



République algérienne démocratique et populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche Scientifique

UNIVERSITE ABBES LAGHROUR- KHENCHELA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT : DE SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER

FILIERE : SCIENCE BIOLOGIQUE

OPTION : MICROBIOLOGIE

Thème

**Etude de l'activité antimicrobienne des feuilles et des fruits
d'*Arbutus unedo L.* en trois stades de maturation**

Présenté par :

OUNISSI Yasmine

CHERMIME Bariza

Encadré par :

Mr BOUSSAA. A

Soutenu le : 14 / 06 /2016

Devant le Jury

Président : M^{elle}. BENREDJEM .L

(MAA) Univ. Abbès Laghrou -Khenchela

Encadreur : Mr. BOUSSAA .A

(MAA) Univ. Abbès Laghrou -Khenchela

Examineur : Mr. FELLOUS .S

(MAB) Univ. Abbès Laghrou -Khenchela

Année Universitaire : 2015-2016

Remerciements

Nous tentons tout d'abord à remercier le Bon Dieu le tout puissant de nous avoir aidées à réaliser ce modeste travail.

*J'exprime d'abord mes vifs, profonds et sincères remerciements à M^{lle} **BENREDJEM** .L notre chère et adorable enseignante qu' on aime beaucoup, Maître de conférences à l'université de **KHENCHELA**, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.*

*Nos vifs remerciements vont à Monsieur **BOUSSAA**.A Maître assistant à la faculté de science de la nature et de la vie, Université Abbés Laghrour Khenchela, pour avoir dirigé et encadré ce travail avec une grande rigueur scientifique, son encadrement, ses précieux conseils, sa disponibilité, et les encouragements qui nous ont permis de réaliser ce travail.*

*J'adresse mes sincères et vifs remerciements à **Mr FELLOUS**.S Maître Assistant à l'université de **KHENCHELA** pour sa précieuse aide et ses conseils, et pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.*

Au terme de ce travail, il nous est agréable d'exprimer notre remerciement à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Dédicace

Toutes les lettres ne seraient trouver les mots qu'il faut
Tous les mots ne seraient exprimer la gratitude, L'amour, le respect, la
reconnaissance, c'est tout simplement que Je dédie cette mémoire a Allah
le tout puissant

A mes adorables parents qui étaient toujours présents avec leur soutien
moral et matériel, derrière toutes mes réussites depuis l'école primaire
Jusqu'à ce jour; Vous m'avez donné l'éducation et enseigné le sens de
l'honneur, de la dignité et le respect de soi.

A ma chère famille, notamment mon adorable père, pour avoir toujours été
là quand j'en avais besoin, merci pour tes concessions et tes sacrifices. A ma
chère mère : Maman qui m'a supportée vaillamment pas à pas tout au
long de ma vie, qui a toujours été convaincue que j'y arriverai m'a soutenu
même quand le moral était bas.

A mes frères: Djamel , Morad

A mes sœurs: Nisrine , Nazwel , Nora , Khadidja
pour leurs encouragements et leur compréhension.

A mes neveux et nièces

Spéciale dédicace a mon binôme **Bariza** et toute la famille

CHERMIME .

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour
que ce projet soit possible, je vous dis merci.

Spécial dédicace à tous mes camarades de promotion de Microbiologie

Yasmine

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde dans son vaste paradis, à toi mon père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon codeur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.

Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, à tous mes frères Abd Elghani, Ramzi, Wassim, et Chahine.

A ma sœur Leila et son mari et son fils.

A toute ma famille, et mes amis.

Je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements.

