés. Après une incubation d'une heure à température ambiante et à l'abri de la

lumière, la lecture de l'absorbance a été effectuée à 750nm. Le contenu en phénols totaux a été déterminé à partir d'une courbe d'étalonnage à l'acide gallique (voir annexe). Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait. Tous les essais ont été effectués trois fois.

### II.3.2. Dosage des flavonoïdes

Le contenu en flavonoïdes des différents extraits a été déterminé par la méthode de Mimica-Dukié1992 in (Maksimović et al., 2004), méthode spectrophotométrique qui se base sur la capacité de ces composés à former des complexes de couleur jaunâtre avec le chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ). Ce réactif a été préparé par dissolution de 133mg d' $AlCl_3$  et 400mg d'acétate de sodium dans 100ml d'eau distillée. Pour 10ml de la solution d'extrait, 5ml du réactif d' $AlCl_3$  lui on été ajoutés et la lecture d'absorbance effectuée à 430nm contre un blanc de 10ml de la solution d'extrait avec 5ml d'eau distillée. Une courbe étalon (voir annexe) a été réalisée avec la rutine comme standard et à partir de laquelle la teneur en flavonoïdes a été calculée et exprimée en mg équivalent rutine par g d'extraits. Tous les essais ont été effectués trois fois.

### II.3.3. Dosage des tannins

La teneur en tannins a été déterminée par la méthode décrite par Hagerman et Bulter (1978). Cette méthode mesure la quantité de tannins condensés et/ou hydrolysables qui précipitent la protéine standard BSA.

#### Préparation des solutions

**Tampon A** : 200mM d'acide acétique, 170Mm NaCl ajusté à pH 4,9.

**Solution de BSA** : une solution de BSA est préparée dans le tampon (A) à une concentration de 1mg/ml.

**SDS/TEA** : 5% de triéthanolamine et 1% de SDS.

**Réactif de chlorure ferrique ( $FeCl_3$ )** : 0.01M de  $FeCl_3$  dans 0.01 M de HCl.

2ml de la solution de BSA ont été additionnés de 1ml de la solution d'extrait et le tout a été incubé à 4°C pendant 24h alors que les mélanges BSA et acide tannique destiné à la courbe d'étalonnage ont été incubés à une température ambiante (25°C à 30°C) durant 15 minute. Après incubation, le précipité a été récupéré par centrifugation à 3000g pendant 15minutes, dissout dans 4ml de solution SDS/TEA et additionné de 1ml du réactif de  $FeCl_3$ . Après 15 minutes, la lecture a été effectuée à 510nm contre un blanc contenant du chlorure ferrique et du SDS/TEA. Tous les essais ont été répétés trois fois et les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide tannique par g d'extrait. (Pour la courbe d'étalonnage, voir annexe).

## II.4. Détermination de l'activité antibactérienne

### II.4.1. les souches bactériennes utilisées

Les souches sur lesquelles nous avons testé l'activité antibactérienne des extraits ont été sélectionnées en fonction de leur pouvoir pathogène pour l'homme. Elles sont issues de sources différentes (voir détail dans le tableau N°1.)

**Tableau N°1:** Origine des différentes souches bactériennes.

souches	Organisme fournisseur	Origine du prélèvement
<i>Staphylococcus aureus</i>	Hôpital d'Akbou	Pus de plaie
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hôpital d'Akbou	Pus de plaie
<i>Shigella dysenteriae</i>	Institut Pasteur d'Algérie	/
<i>Salmonella enteritidis</i>	Hôpital d'Akbou	Sang
<i>Escherichia coli</i> O111B4	Laboratoire de Microbiologie Appliquée de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia	Selles de nourrissons diarrhéiques
<i>Proteus mirabilis</i>	Hôpital d'Akbou	urine

Ces souches ont été isolées et identifiées par les laboratoires des différents organismes fournisseurs, mais nous avons tout de même préféré vérifier quelques caractères biochimiques; la coloration de Gram, la recherche de la catalase, la recherche de la fermentation des sucres, la production de gaz et d'H<sub>2</sub>S sur milieu Hajna-Kligler, la recherche de la nitrate réductase sur bouillon nitraté, test de dégradation du mannitol et de la mobilité, utilisation des citrates sur milieu citrate de Simmons, tests VP et RM sur milieu Clark et Lubs, recherche de la coagulase et de la désoxyribonucléase (DNase) sur gélose à l'ADN pour *Staphylococcus aureus*, et la recherche de la pyocyanine sur milieu King A et la pyoverdine sur King B pour *Pseudomonas aeruginosa* (Les résultats de ces testes figurent en annexe)

#### II.4.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale appelé antibiogramme ou méthode de diffusion en milieu gélosé, ou encore méthode des disques, cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse et de s'appliquer sur un grand nombre d'espèces bactériennes. Cette technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés de différents produits à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec la suspension de bactéries à étudier. Chaque antibiotique diffuse au sein de la gélose à partir du disque, et y détermine un gradient de concentration. Les bactéries poussent sur toute la surface gélosée sauf là où elle rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber leur croissance. On observe ainsi autour du disque des zones circulaires exemptes de colonies appelées zones d'inhibition. Cette méthode utilisée par nombre d'auteurs pour la détermination de l'activité antibactérienne d'extraits de plantes (Natarajan *et al.*, 2005; Meléndez et Capriles, 2006; Al-fatimi *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2007) est celle pour laquelle nous avons opté pour déterminer l'activité antibactérienne de nos extraits.

#### Description de la méthode

Le milieu Muller-Hinton en surfusion est coulé dans des boîtes de pétri de sorte que l'épaisseur de la gélose soit de 4mm. Après solidification de la gélose, une suspension bactérienne de  $10^6$  bactéries/ml préalablement préparée par dilution d'une suspension bactérienne de 18h dans de l'eau physiologique, est ensemencée par inondation. L'excès est jeté et des disques de papier filtre stériles d'un diamètre de 6mm, sont déposés à la surface de la gélose. Chaque disque est imprégné à l'aide d'une pipette Eppendorf d'une quantité de 20 $\mu$ l d'une solution d'extrait dans du méthanol. Des disques imprégnés de 20 $\mu$ l de méthanol sans extraits sont utilisés comme témoins négatifs, et des disques d'antibiotiques réputés actifs sur nos souches sont utilisés comme témoins positifs. Chaque test est effectué trois fois et une boîte témoin ensemencée dans les conditions de l'expérience sans disque, nous renseigne sur l'homogénéité du tapis bactérien. La lecture se fait après 18 à 24h d'incubation à 37C°. Le diamètre des zones est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse et les résultats sont exprimés en (mm). Chaque résultat est exprimé par la moyenne de trois mesures prises dans des orientations différentes. Les solutions d'extraits servant pour les tests ont été conservées à 4C° durant la durée des tests. Les solutions d'acide gallique, catéchine, quercétine, rutine, acide tannique et d'acide caféique sont préparées quelques minutes avant le test. Tous les essais ont été effectués trois fois.

### II.4.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la plus petite concentration de la substance antibactérienne pour laquelle aucune croissance n'est observée après 18 à 24h (Martini et Eloff, 1998). Les CMI ont été déterminées par la méthode de dilution sur un milieu solide. Une solution mère à une concentration de 50mg/ml dans de l'eau distillée stérile et 1% de dimethylsulfoxyde (DMSO) a subi une série de dilutions de moitié jusqu'à la concentration finale de 0.781 µg/ml. Par la suite 1ml de chaque solution est ajouté à 9 ml du milieu Muller-Hinton. Le mélange est coulé en boîtes, laissé solidifier, par la suite 10µl d'un inoculum à 10<sup>6</sup> bactéries/ml de chacune des souches est déposé à la surface de la gélose. Un témoin sans extraits a été réalisé et un autre témoin qui consiste en une boîte avec l'extrait mais non inoculé a été également réalisé. La lecture du résultat a été effectuée après 24 h d'incubation à 37C°. Les essais ont été réalisés en double et les résultats sont exprimés en mg/ml. Dans le but de déterminer si l'effet est bactéricide ou bactériostatique, des tubes de bouillon nutritif ont étéensemencés par un prélèvement effectué au niveau de certaines zones d'inhibitions, l'absence de trouble après 24h d'incubation à 37 C° indique un effet bactéricide.

## II.5. Etude chromatographique

### II.5.1. Chromatographie sur colonne de gel de silice

Les extraits ayant montré une activité importante ont été fractionnés sur une colonne (Witeg 14,5/23) de gel de silice 60 activée dans du chloroforme. A l'exception de l'extrait du chloroforme des feuilles de *Fraxinus angustifolia* pour lequel nous avons appliqué le système décrit par Chomnawang et al (2005) avec une légère modification portant sur le rinçage de la colonne avec un mélange d'acide acétique/eau, les systèmes d'élution utilisés ont été issus de notre pratique expérimentale. Les solvants d'élution ont été choisis en fonction de leur efficacité d'extraction de composés à activité antibactériennes (Martini et Eloff, 1998).

#### II.5.1.1. Préparation de la colonne

La colonne en verre est fixée verticalement et la silice activée dans du chloroforme est laissée sédimenter lentement afin d'éviter la formation de bulles d'air jusqu'à atteindre un niveau de 13cm. Par la suite, l'extrait à fractionner préparé dans le méthanol à une concentration de 10mg/ml est déposé soigneusement en haut de la phase stationnaire.

Les fractions collectées ont été séchées, pesées et dissoutes dans du méthanol et ajustées à la concentration de 100µg/ml. Pour chaque souche, les fractions de trois extraits ayant montré un diamètre d'inhibition plus large à 1mg/ml ont été testées.

### **II.5.2. Chromatographie sur couche mince**

Pour nous faire une idée sur le nombre de fractions présentes dans nos extraits, nous avons effectué en parallèle des chromatographies sur couche mince (CCM) de gel de silice.

#### **II.5.2.1. Préparation de la plaque**

A l'aide d'un étaleur manuel, la plaque de chromatographie en verre est recouverte d'une fine couche (0,5mm) de silice (Silica Woelam F-DC). Après séchage à l'air libre, la silice est réactivée dans une étuve à 110°C pendant 30 min. La plaque est tracée par deux lignes, limitant une distance de 14cm et des spots de 10µL d'une solution d'extraits dans le méthanol à une concentration de 5mg/ml ont été déposés. Par la suite, la plaque est placée verticalement dans une cuve en verre contenant le mélange de solvant d'élution dont les vapeurs auront préalablement saturé la cuve fermée.

#### **II.5.2.2. Développement de la plaque**

Après séchage à l'air et visualisation sous UV à 250nm, une révélation à la vanilline sulfurique a été réalisée selon la méthode de Stahl (1969) in Eloff et al (2005). Après pulvérisation, les plaques ont été rapidement chauffées à 105°C jusqu'au développement optimal de la couleur.

### **II.6. Analyses statistiques**

Les données représentent la moyenne de trois essais (sauf pour les valeurs de la CIM). Pour la comparaison des résultats, l'analyse de la variance, ANOVA (statisque5.5) est utilisée et le degré de signification de données est pris à la probabilité  $P < 0.05$ .

A decorative horizontal scroll border with rounded ends and a slight shadow effect, framing the text.

## *RESULTATS ET DISCUSSIONS*

### III.1. Collecte, séchage, broyage, tamisage et extraction

La collecte, le séchage, le broyage et le tamisage du matériel végétal ont été réalisés de façon à pouvoir récupérer le maximum de composés phénoliques, et d'avoir la meilleure activité antibactérienne.

Le temps choisi pour la collecte du matériel végétal influence l'action antibactérienne des extraits de plantes, car la teneur en métabolites secondaires chez les végétaux n'est pas stable dans le temps. Nous avons collecté les parties de plantes à étudier en été, saison durant laquelle le pic en composés phénoliques est atteint. Ceci est en accord avec une étude montrant l'effet du temps de collecte sur l'activité antibactérienne d'extraits de plantes (Buwa et Staden, 2006).

La procédure de séchage est aussi un paramètre important pouvant influencer l'activité antibactérienne des extraits. En effet, un séchage mal conduit pourrait aboutir à des contaminations fongiques du matériel végétal et mener à des modifications significatives de la composition chimique et de l'activité biologique des extraits de plantes (Mallika et Dhar, 1980; Eloff et McGaw, 2006). Des études comparatives de l'activité antibactérienne d'extraits obtenus par différentes méthodes de séchage ont montré que les meilleures activités antibactériennes sont obtenues avec du matériel végétal séché à température ambiante (Eloff et McGaw, 2006). Ce paramètre influence aussi le taux d'extraction (Naczki et Shahidi, 2004; Eloff et McGaw, 2006). Aussi, durant le séchage les membranes d'organites contenant les métabolites secondaires sont détruites et ceci rend l'extraction plus efficace (Eloff et McGaw, 2006).

La granulométrie de la poudre est également un paramètre important (Sipigno et al., 2007; Pinelo et al., 2005) dans la mesure où la réduction de la taille des particules augmente la surface de contact avec le solvant. Etant favorable au transfert de matière, cette réduction augmente le taux d'extraction (Sipigno et al., 2007). Le temps de macération, le volume et la nature du solvant (Eloff, 1998 ; Hayouni et al., 2007 ) sont aussi des paramètres qui affectent le taux d'extraction.

Pour l'isolement de composés à activité antibactérienne à partir des différents complexes chimiques présents dans le végétal, plusieurs solvants peuvent être utilisés; hexane, chloroforme, éthyle éther, méthylène dichloride, acétone, acétate d'éthyle, éthanol, méthanol et eau (Eloff, 1998). Notre but étant de réaliser une extraction sélective des différentes classes de polyphénols, nous avons opté pour l'éthanol comme solvant de départ, car les solvants alcooliques (éthanol, méthanol) donnent de meilleurs taux d'extraction et sont hautement sélectifs pour les polyphénols (Sipigno et

al., 2007). Par la suite, nous avons entrepris une série d'extraction dont le principe repose sur le partage différentiel d'une substance entre deux liquides non miscibles (Naczek et Shahidi, 2004).

Les taux d'extraction ont été calculés par rapport à la poudre initiale pour l'extrait éthanolique, par la suite il a été calculé par rapport au poids de l'extrait issu de l'étape précédente, les taux d'extraction obtenus sont donnés dans le tableau N°02.

**Tableau N°02 :** Taux d'extractions des différents solvants :

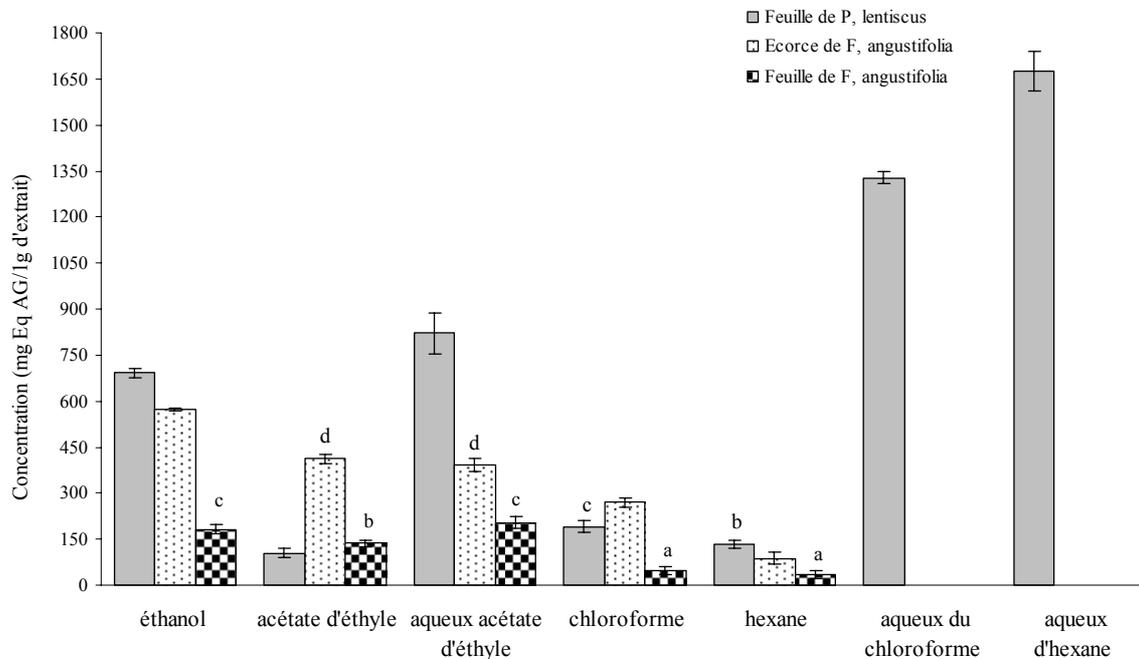
<u>Solvants</u>	<u>Taux d'extraction</u>		
	<i>Fraxinus angustifolia</i>		<i>Pistacia lentiscus</i>
	<u>Ecorce</u>	<u>feuilles</u>	<u>feuilles</u>
Ethanol	10,55%	8,73 %	26,24 %
Ethyle acétate/eau			
Phase organique	12,72%	56,65 %	18.33 %
Phase aqueuse	87,20%	43.34 %	81.66 %
Chloroforme/eau			
Phase organique	70,28 %	82.93	49,16 %
Phase aqueuse	0	0	41,2 %
Hexane/eau			
Phase organique	28 %	60.48 %	54,66 %
Phase aqueuse	0	0	45,33 %

D'après le tableau précédent, nous constatons que le taux d'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, de la partie de la plante et du solvant utilisé. Le meilleur taux d'extraction à l'éthanol est obtenu avec les feuilles de *P. lentiscus* (26,24 %). Avec le mélange acétate d'éthyle/eau, on retrouve pour les feuilles de *P. lentiscus* et l'écorce de *F. angustifolia* des phases aqueuses beaucoup plus concentrées que leurs phases organiques, indiquant une forte proportion en composés polaires. Les dernières étapes d'extraction avec les mélanges chloroforme/eau et hexane/eau ont permis une répartition presque équitable entre les phases aqueuses et organiques des feuilles de *P. lentiscus*, et ce contrairement à l'écorce et aux feuilles de *F. angustifolia* pour lesquelles ces dernières étapes n'ont pas permis de récupérer des phases aqueuses.

### III.2. Dosage des phénols totaux, des flavonoïdes et des tannins

#### III.2.1. Dosage des phénols totaux

Les résultats du dosage des phénols totaux des feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* et des feuilles de *Pistacia lentiscus* sont représentés dans la figure N°25



**Figure N°25 :** Les teneurs en phénols totaux des extraits de l'écorce et des feuilles de *F. angustifolia* et des feuilles de *P. lentiscus*

Nous constatons que le taux de phénols totaux le plus élevé (572,47mg eq AG/g d'extrait) de l'écorce de *F. angustifolia* est obtenu lors de la première phase d'extraction alors que le taux le plus faible (87,31mg eq AG/g d'extrait) est obtenu lors de l'extraction à l'hexane, ce qui indique une faible teneur en composés apolaires solubles dans ce solvant. Pour les feuilles de la même plante, les phénols totaux sont concentrés dans la phase aqueuse d'acétate d'éthyle (204,08 mg eq AG/g d'extrait). Une comparaison des résultats permet de conclure que les différents extraits de l'écorce sont plus riches que ceux des feuilles en phénols totaux, ce qui été prédictible vu les totaux d'extraction obtenus lors de la première phase d'extraction à l'éthanol.

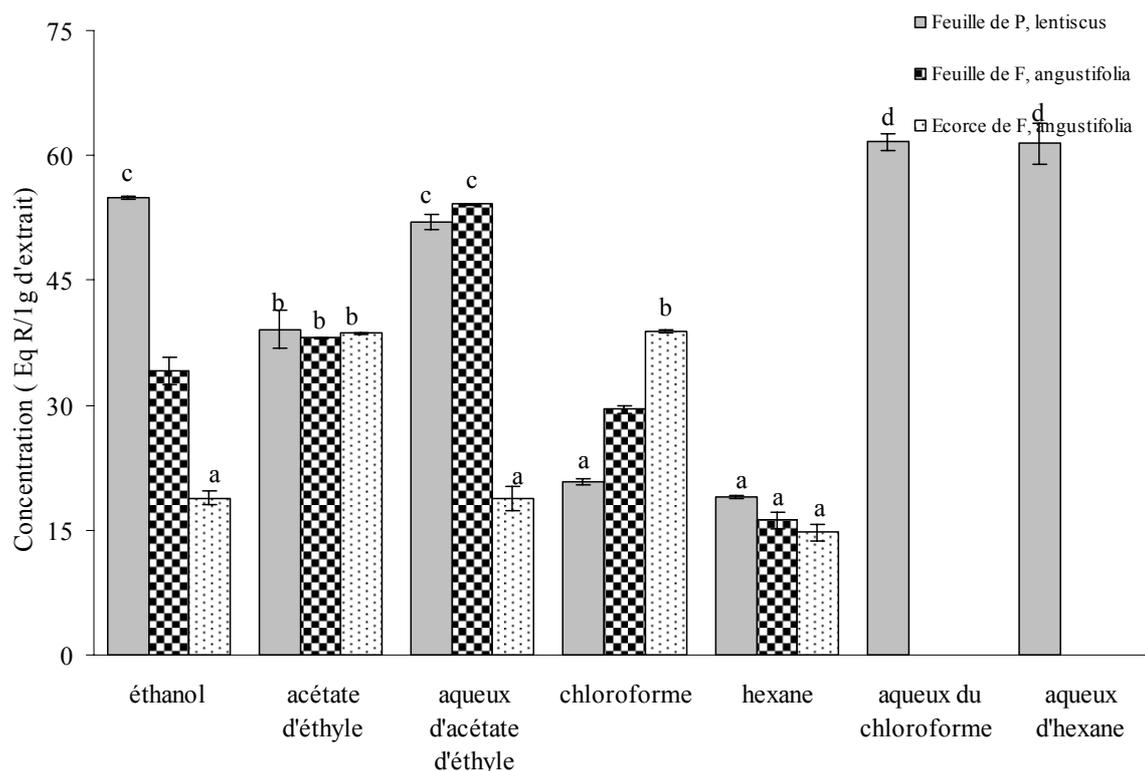
En revanche les phénols totaux des feuilles de *P. lentiscus* sont concentrés au niveau des phases aqueuses ; le taux le plus élevé est retrouvé dans l'extrait aqueux de l'hexane avec 1675,81mg eq AG/g d'extrait tandis que le taux le plus faible est obtenu avec l'extrait organique de l'acétate d'éthyle (104,30mg eq AG/g d'extrait). Ceci indique la richesse des feuilles de *P. lentiscus*

en composés phénoliques polaires, ce qui est en corrélation avec une étude réalisée par Goli et ses collaborateurs (2004) sur *Pistachia vera*, notamment l'extrait aqueux.

Les résultats obtenus montrent la richesse de *Fraxinus angustifolia* et *Pistacia lentiscus* en phénols totaux. La richesse de *Fraxinus angustifolia* a été rapportée par Tinoco et ses collaborateurs (2002). Sur 16 plantes étudiées, *F. angustifolia* arrive en deuxième position en terme de richesse en phénols totaux alors que d'autres espèces du même genre, *Fraxinus americana* (Owen et Johns, 1999) et *Fraxinus rhynchophylla* (Li, 2008) sont aussi classées parmi les plantes les plus riches en phénols. La richesse de *Pistacia lentiscus* en phénol totaux a été confirmée par Ammar et ses collaborateurs (2005).

### III.2.2. Dosage des flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes des extraits de l'écorce et des feuilles de *F. angustifolia* et des extraits des feuilles de *P. lentiscus* sont illustrées dans la figure N°26.

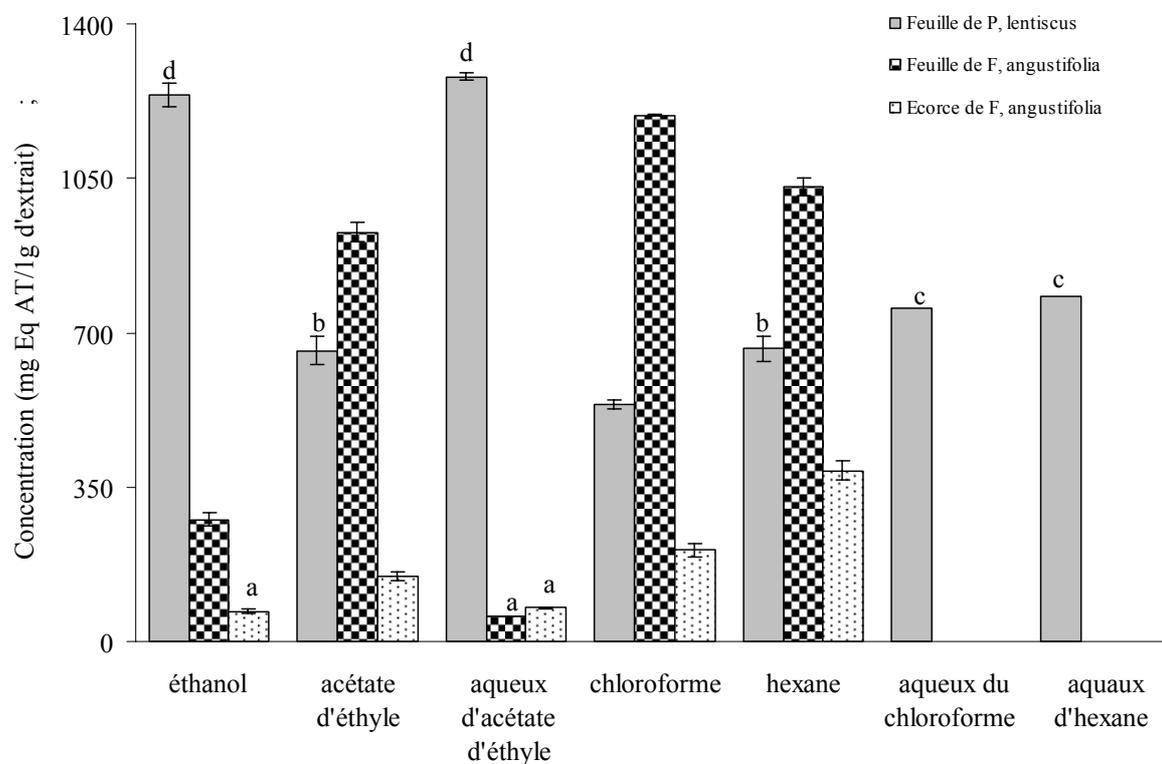


**Figure N°26:** Les teneurs en flavonoïdes des extraits de l'écorce et des feuilles de *F. angustifolia* et des feuilles de *P. lentiscus*

Comme le montre la figure N°26, les flavonoïdes de l'écorce de *F. angustifolia* sont concentrés au niveau des phases organiques du chloroforme et de l'acétate d'éthyle, avec respectivement 38,92 et 38,6mg eq rutine/g d'extrait. Le taux le plus faible 14,72mg eq rutine/g d'extrait est obtenu avec l'extrait de l'hexane. Pour les feuilles c'est l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle qui est le plus riche. Cependant pour *P. lentiscus* les flavonoïdes sont concentrés au niveau des différents extraits aqueux, la teneur la plus élevée est retrouvée au niveau de l'extrait aqueux de l'hexane et aqueux du chloroforme 61,44 et 61,66mg eq rutine/g d'extrait, respectivement L'extrait éthanolique et l'extrait d'acétate d'éthyle présentent également des teneurs élevées. Les plus faibles taux sont obtenus avec l'hexane et le chloroforme avec respectivement 18,97 et 20,80mg eq rutine/g d'extrait. Ceci indique la richesse des feuilles de *Pistacia lentiscus* en flavonoïdes de différentes polarités.