A mon binôme Yasmine et toute la famille Ounissi.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

BARIZA

Table des matières

Liste des figures	I
Liste des tableaux.....	II
Liste des abréviations	III
Liste des annexes.....	V
Introduction.....	01

Etude Bibliographique

Chapitre I : Généralité sur l'espèce *Arbutus unedo L*

I.1.Etymologie.....	03
I.2. Historique et origine.....	03
I.3. Description botanique.....	04
I.3.1. Arbre.....	04
I.3.2. Feuilles.....	05
I.3.3. Fleurs, fruits et grains.....	05
I.4. Place dans la systématique.....	06
I.5. Utilisation alimentaire et thérapeutique.....	07

Chapitre II : Activités antimicrobiennes de plantes

II.1. Les métabolites actifs des plantes.....	09
II.2. Activité antimicrobienne de extraits de plantes	10
II.2.1. Activité antibactérienne.....	10
II.2.2. Activité antifongique.....	10
II.3 . Mécanisme d'action des substances antimicrobiennes d'origine végétale.....	11

Chapitre III : Matériels et méthodes

III.1. Matériel.....	12
III.1.1.végétal.....	12
III.1.2. Les souches indicatrices.....	12
III.1.3. Les milieux de culture.....	13
III.1.4. Les produits chimiques et réactifs.....	13
III.1.5. Appareillage.....	13
III.2 Méthodes.....	14
III.2.1. Préparation de la poudre des échantillons.....	14
III.2.2. Préparation des extraits bruts secs.....	14
III.2.3. Le rendement en extrait sec	15
III.2.4. Dosage des polyphénols totaux.....	15
III.2.5. Dosage des flavonoïdes.....	16
III.2.6. Etude du pouvoir antimicrobien.....	16
III.2.6.1. Préparation des inoculums et des extraits.....	16
III.2.6.2. Test de l'activité antimicrobienne (méthode de diffusion à partir d'un disque solide)	17
III.2.6.3. Méthode des micro-dilutions en milieu liquide.....	18
III.2.7. Concentration minimale bactéricide (CMB) et concentration minimale fongicide (CMF)	18

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV.1. Résultats de la préparation des extraits de feuilles et de fruits d'<i>Arbutus unedo</i> L. en trois stades de maturation	19
VI.2. Rendement des extraits.....	19

IV. 3. Dosage des composés phénoliques.....	20
IV.3.1. Dosage des polyphénols totaux.....	20
IV.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	21
IV .4. Evaluation du pouvoir antimicrobien des extraits	22
IV. 4.1. Evaluation de pouvoir antibactérien.....	23
IV.4.2. Evaluation de pouvoir antifongique.....	28
IV.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	30
IV.5. 1. Concentration minimale inhibitrice (CMI).....	30
IV.5.1.1. Concentration minimale inhibitrice des extrait vis-à-vis les souches bactériennes	30
IV.5.1.2. Concentration minimale inhibitrice des extrait vis-à-vis les souches fongiques.....	33
IV.5. 2. Concentration minimale bactéricide (CMB) et concentration minimale fongicide(CMF)	34
Conclusion et perspectives.....	38
Références bibliographiques	40
Annexes	
Résumé	
Abstract	
ملخص	

Liste des figures

Figure 01 : Distribution d' <i>Arbutus unedo</i> L.	04
Figure02 : Aspect de l'arbre d' <i>Arbutus unedo</i> L.	05
Figure03 : Feuilles, fleurs et fruits d' <i>Arbutus unedo</i> L.....	06
Figure 04 : Echantillon des fruits d' <i>Arbutus unedo</i> L. en trois stades de maturation.....	12
Figure 05 : Poudre des feuilles et des fruits d' <i>Arbutus unedo</i> L. en trois stades de maturation.....	13
Figure 06 : Etapes de la préparation des extraits bruts pour chacun des feuilles et des fruits.....	14
Figure 07 : Méthode de diffusion à partir d'un disque solide.....	17
Figure 08 : Méthode de la micro-dilution en milieu liquide.....	17
Figure 09 : Les extraits méthanoliques bruts de feuilles et de fruits d' <i>Arbutus unedo</i> L	19
Figure 10 : Rendement d'extraction des composés phénoliques de feuilles et de fruits d' <i>Arbutus unedo</i> L. aux trois stades de maturation.....	20
Figure 11 : Teneurs en polyphénols totaux des feuilles et des fruits d'arbousier aux trois stades de maturation	21
Figure 12 : Teneurs en flavonoïdes des feuilles et des fruits d'arbousier aux trois stades de maturation.....	22
Figure 13 : Activité inhibitrice de différents extraits méthanolique vis- a-vis <i>E.coli</i>	25
Figure 14 : Activité inhibitrice de différents extraits méthanolique vis- à-vis <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Acinetobacter baumannii</i>	26
Figure 15 : Activité inhibitrice de différents extraits méthanolique vis avis <i>Salmonella sp</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	27
Figure 16 : Activité inhibitrice de différents extraits méthanoliques vis-à-vis <i>Klebsiella oxytoca</i>	28
Figure 17 : Activité inhibitrice de différents extraits méthanoliques vis-à-vis les différents souches fongiques testées.....	30
Figure 18 : La détermination de la CMB des extraits méthanoliques d' <i>A.unedo</i> L.....	35

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification taxonomique d' <i>Arbutus unedo</i> L.....	07
Tableau 02 : Valeurs moyens des diamètres des zones d'inhibition pour l'extrait de feuilles et de fruits vis-à-vis les souches bactériennes testées.....	24
Tableau 03 : Valeurs moyens des diamètres des zones d'inhibition pour l'extrait de feuilles et de fruits vis-à-vis les souches fongiques testées.....	29
Tableau 04 : Résultats de la détermination de la CMI de différents extraits.....	32
Tableau 05 : Résultats de la détermination de la CMI de différents extraits.....	34
Tableau 06 : Résultats de CMI et CMB des extraits méthanoliques ainsi que les rapports CMB/CMI.....	36
Tableau 07 : Résultats de CMI et CMF des extraits méthanoliques ainsi que les rapports CMF/CMI.....	38

Liste des abréviations

A.baumannii : *Acinetobacter baumannii*.

A.flavus : *Aspergillus flavus*.

AG : Acide gallique.

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium.

A.niger : *Aspergillus niger*.

ATCC : American Type Culture Collection.

A.unedo .L : *Arbutus unedo* L.

B.subtilis : *Bacillus subtilis*.

°C : degré Celsius.

CMB : Concentration minimale bactéricide.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

cm : centimètre.

DMSO : Diméthyl Sulfoxyde.

E. coli : *Escherichia coli*.

g : gramme.

GN : Gélose nutritive.

h : heure.

Kg : kilogramme.

K.oxytoca : *Klebsiella oxytoca* .

L.monocytogenes : *Listeria monocytogenes*.

m : mètre.

M : mol.

Mc Farlend : Mack Farlend.

MeOH : Méthanol.

min : minute.

mg : milligramme.

mgEAG/gMS : milligramme équivalent acide gallique de la matière sèche .

mgEQ/g : milligramme équivalent de la quercétine / gramme.

MH : Muller- Hinton.

ml : millilitre.

mm : millimètre.

NaNO₂ : Nitrite de sodium,

NaOH : Hydroxyde de sodium.

nm : nanomètre.

P.aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa* .

PPT : dosage de polyphénols totaux.

% : Pourcentage.

µl : microlitre.

R : Rendement.

S.aureus : *Staphylococcus aureus*.

Sp : Espèce.

UFC/ml : unité formant une colonie.

UV : Ultra-violet.

v : volume.

ZI : Zone d'inhibition.

Liste des annexes

Annexe 01 : Préparation des solutions.

Annexe 02 : Composition des milieux de culture utilisés pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne.

Annexe 03 : Composition des bouillons nutritifs utilisés pour la culture des microorganismes-tests.

Annexe 04 : Courbes d'étalonnages.

Introduction

Introduction

Certaines plantes se rencontrent à l'état spontané et s'adaptent aux multiples sols et climats notamment les fruits comme l'arbose (**Dib,M.A., 2008**). En effet, *Arbutus unedo L.*, est un fruit sauvage qui se développe dans les régions méditerranéennes et connu en Algérie sous le nom vulgaire de « Lendj» (**IUCN. A, 2005 ; P. Iseri, 2001**). Il est très répondu en raison de sa tolérance à la sécheresse et sa capacité à se régénérer et recoloniser les forêts incendiées (**D. Espírito Santo et al., 2012**).