### III.2.3. Dosage des tannins

Les résultats du dosage des tannins des feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia* et des feuilles de *P. lentiscus* sont présentés dans la figure N°27.



**Figure N°27:** Les teneurs en tannins des extraits de l'écorce et de feuilles de *F. angustifolia* et des feuilles de *P. lentiscus*

La figure N°27 montre que les tannins de l'écorce de *F. angustifolia* sont concentrés au niveau des extraits de l'hexane (387,28mg eq AT/g d'extrait) et du chloroforme (206,78mg eq AT/g d'extrait), le taux le plus faible est retrouvé dans l'extrait éthanolique (68mg eq AT/g d'extrait). Les extraits du chloroforme, de l'hexane et de l'acétate d'éthyle des feuilles de *F. angustifolia* sont les plus riches en tannins. La teneur la plus élevée (1192, 28mg eq AT/g d'extrait) est obtenue avec l'extrait du chloroforme alors que l'extrait aqueux de l'acétate d'éthyle présente le taux le plus faible. Nos résultats indiquent que les feuilles sont beaucoup plus riches en tannins que l'écorce. La teneur élevée en tannins des extraits organiques suggère la prédominance des tannins polymériques au niveau des feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia* car bien que les tannins soient définis comme étant des substances hydrosolubles, cette propriété diminue avec un taux de polymérisation élevé (Cheynier, 2005). Nous remarquons aussi la richesse des différents extraits de *P. lentiscus* en tannins, le taux le plus élevé est retrouvé dans l'extrait éthanolique (1239,11mg eq AT/g d'extrait) et l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle (1279,88mg eq AT/g d'extrait), tandis que le taux le plus faible est obtenu avec l'extrait du chloroforme (536,66mg eq AT/g d'extrait). La richesse en tannins de *Pistacia lentiscus* a été confirmée par plusieurs études (Ammar et al., 2005; Gasmi-Boubaker et al., 2006a; Gasmi-Boubaker et al., 2006b).

En conclusion, il apparaît que la teneur en phénols totaux, tanins et flavonoïdes n'est pas homogène. Elle varie d'une espèce à une autre et, chez le même individu, elle varie d'une partie à une autre. En plus, les résultats des différents dosages montrent que les feuilles de *P. lentiscus* sont beaucoup plus riches en composés phénoliques que les feuilles et l'écorce de *F. angustifolia*.

### **III.3. Détermination de l'activité antibactérienne des extraits de *Fraxinus angustifolia* et de *Pistacia lentiscus* :**

Cette partie de notre travail vise à montrer la présence ou l'absence d'une activité antibactérienne dans les 17 extraits. Nous avons opté pour la méthode des disques, une méthode qualitative de diffusion sur gélose.

La taille de l'inoculum est un paramètre déterminant de la fiabilité et de la reproductibilité du résultat. Un inoculum trop dense peut masquer un effet antibactérien et conduire à des résultats faussement négatifs. Un inoculum trop faible peut être à l'origine de tapis irréguliers rendant la lecture ambiguë et peut mener à des résultats faussement positifs. Nous avons donc choisi un inoculum d'environ  $10^6$  bactéries/ml, cette charge nous a permis d'avoir un tapis de colonies confluentes et suffisamment denses.

Le choix du solvant est aussi un point crucial, beaucoup de nos extraits ont été obtenus avec des solvants apolaires, et sont donc insolubles dans l'eau et les milieux aqueux utilisés en microbiologie. C'est pour cela que nous avons dissous les différents extraits dans le méthanol, et comme il peut par lui-même exercer un effet antibactérien nous avons effectué un témoin sans extrait. Néanmoins, une étude comparative entre différents solvants utilisés habituellement lors du criblage de l'activité antibactérienne d'extraits de plantes a montré que le méthanol offre l'avantage d'être plus volatile et moins toxique pour la cellule bactérienne que beaucoup d'autres solvants (Eloff, 1998).

Certains extraits ont montré des zones d'inhibition incomplètes qui peuvent être attribuées à une résistance par insuffisance de dose d'extraits. La même observation a été rapportée par Kitzberger et al (2007) et Obeid et al (2007). D'autres extraits ont montré un petit halo de croissance de 1mm à 2mm autour des disques d'aspect identique au reste du tapis bactérien (il ne s'agit pas de colonies distinctes), suivi d'une nette zone d'inhibition. Ces extraits ont été considérés actifs, car nous avons jugé la surface de l'halo de croissance négligeable devant la surface d'inhibition et nous n'avons observé aucune re-croissance (c'est à dire élargissement de l'halo de croissance) au cours du temps. Ce résultat s'expliquerait par le fait que la méthode choisie repose sur le pouvoir migratoire des molécules à la surface du milieu gélosé et que nos extraits sont des mélanges de plusieurs composés avec des coefficients de diffusion différents. Il est donc probable que des substances avec un faible pouvoir migratoire et sans activité antibactérienne soient restées autour du disque et que la ou les substance(s) active(s) migre(nt) plus loin.

L'examen des données bibliographiques montre que l'utilisation de la méthode de diffusion sur gélose dans le criblage de l'activité antibactérienne d'extraits de plantes manque d'harmonisation, menant parfois à des résultats contradictoires entre les différents auteurs (Cushnie et al., 2003; Rios et Recio, 2005) et rend toute comparaison difficile.

**III.3.1. Activité des extraits de *F. angustifolia* et *P. lentiscus* sur *Salmonella enteritidis* :**

Les diamètres des zones d'inhibition obtenues sont donnés dans le tableau N°03 et leurs aspects sont montrés dans la figure N°28.

**Tableau N°03:** Activité des extraits de *F. angustifolia* et *P. lentiscus* sur *Salmonella enteritidis*

Extraits	<u>Diamètre de la zone d'inhibition en (mm)</u>		
	<i>Fraxinus angustifolia</i>		<i>Pistacia lentiscus</i>
	Ecorce	feuilles	feuilles
Ethanolique			
5mg/ml	8,4±0,4 <sup>a</sup>	16,8±1,6 <sup>d</sup>	8,6±0,9 <sup>a</sup>
1mg/ml	12,1±0,7 <sup>b</sup>	12,1±0,7 <sup>b</sup>	14,7±1,6 <sup>*</sup>
Éthyle acétate			
5mg/ml	13±0 <sup>bc</sup>	12,4±0,4 <sup>abc</sup>	16,5±1,3 <sup>f</sup>
1mg/ml	14,6±3,1 <sup>c</sup>	14,2±1,1 <sup>c</sup>	9,6±1 <sup>ab</sup>
Aqueux d'éthyle acétate			
5mg/ml	-/-	-/-	-/-
1mg/ml	10,3±1,1 <sup>ab</sup>	-/-	12,3±0,4 <sup>*</sup>
Chloroforme			
5mg/ml	14,8±1,5 <sup>c</sup>	11,8±0,7 <sup>a</sup>	14,6±0,2 <sup>e</sup>
1mg/ml	13,8±0,5 <sup>c</sup>	13,5±0,4 <sup>abc</sup>	13,6±1,6 <sup>de</sup>
Aqueux du chloroforme			
5mg/ml	NT	NT	11,5±0,2 <sup>c</sup>
1mg/ml			10,1±0,3 <sup>b</sup>
Hexane			
5mg/ml	13,4±1,2 <sup>c</sup>	12,3±1,3 <sup>ab</sup>	14,7±0,4 <sup>e</sup>
1mg/ml	13,3±0,6 <sup>c</sup>	13,3±2 <sup>abc</sup>	10,8±0,3 <sup>bc</sup>
Aqueux de l'hexane			
5mg/ml	NT	NT	-/-
1mg/ml			13,8±0,4 <sup>e</sup>

Dans la même colonne les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement, les valeurs sont classées par ordre croissant a<b<c<e<f.

NT : Non testé.

-/- : Pas de zone observée.

\* : inhibition incomplète.

Méthanol :-/-.

Chloramphénicol 30µg/disque 33,9±1mm.

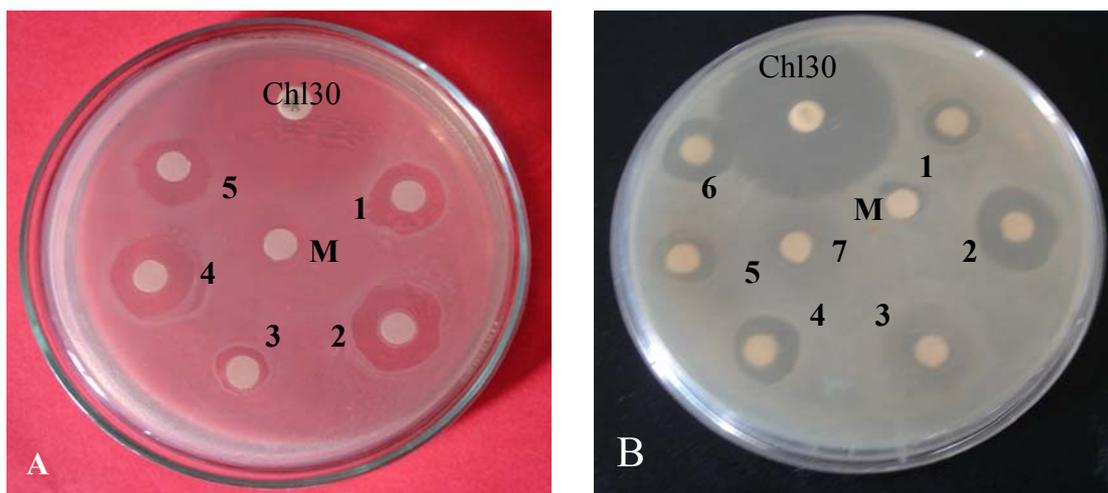
Les résultats du tableau N°03 indiquent que tous les extraits de l'écorce de *F. angustifolia* ont montré un effet inhibiteur vis-à-vis de l'espèce *Salmonella enteritidis*. Des zones d'inhibition allant de 8,4mm à 14,8mm ont été observées. Les meilleures activités en terme de diamètre de la zone d'inhibition ont été obtenues avec les extraits organiques du chloroforme et de l'hexane. Dans le cas de l'extrait éthanolique, l'augmentation de la charge des disques de 20µg à 100µg s'est accompagnée d'une réduction du diamètre de la zone d'inhibition. Dans le cas de l'extrait aqueux

de l'acétate d'éthyle, cette augmentation a provoqué la disparition de la zone d'inhibition déjà observée. Pour les extraits d'acétate d'éthyle, du chloroforme et de l'hexane nous n'avons pas noté de différence significative entre les diamètres d'inhibition obtenus à 1mg/ml et ceux obtenus à 5mg/ml.

A l'exception de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle, tous les autres extraits de feuilles de *F. angustifolia* se sont montrés actifs sur cette souche aux deux concentrations testées. Le diamètre d'inhibition le plus large (16,8mm) a été obtenu avec l'extrait éthanolique à 5mg/ml. Pour le reste des extraits, l'augmentation de la concentration n'a pas induit une différence significative dans le diamètre des zones observées.

Des zones d'inhibition ont été observées avec tous les extraits de feuilles de *P. lentiscus* ; cependant, les zones observées avec l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle et l'extrait éthanolique à 1mg/ml sont incomplètes. Dans le cas de l'extrait éthanolique, l'augmentation de la concentration s'est traduite par la disparition des colonies résistantes et une réduction du diamètre d'inhibition, et ce contrairement à l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle pour qui l'augmentation de la concentration a provoqué la disparition de la zone d'inhibition. Concernant l'extrait aqueux du chloroforme et l'extrait de l'hexane, l'augmentation de la charge du disque a augmenté significativement le diamètre de la zone d'inhibition.

Aucune zone d'inhibition n'a été observée autour des disques imbibés de méthanol. Une zone d'environ 33,9±1mm a été obtenue avec les disques de chloramphénicol à 30µg, confirmant la sensibilité de cette souche à cet antibiotique.



**Figure N°28:** Activité des extraits sur *S. enteritidis* **A)** Extraits de l'écorce de *F. angustifolia* à 1mg/ml, 1: Extrait éthanolique, 2:Extrait éthyle acétate. 3: Extrait aqueux d'éthyle acétate. 4: Extrait de chloroforme.5: Extrait de l'hexane. **B)** Extraits de feuilles *P. lentiscus* à 5mg/ml.1: Extrait éthanolique, 2:Extrait acétate d'éthyle. 3 : Extrait aqueux d'éthyle acétate. 4: Extrait chloroformique, 5: Extrait aqueux de chloroforme 6 : Extrait de l'hexane. 7 : Extrait aqueux de l'hexane. M: méthanol. Chl30 : Chloramphénicol à 30µg/ disque.

Ces résultats sont en accord avec des travaux ayant mis en évidence la sensibilité de *Salmonella enteritidis* aux extraits de plantes. Tassoua et Nychas (1995) ont montré son inhibition par la gomme de *Pistacia lentiscus*. Rnagasamy et ses collaborateurs (2007) ont montré son inhibition par sept extraits méthanoliques de plantes médicinales dont ceux des feuilles de *Mangifera indica* (Anacardiaceae). Les mêmes auteurs ont précédemment montré son inhibition par l'extrait aqueux des feuilles de la même plante (*Mangifera indica*) (Rnagasamy, 2006). En utilisant des extraits aqueux et du chloroforme de *Thymus spathulifolius*, Sokmen et ses collègues (2004) ont observé des diamètres d'inhibition de 16mm et 17mm, respectivement sur *Salmonella enteritidis* ATCC13076 et ce avec un inoculum de densité  $10^6$  UFC et des disques chargés de 300µg d'extrait. La sensibilité de *Salmonella enteritidis* aux extraits aqueux et méthanolique est aussi en corrélation avec les travaux de Barbour et ses collaborateurs (2004). Sgiik et Okzane (2003) ont rapporté l'inhibition de cette espèce par les extraits aqueux de *Thymbra spicata*, *Origanum vulgare* et *Satureja hortensis* (Labiatae), respectivement.

L'extrait d'hexane des feuilles de *Pistacia lentiscus* utilisée dans cette étude est plus actif que celui de l'hexane des feuilles de *Mangifera indica* rapportée par Rnagasamy et al (2007). Les extraits éthanoliques des feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* et des feuilles *Pistacia lentiscus* sont également plus actifs que les 14 extraits méthanoliques de plantes aromatiques dont ceux de *Jasminum officinalis* (Oleaceae) testés par Proestos et ses collaborateurs (2006). De même, les extraits aqueux des feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* et des feuilles de *Pistacia lentiscus* sont plus actifs que les extraits aqueux d'*Alchemilla diademata* (Barbour et al., 2004), *Pimpinella anisum* et *Cuminum cyminum* (Umbelliferae) (Sgiik et okzane,2003). D'autres études ont aussi montré sa résistance vis-à-vis d'extraits d'autres plantes médicinales (Gulluce et al., 2007).

**III.3.2. Activité des extraits de *F. angustifolia* et de *P. lentiscus* sur *Proteus mirabilis***

Les diamètres des zones d'inhibition observées sont rapportés dans le tableau N°04. Leurs l'aspects sont montré dans la figure N°29

**Tableau N°04:** Activité des extraits de *F. angustifolia* et *P. lentiscus* sur *Proteus mirabilis* :

Extraits	<u>Diamètre de la zone d'inhibition en (mm)</u>		
	<i>Fraxinus angustifolia</i>		<i>Pistacia lentiscus</i>
	Ecorce	feuilles	feuilles
Ethanolique			
5mg/ml	11,6±2,8 <sup>b</sup>	11,2±0,3 <sup>ab</sup>	10,4±1,3 <sup>ab</sup>
1mg/ml	7,6±0,9 <sup>a</sup>	12±0,3 <sup>bc</sup>	-/-
Éthyle acétate			
5mg/ml	13,9±1,4 <sup>cd</sup>	13,5±1,4 <sup>c</sup>	13,9±1,3 <sup>e</sup>
1mg/ml	12,7±0,9 <sup>bc</sup>	12,2±2,3 <sup>bc</sup>	11,1±2,5 <sup>bc</sup>
Aqueux d'éthyle acétate			
5mg/ml	-/-	-/-	12,1±0,9*
1mg/ml	8,5±1,5 <sup>a</sup>	12,2±1,5*	-/-
Chloroforme			
5mg/ml	13,4±0,9 <sup>bcd</sup>	9,6±1,5 <sup>a</sup>	12,4±0,6 <sup>cd</sup>
1mg/ml	11,8±0,7 <sup>b</sup>	12,3±1,7 <sup>bc</sup>	13±0,5 <sup>cd</sup>
Aqueux du chloroforme			
5mg/ml	NT	NT	18,4±0,4 <sup>f</sup>
1mg/ml			-/-
Hexane			
5mg/ml	15±0,4 <sup>d</sup>	13±0,9 <sup>bc</sup>	14,6±0,3 <sup>e</sup>
1mg/ml	14,6 <sup>cd</sup>	13,1±1,5 <sup>bc</sup>	-/-
Aqueux de l'hexane			
5mg/ml	NT	NT	18,3±1,5 <sup>f</sup>
1mg/ml			-/-

Dans la même colonne les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement, les valeurs sont classées par ordre croissant a<b<c<d<e<f.

NT : non testé.

-/-: pas de zone observée.

\* : inhibition incomplète.

Méthanol: 9,8±0,9mm.

Ampicilline: -/-.

Ampicilline acide clavulanique 30µg/disque: 8,4±1,7 mm.

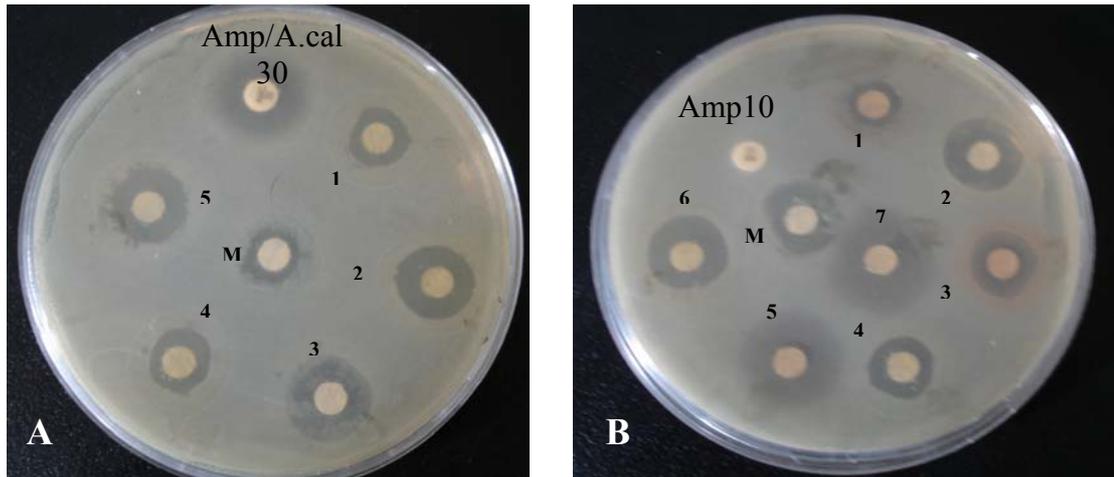
Les diamètres d'inhibition obtenus avec les extraits éthanolique et aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de *F. angustifolia* à 1mg/m, l'extrait éthanolique et l'extrait du chloroforme des feuilles de *F. angustifolia* à 5mg/ml et l'extrait éthanolique des feuilles de *P. lentiscus* à 5mg/ml ne diffèrent pas significativement avec le diamètre de la zone d'inhibition obtenue avec le méthanol (9,8mm) ; mais, le fait d'avoir testé deux concentrations lève l'ambiguïté sur la présence ou

l'absence d'une activité antibactérienne, sauf pour l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de *F. angustifolia* et l'extrait éthanolique des feuilles de *P. lentiscus* que nous avons décidé de retenir pour une étape ultérieure de détermination de la concentration minimale inhibitrice.

A l'exception de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle dont l'activité sera déterminée ultérieurement, tous les extraits de l'écorce de *F. angustifolia* ont montré un effet inhibiteur sur l'espèce *Proteus mirabilis* avec des diamètres variants de 11,6mm à 15mm. Pour les extraits d'acétate d'éthyle, du chloroforme et de l'hexane, l'augmentation de la concentration n'a pas provoqué un effet notable, tandis que cette augmentation a amélioré l'activité de l'extrait éthanolique dont le diamètre est passé de 6,7mm à 11mm. Tous les extraits des feuilles de *F. angustifolia* ont montré un effet inhibiteur, les diamètres d'inhibition obtenus varient de 12mm à 13,5mm.

Les extraits de feuilles de *P. lentiscus* sont également actifs sur cette souche. Les diamètres d'inhibition les plus larges sont obtenus avec les extraits aqueux du chloroforme et de l'hexane avec environ 18mm. A une concentration de 1mg/ml, seuls les extraits du chloroforme et d'acétate d'éthyle ont montré un effet inhibiteur. Aucune zone d'inhibition n'a été observée autour du disque d'ampicilline à 10 $\mu$ g, alors qu'une petite zone de 8,4mm a été générée par les disques d'ampicilline/acide clavulanique. Ceci montre la résistance de cette souche à l'ampicilline et suggère l'implication d'une  $\beta$ -lactamase dans le mécanisme de résistance. La résistance des entérobactéries à l'ampicilline n'est pas un phénomène rare, il arrive que des souches de *proteus mirabilis* isolées en milieu hospitalier soient résistantes à l'ampicilline par production d'une  $\beta$ -lactamase (Bryskier, 1999e).

L'absence de zones d'inhibition autour des disques imprégnés avec les extraits aqueux d'acétate d'éthyle des deux plantes ainsi que ceux imprégnés d'extraits aqueux et organiques de l'hexane et d'extrait aqueux du chloroforme et l'extrait éthanolique des feuilles de *P. lentiscus* pourrait s'expliquer par une annulation de l'effet toxique du méthanol qui pourrait être dû à une interaction du méthanol avec des substances présentes dans ces extraits. En effet, il n'existe pas de solvants complètement inerte vis-à-vis des composés phénoliques ; dans le cas des tannins, le méthanol provoque une méthanolyse des depsides galliques (Bruneton, 1999 ; Muller-Harvy, 2001).



**Figure N°29:** Activité des extraits sur *P. mirabilis*. **A)** Extraits de feuilles de *F. angustifolia* à 1mg/ml, 1: Extrait éthanolique, 2: Extrait acétate d'éthyle. 3: Extrait aqueux de l'acétate d'éthyle. 4: Extrait de chloroforme, 5: Extrait de l'hexane. **B)** Extraits de feuilles de *P. lentiscus* à 5mg/ml. 1: Extrait éthanolique, 2: Extrait acétate d'éthyle. 3: Extrait aqueux de l'acétate d'éthyle. 4: Extrait de chloroforme, 5: Extrait aqueux du chloroforme 6: Extrait de l'hexane. 7: Extrait aqueux de l'hexane. M: méthanol. Amp10: Ampicilline 10µg/disque. Amp/A.cal30: Ampicilline acide clavulanique 30µg/disque.

D'autres études ont montré la sensibilité de l'espèce *Proteus mirabilis* aux extraits de plantes. En effet, sa sensibilité à l'égard des extraits aqueux de l'écorce de *Fraxinus excelsior*, une espèce appartenant au genre *Fraxinus*, a été mise en évidence par Grujic-Vacic et ses collaborateurs (1989) cités par Kostova et Iossifova (2007). Son inhibition par l'extrait aqueux de *Olea hochsetteri* (Oleaceae) a été observée par Adamu et ses collaborateurs (2005). Aussi, Singh et ses collègues (2006) ont rapporté des zones d'inhibition allant de 14mm à 20mm avec un inoculum de  $10^8$  UFC et une charge du disque de 1mg avec les extraits du chloroforme, de l'acétone, de l'éthanol et de l'eau de *Plagiochasma appendiculatum* (Aytoniaceae). Basil et ses collaborateurs (2005) et Zampini et ses collaborateurs (2005) ont, respectivement rapporté l'effet inhibiteur des extraits éthanoliques de *Paullinia cupana* (Sapindaceae) et *Zuccagnia punctata* (Fabaceae). Cependant, plusieurs études ont démontré que cette espèce peut également s'avérer très résistante à beaucoup d'extraits d'autres plantes (Kumarasamy et al., 2002 ; Zaidi et Crow, 2005; Tepe et al., 2005). Ainsi les extraits éthanoliques de l'écorce et des feuilles de *F. angustifolia* et *P. lentiscus* utilisées dans notre étude sont plus actifs que les 24 extraits éthanoliques de plantes médicinales testés par Uzun et ses collaborateurs (2004). Les extraits aqueux de *P. lentiscus* sont plus actifs que l'extrait aqueux de *Selerocarya birraca* (Anacardiaceae) (Adamu et al., 2005).

**III.3.3. Activité des extraits de *F. angustifolia* et de *P. lentiscus* sur *Escherichia coli* O111: B4**

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau N°05 L'aspect des zones d'inhibition est illustré par la figure N°30.

**Tableau N°05:** Activité des extraits de *F. angustifolia* et *P. lentiscus* sur *Escherichia coli* :

Extraits	<u>Diamètre de la zone d'inhibition en (mm)</u>		
	<i>Fraxinus angustifolia</i>		<i>Pistacia lentiscus</i>
	Ecorce	feuilles	feuilles
Ethanolique			
5mg/ml	15,5±1,15 <sup>bc</sup>	14,7±0,3 <sup>c</sup>	11,5±0,3 <sup>a</sup>
1mg/ml	8,3±0,6 <sup>a</sup>	10,4±0,5 <sup>a</sup>	-/-
Éthyle acétate			
5mg/ml	16,2±0,1 <sup>c</sup>	13±1,5 <sup>b</sup>	14,1±0,4 <sup>c</sup>
1mg/ml	-/-	-/-	-/-
Aqueux d'éthyle			
acétate	-/-	-/-	-/-
5mg/ml	-/-	-/-	-/-
1mg/ml	-/-	-/-	-/-
Chloroforme			
5mg/ml	14,3±0,4 <sup>b</sup>	12,6±1,4 <sup>b</sup>	-/-
1mg/ml	-/-	-/-	-/-
Aqueux du chloroforme			
5mg/ml	NT	NT	14,9±2,5 <sup>c</sup>
1mg/ml	-/-	-/-	-/-
Hexane			
5mg/ml	14,5±1,2 <sup>b</sup>	14,5±1,2 <sup>c</sup>	12,7±0,9 <sup>b</sup>
1mg/ml	8,8±1,2 <sup>a</sup>	-/-	-/-
Aqueux de l'hexane			
5mg/ml	NT	NT	-/-
1mg/ml	-/-	-/-	-/-

Dans la même colonne les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement, les valeurs sont classées par ordre croissant a<b<c.