Arbutus unedo L. , l'arbre de fraise (famille des éricacées), est un arbuste à feuilles persistantes ou petit arbre, et il est largement distribué dans la région méditerranéenne et dans le Nord Afrique. Il pousse sauvagement sur les pentes et collines rocheuses sèches ou dans les forêts de pins, en particulier dans les montagnes du Taurus, à 600 m au-dessus du niveau de la mer en Turquie (**Ayaz et al., 2000**). Ces fruits sont appropriés pour la production de boissons alcoolisées, les confitures, gelées et marmelades (**Pallauf et al., 2008**). En outre, *A. unedo.*,

est fréquemment utilisée dans la médecine traditionnelle dans certains pays, comme l'Espagne et le Maroc (**Ziyyat et al., 1997, Tahraoui et al., 2007**).

Certains chercheurs ont étudié les propriétés nutritionnelles des fruits de fraises fraîches (**Ozcan et Haciasrefogulları , 2007**). Des sucres, des composés non volatils et d'acide phénolique ont été déterminées dans les échantillons de fruits récoltés dans le nord de l'Anatolie (**Ayaz et al., 2000**).

L'*A. unedo L.*, est connue par ces propriétés antiseptiques et désinfectantes des voies urinaires, antispasmodiques et astringentes. Reconnue également dans d'autres pays, comme la Turquie, comme diurétique ou le Maroc comme remède naturel pour l'hypertension et le diabète (**Boullard, 2001 ; El Houari, 2007**).

L'objectif de notre travail vise à démontrer la richesse de notre plante *A.unedo .*,

en polyphénols et flavonoïdes et à déterminer l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques des feuilles et fruits de la plante in vitro.

Notre travail est organisé en trois parties essentielles :

Une première partie englobe l'étude bibliographique ou seront rappelées des généralités sur l'espèce *Arbutus unedo L.*

La deuxième partie, illustre le matériel et les méthodes utilisées dans le cadre de cette étude, basé sur la préparation de différents extraits méthanoliques .les quarts types d'extraits ont été préparé à partir de la poudre des fruits (feuilles) d'*A.unedo L.* D'autre part l'étude quantitative afin d'estimer la quantité des polyphénols et flavonoïdes dans ces extraits.

Un autre volet de ce travail est consacré à une étude de l'activité antibactérienne et antifongique ainsi que la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale bactéricide in vitro des différents extraits sur des souches test bactériennes et fongiques.

Alors que le troisième volet regroupe les résultats obtenus et la discussion de ces résultats.

Le manuscrit est achevé par une conclusion générale qui résume notre travail et les perspectives.

Etude bibliographique

Chapitre I

Généralités sur l'espèce *Arbutus unedo* L.

I.1. Etymologie

L'arbousier, ou arbres aux fraises, n'est en fait qu'un arbuste. Unedo est utilisé par Carl Linnaeus (1753), Puis décrit par Pline l'ancien. Ce fruit est connu sous plusieurs noms vernaculaires, Assisnou en Berbère , Strawberry tree en anglais et Lendj en arabe (**Djazairi, 1960**).

I.2. Historique et origine

C'est l'Arbousier, l'Arbre aux Fraises, Fraisier en Arbre, (**Boullard, 2001**). Les arbouses durent être consommées par les populations préhistoriques, dans l'Hérault, près du village d'Argelliers, sur un site néolithique daté d'environ 2800 avant notre ère, les fouilles ont permis d'identifier des arbouses parmi les restes trouvés dans une maison de pierres sèches qui avait brûlé à cette lointaine époque. De nos jours, ces petits fruits restent un complément alimentaire abondant et facile à ramasser (**Tonelli et Gallouin, 2013**).

D'après Daoud EL ANTAKE, dans son œuvre «TADHKIRA» le nom classique de l'arbousier est Djina. Il est mentionné aussi par Ibn EL BAYTAR avec une bien curieuse expression « qatil abihi » «meurtrier de son père (**Baba-Aissa, 2000 ; Dib, 2008**). Cette expression est aussi indiquée par Abderrazaq EL DJAZAIRI dans son livre avec deux autres synonymes (**Djazairi, 1960**).