NT : non testé.

-/-: pas de zone observée.

\*: inhibition incomplète.

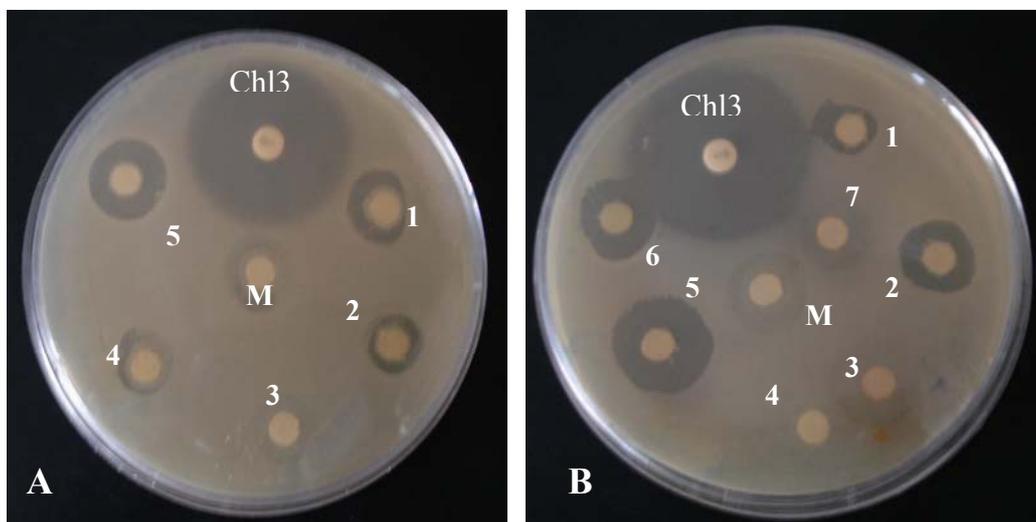
Méthanol : -/-.

Chloramphénicol 30µg/disque : 32,5±1,2.mm.

Les résultats illustrés dans le tableau 05 indiquent qu'à l'exception de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle, tous les extraits de l'écorce de *F. angustifolia* ont montré un effet inhibiteur vis-à-vis de la souche d'*Escherichia coli* O111: B4. Des diamètres d'inhibition allant de 8,3mm à 16,2mm ont été enregistrés. Néanmoins à 1mg/ml, seuls les extraits de l'hexane et du éthanol ont montré de petites zones d'inhibition, respectivement de 8,8mm à 8,3mm

Concernant les feuilles de *F. angustifolia*, l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle est inactif aux deux concentrations testées. Les extraits d'acétate d'éthyle, du chloroforme et de l'hexane ont été actifs uniquement à 5mg/ml. La meilleure activité en terme de diamètre d'inhibition a été obtenue avec l'extrait éthanolique (14,7mm).

Pour les extraits des feuilles de *P. lentiscus*, seuls les extraits éthanoliques, d'acétate d'éthyle, de l'hexane, et aqueux du chloroforme ont inhibé la croissance de cette souche avec des zones d'inhibition de 11,5mm à 14,9mm. À un 1mg/ml, aucun effet inhibiteur n'a été constaté. Aucune zone d'inhibition n'a été observée autour des disques imbibés de méthanol. Des zones d'environ 32,5mm ont été enregistrées autour des disques de chloramphénicol (30µg), indiquant la sensibilité de cette souche à cet antibiotique.



**Figure N°30:** Activité des extraits sur *E. coli* **A)** Extraits de feuilles de *F. angustifolia* à 1mg/ml, 1: Extrait éthanolique. 2: Extrait éthyle acétate, 3 : Extrait aqueux d'éthyle acétate. 4: Extrait de chloroforme, 5 : Extrait de l'hexane. **B)** Extraits de feuilles de *P. lentiscus* à 5mg/ml. 1: Extrait éthanolique. 2: Extrait éthyle acétate. 3 : Extrait aqueux de l'acétate d'éthyle. 4: Extrait de chloroforme, 5: Extraits aqueux du chloroforme 6: Extrait de l'hexane. 7 : Extrait aqueux de l'hexane. M: méthanol. Chl 30 : Chloramphénicol à 30µg/disque.

La sensibilité d'*Escherichia coli* aux extraits de *F. angustifolia* et *P. lentiscus* est en corrélation avec les données bibliographiques. En effet, Les extraits de l'hexane, du dichlorométhane et du méthanol des feuilles de *F. excelsior* sont actifs contre cette espèce, des CMI allant de 0,125µg/ml à 1mg/ml ont été rapportées par Middleton et ses collaborateurs (2005). Les extraits apolaires de différentes parties de *Pistacia vera* sont actifs sur *E. coli* avec des CMI de 128 µg/ml (Özçelik et al., 2005). D'autres Anacardiaceae l'inhibent également, l'extrait éthanolique de *Mangifera indica* (Ahmed et Akil, 2007) les extraits du méthanol, de l'éthanol, de l'acétone, et

l'extrait aqueux de *Ozoroa insignis* (Mathabe et al., 2006). L'extrait méthanolique de *Schinus molle* inhibe *E. coli* ATCC25922 et reste inactif sur *E. coli* O157: H7 (Alanis et al., 2005). Les extraits éthanoliques que nous avons testé sont plus actifs que 18 extraits éthanoliques de plantes médicinales de différentes familles dont l'inefficacité vis-à-vis d'*E. coli* a été rapporté par Kokoska et ses collaborateurs (2002). Les extraits de l'hexane, du chloroforme et de l'éthanol des feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia* et des feuilles de *P. lentiscus* montrent aussi une meilleure activité que les extraits du méthanol, de l'hexane et du chloroforme de *Bursera simaruba* (Burseraceae), *Guazuma ulmifolia* (Sterculiaceae) et *Hamelia patens* (Rubiaceae) testés par Camporese et ses collaborateurs (2003). Aussi l'extrait aqueux de chloroforme de *P. lentiscus* est plus actif que l'extrait aqueux de *Selerocarya birraca* (Anacardiaceae) (Adamu et al., 2005) et l'extrait aqueux d'*Emilia coccinea* (Teke et al., 2007). Cependant, l'activité de l'extrait aqueux d'*Olea hochsetteri* (Oleaceae) rapportée par Adamu et ses collègues (2005) est meilleure que celle des extraits aqueux des feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia*. Les données bibliographiques concernant l'effet d'extraits de plantes sur la souche *E. coli* O111: B4 ne sont pas disponibles.

#### III.3.4. Activité des extraits de *F. angustifolia* et *P. lentiscus* sur *Shigella dysenteriae*

Les diamètres des zones d'inhibition obtenues sont donnés dans le tableau N°06 et la figure N°31 illustre leurs aspects.

Comme le montre le tableau N°06, tous les extraits de l'écorce de *F. angustifolia* ont inhibé la croissance de l'espèce *Shigella dysenteriae*. Des diamètres d'inhibition de 10mm à 16,8mm ont été observés. Les diamètres les plus larges ont été obtenus avec les extraits de l'acétate d'éthyle et de l'hexane à 1mg. Une diminution de l'activité (en terme de diamètre d'inhibition) suite à l'augmentation de la concentration a été observée dans le cas des extraits aqueux et organique d'acétate d'éthyle et l'extrait du chloroforme, et ce contrairement à l'extrait éthanolique pour qui l'augmentation de la concentration a élargi le diamètre d'inhibition.

A l'exception de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle, tous les extraits des feuilles de *F. angustifolia* ont montré un effet inhibiteur aux deux concentrations testées, des zones de 12mm à 15mm ont été observées. Néanmoins, il n'existe pas de différence significative entre l'effet observé à 1mg/ml et celui observé à 5mg/ml.

**Tableau N°06:** Activité des extraits de *F. angustifolia* et *P. lentiscus* sur *Shigella dysenteriae* :

Extraits	<u>Diamètre de la zone d'inhibition en (mm)</u>		
	<i>Fraxinus angustifolia</i>		<i>Pistacia lentiscus</i>
	Ecorce	feuilles	feuilles
Ethanolique			
5mg/ml	13,8±0,8 <sup>cd</sup>	12.5±0,1 <sup>a</sup>	13,2±0,5 <sup>bc</sup>
1mg/ml	10±0,7 <sup>a</sup>	13,6±1,2 <sup>ab</sup>	12,4±1,2 <sup>b</sup>
Éthyle acétate			
5mg/ml	15,4±0,8 <sup>e</sup>	13,8±1,3 <sup>abc</sup>	14,4±1,1 <sup>de</sup>
1mg/ml	16,8±0,9 <sup>f</sup>	14,8±2,4 <sup>bc</sup>	13,9±0,9 <sup>cd</sup>
Aqueux d'éthyle acétate			
5mg/ml	-/-	-/-	-/-
1mg/ml	11,9 <sup>b</sup>	-/-	-/-
Chloroforme			
5mg/ml	13,3±0,6 <sup>c</sup>	14,6±0,7 <sup>bc</sup>	16,2±0,3 <sup>f</sup>
1mg/ml	15,2±0,5 <sup>e</sup>	15,4±0,9 <sup>bc</sup>	-/-
Aqueux du chloroforme			
5mg/ml	NT	NT	9±0,8 <sup>a</sup>
1mg/ml			-/-
Hexane			
5mg/ml	14,9±0,7 <sup>e</sup>	14,1±0,9 <sup>abc</sup>	15,1±1,5 <sup>e</sup>
1mg/ml	15,6±0,5 <sup>ef</sup>	15,6±1,4 <sup>c</sup>	-/-
Aqueux de l'hexane			
5mg/ml	NT	NT	-/-
1mg/ml			-/-

Dans la même colonne les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement, les valeurs sont classées par ordre croissant a<b<c<d<e<f.

NT: Non testé.

-/-: Pas de zone observée.

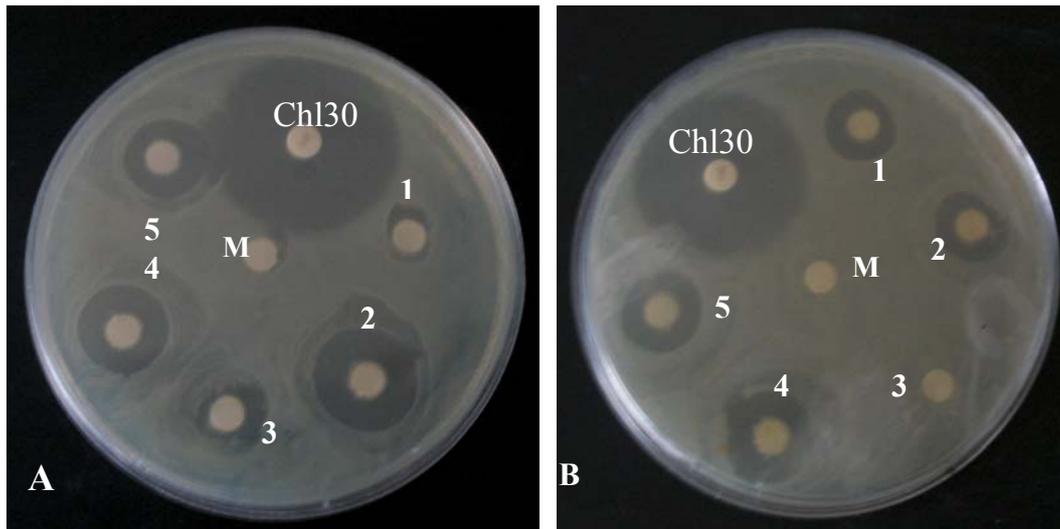
\*: inhibition incomplète.

Méthanol:-/-.

Chloramphénicol 30µg/disque: 33,9±1mm.

Pour les extraits des feuilles de *P. lentiscus*, seul l'extrait éthanolique et l'extrait d'acétate d'éthyle ont montré un effet inhibiteur aux deux concentrations testées. L'extrait aqueux d'acétate d'éthyle et l'extrait aqueux d'hexane n'ont montré aucun effet inhibiteur. Les extraits aqueux et organique du chloroforme et l'extrait de l'hexane ont montré des diamètres d'inhibition uniquement à 5mg/ml. Le diamètre d'inhibition le plus large (16,2mm) a été obtenu avec l'extrait du chloroforme. La plus petite zone d'inhibition (9mm) a été obtenue avec l'extrait aqueux du chloroforme.

Une zone d'inhibition d'environ 32,4mm a été observée autour des disques de chloramphénicol, indiquant la sensibilité de cette souche à cet antibiotique ; le méthanol n'a pas montré d'effet inhibiteur.

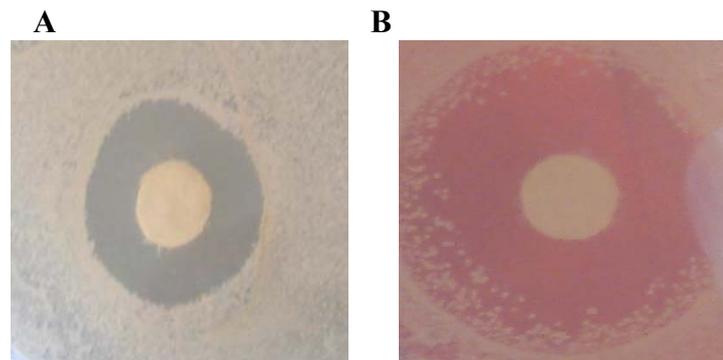


**Figure N°31:** Activité des extraits sur *S. dysenteriae* **A)** Extraits de l'écorce de *F. angustifolia* à 1mg/ml, **B)** Extraits de feuilles de *F. angustifolia* à 1mg/ml. 1: Extrait éthanologique. 2: Extrait acétate d'éthyle. 3: Extrait aqueux de l'acétate d'éthyle. 4: Extrait du chloroforme. 5: Extrait de l'hexane. Chl30 : Chloramphénicol à 30µg/disque.

Des travaux antérieurs ont mis en évidence la susceptibilité d'espèces du genre *Shigella* aux extraits de plantes appartenant à la famille des *Anacardiaceae*. Ahmed et Aqil (2007) ont montré l'inhibition de *Shigella dysenteriae* productrice de  $\beta$ -lactamase par les extraits de *Mangifera indica*. Mathabe et ses collaborateurs (2006) ont mis en évidence la sensibilité de quelques espèces du genre *Shigella* aux extraits d'*Ozoroa insignis* obtenus avec l'éthanol, le méthanol, l'acétone et l'eau. Les extraits aqueux et méthanoliques de *Schinus molle* inhibent *Shigella sonnei* et *Shigella flexneri* (Alnis et al 2005). L'extrait éthanologique de l'écorce et des feuilles de *Fraxinus angustifolia* et l'extrait éthanologique des feuilles de *Pistacia lentiscus* sont plus actifs que l'extrait éthanologique des feuilles de *Nyctanthes arbortristis* (Oleaceae) (Ahmad et Beg, 2001), et l'extrait méthanolique de *Treculia obovoidea* (Moraceae) (Kuate et al., 2007a). Les extraits aqueux que nous avons testés sont aussi plus actifs que les extraits aqueux de *Psidium guaja*, *Bridelia micrantha* et *Eleutherina bulbosa* testés par Lin et ses collaborateurs (2002a).

### III.3.5. Activité des extraits de *F. angustifolia* et de *P. lentiscus* sur *Staphylococcus aureus*

Avec l'espèce *S. aureus* nous avons remarqué que les bordures des zones d'inhibition obtenues n'étaient pas similaires pour tous les extraits (figure N°32). Avec certains extraits, la périphérie de la zone d'inhibition montre un anneau de colonies résistantes, disjointes qui se densifient jusqu'à être aussi confluentes que le reste du tapis bactérien. La même observation a été rapportée par Pibiri (2005), avec uniquement l'espèce *S. aureus*. L'auteur a appelé ces zones, « couronne de résistance ».



**Figure N°32:** Exemples de bordures de zones d'inhibition obtenue avec *Staphylococcus aureus*. A: avec l'extrait de l'hexane des feuilles de *P. lentiscus*. B : extrait éthanolique des feuilles de *P. lentiscus*

L'aspect de la bordure de la zone d'inhibition peut indiquer la présence ou l'absence d'un phénomène de résistance. Des études ont rapporté l'apparition de bordure similaire avec les souches de *Staphylococcus aureus* qui codent pour une  $\beta$ -lactamase inductible (Avril et al., 2000 ; Singleton, 2005). Ainsi, les cellules proches du disque sont tuées avant d'avoir pu synthétiser une quantité suffisante d'enzyme. Les cellules plus éloignées du disque subissent des concentrations en antibiotique qui augmente graduellement, à une certaine distance du disque, quelques cellules auront synthétisé assez d'enzyme pour pouvoir survivre. Ces cellules donneront naissance à des colonies de taille normale ou relativement plus grande (Singleton, 2005). Il est donc probable que « les couronnes de résistance » observées avec certains extraits soient dû à un phénomène d'inactivation enzymatique de la ou des substance(s) active(s). Comme il est probable que cette résistance soit dû à l'expression d'un système d'efflux, inefficace à grande concentration, mais capable à des concentrations plus faibles d'empêcher la ou les substance (s) active(s) d'atteindre leur cible(s) à concentration suffisante. Seul le diamètre de l'halo exempt de colonies a été pris en compte lors de la mesure du diamètre d'inhibition, les valeurs sont rapportées dans le tableau N°07, leurs aspects sont illustrés par la figure N°33

**Tableau N°07:** Activité des extraits de *F. angustifolia* et *P. lentiscus* sur *Staphylococcus aureus*

Extraits	Diamètre de la zone d'inhibition en (mm)		
	<i>Fraxinus angustifolia</i>		<i>Pistacia lentiscus</i>
	Ecorce	feuilles	feuilles
Ethanolique			
5mg/ml	16,4±2,1 <sup>c</sup>	11,7±0,3 <sup>c</sup>	15,1±1,1 <sup>def</sup>
1mg/ml	9±0,5 <sup>ab</sup>	9,8±0,5 <sup>b</sup>	8,3±0,5 <sup>a</sup>
Éthyle acétate			
5mg/ml	16±2,2 <sup>c</sup>	13,3±0,6 <sup>bcd</sup>	14,7±0,4 <sup>cde</sup>
1mg/ml	8,5±0,5 <sup>ab</sup>	9,4±1,1 <sup>b</sup>	10,6±0,3 <sup>b</sup>
Aqueux d'éthyle acétate			
5mg/ml	-/-	-/-	16,8±0,4 <sup>*</sup>
1mg/ml	8,5±0,5 <sup>ab</sup>	8,2±0,3 <sup>a</sup>	9±1 <sup>*</sup>
Chloroforme			
5mg/ml	15±1 <sup>c</sup>	12,5±1,6 <sup>c</sup>	12,9±0,5 <sup>c</sup>
1mg/ml	8±0,1 <sup>a</sup>	7,8±0,9 <sup>a</sup>	9,4±0,4 <sup>ab</sup>
Aqueux du chloroforme			
5mg/ml	NT	NT	17,8±2,5 <sup>g</sup>
1mg/ml			9,1±0,8 <sup>ab</sup>
Hexane			
5mg/ml	15±0,6 <sup>c</sup>	14±0,8 <sup>d</sup>	13,7±0,8 <sup>cd</sup>
1mg/ml	10,1±1,7 <sup>a</sup>	8,9±0,6 <sup>ab</sup>	8,7±1,1 <sup>a</sup>
Aqueux de l'hexane			
5mg/ml	NT	NT	15,6±2,5 <sup>ef</sup>
1mg/ml			8±1 <sup>a</sup>

Dans la même colonne les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement, les valeurs sont classées par ordre croissant a<b<c<d<e<f.

NT : non testé.

-/-: pas de zone observée.

\*: inhibition incomplète.

Méthanol : 8,7±0,9\*.

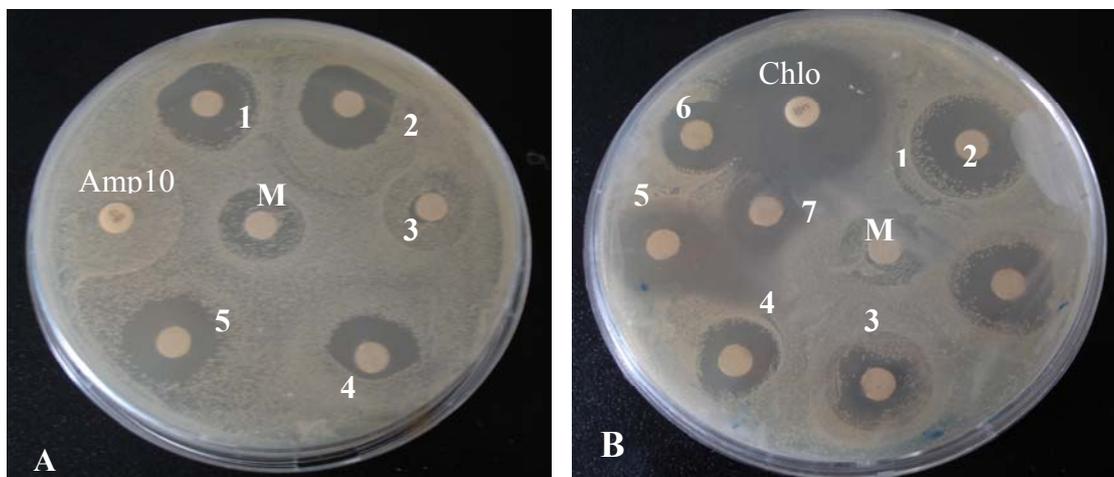
Ampicilline 10µg/disque :-/. Chloramphénicol à 30µg/disque: 30,6±0,5mm.

Comme on peut le voir à partir du tableau N°07, tous les extraits de l'écorce de *F. angustifolia* ont inhibé la croissance de l'espèce *Staphylococcus aureus*. Des diamètres d'inhibition allant de 8mm à 16,4mm ont été enregistrés. Les meilleures activités en terme de diamètre de la zone d'inhibition ont été obtenues avec l'extrait éthanolique et l'extrait d'éthyle acétate. L'extrait aqueux d'éthyle acétate a été l'extrait le moins actif (8,5mm à 1mg/ml).

Nous constatons également que tous les extraits de feuilles de *F. angustifolia* se sont montrés actifs, les diamètres d'inhibition varient de 7,8mm à 14,8mm. L'extrait aqueux d'acétate d'éthyle est l'extrait le moins actif.

Tous les extraits de feuilles de *P. lentiscus* ont montré un effet inhibiteur aux deux concentrations testées. Néanmoins, les zones d'inhibition observées avec l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle sont incomplètes.

Nous constatons qu'à l'exception des extraits aqueux d'éthyle acétate des feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia*, l'augmentation de la concentration a induit un élargissement des diamètres des zones d'inhibition. Le méthanol a montré une zone d'inhibition incomplète d'environ 8,7mm. Aucune zone d'inhibition n'a été observée autour des disques d'ampicilline (10µg). Le chloramphénicol (30µg) a exhibé une zone de 30,6mm, ce qui confirme la sensibilité de cette souche au chloramphénicol et montre sa résistance à l'ampicilline.



**Figure N°33:** Activité des extraits sur *S. aureus* **A)** Extraits de feuilles de *F. angustifolia* à 1mg/ml, 1: Extrait éthanolique. 2: Extrait d'éthyle acétate. 3: Extrait aqueux d'éthyle acétate. 4: Extrait du chloroforme. 5: Extrait de l'hexane. **B)** Extraits de feuille de *P. lentiscus* à 5mg/ml. 1: Extrait éthanolique. 2: Extrait d'éthyle acétate. 3: Extrait aqueux d'éthyle acétate. 4: Extrait du chloroforme, 5 : Extrait aqueux du chloroforme. 6: Extrait de l'hexane. 7: Extrait aqueux de l'hexane. M: méthanol. Amp10: Ampicilline à 10µg/disque. Chlo30 : Chloramphénicol à 30µg/disque.

La sensibilité de l'espèce *Staphylococcus aureus* aux extraits de *F. angustifolia* et *P. lentiscus* est en accord avec d'autres études. En effet, Tassoua et Nychas (1995) ont montré l'effet inhibiteur de la gomme de *Pistacia lentiscus*. 15 extraits apolaires (issus d'un gradient éthanol/hexane) de *Pistacia vera* ont montré un effet inhibiteur sur cette espèce avec des CMI de 62µg/ml à 32µg/ml (Özçelk et al., 2005). L'extrait du méthanol, de l'hexane et du dichlorométhane des feuilles de *Fraxinus excelsior* inhibent *S. aureus* sensible à la méthicilline. Les mêmes extraits à l'exception de l'extrait méthanolique sont aussi actifs sur *S. aureus* résistant à la méthicilline (Middleton et al., 2005). L'extrait éthanolique de *Nyctanthes arbortristis* (Oleaceae) (Ahmad et Beg, 2001) et l'extrait aqueux d'*Olea hochsetteri* (Oleaceae) (Adamu et al., 2005) sont aussi actifs. Les études montrant la sensibilité de *S. aureus* aux extraits de plantes appartenant à la famille des Anacardiaceae sont nombreuses. Les extraits d'éthanol, d'éthyle acétate, du chloroforme et

d'hexane de *Schinus terebinthifolius* inhibent des souches de *S. aureus* sensibles et résistantes aux fluoroquinolones (De Lima et al., 2006). Les extraits méthanolique de *Rhus coriaria* (Bonjar, 2004a), de *Semicarpus anacardium* (Bonjar, 2004b) et de *Astronium balansae* (Salvat et al., 2004) ainsi que les extraits méthanolique, acétonique, éthanolique et aqueux de *Ozoroa insignis* (Mathabe et al., 2006) sont également inhibiteurs de cette espèce. Néanmoins, l'espèce *Staphylococcus aureus* peut être résistante aux extraits de plantes appartenant à d'autres familles. Ainsi les extraits éthanoliques de l'écorce et des feuilles de *F. angustifolia* et des feuilles de *P. lentiscus* sont plus actifs que les 21 extraits éthanolique de 15 plantes appartenant à 9 familles différentes testées par Rojas et ses collègues (2003). Aussi, les extraits de l'hexane et du chloroforme et les extraits aqueux que nous avons testés sont plus actifs que ceux de l'hexane, du chloroforme et du méthanol de *Bursera simaruba* (Burseraceae), *Guazuma ulmifolia* (Sterculiaceae) et *Hamelia patens* (Rubiaceae) (Camporese et al., 2003) et l'extrait aqueux de *Emilia coccinea* (Asteraceae) (Teke et al., 2007).

### II.3.6. Activité des extraits de *F. angustifolia* et de *P. lentiscus* sur *Pseudomonas aeruginosa*

Les résultats sont donnés dans le tableau N°08 et l'aspect des zones est illustré dans la figure N°34

Mis à part l'extrait aqueux d'éthyle acétate, tous les extraits de l'écorce de *F. angustifolia* se sont montrés actifs à l'égard de *Pseudomonas aeruginosa*, des diamètres d'inhibition de 8,4mm à 14,6mm ont été enregistrés. Cependant, seul l'extrait éthanolique a montré un effet inhibiteur à une concentration de 1mg/ml.

L'extrait aqueux d'acétate d'éthyle des feuilles de *F. angustifolia* est inactif aux deux concentrations testées. Le reste des extraits ont montré un effet inhibiteur. Des diamètres allant de 7,7mm à 14,7mm ont été observés, suivis d'un élargissement du diamètre de la zone d'inhibition avec l'augmentation de la concentration

Parmi les extraits de feuilles de *P. lentiscus*, seul l'extrait d'acétate d'éthyle a montré un effet inhibiteur avec un diamètre d'inhibition de 14,7mm. L'absence d'activité au niveau de l'extrait éthanolique brut et son apparition au niveau de l'extrait d'éthyle acétate s'expliquerait par le fait que la (es) substance(s) active(s) se trouve (nt) inhibée(s) par la présence d'autres substances dans l'extrait brut et que la séparation différentielle a permis d'isoler au niveau de l'extrait de l'acétate d'éthyle.

Le méthanol n'a pas montré de zone d'inhibition alors que les disques de gentamicine (10µg) ont montré des zones d'inhibition d'environ 21,1mm, indiquant la sensibilité de cette souche à cet antibiotique.

**Tableau N°08:** Activité des extraits de *F. angustifolia* et *P. lentiscus* sur *Pseudomonas aeruginosa* :

Extraits	<u>Diamètre de la zone d'inhibition en (mm)</u>		
	<i>Fraxinus angustifolia</i>		<i>Pistacia lentiscus</i>
	Ecorce	feuilles	feuilles
Ethanolique			
5mg/ml	11,5±0,4 <sup>b</sup>	14,7±0,9 <sup>d</sup>	-/-
1mg/ml	8,4±0,5 <sup>a</sup>	8,4±0,5 <sup>a</sup>	-/-
Éthyle acétate			
5mg/ml	14,5±0,5 <sup>c</sup>	13,5±0,7 <sup>c</sup>	14,7±1,4
1mg/ml	-/-	8,5±1,5 <sup>a</sup>	-/-
Aqueux d'éthyle acétate			
5mg/ml	-/-	-/-	-/-
1mg/ml	-/-	-/-	-/-
Chloroforme			
5mg/ml	12,3±0,5 <sup>b</sup>	11,6±1,6 <sup>b</sup>	-/-
1mg/ml	-/-	-/-	-/-
Aqueux du chloroforme			
5mg/ml	NT	NT	-/-
1mg/ml			-/-
Hexane			
5mg/ml	14,6±0,3 <sup>c</sup>	13,2±0,2 <sup>c</sup>	-/-
1mg/ml	-/-	7,7±0,5 <sup>a</sup>	-/-
Aqueux de l'hexane			
5mg/ml	NT	NT	-/-
1mg/ml			-/-

Dans la même colonne les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement, les valeurs sont classées par ordre croissant a<b<c<d<e<f.

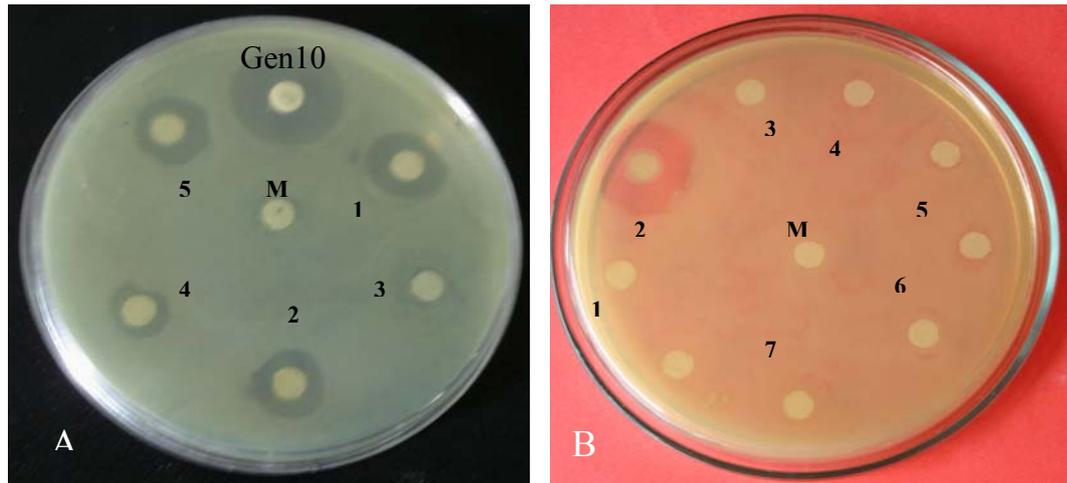
NT : non testé,

-/-: pas de zone observé

\*: inhibition incomplète

Méthanol : -/-.

Gentamicine 10µg/disque : 21,1±09



**Figure N°34 :** Activité des extraits sur *P. aeruginosa* **A)** Extraits de feuilles de *F. angustifolia* à 1mg/ml, 1: Extrait éthanolique, 2: Extrait d'éthyle acétate, 3 : Extrait aqueux d'éthyle acétate. 4: Extrait de chloroforme, 5 : Extrait de l'hexane. **B)** Extraits de feuille de *P. lentiscus* à 5mg/ml. 1: Extrait éthanolique, 2:Extrait d'éthyle acétate. 3 : Extrait aqueux d'éthyle acétate. 4: Extrait de chloroforme.5: Extrait aqueux du chloroforme 6: Extrait de l'hexane. 7: Extrait aqueux de l'hexane. M: méthanol. Gen 10 : Gentamicine 10µg/disque.

L'effet inhibiteur des extraits de *F. angustifolia* sur *Pseudomonas aeruginosa* est en accord avec les résultats de Middelton et ses collaborateurs (2005) qui ont montré l'inhibition de cette espèce par les extraits de l'hexane, du méthanol et du dichlorométhane des feuilles de *Fraxinus excelsior* ; des CMI de 0,250mg/ml ont été obtenue avec les extraits du dichlorométhane et de l'hexane. Cependant les extraits aqueux de *F. angustifolia* sont moins actifs que ceux d'*Olea hochsetteri* (Oleaceae) dont l'effet inhibiteur a été rapporté par Adamu et ses collègues (2005)

La faible activité en terme de nombre d'extraits actifs des feuilles de *Pistacia lentiscus* est aussi en accord avec la littérature qui montre que cette espèce est généralement peu sensible aux extraits de plantes appartenant à la famille des Anacardiaceae. Ainsi, *P. aeruginosa* est résistante à l'extrait méthanolique de *Schinus molle* (Oliviera et al., 2007), à l'extrait du dichlorométhane de *Magnifera indica* (Rangasamy et al., 2006), l'extrait aqueux et les extraits du méthanol et d'hexane des feuilles et de l'écorce de *Rhus lanca* (McGaw et al., 2005). Seuls Özçelk et ses collaborateurs (2005) et Bonjar (2004b) ont montré l'inhibition de cette espèce par les extraits apolaires des feuilles de *Pistacia vera* et l'extrait méthanolique des feuilles de *Semicarpus anacardium*, respectivement. La résistance de *P. aeruginosa* aux extraits aqueux est aussi en corrélation avec les résultats de Romero et ses collaborateurs (2005) qui ont montré l'inefficacité des extraits aqueux de plusieurs plantes médicinales. Néanmoins cette espèce peut être sensible à d'autres extraits. Les extraits éthanoliques de *Lavatera arborea* (Malvaceae) et *Oenothera multicaulis* (Onagraceae) (Rojas et al., 2003). Les extraits du chloroforme et de l'hexane de *Hymenocrater sessilifolium*

(Lamiaceae) ainsi que les extraits du chloroforme et aqueux de *Grewia erythraea* (Tiliaceae) (Zaidi et Crow, 2005).

En comparant (en terme de nombre d'extraits actifs) la susceptibilité des différentes souches vis-à-vis des différents extraits, on constate que *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* sont les espèces les moins sensibles. Sur les 17 extraits testés, seulement 9 ont inhibé la croissance de *P. aeruginosa* et 12 ont inhibé la croissance d'*E. coli* O111 :B4. L'espèce *Staphylococcus aureus* a été sensible à tous les extraits testés. Aussi, les extraits aqueux montrent des spectres d'activité plus étroits que les extraits organiques.

Il est probable que la résistance de *P. aeruginosa* et *E. coli* vis-à-vis de certains extraits soit dû à un catabolisme spécifique, car il a été démontré que dans les conditions d'aérobie, les espèces appartenant au genre *Pseudomonas* sont les plus impliquées dans la biodégradation des composés phénoliques aussi bien naturels que synthétiques (Whiteley et Bailey, 2000). Certaines souches d'*Escherichia coli* (*E. coli* K12) sont également capables de dégrader certains composés aromatiques (Diaz et al., 2001; Parales et al., 2002).

Il est également probable que ce résultat soit dû à une différence dans la capacité de pénétration des composés actifs présents dans ces extraits. Chez les bactéries à Gram négatif, la membrane externe constitue une barrière de perméabilité efficace ; le lipopolysaccharide, grâce à ses charges négatives de surface, empêche la diffusion des molécules hydrophobes, et les porines excluent le passage des molécules hydrophiles de poids moléculaires élevés (Nikaido, 2003). Les bactéries à Gram positif sont moins protégées contre les agents antibactériens, le peptidoglycane n'entrave que la diffusion des molécules de poids moléculaire supérieur à 50.000 D (Hogan et Kolter, 2002). Ainsi, *Pseudomonas aeruginosa* ne possède que des porines de faible perméabilité (Nikaido, 2003) ; elle est naturellement plus résistante à de nombreux antibiotiques (Michea-Hamzehpour et al., 1991; Filloux et Vallet, 2003 ; wang et al., 2003) et extraits de plantes (Polombo et Semple, 2001; Shahine et al., 2003; Ezoubeiri et al., 2005 ).

Le résultat observé pourrait être dû à une différence d'affinité entre les cibles bactériennes. Caturla et ses collaborateurs (2003) ont montré que l'affinité des catéchines pour les bicouches lipidiques varie en fonction des proportions des différents phospholipides.

Il est également probable qu'un mécanisme de détoxification spécifique soit à l'origine de la résistance observée. Togos et ses collaborateurs (2002) ont montré que l'inhibition des pompes d'efflux (MDRs) améliore l'activité d'extraits de rhubarb de 100 à 2.000 fois (en fonction de l'espèce bactérienne). Il a été démontré *in vitro* que les bactéries du rumen incubées en présence de fortes concentrations de tannins extraits de *Lotus coraniculatus* produisent un glycocalyx et qu'elles

ne produisent pas lorsque elles sont incubées en présence de concentrations plus faibles (Chiquette et al., 1985 cité par scalbert, 1991).

Nous constatons également que l'augmentation de la charge des disques de 20µg à 100µg d'extraits produit des effets différents d'une souche à une autre. Par exemple, l'augmentation de la concentration de l'extrait du chloroforme de l'écorce de *F. angustifolia* n'a produit aucune différence significative dans les diamètres des zones d'inhibition lorsque il a été testé sur *S. enteritidis* et *P. mirabilis*. Cet extrait a provoqué une réduction des diamètres des zones d'inhibition lorsque il a été testé sur *S. dysenteriae*, et induit une amélioration de l'activité lorsque il a été testé sur *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*. De même l'augmentation de la concentration de l'extrait de l'hexane des feuilles de *F. angustifolia* n'a eu aucun effet sur *S. enteritidis*, *S. dysenteriae* et *P. mirabilis*, alors qu'elle a provoqué une amélioration de l'activité sur *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres auteurs. Chun et ses collaborateurs (2005), en testant l'activité des extraits éthanolique et aqueux de *Origanum vulgare* sur *Helicobacter pylori*, ont constaté que l'augmentation de la charge du disque de 50µg, 100µg, 150µg et 200µg ne produit pas une différence significative dans le diamètre de la zone d'inhibition. Özkan et ses collaborateurs (2007) ont testé l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Teucrium montbertyi* (lamiaceae), sur *Streptococcus pneumoniae* l'augmentation de la concentration de l'extrait est restée sans effet notable tandis que sur le reste des espèces bactériennes testées, elle s'est traduite par une amélioration de l'activité. Obied et al (2007) ont observé avec *S. aureus* et *Bacillus subtilis* une réduction du diamètre de la zone d'inhibition lorsque ils ont testé la lutéoline à 100, 200 et 300µg/disque. Des résultat similaires aux nôtres ont été également obtenus par Kumar et ses collaborateurs (2006) qui ont testé l'effet inhibiteur de 61 extraits de plantes à 1mg/ml et à 0,5 mg/ml. Ils ont montré que pour certaines souches vis-à-vis de certains extraits l'augmentation de la concentration ne s'accompagne pas d'une amélioration de l'activité ; pour d'autres, l'effet inhibiteur augmente avec l'augmentation de la concentration. Une diminution et parfois une annulation de l'effet inhibiteur ont été aussi observées. C'est notamment le cas de l'extrait de *Symplocos racemosa* ( Symplocaceae), qui est inactif sur *Bordetella bronchiseptica* à 0,5mg/ml et devient actif à 1mg/ml ; sur *Streptococcus faecalis* l'extrait est inactif à 1mg/ml, il est actif uniquement à 0,5mg/ml.

Nos résultats suggèrent qu'au niveau d'un même extrait, plusieurs composés sont actifs. Ces composés exerceraient une inhibition sélective vis-à-vis des différentes souches

La diminution du diamètre de la zone d'inhibition avec l'augmentation de la concentration pourrait s'expliquer par une diminution de l'activité qui pourrait être due à une diminution de la solubilité de la ou des substance (s) active (s). Dans certains cas l'insolubilité de certains composés phénoliques (tel que les flavonoïdes) est un facteur limitant de leurs effet inhibiteurs (Denny et *al.*, 2002 ; Tombola et *al.*, 2003). Cushnie et ses collaborateurs ont montré des problèmes de solubilité de quelques flavonoïdes dans différents solvants, les auteurs ont observé que la galangin est plus active à 25µg/ml qu'à 100µg/ml sur certaines souches de *S. aureus* (Cushnie et *al.*, 2003).

Il est probable aussi que la diminution de l'activité soit due à une modification d'autres propriétés physicochimiques de la substance responsable de l'activité, car les extraits contiennent plusieurs composés qui peuvent interagir en solution. Ces interactions peuvent modifier des facteurs déterminants pour l'activité de la substance, tel que le pouvoir de pénétration à travers la bicouche lipidique. En effet, il a été démontré à travers un modèle de membrane lipophile que la présence de certaines substances hydrophiles réduit la force motrice de pénétration et abaisse le coefficient de perméabilité des flavonoïdes (Arct et *al.*, 2002).

Il est également probable que la diminution du diamètre de la zone d'inhibition ne soit pas liée à une diminution de l'activité de la ou les substance (s) inhibitrice (s) mais uniquement à une diminution du pouvoir migratoire sur la surface de la gélose.

L'activité antibactérienne observée avec les différents extraits peut être attribuée à la composition chimique des deux plantes. En effet, dans la première partie de notre travail nous avons mis en évidence la richesse des deux plantes en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins. Les études phytochimiques menées sur des espèces du genre *Fraxinus* révèlent leur richesse en coumarines ; chez *F. angustifolia* l'escultine, la scopoletin, l'isoscopoletine, la cichoriin, fraxitine, fraxine et le fraxinol sont les coumarines majoritaires (Kostova et Iossifova, 2007). L'effet antibactérien de la fraxitine et du fraxinol a été mis en évidence (Abou Zeid, 2002 ; Marquez et *al.*, 2005), Kostova et ses collaborateurs (1993) cités par Kostova et Iossifova, (2007) ont montré que l'activité anti-Staphylococcique de trois extraits de *F. ornus* était dépendante de leurs teneurs en coumarines. Plusieurs flavonoïdes ayant une activité antibactérienne sont recensés ; l'apigénine, la lutéoline, la catéchine, la quercétine et l'épicatéchine sont retrouvées dans différentes espèces du genre *Fraxinus* (Kostova et Iossifova, 2007), la rutine est retrouvée chez *F. angustifolia* (Hosny, 1998 cité par Kostova et Iossifova, 2007), des phénols simples et des acides phénols exhibant une activité antibactérienne comme les acides *p*-hydroxy benzoïque, protocatechique, vanillique,

gallique et caféique sont rapportés dans différentes espèces du genre *Fraxinus* (Kostova et Iossifova, 2007). De même les études phytochimiques menées sur le genre *Pistacia* rapportent la présence de composés phénoliques dont l'activité antibactérienne est prouvée. L'acide gallique et l'acide tannique (Abdelwahabe et al., 2007), les anthocyanine (Longo et al., 2007) sont présents chez *Pistacia lentiscus*; l'apigenin, la luteolin et la quercétine ont été rapportées chez *Pistacia terebinthus* (Topçu et al., 2007).

#### III.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits aqueux

Bien que les extraits aqueux aient exhibés une activité modérée, comme nous l'avons déjà indiqué, seules les concentrations minimales inhibitrices de ces extraits ont été déterminées, et ceci pour des contraintes liées à la nature insoluble des neuf extraits organiques. Les extraits ont été dissous dans un mélange eaux/DMSO pour déterminer les CMI par la méthode de dilution sur milieu solide. Les valeurs obtenues sont représentées dans le tableau N°09

**Tableau N°09** : Concentrations minimales inhibitrices des extraits aqueux :

Extraits aqueux	<u>CMI en mg/ml</u>					
	<i>S. aureus</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ecorce de <i>F. angustifolia</i>						
De l'éthyle acétate	0,625	2,5	5	5	NT	NT
Feuille de <i>F. angustifolia</i>						
De l'éthyle acétate	0.625	NT	5	5	NT	NT
Feuille de <i>P. lentiscus</i>						
De l'éthyle acétate	1.5	>5	NT	>5	NT	NT
Du chloroforme	0.312	>5	0.625	0.625	>5	NT
De l'hexane	0.312	0.625	>5	>5	NT	NT

Nous constatons que *Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus sensible aux extraits aqueux des deux plantes ; la CMI la plus faible (0,312mg/ml) est obtenue avec les extraits aqueux de l'hexane et du chloroforme des feuilles de *P. lentiscus*. Les espèces *S. enteritidis*, *S. dysenteriae* et

*P. mirabilis* se sont également montrées sensibles à l'égard des extraits aqueux ; la CMI de l'extrait aqueux de l'hexane des feuilles de *P. lentiscus* sur *S. enteritidis* est de 0,625 mg/ml. Concernant les espèces *S. dysenteriae* et *P. mirabilis*, la CMI de l'extrait aqueux du chloroforme des feuilles de *P. lentiscus* est de 0,625 mg/ml. La CMI de l'extrait aqueux d'éthyle acétate des feuilles de *F. angustifolia* sur *S. dysenteriae* est de 5mg/ml, ceci confirme le faible pouvoir antibactérien que nous avons suspecté. Les CMI d'autres extraits sont plus élevées que les concentrations testées, ceci indique une activité antibactérienne médiocre.

Nos résultats sont en accord avec la littérature selon laquelle les bactéries à Gram positif montrent la plus grande sensibilité vis-à-vis des extraits aqueux (Masika et Afolayan, 2002 ; McGaw et al., 2005). Les extraits aqueux de *Pistacia lentiscus* et de *Fraxinus angustifolia* se sont montrés plus actifs sur *S. aureus* que les 23 extraits aqueux dont ceux des feuilles de *Rhus lancea* (Anacardiaceae) (12,5mg/ml) testés par McGaw et ses collègues (2005).

Nos CMI sont proches de celles obtenues par d'autres auteurs. En effet, Taguri et ses collaborateurs (2006) ont obtenu une CMI de 0,667mg/ml sur *P. mirabilis* avec les extraits de *Bischofia javanica* et de *stachyrus javanica*. Mathabe et ses collègues (2006) ont obtenu une CMI de 0,312mg/ml sur *S. aureus* avec les extraits aqueux de *Schotia brachypetala* et *Gymnosporia senegalensis*. Cependant l'extrait aqueux d'*Ozoroa insignis* (Anacardiaceae) est plus actif sur *S. aureus* (CMI de 0,156 mg/ml) que les extraits aqueux de nos deux plantes. L'extrait aqueux de *Terminalia macroptera* (Combretaceae) est plus actif sur *Shigella dysenteriae* (CMI=0,313mg/ml) que les extraits aqueux de l'écorce et des feuilles de *Fraxinus angustifolia* et des feuilles de *Pistacia lentiscus* (Silva, 1997).

La plus grande susceptibilité de *S. aureus* vis-à-vis des extraits aqueux par rapport aux autres espèces bactériennes testées s'expliquerait par une meilleure perméabilité du ou des composé(s) actif(s). Ceci s'expliquerait par des différences dans la constitution de la paroi cellulaire. *Staphylococcus aureus* est une bactérie à Gram positif où le peptidoglycane n'entrave pas l'entrée des molécules dont le poids moléculaire est inférieure à 50,000 D (Hogan et Kolter, 2002) contrairement aux bactéries à Gram négatifs pour lesquelles la diffusion des molécules hydrophiles se fait via des porines spécifiques ou non spécifiques qui forment une barrière efficace empêchant l'entrée des molécules aqueuses dont le poids moléculaire est élevé (Nostro, 2000; Nikaido, 2003; Pages, 2003).

En comparant les CMI des extraits aqueux de *Pistacia lentiscus* nous constatons que les CMI des extraits aqueux de l'hexane et du chloroforme sont nettement plus faibles que celles de l'extrait aqueux d'éthyle acétate, ceci indique un gain d'activité résultant de l'extraction sélective que nous avons adoptée.

### III.5. Activité antibactériennes de quelques composés phénoliques purs

Pour les besoins de cette étude, nous avons décidé d'ajuster la taille de l'inoculum bactérien pour l'espèce *Staphylococcus aureus* et *Proteus mirabilis* à  $10^7$  cellules/ml, et ceci pour contrer l'effet inhibiteur du méthanol et d'éviter d'éventuelles ambiguïtés dans l'interprétation des résultats car avec cette charge aucune zone d'inhibition n'est observée avec le méthanol. L'activité antibactérienne de quelques composés phénoliques pure a été testée et les diamètres des zones d'inhibition obtenues sont rapportés dans le tableau N°09.

**Tableau N°10 : Activité de quelques composés phénolique purs :**

		<u>Diamètre de la zone d'inhibition (mm)</u>					
Standards (µg/ml)		<i>S. enteritidis</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Catéchine	100	11.1±0,2	-/-	-/-	13.7±1,3	-/-	-/-
	1000	15,7±0,5	9,2±0.7	7.6±0,5	13,8±0,2	-/-	-/-
Acide Caféique	100	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	1000	7,6±0,5	-/-	9±0,5	7,3±0,4	-/-	-/-
Rutine	100	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	1000	9,6±0,5	-/-	8±0,4	10.6±0.3	7,5±0,5	-/-
Acide Gallique	100	7,5±0,4	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	1000	13±0,5	-/-	-/-	11.8±0.6	-/-	-/-
Acide Tannique	100	-/-	8.7±0.4*	-/-	-/-	-/-	-/-
	1000	-/-	9,1±0.4	7,9±0,7	15.8±0.7	-/-	18,5±0,4*
Quercétine	100	-/-	11.4±0,4	13,6±0,4	-/-	-/-	18,9±0,5*
	1000	9±0,5	14,8±0,8	14,1±0,2	11.7±0.8	8,1±0,6	19,1±0,3

-/- : Pas de zone observée.

\* : inhibition incomplète.

Le tableau N°10 montre que la susceptibilité des différentes souches vis-à-vis de quelques composés phénoliques purs est différente. Ainsi, tous les standards à l'exception de l'acide tannique ont montré un effet inhibiteur sur *Salmonella enteritidis*.

La catéchine, la quercétine et l'acide tannique ont montré des zones d'inhibition appréciables sur *Shigella dysenteriae* ; le diamètre le plus important est obtenu avec la quercétine ( $14 \pm 0,8$ mm). L'acide caféique, l'acide gallique et la rutine n'ont pas montré de zones d'inhibition aux deux concentrations testées.

A l'exception de l'acide gallique, tous les standards testés ont montré des zones d'inhibition sur l'espèce *Proteus mirabilis* ; la meilleure activité (en terme de diamètre de la zone d'inhibition) est obtenue avec la quercétine à 1mg/ml ( $14,1 \pm 0,2$ mm).

L'espèce *Escherichia coli* O111: B4 a montré une sensibilité vis-à-vis de tous les standards, le diamètre d'inhibition le plus large est obtenu avec l'acide tannique à 1mg/ml ( $15,8 \pm 0,7$ mm).

Sur l'espèce *Staphylococcus aureus*, la catéchine, l'acide caféique, l'acide gallique, l'acide tannique n'ont montré aucune zone d'inhibition aux deux concentrations testées, seule la rutine et la quercétine ont montré de faibles zones d'inhibition  $7,5 \pm 0,5$ mm et  $8,1 \pm 0,1$ mm, respectivement.

L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* s'est montrée sensible uniquement vis-à-vis de l'acide tannique qui a montré une zone d'inhibition incomplète de  $18,5 \pm 0,4$ mm et de la quercétine qui a montré à 100µg/ml une zone d'inhibition incomplète, qui est devenue plus nette à 1mg/ml.

Les résultats obtenus avec la catéchine, l'acide gallique, l'acide caféique et la quercétine sur *P. mirabilis*, sont en accord avec les résultats obtenus par Rodriguez-Vaquero et ses collaborateurs (2007b). Contrairement à nos résultats, les auteurs n'ont pas observé de zone d'inhibition avec la rutine, ceci pourrait être dû à la différence dans la taille de l'inoculum utilisé qui été de  $2 \times 10^9$ . La sensibilité de *P. mirabilis* à l'égard de l'acide tannique a été rapportée par Taguri et ses collaborateurs (2006).

La sensibilité d'*E. coli* vis-à-vis des standards est similaire à celle observée par Rodriguez-Vaquero et al (2007b). Sa susceptibilité vis-à-vis de l'acide tannique a été mise en évidence par Taguiri et ses collaborateurs (2006).

Les résultats que nous avons obtenus sur l'espèce *S. aureus*, sont proches de ceux obtenus sur *S. aureus* ATCC25923 par Rodriguez-Vaquero et ses collaborateurs (2007b), à l'exception de la rutine qui, dans les conditions de notre expérimentation a montré un effet inhibiteur. Bien que des études aient montré la sensibilité de *S. aureus* vis-à-vis de l'acide tannique, (Akiyama, 2001 ;

Taguri et *al.*, 2006 ), nous n'avons pas observé de zone d'inhibition par l'acide tannique dans les conditions de notre test, ceci pourrait être du à une insuffisance dans la charge du disque (2 et 20µg/disque) car malheureusement la méthode des disques n'est pas très sensible aux faibles concentrations.

Rodriguez-Vaquiro et ses collaborateurs (2007b), ont observé des zones d'inhibitions avec la rutine, la quercétine, l'acide gallique, l'acide caféique et la catéchine sur *P. aeruginosa* ATCC29213. La souche que nous avons testée est donc plus résistante que la souche de référence testée par ces auteurs. En effet des souches différentes appartenant à la même espèce peuvent montrer des susceptibilités très différentes vis-à-vis d'un même composé (Cushnie et *al.*, 2003; Sokem et *al.*, 2004). La sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis de l'acide tannique est confirmée (CMI= 400µg/ml) par Taguri et ses collègues (2006).

A l'exception de l'effet inhibiteur de l'acide tannique sur *S. enteritidis* (Chung et *al.*, 1993 cité par Chung et *al.*, 1998), que nous n'avons pas pu mettre en évidence, probablement par insuffisance de la dose testée, la bibliographie consultée ne rapporte pas l'effet des standards testés sur les espèces *Salmonella enteritidis* et *Shigella dysenteriae*.

### III. 6. Etude chromatographique

#### III.6.1. Séparation sur colonne

Les fractions de trois extraits ayant montré une meilleure activité (en terme de diamètre de la zone d'inhibition) ont été testées sur chaque souche

##### III.6.1.1. Activité des fractions chromatographiques sur l'espèce *Staphylococcus aureus*

Les valeurs des zones d'inhibition sont données dans le tableau N°11.

**Tableau N°11 : Activité des fractions chromatographique sur *Staphylococcus aureus* :**

Fractions	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
<b>Ecorce <i>F. angustifolia</i></b>	
<b>Extrait acétate d'éthyle</b>	
F- Chloroforme	15,6±0,6
F-Chloroforme/Butanol	15,5±0,4
F-Butanol	19,1±0,5***
F-Butanol/Acétate d'éthyle	-/-
F-Acétate d'éthyle	-/-
F-Acide formique/eau	-/-
<b>Extrait de l'hexane</b>	
F-Chloroforme	11,5±0,9
F-Butanol	-/-
F-Acétate d'éthyle	-/-
F-Acide formique/eau	-/-
<b>Feuilles <i>F. angustifolia</i></b>	
<b>Extrait acétate d'éthyle</b>	
F-Chloroforme	-/-
F-Butanol	-/-
F-Acétate d'éthyle	-/-
F-Méthanol	14,1±0,2
F-Acide formique/eau	-/-

-/- : Pas de zone observée.

\*\* : Effet bactériostatique.

\*\*\* : Effet bactéricide.

Les résultats du tableau précédent indiquent que l'activité de l'extrait d'éthyle acétate de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* a été retrouvée dans les trois premières fractions éluées respectivement avec du chloroforme, le mélange chloroforme/butanol et le butanol. L'activité la plus importante a été obtenue avec la fraction éluee avec le butanol qui a montré une zone stérile de 19,1±0,5mm. L'activité de l'extrait de l'hexane de l'écorce a été retrouvée exclusivement au niveau de la première fraction éluee par le chloroforme avec un diamètre d'inhibition de 11,5±0,9mm.

Cependant l'activité de l'extrait d'éthyle acétate des feuilles a été retrouvée dans la fraction éluee avec le méthanol, indiquant que la ou les substance(s) active(s) sont de nature polaire.

### III.6.1.2. Activité des fractions chromatographiques sur l'espèce *Salmonella enteritidis*

Les valeurs des zones d'inhibition sont données dans le tableau N°12

**Tableau N°12:** Activité des fractions chromatographiques sur *Salmonella enteritidis* :

Fractions	<u>Diamètre de la zone d'inhibition(mm)</u>
<b>Ecorce <i>F. angustifolia</i></b>	
<b>Extrait acétate d'éthyle</b>	
F-Chloroforme	15,1±0,6***
F-Chloroforme/Butanol	-/-
F-Butanol	-/-
F-Butanol/Acétate d'éthyle	-/-
F-Acétate d'éthyle	-/-
F-Acide formique/eau	-/-
<b>Feuilles <i>F. angustifolia</i></b>	
<b>Extrait acétate d'éthyle</b>	
F- Chloroforme	13,2±
F-Butanol	-/-
F-Acétate d'éthyle	-/-
F-Méthanol	-/-
F-Acide formique/eau	-/-
<b>Extrait de l'hexane</b>	
F-Chloroforme	-/-
F-Butanol	14,1±0,3
F-Acétate d'éthyle	-/-
F-Acide acétique/eau	-/-

-/- : Pas de zone observée

\*\* : Effet bactériostatique

\*\*\* : Effet bactéricide.

Concernant *Salmonella enteritidis*, l'activité des extraits d'éthyle acétate de l'écorce et des feuilles de *Fraxinus angustifolia* a été retrouvée au niveau des fractions les moins polaires éluees avec du chloroforme, avec un diamètre de 15.1±0,6mm et 13,2±2mm, respectivement. La fraction active de l'extrait de l'hexane des feuilles de *F. angustifolia* éluee grâce à l'hexane a montré un diamètre d'inhibition de 14.1±0,3mm. Ce résultat montre que les systèmes d'élution choisis ont permis une bonne séparation de la ou des substance(s) responsable (s) de l'activité sur *Salmonella enteritidis*

### III.6.1.3. Activité des fractions chromatographiques sur l'espèce *Shigella dysenteriae*

Les valeurs des zones d'inhibition sont données dans le tableau N°13.

**Tableau N°13:** Activité des fractions chromatographiques sur *Shigella dysenteriae* :

Fractions	<u>Diamètre de la zone d'inhibition (mm)</u>
<b>Ecorce <i>F. angustifolia</i></b>	
<b>Extrait acétate d'éthyle</b>	
F-Chloroforme	14,9±0,3***
F-Chloroforme/Butanol	15,6±0,4**
F-Butanol	14,5±0,4***
F-Butanol/Acétate d'éthyle	-/-
F-Acétate d'éthyle	-/-
F-Acide formique/eau	-/-
<b>Extrait du chloroforme</b>	
F- Chloroforme	-/-
F-Butanol	-/-
F-Acétate d'éthyle	13,6±1,2
F-Acide formique/eau	12,2±0,3
<b>Feuilles <i>F. angustifolia</i></b>	
<b>Extrait du chloroforme</b>	
F-Chloroforme	-/-
F-Chloroforme/ acétate d'éthyle (3/1)	-/-
F-Chloroforme/ acétate d'éthyle (1/3)	-/-
F-Acétate d'éthyle	-/-
F-Méthanol	-/-
F-Acide formique/eau	-/-

-/-: Pas de zone observé.

\*\* : Effet bactériostatique.

\*\*\* : Effet bactéricide.

Dans le cas de *Shigella dysenteriae* le chloroforme et le butanol ont permis de récupérer à partir de l'extrait d'éthyle acétate de l'écorce deux fractions à activité bactéricide dont le diamètre est respectivement de 14.9±0,3mm et 14.5±0,4mm. Le mélange des deux solvants a permis de récupérer une fraction dont l'effet est bactériostatique (15.6±0.46mm). En revanche, l'activité de l'extrait du chloroforme a été retrouvée dans les fractions les plus polaires éluées avec l'acétate d'éthyle et le mélange d'acide formique/eau. L'activité de l'extrait du chloroforme des feuilles n'a pas été retrouvée dans les 6 fractions obtenues, indiquant probablement que l'activité initiale observée soit due à plusieurs composés agissants en synergie qui ont été séparés.

### III.6.1.4. Activité des fractions chromatographiques sur l'espèce *Proteus mirabilis*

Les valeurs des zones d'inhibition sont données dans le tableau N°14

**Tableau N°14:** Activité des fractions chromatographiques sur *Proteus mirabilis* :

Fractions	<u>Diamètre de la zone d'inhibition (mm)</u>
<b>Ecorce <i>F. angustifolia</i></b>	
<b>Extrait acétate d'éthyle</b>	
F-Chloroforme	-/-
F-Chloroforme/Butanol	11,7±0,5**
F-Butanol	18,8±0,8***
F-Butanol/Acétate d'éthyle	-/-
F-Acétate d'éthyle	-/-
F-Acide formique/eau	8,3±0,5
<b>Extrait de l'hexane</b>	
F-Chloroforme	14,6±0,4
F-Butanol	-/-
F-Acétate d'éthyle	-/-
F-Acide formique/eau	-/-
<b>Feuilles <i>F. angustifolia</i></b>	
<b>Extrait de l'hexane</b>	
F-Chloroforme	11,6±0,3
F-Butanol	-/-
F-Acétate d'éthyle	-/-
F-Acide acétique/eau	-/-

-/-: Pas de zone observée.

\*\* : Effet bactériostatique.

\*\*\*: Effet bactéricide.

La séparation de l'extrait d'éthyle acétate de l'écorce a permis de récupérer trois fractions actives sur *Proteus mirabilis*. Une zone bactériostatique de 11,7±0,5mm a été obtenue avec la fraction éluée avec le mélange chloroforme/butanol, une zone stérile de 18.8±0,8mm a été obtenue avec la fraction éluée avec le butanol et une petite zone de 8,3±0,5mm a été obtenue avec la dernière fraction issue du rinçage de la colonne avec le mélange d'acide formique/eau. Le fractionnement de l'extrait de l'hexane des feuilles et de l'écorce a permis de récupérer l'activité exclusivement au niveau de la fraction éluée avec le chloroforme.

### III.6.1.5. Activité des fractions chromatographiques sur l'espèce *Escherichia coli*

Les valeurs des zones d'inhibition sont données dans le tableau N°15.

**Tableau N°15:** Activité des fractions chromatographiques sur *Escherichia coli* :

Fractions	<u>Diamètre de la zone d'inhibition (mm)</u>
<b>Ecorce de <i>F. angustifolia</i></b>	
<b>Extrait acétate d'éthyle</b>	
F-Chloroforme	15,9±0,8**
F-Chloroforme/Butanol	12,9±0,9**
F-Butanol	-/-
F-Butanol/Acétate d'éthyle	-/-
F-Acétate d'éthyle	-/-
F-Acide formique/eau	-/-
<b>Extrait de l'hexane</b>	
F-Chloroforme	14,6±1,3**
F-Butanol	14,4±0,7***
F-Acétate d'éthyle	15,6±0,5
F-Acide formique/eau	15,4±0,3
<b>Feuilles de <i>F. angustifolia</i></b>	
<b>Extrait de l'hexane</b>	
F-Chloroforme	15,8±1,6***
F-Butanol	11,9±***
F-Acétate d'éthyle	-/-
F-Acide acétique/eau	-/-

-/-: Pas de zone observé.

\*\* : Effet bactériostatique.

\*\*\*: Effet bactéricide.

Le fractionnement de l'extrait d'éthyle acétate de l'écorce a permis de récupérer l'activité au niveau des fractions les plus apolaires éluées en utilisant le chloroforme seul (15.9±0.85mm) et le mélange chloroforme/butanol (12.9±0.95mm) qui a «exhibé» un effet bactériostatique sur *Escherichia coli*. Aussi, les fractions de l'extrait d'hexane de l'écorce se sont toutes montrées actives sur cette souche. Ceci pourrait être du à la présence de plusieurs composés actifs de polarités différentes qui ont été récupérées dans les différentes fractions. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par Varavuthikunchia et ses collaborateurs (2005) qui ont testé les extraits du chloroforme, de l'éthanol et l'extrait aqueux, et des fractions obtenues avec le butanol et de l'acétate d'éthyle de *Punica granatum* qui se sont toutes révélées actives sur *E. coli* entéropathogène. Les fractions éluées avec le chloroforme et celle éluée avec le butanol ont été les seules fractions actives issues

du fractionnement de l'extrait de l'hexane des feuilles ; les deux fractions on montré un effet bactéricide avec un diamètre d'inhibition de  $15,8 \pm 1,6$ mm et  $11,9 \pm 1,6$ mm, respectivement.

### III.6.1.7. Activité des fractions chromatographiques sur l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*

Les valeurs des zones d'inhibition sont données dans le tableau N°16

**Tableau N°16:** Activité des fractions chromatographiques sur *Pseudomonas aeruginosa*

Fractions	<u>Diamètre de la zone d'inhibition (mm)</u>
<b>Ecorce <i>F. angustifolia</i></b>	
<b>Extrait acétate d'éthyle</b>	
F-Chloroforme	7,3±0,5**
F-Chloroforme/Butanol	13,7±0,8**
F-Butanol	15±0,7**
F-Butanol/Acétate d'éthyle	-/-
F-Acétate d'éthyle	-/-
F-Acide formique/eau	-/-
<b>Feuilles <i>F. angustifolia</i></b>	
<b>Extrait acétate d'éthyle</b>	
F- Chloroforme	-/-
F-Butanol	-/-
F-Acétate d'éthyle	-/-
F-Méthanol	-/-
F-Acide formique/eau	-/-
<b>Extrait de l'hexane</b>	
F-Chloroforme	14,4±0,4**
F-Butanol	-/-
F-Acétate d'éthyle	-/-
F-Acide acétique/eau	-/-

-/-: Pas de zone observée.

\*\* Effet bactériostatique.

\*\*\*: Effet bactéricide.

La croissance de *Pseudomonas aeruginosa* a été inhibée par les fractions de l'extrait d'éthyle acétate des feuilles éluées avec le chloroforme, le mélange chloroforme/butanol et le butanol qui ont montré des zones d'inhibition de  $7,3 \pm 0,5$ mm,  $13,7 \pm 0,8$ mm et  $15 \pm 0,7$ mm, respectivement. En revanche l'activité de l'extrait d'éthyle acétate des feuilles n'a pas été retrouvée dans aucune des 5 fractions, alors que l'activité de l'extrait de l'hexane des feuilles a été retrouvée dans la fraction éluée avec le chloroforme ( $14,4 \pm 0,4$ mm).

Nous constatons donc que l'activité des fractions est dépendante de la souche. Les fractions les plus apolaires sont celles qui se sont montrées les plus actives, ceci est en corrélation avec les

données de la littérature qui mentionnent que les solvants apolaires permettent une bonne extraction de substance à activité antibactérienne (Martini et Eloff., 1998). L'activité de quelques fractions éluées avec le mélange d'acide formique et eau sur *S. dysenteriae* et *P. mirabilis* corrobore nos résultats précédents sur la sensibilité de ces deux souches aux extraits aqueux.

### III.6.2. Etude chromatographique sur couche mince

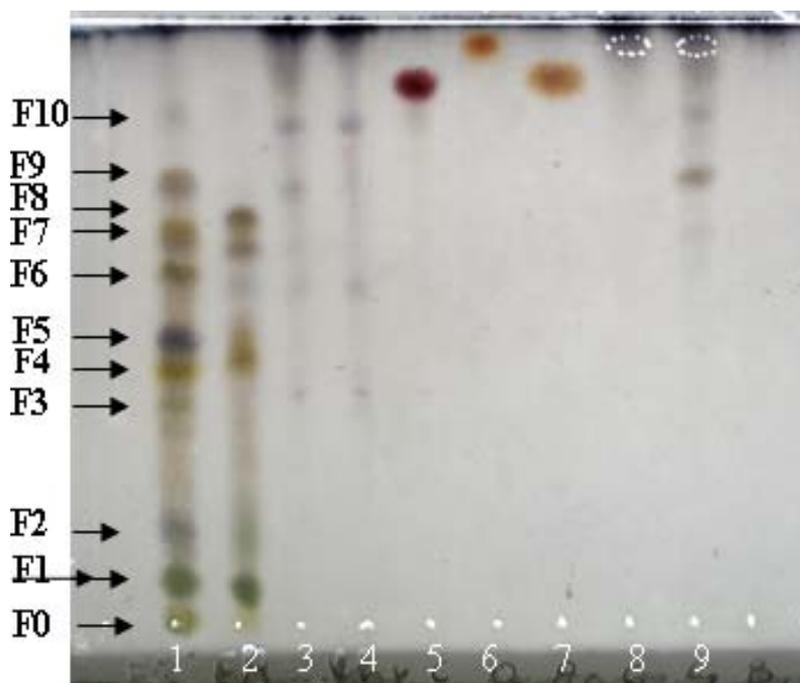
Des chromatographies sur couche mince (CCM) comparatives des extraits des feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*, des extraits des feuilles de *Pistacia lentiscus*, de 4 fractions collectées sur colonne et de quelques standards ont été réalisées ; la pulvérisation de la vanilline sulfurique nous a permis de visualiser les différentes bandes.

#### III.6.2.1. Chromatographie sur couche mince des extraits de l'écorce de *F. angustifolia*

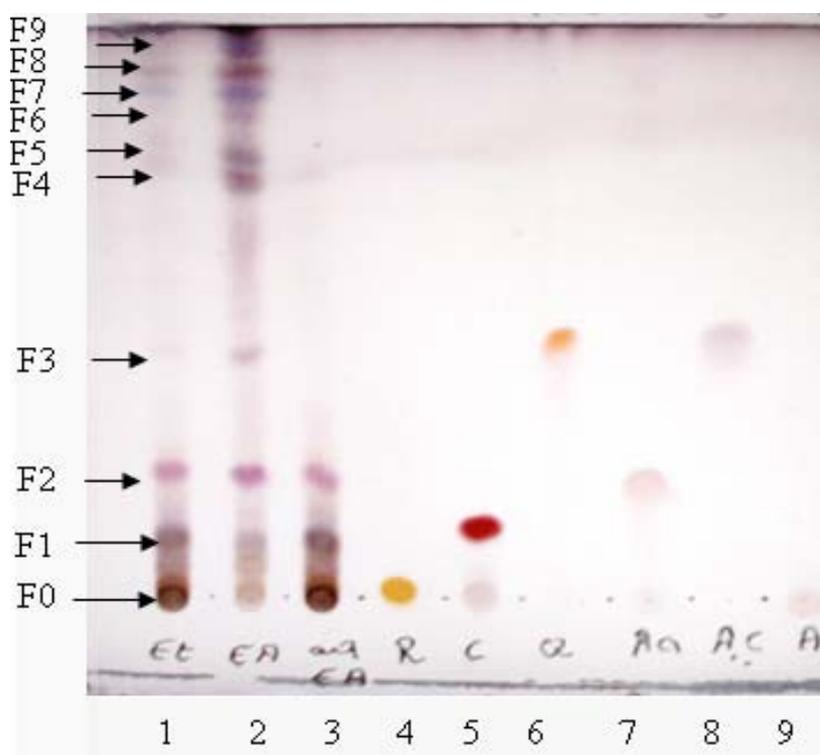
Pour séparer les composés des différents extraits organiques de l'écorce de *F. angustifolia* nous avons choisis un système à quatre solvants: acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau. Pour l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle, nous avons préféré le système: Chloroforme / Méthanol /Eau /Acide acétique car la qualité de la séparation de cet extrait était meilleure dans ce système. Les deux chromatogrammes sont montrés dans les figures N°35 et 36, respectivement. Les rapports frontaux (Rf) des différentes fractions sont donnés dans le tableau N°17.

**Tableau N°17:** les rapports frontaux des différentes fractions séparés par les systèmes; Acétate d'éthyle/Acide formique/Acide acétique/Eau et Chloroforme/Méthanol/Acide acétique/ Eau :

Dans le système ; Acétate d'éthyle/Acide formique/Acide acétique/Eau.		Dans le système ; Chloroforme/méthanol/Acide acétique/ Eau.	
Fractions	RF	Fractions	RF
F1	0,05	F1	0,10
F2	0,13	F2	0,21
F3	0,29	F3	0,42
F4	0,32	F4	0,71
F5	0,39	F5	0,75
F6	0,45	F6	0,85
F7	0,54	F7	0,89
F8	0,57	F8	0,92
F9	0,61	F9	0,96
F10	0,69		



**Figure N°35 :** Chromatogramme des extraits de l'écorce de *F. angustifolia*, de quelques standards et de deux fractions issues de la séparation sur colonne dans le système : acétate d'éthyle /acide formique /acide acétique/eau. 1: Extrait éthanolique. 2 : Extrait acétate d'éthyle. 3 : Extrait du chloroforme.4: Extrait de l'hexane. 5: Catéchine. 6: Quercétine. 7: Acide gallique. 8 : Fraction de l'extrait acétate d'éthyle éluée avec du chloroforme. 9: Fraction de l'extrait acétate d'éthyle éluée avec chloroforme/butanol.



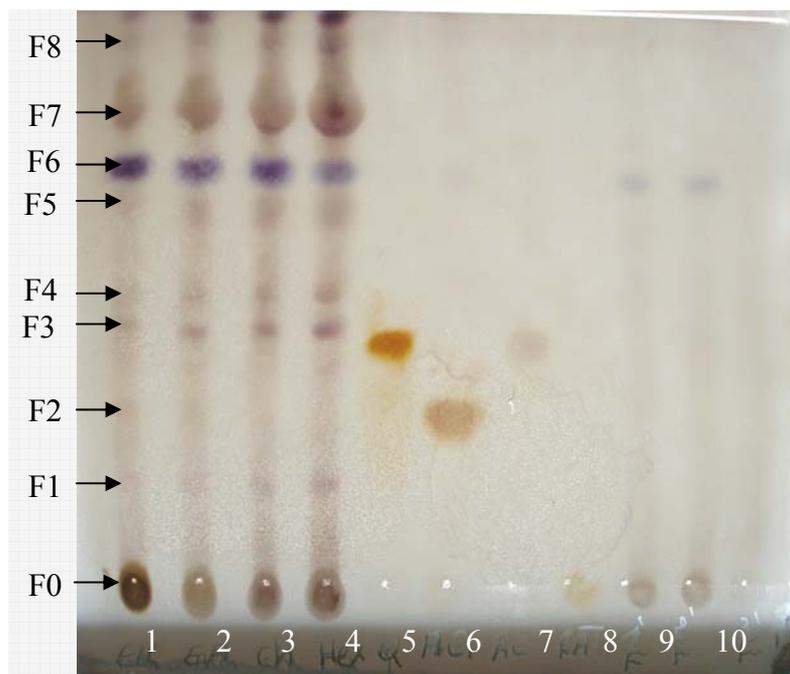
**Figure N°36:** Chromatogramme des extraits de l'écorce *F. angustifolia* et de quelques standards dans le système : Chloroforme/ méthanol/ acide acétique/ eau. 1: Extrait éthanolique. 2: Extrait acétate d'éthyle. 3: Extrait aqueux d'acétate d'éthyle.4: Rutine. 5: Catechine.6: Quercétine. 7: Acide gallique. 8 : Acide caféique. 9 : Acide tannique.

D'après la figure N°35 nous constatons que 9 fractions sont visibles au niveau de l'extrait éthanolique, 6 fractions au niveau de l'extrait acétate d'éthyle, 4 fractions au niveau de l'extrait du chloroforme et 3 fractions au niveau de l'extrait de l'hexane. Ceci montre la richesse de l'extrait éthanolique brut en différents composés comparativement aux autres extraits ; de même la composition de l'extrait d'acétate d'éthyle paraît plus diversifiée que celle des extraits d'hexane et du chloroforme, indiquant un gain de pureté due à l'extraction sélective que nous avons effectué. La fraction issue de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'écorce de *F. angustifolia* éluée avec du chloroforme montre une seule tache de  $R_f = 0,96$ . L'observation sous lampe UV à 250 révèle une tache de couleur bleue, suggérant la présence probable d'un acide phénol de faible poids moléculaire (Bruneton, 1999). La deuxième fraction est issue du même extrait mais éluée avec un mélange chloroforme butanol montre trois bandes de  $R_f$  ; 0,96, 0,69 et 0,57, respectivement. Observée sous lampe UV à 250 nm, seul le composé avec le  $R_f = 0,96$  apparaît, il est bleu.

La figure N°36 montre la séparation de 7 fractions au niveau de l'extrait éthanolique, 9 fractions au niveau de l'extrait d'acétate d'éthyle et uniquement deux fractions au niveau de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle. Nous constatons que la coloration de des fractions F3, F4, F5, F7 et F8 apparaît plus intense au niveau de l'extrait d'acétate d'éthyle, ceci pourrait être attribué à une différence dans la concentration de ces composés. Les fractions F6 et F9 n'ont pas été mise en évidence au niveau de l'extrait éthanolique brut, ceci s'expliquerait également par leur présence à une concentration trop faible et que l'extraction avec l'acétate d'éthyle a permis de concentrer. Le composé F3 ayant le même profil chromatographique ( $R_f$  et couleur sous UV et après révélation à la vanilline) que l'acide caféique a été observé au niveau de l'extrait éthanolique et l'extrait acétate d'éthyle ; il est donc probable que l'acide caféique soit présent au niveau de ces deux extraits. Bien que la fraction F2 montre le même  $R_f$  que l'acide gallique (0,21), il est peu probable que le composé F2 soit de l'acide gallique, car les fractions F2 paraissent sous UV de couleur bleue fluorescente contrairement à l'acide gallique.

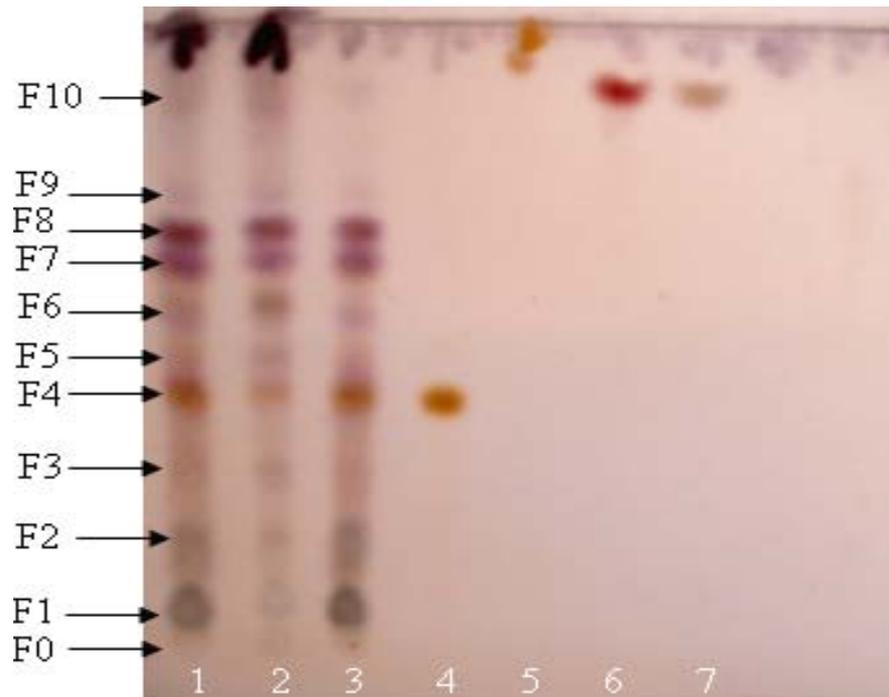
### III.6.2.2. Chromatographie sur couche mince des extraits des feuilles de *F. angustifolia*

Un système à trois solvants a été choisi pour séparer les composés des extraits organiques des feuilles de *F. angustifolia*, à savoir: Acétate d'éthyle/Hexane/Acide formique. Par contre, nous avons préféré le système acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau pour fractionner les composés de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle vue la meilleur qualité de la séparation dans ce système. Les figures N°37 et N°38 illustrent la séparation obtenue et les tableaux N°19 montre les rapports frontaux calculés pour les différents composés.



**Figure N°37 :** Chromatogramme des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*, de quelques standards et de deux fractions issues de la séparation sur colonne dans le système: acétate d'éthyle/ hexane/ acide formique. 1: Extrait éthanolique. 2: Extrait acétate d'éthyle. 3 : Extrait du chloroforme.4 : Extrait de l'hexane. 5: Quercétine.6: Acide gallique.7: Acide caféique. 8 : Acide tannique. 9 : Fraction de l'extrait de l'hexane collectée avec du chloroforme.10 : Fraction de l'extrait de l'hexane collectée avec du butanol.

Dans ce système le profil des extraits est remarquablement similaire, 8 bandes ont été visualisées au niveau de chaque extrait, ceci indique que le système a permis de séparer les mêmes composés au niveau des 4 extraits. La différence dans la composition pourrait donc résider au niveau des composés restés au point de dépôt. Les quatre extraits montrent une fraction F2 dont le  $R_f=0,28$  est similaire à celui de l'acide gallique mais de couleur beaucoup moins intense, il est donc probable que l'acide gallique soit présent au niveau de ces extraits. Les fractions issues de la séparation sur colonne de l'extrait de l'hexane des feuilles de *F. angustifolia* dont une collectée avec du chloroforme et l'autre collectée avec du butanol montrent aussi une seule tache dont le  $R_f$  est de 0,48. L'observation à la lumière du jour et sous UV n'a révélée aucune tache. La différence dans l'activité pourrait être due à la différence dans la nature des composés non séparés ou non révélés par la vanilline.



**Figure N°38 :** Chromatogramme des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia* et de quelques standards dans le système acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau. 1: Extrait éthanolique. 2: Extrait d'acétate d'éthyle. 3: Extrait queux d'acétate d'éthyle. 4: Rutine. 5: Quercétine. 6: Catéchine. 7: Acide caféique.

La figure N°38 montre aussi un profil similaire pour les trois extraits. La vanilline sulfurique à permis de visualiser 10 bandes au niveau de chaque extrait ; cependant, une légère différence dans l'intensité de la coloration est observable pour certaines fractions. Nous remarquons aussi que les trois extraits montrent une tache commune dont les caractéristiques chromatographiques ( $R_f = 0,45$ , couleur à la lumière du jour et révélation à la vanilline sulfurique) sont similaires à celle de la rutine. Il est donc très probable que la rutine soit présente au niveau de ces extraits. Hosny (1998) cité par Kostova et Iossifova (2007) a rapporté la présence de la rutine chez l'espèce *Fraxinus angustifolia*.

**Tableau N°19 :** Rapports frontaux des différentes fractions des extrait de feuilles de *Fraxinus angustifolia* séparé dans les systèmes ; Acétate d'éthyle/ Hexane/Acide formique et Acétate d'éthyle /Acide formique/Acide acétique/ Eau :

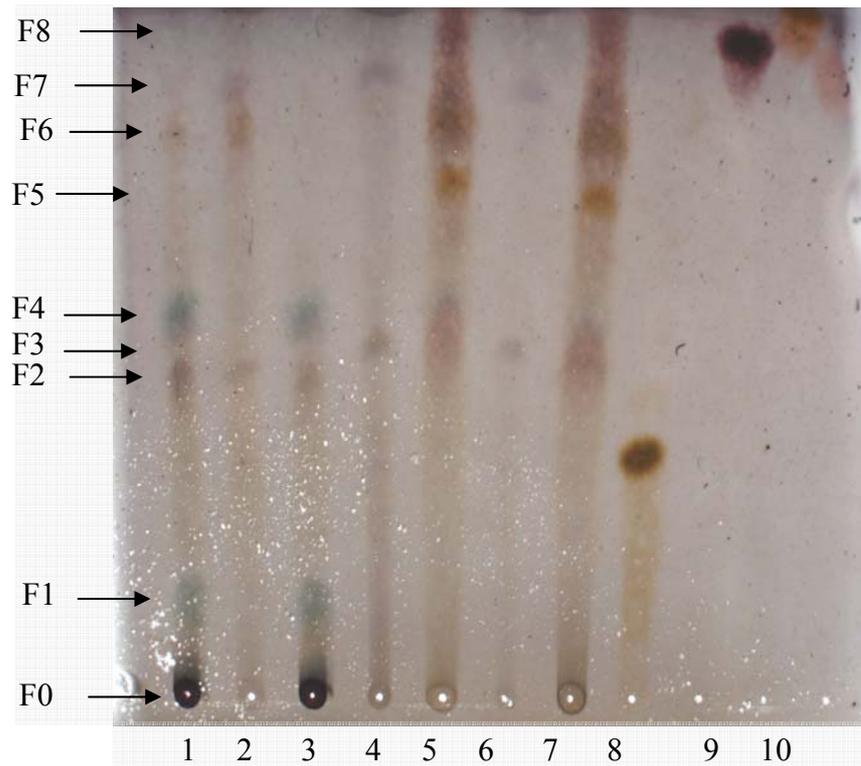
Dans le système ; Acétate d'éthyle/ Hexane/Acide formique		Dans le système ; Acétate d'éthyle /Acide formique/Acide acétique/ Eau	
Fractions	RF	Fractions	RF
F1	0,18	F1	0,07
F2	0,28	F2	0,17
F3	0,42	F3	0,24
F4	0,48	F4	0,45
F5	0,74	F5	0,53
F6	0,78	F6	0,57
F7	0,91	F7	0,76
F8	0,97	F8	0,78
		F9	0,82
		F10	0,90

### II.6.2.3. Chromatographie sur couche mince des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus*

Le système acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau a permis une bonne séparations des composés des extraits de feuilles de *P. lentiscus*. La figure N°38 montre le chromatogramme effectué. Les rapports frontaux calculés sont donnés dans le tableau N°20

**Tableau N°20:** Les rapports frontaux des composés des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* dans le système: acétate d'éthyle/ acide formique/ acide acétique/ eau :

Fractions	Rapport frontal
F1	0,14
F2	0,50
F3	0,53
F4	0,57
F5	0,78
F6	0,85
F7	0,92
F8	0,96



**Figure N°39** : Chromatogramme des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* et de quelques standards dans le système: Acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau. 1: Extrait éthanolique. 2: Extrait d'acétate d'éthyle. 3: Extrait aqueux d'acétate d'éthyle. 4: Extrait du chloroforme. 5: Extrait aqueux du chloroforme. 6: Extrait de l'hexane. 7: Extrait aqueux de l'hexane. 8: Rutine. 9: Catéchine. 10: Quercétine.

Les résultats de la figure N°39 indiquent que les profils des extraits du chloroforme et d'hexane sont similaires, mettant en évidence deux fractions principales. Les extraits aqueux du chloroforme et d'hexane montrent aussi des profils similaires exhibant quatre fractions dont une ayant des caractéristiques ( $R_f = 0,96$  et couleur) similaires à celles de la quercétine, suggérant la présence probable de la quercétine dans ces deux extraits aqueux.

Nous pouvons donc conclure que la différence dans l'activité antibactérienne observée est attribuable à la différence dans la composition des extraits.

# *CONCLUSION ET PERSPECTIVES*

## Conclusion et perspectives

Lors de cette étude, une extraction sélective des composés phénoliques a été effectuée ; elle nous a permis de récupérer 17 extraits dont 5 aqueux et 12 organiques. L'effet antibactérien a été testé *in vitro* sur des souches isolées en milieu hospitalier : il s'agit de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella dysenteriae*, *Proteus mirabilis* et une souche d'*Escherichia coli* O111: B4.

L'évaluation qualitative de l'effet antibactérien montre que tous les extraits organiques de l'écorce et des feuilles de *Fraxinus angustifolia* sont actifs sur toutes les souches bactériennes testées. Des zones d'inhibition de diamètres variables ont été observées à au moins une des deux concentrations testées. La plupart des extraits de *Pistacia lentiscus* sont aussi actifs, néanmoins l'activité a été le plus souvent observée à 100µg/disque. Les extraits aqueux des deux plantes montrent des spectres d'activité moins larges. En comparant la susceptibilité des pathogènes étudiés (en terme de nombre d'extraits actifs), *Pseudomonas aeruginosa* a été l'espèce la plus résistante : seul 9 extraits ont inhibé sa croissance. Néanmoins, l'effet inhibiteur observé sur cette souche serait d'un grand intérêt car cette espèce est naturellement résistante à de nombreux antibiotiques et extraits de plantes. L'activité de nos extraits sur *Proteus mirabilis* et *Staphylococcus aureus* serait aussi intéressante car ces deux souches se sont révélées résistantes à l'ampicilline.

L'évaluation quantitative de l'activité antibactérienne des extraits aqueux des deux plantes par la détermination de la concentration minimale inhibitrice montre que *Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus sensible vis-à-vis des extraits aqueux. En effet, les CMI les plus faibles (0,312 mg/ml) ont été obtenues avec les extraits aqueux de l'hexane et du chloroforme des feuilles de *Pistacia lentiscus*. Le fait que cette valeur (CMI=0,312mg/ml) soit inférieure à celle de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle (CMI=1,5mg/ml) indique un gain d'activité lié à un gain de pureté, renforçant l'idée de l'efficacité de l'extraction sélective effectuée.

Le fractionnement de certains extraits par chromatographie sur colonne de gel de silice a permis de récupérer des fractions bactéricides ou bactériostatiques. Le chloroforme et le butanol ont été les solvants qui ont permis de collecter les fractions les plus actives. Ainsi la fraction de l'extrait de l'acétate d'éthyle de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* collectée avec du chloroforme est bactéricide vis-à-vis de *Salmonella enteritidis* et *Shigella dysenteriae*. Celle collectée avec le

butanol est bactéricide à l'égard de *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae* et *Proteus mirabilis*. Les fractions de l'extrait de l'hexane des feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia* récupérées avec le butanol sont bactéricides pour *Escherichia coli*. Aussi, la fraction collectée avec le chloroforme à partir de l'extrait de l'hexane des feuilles de la même plante est également létale pour *E. coli*.

La séparation de ces fractions par chromatographie sur couche mince de gel de silice montre clairement un gain de pureté. En effet, une seule tâche a été mise en évidence dans la fraction collectée avec du chloroforme à partir de l'extrait de l'acétate d'éthyle de l'écorce de *F. angustifolia*, ce qui laisse supposer la présence d'un seul composé. Cependant, la fraction récupérée avec le mélange butanol/chloroforme montre la présence de trois taches. Aussi les deux fractions collectées avec le chloroforme et le butanol à partir de l'extrait de l'hexane des feuilles de *F. angustifolia* montrent après pulvérisation de la vanilline sulfurique la migration d'un seul composé.

L'activité antibactérienne de quelques composés phénoliques purs a été mise en évidence. Aux concentrations utilisées, la quercétine a été le flavonoïde le plus actif contre toutes les souches testées. Les acides phénols ont montré une activité modérée; l'acide gallique a inhibé *S. enteritidis* et *E. coli*. L'acide caféique a inhibé *S. enteritidis*, *P. mirabilis* et *E. coli*. L'acide tannique s'est montré actif vis-à-vis de *S. dysenteriae*, *P. mirabilis*, *E. coli* et *P. aeruginosa*.

L'activité antibactérienne de nos extraits est attribuable aux composés phénoliques, car les différents dosages effectués montrent la richesse des différents extraits en phénol totaux, tannins et flavonoïdes. De plus, les chromatogrammes réalisés avec différents systèmes d'élution montrent que nos extraits sont des mélanges de plusieurs composés avec des rapports frontaux différents et montrent aussi l'éventuelle présence dans certains d'entre eux de l'acide caféique, de l'acide gallique, de la rutine et de la quercétine.

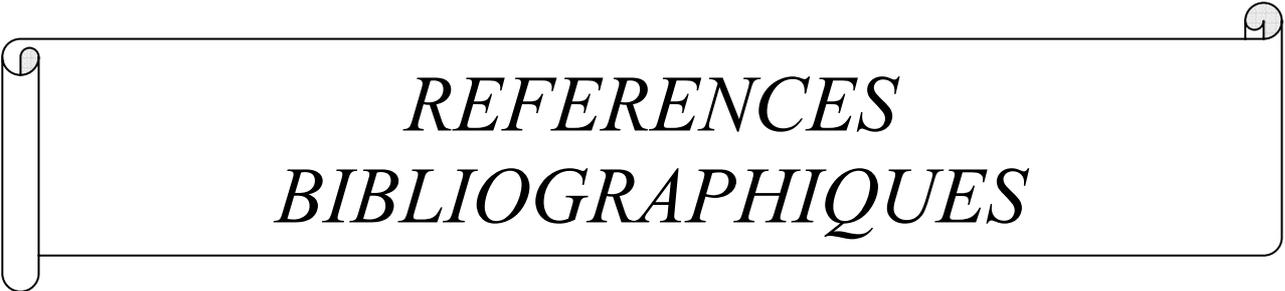
Nous pouvons donc conclure que l'utilisation traditionnelle des deux plantes dans le traitement de maladie infectieuse semble justifiée. Les résultats de la présente étude méritent d'être affinés, il serait intéressant :

- De déterminer l'activité de l'extrait éthanolique des feuilles de *Pistacia lentiscus* sur l'espèce *Proteus mirabilis*
- De déterminer les concentrations minimales inhibitrices des extraits organiques.

-De déterminer les concentrations minimales bactéricides de tous les extraits et fractions actives.

-De tester l'activité de nos extraits sur d'autres espèces bactériennes dont des souches de référence et des souches multi-résistantes.

-De purifier et d'identifier les principes actifs responsables de cette activité et de tester leur activité et toxicité *in vivo* dans le but de mettre en place des traitements naturels de maladies infectieuses mieux tolérés et moins onéreux.

A decorative horizontal border with a scroll-like appearance on the left and right sides, containing the text.

*REFERENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*

Références bibliographiques

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

**Abou Zeid, A. H., (2002).** Stress metabolites from *Corchorus olitorius* L. leaves in response to certain stress agents. *Food Chemistry*, 76: 187–195.

**Ackermann, G., Rodloff, A.C., (2003).** Drugs of the 21st century: telithromycin (HMR 3647)-the first. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51: 497–511.

**Adamu, H.M., Abayeha, O.J., Aghoa, M.O., Abdullahi, A.I., Uba, A., Dukkuc, H.U., Wufema, B.M., (2005).** An ethnobotanical survey of Bauchi State herbal plants and their antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 99: 1–4.

**Ahmad, I., Aqil, F., (2007).** In vitro efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ESbL-producing multidrug-resistant enteric bacteria. *Microbiological Research*, 162 (3 ): 264-275.

**Ahmad, I., Beg, A.Z., (2001).** Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, 74: 113–123.

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

**Alcaraz, L.E., Blanco, S.E., Puig, O.N., Tomas, F., Ferretti, F.H., (2000).** Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Theoretical Biology*, 205 :231-240.

**Al-Fatimi, M., Wurster, M., Schroder, G., Lindequist, U., (2007).** Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *Journal of Ethnopharmacology*, 111: 657–666.

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

**Ammar, H., Lopez, S., Gonzalez, S., (2005).** Assessment of the digestibility of some mediterranean shrubs by in vitro techniques. *Animal Feed Science and Technology*, 119: 323–331.

**Anderson, J.C., Headley, C., Stapleton, P.D., Taylor, P.W., (2005).** Synthesis and antibacterial activity of hydrolytically stable(-)-epicatechin gallate analogues for the modulation of  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15 :2633–2635.

**Andersson, M.I., MacGowan, A.P., (2003).** Development of the quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, S1: 1-11.

- Andremont, A., (2002).** L'impacte des antibiotiques sur les flores commensales conditionne l'avenir de la résistance. *Medicine Science*, 18: 364-5.
- Angeh, J.E., (2006).** Isolation and charcterisation of antibacterial compounds present in members of Combretum section, hypocrateropsis. Thèse de doctorat, Université de pertoria, Afrique du sud.
- Arct, A.J., Oborska, Mojski, M., Binkowska, A., widzikowska, B. S., (2002).** Common cosmetic hydrophilic ingredients as penetration modifiers of flavonoids. *International Journal of Cosmetic Science*, 24: 357-366.
- Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H., (2000).** Bacteriologie clinique. *Edition Ellipses*.
- Aziz, N.H., Farag, S.E., Mousa, L.A., Abo-Zaid, M.A.,(1998).** Effets antibactériens et antifongiques comparatifs de certains composants phénoliques. *Microbiology*, 93(374):43-54. abstract.
- Baba, B., (2000).** Encyclopédie des plantes médicinales utiles. Flore d'Algerie et du Maghreb. Substances végétales d' Afrique d'orient et d'occidents. *Editions Roiba*, 1-294.
- Bais, H., Walker, S.T., Herbert, P., Schweizer, b., Jorge, M., Vivanco, A., (2002).** Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicam*. *Plant Physiology Biochemistry*, 40: 983–995.
- Barbour, E.K., Al Sharif, M., Sagherian, S.V., Habre, N.A, Talhouk, S.R., Talhouk, S.N., (2004).**Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 93: 1–7.
- Basile, A., Ferrara, L., Del Pezzo, M., Meled, G., Sorbo, S., Paola Bassi, P., Montesano, D., (2005).** Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *Journal of Ethnopharmacology*, 102: 32–36.
- Basile, A., Giordano, S., Lopez-Zàez, J.A., Castaldo-cobianchi, R., (1999).** Antibacterial activity of pure flavonoids from mousses. *Phytochemistry*, 5 :1479-1482.
- Bellon, S., Parsons, J.D., Wei, Y., Hayakawa, K., Swenson, L.L. , Charifson, P.S., Lippke, A.J., Aldape, R., Gross, C.H., (2004).** Crystal Structures of *Escherichia coli* Topoisomerase IV ParE Subunit (24 and 43 Kilodaltons): a Single Residue Dictates Differences in Novobiocin Potency against Topoisomerase IV and DNA Gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(5): 1856–1864.
- Bernard, F.x., Sabel, S.,Cameron, B., Provost, J., Desnottes, J.F., Grouzet, J., Blanche, F., (1997).** Glycosylated Flavones as Selective Inhibitors of Topoisomerase IV. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(5): 992–998.
- Blanco, A.R., Sudano-Roccaro, A., Spoto, G.C., Nostro, A., Rusciano, D., (2005).** Epigallocatechin Gallate Inhibits Biofilm Formation by Ocular Staphylococcal Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(10): 4339–4343.
- Bonjar, S., (2004a).** Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used in Iran. *Journal of Ethnopharmacology*, 94: 301–305.

- Bonjar, S.G.H., (2004 b).** Antibacterial screening of plants used in Iranian folkloric medicine. *Fitoterapia*, 75: 231–235.
- Borges-Walmasley, M.I., McKeegan, S.K., Walmasley, A.R., (2003).** Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochemical Journal*, 376: 313–338.
- Bruneton, J., (1999).** Pharmacognosie Phytochimie Plantes Medicinales. *Édition Technique et Documentations*.
- Bryskier, A., (1999a).** Pénicillines, p: 157-224 in Bryskier, A., Antibiotique Agents Antibacteriens et Antifongique, *Edition Ellipses*, Paris. 947-990.
- Bryskier, A., (1999b).** Nouvelles tétracyclines, p: 669-680. In Bryskier, A., Antibiotique Agents Antibacteriens et Antifongique, *Edition Ellipses*, Paris.
- Bryskier, A., (1999c).** Streptogarmine, Lincosamine, p: 598-632. In Bryskier, A., Antibiotique Agents Antibacteriens et Antifongique, *Edition Ellipses*, Paris.
- Bryskier, A., (1999d).** Ansamycines, p: 947-971. In Bryskier, A., Antibiotique Agents Antibacteriens et Antifongique, *Edition Ellipses*, Paris.
- Bryskier, A., (1999e).** Epidimiologie de la résistance aux antibacteriens. In Bryskier, A., Antibiotique Agents Antibacteriens et Antifongique, *Edition Ellipses*, Paris.
- Bryskier, A., Agouridas, C., (1999).** Antibiotiques peptidiques, p: 867-928. In Bryskier, A., Antibiotique Agents Antibacteriens et Antifongique, *Edition Ellipses*, Paris.
- Bryskier, A., Klich, M., (1999).** Antibiotique coumariniques: Novobiocine, coumermycine, clorobiocine, p 856-866. In Bryskier, A., Antibiotique Agents Antibacteriens et Antifongique, *Edition Ellipses*, Paris.
- Buwa, L.V., Staden. J.V., (2006).** Effect of tim collection on the antimicrobial activities of *Harphyllum caffrum* brak.. *South African Journal of Botany*, 130(1): 139-142.
- Camporese, A., Balick, M.J., Arvigo, R., Esposito, R.G., Morsellino, N., De Simone, F., Tubaro, A., (2003).** Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). *Journal of Ethnopharmacology*, 87: 103–107.
- Cattoir, V., (2004).** Pompe d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie*. 52: 607-616.
- Caturla, N., Vera-Samper, E., Villalain, J., Mateo, C.R., Micol, V., (2003).** The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of gallolylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radical Biology & Medicine*, 34 (6) :648–662.
- Chacha, M., Bojase-Moleta, G., Majinda, R. R.T., (2005).** Antimicrobial and radical scavenging flavonoids from the stem wood of *Erythrina latissima*. *Phytochemistry*, 66: 99–104.

- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Kilburn, J.D., Rakariyatham, N.,(2007).** Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food Chemistry*, 100 : 1044–1048.
- Chopra, I., O'Neill, A., Miller, K., (2003).** The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resistance Updates*, 6:137-145.
- Chopra, I., Roberts, M., (2001).** Tetracycline Antibiotics: Mode of Action Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 65(2): 232-260.
- Chowdhury, R., Hasan, M.C., Rashid, M.A., (2003).** Antimicrobial activity of *Toona ciliata* and *Amoora rohituka*. *Fitoterapia*, 74: 155–158.
- Chun, S.S., Vатtem, A.D., Lin, Y.T., Shetty, K., (2007).** Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*, 40: 809–816.
- Chung, K.T., Wong, T.Y., Wei, C.I., Huang, Y.W., (1998).** Tannins and human health: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(6): 421-464.
- Cloete, T.E., (2003).** Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51 :277-282.
- Cottilga, F., Loy, D., Floris, C., Casu, M., Pompie, R., Bonsignore, L., (2001).** Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium*. *Phytomedicine*, 8(4): 302-305.
- Cowan, M.M., (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review*, 12(4): 564-582.
- Croteau, R., Kutchan, M.T., Lewis, N.G.,** Natural products (secondary metabolites), p : 1250-1318 in Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R., (2000). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, edited by American Society of Plant Physiologists.
- Cui, L., Murakami, H.H., Kuwahara-Arai, K., Hanaki, H., Hiramatsu, K., (2000)** Contribution of a Thickened Cell Wall and Its Glutamine Nonamidated Component to the Vancomycin Resistance Expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (44) 9: 2276-2285.
- Cushnie, T.P.T., Hamiltone, V.S.E., Lamb, J.A., (2003).** Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiological Reserche*, 158: 281-289.
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., (2005a).** Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26: 343-356.
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., (2005b).** Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *Journal of Ethnopharmacology*, 101: 243–248.

- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., (2006).** Assessment of the antibacterial activity of galangin against 4-quinolone resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine*, 13: 187–191.
- Dall'Acqua, F., Marciani, S., Rodighiero, G., (1969).** The action spectrum of xanthotoxin and bergapten for the photoreaction with native DNA. *Naturforsch*, 24: 667-671
- Dall'Acqua, F., Martelli, P., (1991).** Photosensitizing action of furocoumarins on membrane components and consequent intracellular events. *Journal of Photochemical and Photobiology*, 8: 235-254.
- De Lima, M.R.F., de Souza Luna, J., Dos Santos, A.F., Cano de Andrade, M.C., Antonio Santana, A.E.G., Genet, J.P., Marquez, B., Neuville, L., Moreau, N.,(2006).** Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 105 : 137–147.
- Denny, J.B., Lambert, P.A., West, P.P.A., (2002).** The favonoid galangin inhibits the L1 metallo-L-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiology Letters*, 208: 21-24.
- Diaz, E., Ferrandes, A., Prieto, M.A., Garcia, J.L., (2001).** Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reveiw*, 65(6): 523-569.
- Domart, Y., Veyssier., (1999).** Vancomycine, teicoplanine, p: 989-946. In Bryskier, A., Antibiotique Agents Antibacteriens et Antifongique, *Edition Ellipses*, Paris.
- Doublet, B., (2004).** Caractérisation des éléments génétiques mobiles du gène de résistance au florfenicol *floR* chez *Salmonella enterica* et *Escherichia coli*. Thèse de doctorat, université François Rabelais de tours.
- Drewes, E.S., Khan, F., Van Vauuren, S.F., Viljoen, A.M., (2005).** Simple 1,4-benzoquinones with antibacterial activity from stems and leaves of *Gunnera perperisa*. *Phytochemistry*, 66: 1812-1816.
- Drilica, K., Zhao, X., (1997).** DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(3): 377-392.
- Dutronc, H., Bocquentin, F., Galpérine, T., Lafarie-Castet, S., Dupon, M., (2005).** Le linzolide, le premier antibiotique de la famille des oxazolidonones. *Medicine et Maladie Infectieuses*, 35 :472-434.
- Duval, J., Soussy, C.J., (1999).** Antibiotherapie. 4eme Edition Masson.
- Eloff, J. N., (1998).** Wich extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology*, 60: 1-8.
- Eloff, J. N., Famakin, J.O., Katerere, D.R.P., (2005).** *Combretum woodi* (Combretaceae) leaf extracts have high activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 4 (10):1161-1166.
- Eloff, J.N., McGaw, L.J., (2006).** Modern phytomedicine. Turning medicinal plants into drugs. Edited by I. Ahmad, F. Aqil, and M. Owais.97-121.

- Ezoubeiri, A., C.A. Gadhi, C.A., Fdil, N., Benharref, A., Jana, M., Vanhaelen, M., (2005).** Isolation and antimicrobial activity of two phenolic compounds from *Pulicaria odora* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 99 : 287–292.
- Figuroa, M., Rivero-Cruz, I., Rivero-Cruz, B., Byeb, R., Navarrete, A., Mataa, R., (2007).** Constituents, biological activities and quality control parameters of the crude extract and essential oil from *Arracacia toluensis* var. *multifida*. *Journal of Ethnopharmacology*, 113: 125–131.
- Filloux, A., Vallet, I., (2003).** Biofilm : mise en place d'une communauté bactérienne. *Medicine/Science*, 19: 77-83.
- Fish, A., (1999).** Phénicolés, p972-979, In Bryskier, A.; Antibiotique Agents Antibacteriens et Antifongique, Edition Ellipses, Paris.
- Fogliani, B., Raharivelomanana, P., Bianchini, J.P., Bouraima-Madjebi, S., Hnawia, E., (2005).** Bioactive ellagitannins from *Cunonia macrophylla*, an endemic Cunoniaceae from New Caledonia. *Phytochemistry*, 66: 241–247.
- Folin, O., Ciocalteu, V., (1927).** On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 73-627.
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., Stoodley, P., (2005).** Survival strategies of infectious biofilm. *Trends in Microbiology*, 13-1.
- Gasmi-Boubaker, A., Kayouli, C., Buldgen, A., Boukary, A., Ammar, H., Lopez, S., (2006a).** Effect of feed block supply on the ruminal ecosystem of goats grazing shrub land in Tunisia. *Animal Feed Science and Technology*, 127: 1–12.
- Gasmi-Boubaker, A., Kayouli, C., Buldgen, A., (2006b).** Feed blocks as a supplement for goat kids grazing natural Tunisian rangeland during the dry season. *Animal Feed Science and Technology*, 126 :31–41.
- Goli, A.H., Barzegar, M. Sahari, M.A., (2004).** Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, 92(3)521-525.
- Gravot, A., (2002).** Etude de P450s impliqués dans la biosynthèse des furanocoumarines chez *Ruta graveolens*. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de lorraine.
- Guinard, J.L., (2000).** Les composés aromatiques. Biochimie végétale. *Edition Dunod* : 161-176 .
- Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, F., Sokmen, A., Polissiou, M., A. Adiguzel, A., Ozkan, H., (2007).** Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *Longifolia*. *Food Chemistry*, 103: 1449–1456.
- Hagerman, A.E, Butler, L.G., (1981).** The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(9): 4444-4497.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G., (1978).** Protein precipitation method for quantitative determination of tannins. *Journal of Agriculture and Food chemistry*, 26: 809-812

- Hamilton-Miller, J.M.T., (1995).** Antimicrobial Properties of Tea (*Camellia sinensis* L.). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (39)11: 2375–2377.
- Hamilton-Miller, J.M.T., Shah, S., (2000).** Activity of tea component epicatechin gallate and analogues against methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46: 847-863.
- Hara, Y., (2001).** Green tea health benefits and applications. Marcel Dekker, Inc. New York Basel. Chapitre 6.
- Hartman, J.B., Tomasz, A., (1984).** Low-affinity Penicillin-Binding Protein associated with  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 158(2): 513-519.
- Hatano, T., Kusuda, M., Inada, K., Ogawa, T.O., Shiota, S., Tsuchiya, T. Yoshida, T., (2005).** Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 66: 2047–2055.
- Havsteen, B.H., (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology&Therapeutics*, 96:97-202.
- Hawkey, P.M., (2003).** Mechanisms of quinolone action and microbial response. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, S1:29-35.
- Hayouni, E., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, H., (2007).** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*. 105(3): 1126-1134.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, Dennis, D.J., (2002).** Flavonoid antioxidants: metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584.
- Henis, Y., Tagari, H., Volcani, R, (1964).** Effect of water extracts of carob pods, tannic acid, and their derivatives on the morphology and growth of microorganisms. *Applied Microbiology*, 12 (3) : 204-209.
- Hogan, D., Kolter, R., (2002).** Why are bacteria refractory to antimicrobials? *Current Opinion in Microbiology*, 5: 472-477.
- Hu, Z.Q., Zhao, W.H., Asano, N., Yoda, Y., Hara, Y., Shimamura, T., (2002).** Epigallocatechin gallate synergistically enhances the activity of carbapenems against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(2): 558–560.
- Hu, Z.Q., Zhao, W.H., Hara, Y., Shimamura, T., (2001).** Epigallocatechin gallate synergy with ampicillin/sublactam against 28 clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 361-364.
- Huber, B., Eberla, L., Feucht, W., Jürgen Polster, J., (2003).** Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. *Z Naturforsch.* 58: 879-884.

- Jones, G.A., MacAllister, T.A., Muir, A.D., Cheng, K.J., (1994).** Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop). Condensed tannins on the growth and proteolysis by four strains of ruminal bacterial. *Applied Environmental Microbiology*, 60(4) :1374-1378.
- Kaneko, T., Baba, N., Matsuo, M., (2003).** Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 142:239-254.
- Kitzberger, C.S.G., Smania Jr, A., Pedrosa, R.C., Salvador-Ferreira, S.R., (2007).** Antioxidant and antimicrobial activities of shiikate (*Lentinula edodes*) obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering*, 80: 631-638.
- Kokoska, L., Polesny, Z., Rada, V., Nepovim, V., Vanek, T., (2002).** Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 82: 51-53.
- Kostova, I., Iossifova, T., (2007).** Chemical components of Fraxinus species. *Fitoterapia*, 78: 85–106.
- Kuete, V., Konga-Simo, K., Ngameni, B., Bigoga, J.D., Watchueng, J., Nzesse-Kapguepa, R., Etoa, F.X., Ngadjui-Tchaleu, B., Penlap-Benga, V., (2007b).** Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and four flavonoids from the twigs of *Dorstenia angusticornis* Engl. (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 112: 271–277.
- Kuete, V., Metuno, R., Ngameni, B., Mbaveng-Tsafack, A., Ngandeu, F., Wabo-Fotso, G., Bezabih, M., Etoa, F.X., Tchaleu-Ngadjui, B., Begaz, M.B., Penlap-Benga, V., (2007a).** Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Treculia obovoidea* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 112: 531–536.
- Kumar, P.V., Chauhan, S.N., Padh, H., Rajani, M., (2006).** Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 107: 182–188.
- Kumarasamy, Y., Cox, P.J., Marcel Jaspars, M., Nahar, L., Dey Sarker, S., (2002).** Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 83: 73-77.
- Lee, C.H., Jenner, A.M., Low, C.S., Lee, K.Y., (2006).** Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in Microbiology*, 157 : 876–884.
- Levin, A.D., (1976).** The chemical defenses of plants to pathogen and herbivores. *Annual Reviews Ecological System*, 7:121-59.
- Li, H.B., Wonga, C.C., Ka-Wing Chenga, K.W., Chena, F., (2008).** Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT* 41(3)385 :390.
- Li, X.Z., (2005).** Quinolone, resistance in bacteria: emphasis on plasmide-mediate mechanisms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25:453-463.
- Lin, J., Puckre, T., Mvelase, T.P., (2002a).** Anti-diarrhoeal evaluation of some medicinal plants used by Zulu traditional healers. *Journal of Ethnopharmacology*, 79: 53–56.

- Lin, Y.M., Zhou, Y., Flavin, M.T., Zhou, L.M., Nie, W., Chen, F.C.,(2002b).** Chalcones and flavonoids as anti-tuberculosis agents. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 10:2795-2802.
- Long, S.K., Porse, T.B., (2003).** A conserved chloramphenicol binding site at the entrance to the ribosomal peptide exit tunnel. *Nucleic Acids Research*, (31)24: 7208-7215.
- Longo, L., Scardino, A., Vasapollo, G., (2007).** Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8 :360–364.
- Maksimović, Z., Malencić, N.D., Kovacević, N., (2005).** Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* Extracts. *Bioresource Technology* (96)8:873-877.
- Mallika, M., Dhar, S.C., (1980).** Studies on the oxidation of tannins by *Aspergillus flavus*. *Journal of Bioscience*, 1(2): 43-48.
- Marquez, B., Neuville, L., Moreau, N.J., Genet, J.P., dos Santos, A.F., Cano de Andrade, M.C., Goulart Sant’Ana, A.E., (2005).** Multidrug resistance reversal agent from *Jatropha elliptica*. *Phytochemistry*, 66 : 1804–1811.
- Martini, N., Eloff, J.N., (1998).** The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 62: 255–263.
- Masika, P.J., Afolayan, A.J., (2002).** Antimicrobial activity of some plants used for the treatment of livestock disease in eastern cao, south africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 83: 129-134.
- Massova, I., Mobashery, S., (1998).** Kinship and Diversification of Bacterial Penicillin-Binding Proteins and b-Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(1): 1-17.
- Mathabe, M.C., Nikolova, R.V., Lall, N., Nyazema, N.Z.,(2006).** Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 105: 286–293.
- Matsushashi, M., Song, M.D., Ishino, F., Wachi, M., Doi, M., Inoue, M., Ubukata, K., Yamashita, N., Konno, M.,(1986).** Molecular cloning of the gene of Penicillin-Binding Protein Supposed to Cause high resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 167(3): 975-980.
- McGaw, L.J., Van der Merwe, D., Eloff, J.N., (2005).** In vitro anthelmintic, antibacterial and cytotoxic effects of extracts from plants used in south African ethnoveterinary medicine. *The Veterinary Journal*, xx;xx173:366-372.
- Meléndez, P.A., Caprilesa, V.A.,(2006).** Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. *Phytomedicine*, 13: 272–276.
- Michea-Hamzhepour, M., Lucan, C., Pecher, J.C., (1991).** Resistance to Pefloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(3): 512-518.
- Middleton, P., Stewart, F., Al-Qahtani, S., Egan, P., O’Rourke, C., Abdulrahman, A., Byres, M., Middleton, M., Kumarasamy, Y., Shoeb, M., Nahar, L., Delazar, A., Dey Sarker, S.,**

- (2005). Antioxidant, antibacterial activities and general toxicity of *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior* and *Papaver rhoeas*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2: 81-86.
- Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y., Tulkens, P.M., (1999). Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43:727-737.
- Muller-Harvy, I., (2001). Analyse of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 3-20.
- Mutabaruka, R., Hairiah, K., Cadisch, G., (2007). Microbial degradation of hydrolysable and condensed tannin polyphenol-protein complexes in soils from different land-use histories. *Soil Biology & Biochemistry*, 39: 1479-1492.
- Naczka, M., Shahidi, F., (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatographie*, A 1054 : 95-111.
- Nagayama, K., Iwamura, Y., Shibata, T., Hirayama, I., Nakamura, T., (2002). Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50: 889-893.
- Nakijima, Y., (2002). Macrolide Antibiotics, chemistry, biology and practice. Second édition, Elsevier Science (USA), 453-499.
- Natarajan, D., Britto, J.S., Srinivasan, K., Nagamurugan, K., Mohanasundari, C., G. Perumal, G., (2005). Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*—A rare medicinal herb. *Journal of Ethnopharmacology*, 102: 123-126.
- Nikaido, H., (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4) :593-656.
- Nostro, A., Germano, M.P., D'angelo, V., Marino, A., Cannatelli, M.A., (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 30 : 379-384.
- Nowakowska, N., (2007) A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42 :125-137.
- Obied, H.K., Bedgood Jr., D.R., Prenzler, P.D., Robards, K., (2007). Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology*, 47 :1238-1248.
- Ojala, T., Remes, S., Haansuu, P., Vuorela, H., Hiltunen, R., Kaahtela, K., Vuorela, P., (2002). Antimicrobial activity of some coumarins growing in Finland. *Journal of Ethnopharmacology*, 73 :299-305.
- Okuda, T., (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*, 66:2012-2031.

- Oliveira, D.F., Pereira, A.C., Figueiredo, H.C.P., Carvalho, D.A., Silva, G., Nunes, A.S., Alves, D.S., Carvalho, H.W.P., (2007).** Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region. *Fitoterapia*, 78: 142–145.
- Onyilagha, J.C., Grotewold, E., (2004).** The biology and structural distribution of surface flavonoids. *Recent Resrech and Deveplemt Plant Sciences*, 2 ISBN: 81-7736-239-9
- Owen, P.L., Johns, T., (1999).** Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern north america plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 149-160.
- Özçelik, B., Aslan, M., Orhan, I., Karaogluç, T., (2005).** Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophylic extracts of *Pistacia vera*. *Microbiological Research*, 160: 159-164.
- Özkan, G., Kuleaşan, H., Celik, S., GÖktürk, R.S., Ünal, O., (2007).** Screening of turkish endemic *Teucrium montbretii* subsp. Pamphylicum extracts for antioxidant and antibacterial activities. *Food Control*, 18: 509-512.
- Pagès, J.M., (2004).** Porines bactériennes et sensibilité au antibiotiques. *Medicine/Science* 20 :346-51.
- Palombo, E.A., Semple, S.J., (2001).** Antibacteeial activity of traditional Australian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 77: 151-157.
- Parales, R.E., Bruce, N.C., Schmid, A., Wackett, L.P., (2002).** Biodegradation, biotransformation, and biocatalysis (B3). *Applied and Enviromental Microbiology*, 68 (10): 4699–4709.
- Parsek, M.R., Fuqua, C., (2004).** Biofilms 2003: Emerging Themes and Challenges in Studies of Surface-Associated Microbial Life. *Journal of Bacteriology* , 186(14): 4427–4440.
- Pepeljnjak, S., Kalodera, Z., Zovro, M., (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids from *Pelargonium radula* (cav), l'herit. *Acta Phama*, 55:431-435.
- Pereira, E.M., de Barros-Machado, M., Ramos-Leal, I.V., Jésus, D.M., de Almeida-Damaso, C.R., Ventura Pinto, A., Giambiagi-deMarval, M., Machado Kuster, R., Netto dos Santos, K.R., (2006).** *Tabebuia avellaneda* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 5 : 5.
- Perry, J.J., Staley, J.T., Lory, S., (2004).** Microbiologie. *Edition Dunod*.
- Pfltz, R.F., Singh, V.K., Schmidt, J.I., Batten, A.M., Baranyk, S.C., Nadakavukaren, M.J., Jayaswal, R.K., Wilkinson, B.J., (2000).**Characterization of Passage-Selected Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains of Diverse Parental Backgrounds., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (44)2 : 294–303.
- Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Jose´ Nunez, M., Nicoli, M.C., (2005).** Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry*, 92 :109–117.

- Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Solmajer, S., Tand Jeralab, R., (2003).** Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306: 530–536.
- 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: 664–671.
- Rahman, M.M., Gray, I.A., (2002).** Antimicrobial constituents from the stem bark of *Feronia limonia*. *Phytochemistry*, 59 :73–77.
- Rangasamy, O., Raelison, G., Rakotoniriana, F.E., Cheuk, K., Urverg-Ratsimamanga, S., 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: 331–337.
- Riberaux-Gayon, P., (1968).**
- Richter, G., (1993).** Les composés phénoliques. Métabolisme des végétaux (physiologie et biochimie). Edition *DUNOD*: 317-339.
- Rios, J.L., Recio, M.C., (2005).** Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 80-84.
- Rodriguez-Vaquero, M.J., Alberto, M.R., Manca de Nadera, M.C., (2007a).** Influence of phenolic compounds from wine on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18: 587-593.
- Rodriguez-Vaquero, M.J., Alberto, M.R., Manca de Nadera, M.C., (2007b).** Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, 18: 93-101.
- Rojas, R., Bustamante, B., Bauer, J., Irma-Fernández, I., Albán, J., Locka, O., (2003).** Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 88: 199-204.
- Romero, C.D., Chopin, S.F., Buck, G., Martinez, E., Garcia, M., Bixb, L., (2005).** Antibacterial properties of common herbal remedies of the southwest. *Journal of Ethnopharmacology*, 99: 253–257.
- Ruimy, R., Andremont, A., (2004).** Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* molecular mechanism, clinical impact, and inhibition. *Réanimation*, 13: 176–184.
- Sığdıç, O., Özcan, M., (2003).** Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control*, 14 ; 141–143.
- Şahin, F., Karaman, I., Gülluce, M., Ögütçü, H., Şengül, M., Adigüzel, A., Öztürk, S., Kotane, R., (2003).** Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 87: 61-65.

- Salvat, A., Antonacci, L., Fortunato, R.H., Suarez, E.Y., Godoy, H.M., (2004).** Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. *Phytomedicine*, 11: 230–234.
- Sato, M., Tanaka, H., Oh-Uchi, T., Etoh, H., Yamaguchi, R.,(2004a).** Antibacterial activity of phytochemicals isolated from *Erythrina zeyheri* against vancomycin-resistant enterococci and their combination with vancomycin. *Phytotherapy Research*, 18:906-910.
- Sato, Y., Shibata, H., Arai, T., Yamamoto, Y., Okimura, Y., Arakaki, N., Higuti, T., (2004 b).** Variation in synergistic activity by flavone and its related compounds on the increased susceptibility of various strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to  $\beta$ -lactam antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24: 8–35.
- Scalbert, A., (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12): 3875-3883.
- Shetty, K., Lin, Y.T., (2006).** Phenolic antimicrobials from plants for control of bacterial pathogens. Chapitre3. in Food biotechnology. Second Edition edited by ; Kalidas Shetty, Gopinadhan Paliyath, Anthony Pometto, Robert E. Levin, Published in 2006 by : CRC Press Taylor & Francis Group 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742.
- Shahidi, F., Naczek, M. (2004).** Phenolics in food and nutraceuticals. Edition CRC Press LLC. ISBN 1-58716-138-9.
- Shibata, H., Kondo, K., Katsuyama, R., Kawazoe, K., Sato, Y., Murakami, K., Takaishi, Y., Arakaki, N., Higuti, T.,(2005).** Alkyl gallates, intensifiers of  $\beta$ -Lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (2): 549–555.
- Shimizu, M., Shiota, S., Mizushima, T., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T., Tsuchiya, T., (2001).** Marked potentiation of activity of  $\beta$ -Lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by corilagin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45 (11): 3198–3201.
- Shiota, S., Shimizu, M., Sugiyama, J., Morita, Y., Mizushima, T., Tsuchiya, T., (2004),** Mechanisms of action of Corilagin and Tellimagradin I That Remarkably Potentiate the Activity of  $\beta$ -lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiology Immunology*, 48: 67-73.
- Silva, O., Duarte, A., Pimentel, M., Viegas, S., Barroso, H., Machado, J., Pires, I., Caberita, J., Gomes, E., (1997).** Antimicrobial activity of *Terminalia macroptera* root. *Journal of Ethnopharmacologie*, 57 :203-207.
- Singh, M., Govindarajan, R., Nath, V., Singh Rawat, A.J., Mehrotra, S., (2006).** Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity of *Plagiochasma appendiculatum* Lehm. et Lind. *Journal of Ethnopharmacology*, 107: 67–72.
- Singleton, P., (2005).** Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. Édition DNOD, 15: 447-454.

- Sokmen, A., Gulluce, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sokmen, M., Sahin, F., (2004).** The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, 15 : 627–634.
- Spigno, G., Tarmelli, L., De Faveri, D.M. (2007)** Effect of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1): 200-208.
- Sqzgec, S., Mericlia, A.H., Houghtonb, J.P., Çubukc, B., (2005).** Flavonoids of *Helichrysum compactum* and their antioxidant and antibacterial activity. *Fitoterapia*, 76 : 269– 272.
- Stapleton, P.D., Shah, S., Anderson, J.C., Hara, Y., Hamilton-Miller, J.M.T., Taylor, P.W., (2004a).** Modulation of  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23 :462–467
- Stapleton, P.D., Shah, S., Hamilton-Miller, J.M.T., Hara, Y., Nagaoka, Y., Kumagai, A., Uesato, S., Taylor, P.W., (2004b).** Anti-*Staphylococcus aureus* activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-*O*-acyl-catechins. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24: 374–380.
- Sudano-Roccaro, A., Blanco, A.R., Giuliano, F., Rusciano, D., Enea, V., (2004).** Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(6): 1968–197
- Tada, Y., Shikishima, Y., Takaishia, Y., Shibata,H., Higuti,T., Honda, G., Ito, M., Takeda, Y., Kodzhimatov, K.O., Ashurmetov, O., Ohmoto, Y.,(2002).** Coumarins and g-pyrone derivatives from *Prangos pabularia*: antibacterial activity and inhibition of cytokine release. *Phytochemistry*. 59: 649–654.
- Taguri, T., Tanaka, T., Kouno, I., (2006).** Antibacterial Spectrum of Plant Polyphenols and Extracts Depending upon Hydroxyphenyl Structure. *Biology Pharmacology Bulltin*, 29(11): 2226–2235.
- Tassoua, C.C., Nychas, G.J.E., (1995)** Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *chia*) on gram positive and gram negative bacteria in broth and in model food system. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41 I-420.
- Taylor, P.W., Stapleton, P.D., Luzio, P., (2002).** New ways to treat bacterial infections. *Drug Discovery today*.7-21.
- Tegos, G., Stermitz, F.R., Lomovskaya, O., Lewis, K., (2002).** Multidrug Pump Inhibitors Uncover Remarkable Activityof Plant Antimicrobial. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(10): 3133–3141.
- Teke, G.N., Kuate, J.R., Ngouateu, O.B., Gatsing, D., (2007).** Antidiarrhoeal and antimicrobial activities of *Emilia coccinea* (Sims) G. Don extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 112 :278–283.
- Tenson, T., Lovmar, M., Ehrenberg, M., (2003).** The Mechanism of Action of Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B Reveals the Nascent Peptide Exit Path in the Ribosome. *Journal of Moleccular Biology*, 330 :1005–1014

- Tepe, B., Daferera, D., Sokemen, A., Sokemen, M., Polissiou, M., (2005).** Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomrntosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90 :333-340.
- Thuresson, A.C., Kirsebom, L.A., Virtanen, A.,(2007).** Inhibition of poly(A) polymerase by aminoglycosides. *Biochimie*, 89 :1221-1227.
- Tim J. Wigle, T.J., Singleton, S.F., (2007).** Directed molecular screening for RecA ATPase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17: 3249–3253.
- Tinoco, P., Almendros, G., Gonzalez-Vila, F.J., (2002).** Impact of the vegetation on the lignin pyrolytic signature of soil humic acids from Mediterranean soils. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 64: 407–420.
- Tombola, F., Campello, S., De Luca, L., Ruggiero, P., Del Giudice, G., Papinia, E., Zoratti, M., (2003).** Plant polyphenols inhibit VacA, a toxin secreted by the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *FEBS Letters*, 543:184-189.
- Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkuşurkuc, C., Ozturk, M., Ulubelen, A., (2007).** A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103: 816–822.
- Tor, C., (2006).** The ribosomal A-site as an inspiration for design of RNA binders. *Biochimie*, 88 :1045-1051
- Tsukiyama, R.I., Katsura, H., Tokuriki, N., Kobayashi, M., (2002).** Antibacterial activity of licochalcone A against spore-forming bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(5): 1226–1230
- Uzuna, E., Sariyara, G., Adsersen, A., Karakoc, B., Otuk, G., Oktayoglu, E., Pirildar, S., (2004).** Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species. *Journal of Ethnopharmacology*, 95: 287–296.
- Vaiana, A.C., Westhof, E., Auffinger, A., (2006).** A molecular dynamics simulation study of an aminoglycoside/A-site RNA complex: Conformational and hybridation patterns. *Biochimie*, 88: 1061-1073.
- Veyssier, P., (1999a).** Aminoglycosides. Aminocyclitols. P: 445-490. in Bryskier, A.; Antibiotique Agents Antibacteriens et Antifongique, Edition Ellipses, Paris.
- Veyssier, P., (1999b).** Inhibiteurs de la dihydrofolate réductase, nitrocydes (furans) et 8-hydroxyquinoléines.p: 995-1029. in Bryskier, A.; Antibiotique Agents Antibacteriens et Antifongique, Edition Ellipses, Paris.
- Voravuthikunchai, S.P. Sririrak,T., Limsuwan, S., Supawita,T., Lida, T., Honda., T., (2005).** Inhibitory effects of active compounds from *Punica granatum* pericarp on verotoxine production by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7. *Journal of Health Science*, 51(5) : 590-596.

- Wang, Y., Ha, U., Zeng, L., Jin, S., (2003).** Regulation of membrane permeability by a two-component regulatory system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(1): 95–101.
- Whiteley, A. S., Bailey, M. J., (2000).** Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. *Applied Environmental Microbiology*, 66:2400–2407.
- Wigle, T.J., Singleton, S.F., (2007).** Directed molecular screening for RecA ATPase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17: 3249–3253.
- Wong, P.Y.Y., Kitts, D.D., (2006).** Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chemistry*, 97 :505-515.
- Wright, G.,** Mechanisms of resistance to antibiotics. *Current Opinion in Chemical Biology*. 7: 563-569.
- Yam, T.S., Hamilton-Miller, J.M.T., Shah, S.,(1998).** The effect of a component of tea (*Camellia Sinensis*) on methicillin resistance, PBP2' synthase and  $\beta$ -lactamase in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42: 211-216.
- Yamamoto, H., Ogawa, T., (2002).** Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 66(4): 921-924.
- Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-Perez, L., Leopez-Villafranco, E., Estrada- Munize, E., Aguilar, A., Reyes-Chilpa, R., (2005).** Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *Journal of Ethnopharmacology*, 97: 293–299.
- Yenesew, A., Derese, S., Midiwo, J.O., Bii, C.C., Heydenreich, M., Peter, M.,G., (2005).** Antimicrobial flavonoids from the stem bark of *Erythrina burttii*. *Fitoterapia*, 76: 469– 472.
- Zaidi, M.A., A. Crow Jr. S.A., (2005).** Biologically active traditional medicinal herbs from Balochistan, Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology*, 96: 331–334.
- Zampini, I., Vattuone, A.M., Isla, M., (2005).** Antibacterial activity of Zuccagnie punctata Cav. Ethanolic extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 102 : 450-456.
- Zhang, Y.M., Rock, C.O., (2004).** Evaluation of epigallocatechin gallate and related plant polyphenols as inhibitors of the FabG and FabI reductases of bacterial Type II Fatty-acid synthase. *The journal of biological chemistry*, 279(30): 30994–31001.
- Zhao, W.H., Hu, Z. Q., Hara, Y., Shimamura, T., (2002).** Inhibition of penicillinase by epigallocatechin gallate resulting in restoration of antibacterial activity of penicillin against penicillinase-producing *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(7) 2266–2268.

**Zhao, W.H., Hu, Z.Q., Okubo, S., Hara, Y., Shimamurat, S., (2001).** Mechanism of Synergy between epigallocatechin gallate and  $\beta$ -Lactams against methicillin-resistant *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(6): 1737–1742.

Site Internte

**Wallander, I., (2002).** Classification of Fraxinus sensu

<http://www2.botany.gu.se/staff/evawal/fraxinus/classification.html>.

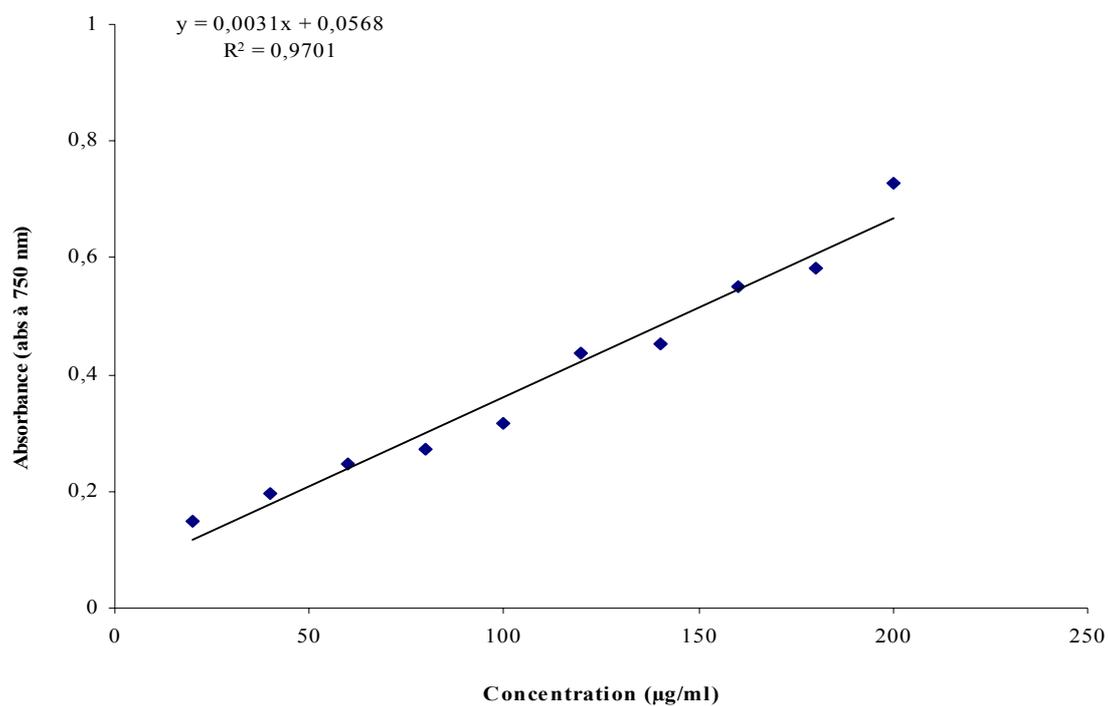
**Hagerman, A.E., 1998-2002.** Tannins Handbook.

<http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>.

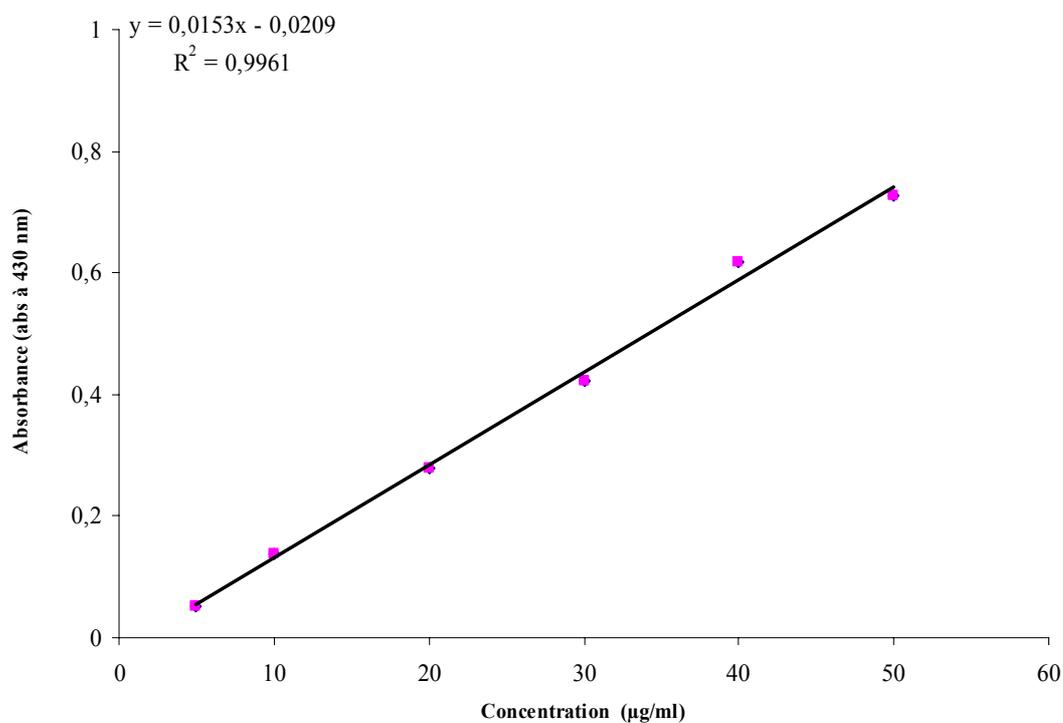


*ANNEXES*

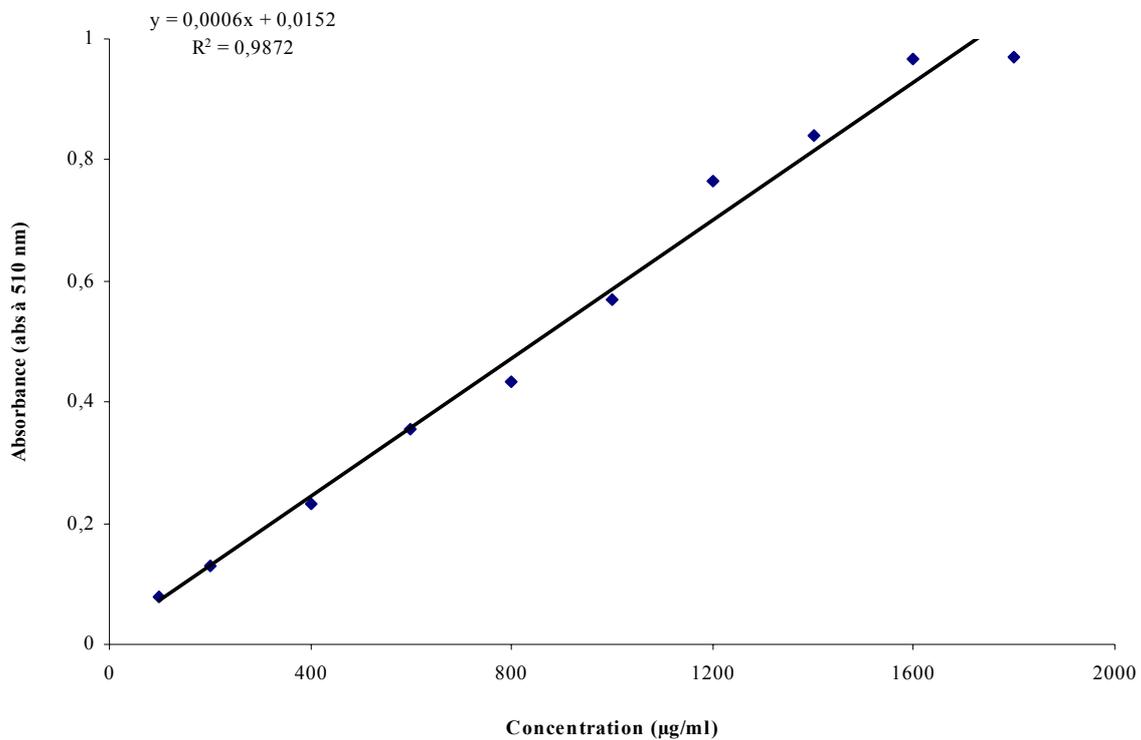
**Annexe N°01** : Courbes d'étalonnage utilisées pour le calcul des taux de phénols totaux, flavonoïdes et tannins.



**Figure 1** : Coube d'etalonnage avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux



**Figure 2**: Courbe d'étalonnage avec la rutin pour le dosage des flavonoïdes



**Figure 3:** Courbe d'étalonnage avec l'acide tannique pour le dosage des tannins.

## Annexe N°02 : Protocole des testes effectués

### Coloration de Gram

- le frottis est fixé à la chaleur
- on colore une minute au violet de Gentiane
- on traite une minute avec le lugol.
- on fait couler l'éthanol durant 1 à 3 secondes, jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis
- on rince à l'eau
- on traite à la fushine 30 secondes.
- on rince brièvement, on sèche la lame à l'aide d'un buvard.
- on examine à l'objectif à immersion (x100).

### Lecture

- Coloration violet: Gram+
- Coloration rose: Gram-.

### **Teste de la catalase**

Un fragment de culture solide de 18 à 24 h est déposé sur une lame, on ajoute au dessus une goutte d'eau oxygénée à 10V la formation de bulles d'air traduit la présence de la catalase.

### **Teste de la coagulase**

0,5 ml d'une culture de 18 à 24 h est ajouté à 1ml de plasma humain, le tube est incubé à 37C°, et examiné 1, 2, 3, 4 et 24 h. un résultat positif se traduit par la formation d'un caillot.

### **Teste de la DNase**

Ensemencement par strie de la surface d'un milieu gélosé à l'ADN (gélose à l'ADN). Après 18 h d'incubation à 37C°, une solution de HCl à 1N est pulvérisée sur la boîte. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une zone claire autour de la strie après quelques minutes.

### **Teste de l'utilisation des citrates**

Le milieu de citrate de Simmons est ensemencé par strie longitudinale à partir d'une suspension de bactéries dans l'eau physiologique, incubation à 37C°, lecture après 48 h, les tubes seront observés durant 5 jours. Un résultat positif se traduit par un virage au bleu.

### **Teste VP et RM**

Les deux tests sont réalisés conjointement, un seul tube du milieu Clark-Lubs est ensemencé avec deux gouttes de suspension bactérienne, incubé à 37 C° pendant 48h

### **Teste VP**

après 48h d'incubation, 1ml du milieu sont prélevés, une goutte du réactif VPI et une goutte du réactif VPII sont ajoutés, on laisse 10 à 15 minutes en position inclinée. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration rouge ou rose.

### **Teste RM**

Après 48h d'incubation, 2ml du milieu sont prélevés, une à deux gouttes de la solution de rouge de méthyle sont ajoutés. Une coloration rouge indique une réaction positive, une coloration jaune indique une réaction négative.

### **Teste de la réduction des nitrates**

Un tube de bouillon nitraté est ensemencé avec une culture de 24h, incubé 18 à 24 h à 37C°, après on ajoute 5 gouttes de réactif nitrate réductase I et 5 gouttes du réactif nitrate réductase II. Une coloration rouge ou rose indique la réduction des nitrates en nitrites.

### **Teste de fermentation du lactose, glucose, production de gaze et de H<sub>2</sub>S sur Milieu Hajna-Kligler :**

Ensemencer abondamment la surface par stries serrées ou par inondation le Milieu Hajna-Kligler puis le culot par simple piqûre, à l'aide de la même pipette boutonnée. Le bouchon n'est pas vissé à fond pour permettre les échanges gazeux. On incube 24H à 37C°. Le virage au jaune du culot indique la fermentation du glucose, le virage au jaune de la pente indique la fermentation du lactose, noircissement du milieu indique la production de H<sub>2</sub>S. La production de gaze se traduit par la formation d'une poche de gaze qui parfois peut décoller la totalité de la gélose vers le haut

**Annexe N°03 : Résultats des tests biochimiques**

	<i>Escheruchia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
Mobilité	+	+	-	+
Gram	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+
Mannitol	+	-	-	+
Citrate	-	-	-	+
Glucose	+	+	+	+
Lactose	+	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	+	-	+
Gaz	+	+	-	+
RM	+	+	+	+
VP	-	-	-	-
Nitrate réductase	+	+	+	+

*Pseudomonas aeruginosa*: mobilité (+), King A+, King B+.Gram (-), Catalase (+).

*Staphylococcus aureus* : mobilité (-), coagulase (+), DNase(+),Gram (+), Catalase(-).



**Figure N°04** : mise en évidence de la DNase: à gauche avant pulvérisation de la solution de HCL 1N à droite : Après pulvérisation de la solution de HCL 1N.

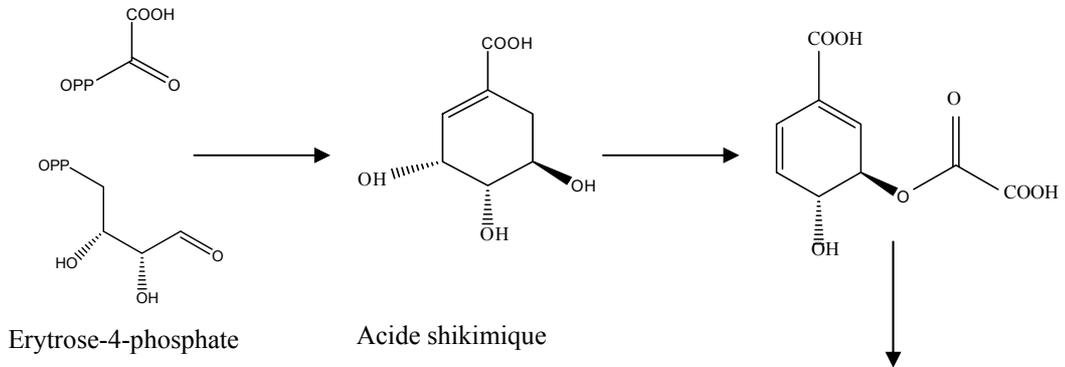
**Annexe N°4 : Quelques caractères bactériologiques et pouvoir pathogène des souches étudiées**

Souche	Caractères bactériologiques	Pouvoir pathogène
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocci à gram+ Immobile, catalase+, généralement groupés en amas irréguliers	Peut être à l'origine de toxi-infection, d'entérocolite aigu, d'infection cutané sous cutané, muqueuse, d'endocardite, de septicémie, et du syndrome du choc toxique. Son pouvoir pathogène repose sur la sécrétion de plusieurs substances dont des enzymes et des toxines. Tel que les hémolysines, les leucocidine, les entérotoxines, les exfoliatines, hyaluronidase..etc.
<i>Shigella dysenteriae</i>	Immobile, lactose (-), Uréase (-), ONPG : variable.	Responsable de la dysenterie bacillaire, L'essentielle de sa pathogénicité repose sur sa capacité à envahir l'épithélium du colon humain et sur la production de la vérotoxine et la shégatoxine
<i>Salmonella enteritidis</i>	Uréase(-), Indol (-), ONPG (-), Saccharose(-).	A l'origine d'affections appelées salmonellose, produit une entérotoxine et une cytotoxine
<i>Proteus mirabilis</i>	ONPG (-), Uréase(+), Indol (-), Saccharose(-) )	Souvent isolées des infections urinaires
<i>Escherichia coli</i> <i>O111 :B4</i>	Uréase (-), ONPG (+), Indol (+), Saccharose (+).	Ce sérotype appartient au groupe des entéropathogènes, responsable de diarrhée aiguë et chronique chez l'enfant de moins de 2 ans
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Oxydase(+), ,Uréase(+), ONPG(+), nitrate reductase(+)	Pathogène opportuniste.

# Annexe N°05

Phosphoenolpyruvate

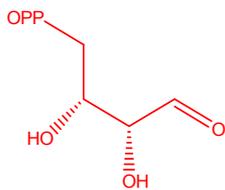
Acide chorismique



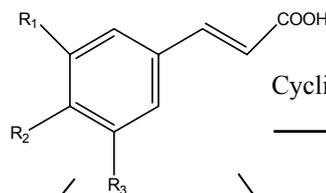
**Voie shikimate**

-Phénylalanine  
-Tyrosine

**Voie polyacétate**



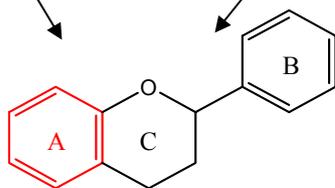
Dérives hydroxycinnamiques



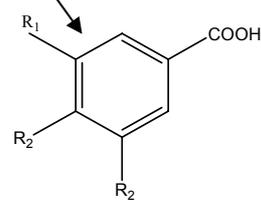
Cyclisation de la chaîne latérale

Dégradation de la chaîne latérale

Coumarines



Flavonoïdes  
(Condensation des anthocyanines)



Dérives hydroxybenzoïques  
(Condensation de l'acide gallique)

Tannins condensés

Tannins hydrolysables

**Annexe N°06 : Composition des différents milieu de culture et réactif utilisés :**

<b>Gélose nutritive (g/litre)</b>	<b>Bouillon nutritif</b>
Macération de viande..... 1litre (ou extrait de viande + eau distillée ..... 15 Peptone trypsiqueNaCl ou Kcl ..... 5 Agar ..... 15à 20 <b>PH 7,2</b>	Macération de viande (ou extrait de viande + eau distillée ..... 1litre Peptone trypsique ..... 15 NaCl ou Kcl ..... 5 <b>PH 7,2</b>
<b>Hektoen (g/litre)</b>	<b>Citrate de simmons (g/litre)</b>
Proteose peptone... ..... 12 Extrait de levure..... 3 Chlorure de sodium..... 5 Thiosulfate de sodium..... 5 Sels biliaires..... 9 Citrate de fer ammoniacal..... 1,5 Salicine ..... 0,2 Lactose..... 12 Saccharose ..... 12 Fuschine acide ..... 0,1 Bleu de bromothymol ..... 0,065 Agar ..... 14 <b>PH 7,5</b>	Citrate de simmons (g/litre) ..... 0,2 Sulfite de magnésium..... 1 Phosphate mono-ammoniaque ..... 1 Phosphate bipotassique ..... 2 Citrate de sodium ..... 5 Bleu de bromothymol..... 0,08 Agar ..... 15 <b>PH 6,8</b>
<b>Mueller-Hintone (g/l)</b>	<b>Citrate de Simmons (g/litre)</b>
Infusion de viande de bœuf..... 300 Hydrolysate de casienne ..... 17,5 Amidon ..... 1,5 Agar ..... 17 <b>PH 7,4</b>	Sulfite de magnésium..... 0,2 Phosphate mono ammoniaque ..... 1 Phosphate bipotassique ..... 1 Citrate de sodium ..... 2 Chlorure de sodium..... 5 Bleu de bromothymol..... 0,08 Agar ..... 15 <b>PH 6,8</b>
<b>Mannitol-mobilité</b>	<b>Chapman (g/l)</b>
Peptone trypsique de viande ..... 20g Mannitol..... 2g KNO3..... 1g Agar ..... 4g Rouge de phenol à 1% ..... 4ml <b>PH 8,1</b>	Peptone..... 11 Extrait de viande ..... 1 Chlorure de sodium ..... 75 Mannitol..... 15 Agar..... 15 Rouge de phénol..... 0,025 <b>PH 7,8</b>
<b>King A</b>	<b>King B</b>
Peptone ou Gelysate ..... 20g Glycérol ..... 10ml Sulfate de potassium..... 10g Chlorure de magnésium ..... 1,4g Gélose ..... 15g <b>PH 7,2</b>	Protéose peptone ..... 20g Glycérol..... 10ml Phosphate dipotassique ..... 1,5g Sulfate de magnésium ..... 1,5g Gélose..... <b>PH 7,2</b>

<b>Gélose à l'ADN (g/l)</b>	<b>Gélose Salmonella -Shigella (g/l)</b>
Peptone pepsique ou tryptique de caséines .20 Acide désoxyribonucléique .....2 NaCl.....5 Gélose ..... 15 <p style="text-align: center;"><b>PH 7,3</b></p>	Extrait de viande de bœuf ..... 5 Polypeptone..... 5 Lactose ..... 10 Sels biliaires ..... 8,5 Citrate de sodium ..... 10 Thiosulfate de sodium ..... 8,5 Citrate ferrique ..... 1 Gélose ..... 13,5 Vert brillant ..... 0,00033 Rouge neutre ..... 0,025 <p style="text-align: center;"><b>PH 7,0</b></p>
<b>Milieu Braid-Parker (g/l)</b>	<b>Hajna-Kligler (g/l)</b>
Peptone tryptique de caséines ..... 10 Extrait de viande ..... 5 Extrait de levure.....2 Pyruvate de sodium.....10 Glycocolle.....12 Chlorure de lithium.....5 Agar ..... 14 <p style="text-align: center;"><b>PH 7,2</b></p>	Extrait de viande de bœuf ..... 3 Extrait de levure ..... 3 Peptone..... 20 Chlorure de sodium..... 5 Citrate ferrique ..... 0,3 Thiosulfate de sodium ..... 0,3 Lactose ..... 10 Glucose ..... 1 Rouge de phénol..... 0,05 Agar..... 12 <p style="text-align: center;"><b>PH 7,4</b></p>
<b>Gélose au cristal violet, au rouge neutre et à la bille (VRBL) (g/l)</b>	<b>Clark et lubs (g/l)</b>
Peptone ..... 7 Extrait de levure ..... 3 Lactose ..... 10 Chlorure de sodium.....5 Mélange de sels biliaires..... 1,5 Rouge neutre..... 0,03 Cristal violet ..... 0,002 Agar-Agar ..... 13 <p style="text-align: center;"><b>PH 7,4</b></p>	Peptone tryptique ou polypeptone ..... 5 à 7 Glucose ..... 5 Phosphate bipostassique ..... 5 <p style="text-align: center;">PH7</p>

## Resumé

L'activité antibactérienne de deux plantes médicinales *Fraxinus angustifolia* et *Pistacia lentiscus* a été évaluée. 17 extraits dont 12 organiques et 5 aqueux ont été testés par la méthode de diffusion sur gélose contre des souches hospitalières de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis* et une souche de référence; *Escherichia coli* O111: B4. *Staphylococcus aureus* a été l'espèce la plus sensible puisque sa croissance a été inhibée par tous les extraits. Par contre, *Pseudomonas aeruginosa* s'est montrée la plus résistante car seul 9 extraits l'ont inhibé.

La concentration minimale inhibitrice des extraits aqueux vis-à-vis des souches sensibles a été déterminée par la méthode de dilution sur milieu solide. Les extraits aqueux de l'hexane et du chloroforme des feuilles de *P. lentiscus* se sont montrés plus actifs à l'égard de *S. aureus* (CMI=0.312mg/ml).

Un fractionnement des extraits sur colonne chromatographique de gel de silice a été effectué et des fractions à effet bactériostatique et bactéricides ont été collectées. La fraction de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'écorce de *F. angustifolia* collectée avec du chloroforme est bactéricide vis-à-vis de *Salmonella enteritidis* et *Shigella dysenteriae*, alors que celle collectée avec le butanol est bactéricide à l'égard de *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae* et *Proteus mirabilis*. Les fractions de l'extrait d'hexane des feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia* récupérées avec le butanol sont bactéricides pour *Escherichia coli*. Aussi, la fraction collectée avec le chloroforme à partir de l'extrait d'hexane des feuilles de la même plante est également létale pour *E. coli*.

**Mots clés:** activité antibactérienne, composés phénoliques, extraits aqueux, *Pistacia lentiscus*, *Fraxinus angustifolia*, Chromatographie sur couche mince, méthode de diffusion sur gélose.

## Abstract

The anti-bacterial activity of two medicinal plants *Fraxinus angustifolia* and *Pistacia lentiscus* has been evaluated. 17 extracts of which 12 organic and 5 aqueous have been tested by the method of diffusion against hospital strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis* and a strain of reference, *Escherichia coli* O111: B. *Staphylococcus aureus* was the most sensitive since its growth was inhibited by all extracts. On the other hand, *Pseudomonas aeruginosa* was the most resistant as it was inhibited by only 9 extracts.

The minimal inhibitory concentration of aqueous extracts towards sensitive strains was determined using the method of dilution on solid medium. Aqueous extracts from hexane and chloroform of *Pistacia lentiscus* leaves showed the best activity against *S. aureus* (MIC=0.312mg/ml).

Fractionation of extracts on silica gel column chromatography was carried out and fractions with bacteriostatic and bactericidal effects were collected. The fraction from ethyl acetate of *Fraxinus angustifolia* bark eluted with chloroform is bactericidal against *Salmonella enteritidis* and *Shigella dysenteriae*. Whereas that collected with butanol is bactericidal against *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae* and *Proteus mirabilis*. Hexane extract fractions of *Fraxinus angustifolia* leaves and bark obtained from butanol elution are bactericidal against *Escherichia coli*; meanwhile, the fraction collected with chloroform from hexane extract of the leaves is also lethal for *E. coli*.

**Keywords:** anti-bacterial activity, phenolic compounds, aqueous extracts, *Pistacia lentiscus*, *Fraxinus angustifolia*, thin layer chromatography, agar diffusion method.

## ملخص

المفعول المضاد الحيوي لنبتتين طبيئتين *Fraxinus angustifolia* و *Pistacia lentiscus* تم تقييمه 17 مستخلص من بينهم 12 عضوي و 6 مائي اختبرت بطريقة الانتشار على سطح جيلوز ضد بكتيريا مصدرها المستشفيات *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis* و بكتريا (معلم) *Escherichiacoli* O111B:4. كانت *Staphylococcus aureus* الأكثر حساسية حيث كل المستخلصات كبحت نموها بينما *Pseudomonas aeruginosa* كانت الأكثر مقاومة 9 مستخلصات فقط كبحت نموها. الكمية المكبحة الأصغر للمستخلصات المائية تم تحديدها بطريقة الانحلال في وسط صلب. المستخلص المائي للهكسن و الكلوروفورم لأوراق *Pistacia lentiscus* كان الأكثر فعالية 0.312مغ/مل. تجزئة المستخلصات بطريقة الكروماتوغرافية على أنبوب مكن من عزل عينات ذات مفعول قاتل و مكبح. عينة مستخلص الاستات الأثيل الجذور *Fraxinus angustifolia* المتحصل عليها بلكلوروفورم قاتلة *Salmonella enteritidis* و *Shigella dysenteriae*. العينة المتحصلة بليونول قاتلة *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae* و *Proteus mirabilis* عينات المستخلص للهكسن لجذور و أوراق *Fraxinus angustifolia* المستحصلة لليونول قاتلة *Escherichia coli* و كذا العينة المستحصلة بلكلوروفورم كانت مميتة *Escherichia coli*.

، *Pistacia lentiscus*, *Fraxinus angustifolia* كلمات أساسية: المفعول المضاد الحيوي، المركبات الفينولية، مستخلص مائي، الكروماتوغرافية على سطح رقيق، الانتشار على سطح جيلوز.