Arbutus unedo L., est un arbuste à feuilles persistantes, originaire de la région méditerranéenne, on peut le trouver du niveau de la mer jusqu'à 600m d'altitude voir 1200 m en Europe occidentale, centrale et méridionale, l'Afrique Nord-Est (à l'exclusion de l'Egypte et la Libye) et les îles Canaries et l'Asie occidentale, où le froid n'est pas très habituel et la sécheresse d'été n'est pas très intense (**Kim, 2012 ; Tonelli et Gallouin, 2013**).

En Europe, Il se développe la plupart du temps dans le bassin méditerranéen (Portugal, Espagne, France, Italie, Albanie, la Grèce, la Bosnie et l' Herzégovine, Croatie, Macedonia, Monténégro, la Serbie et la Slovénie) y compris quelques îles méditerranéennes (Baléare, La Corse, la Sardaigne, la Sicile et la Crète), principalement dans les régions côtières et intérieurs où le climat est favorable pour leur développement, il peut également s'adapter à la côte du Sud- Ouest de l'Irlande (**figure 01**) (**Torres et al., 2002**).

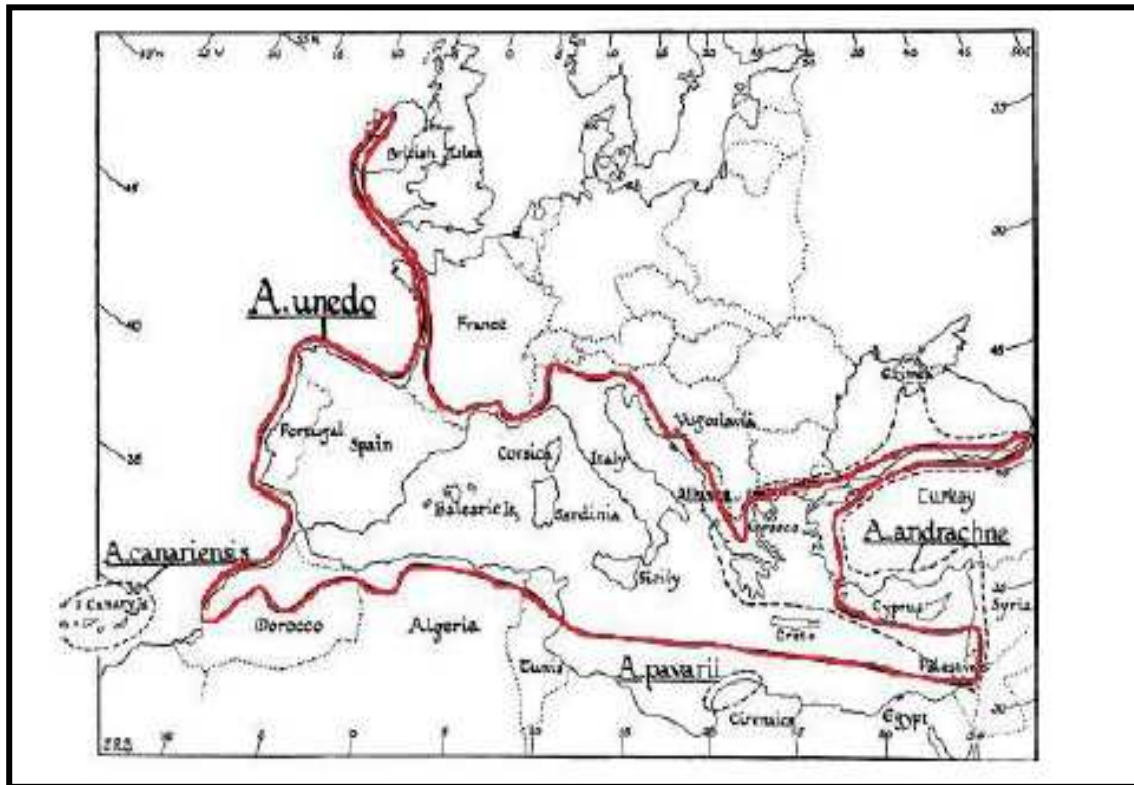


Figure 01 : Distribution d'*Arbutus unedo* L. (Vitale, 2012).

I.3. Description botanique

I.3.1. Arbre

L'arbousier est un petit arbre de 1.5 à 3 m d'hauteur mais peut atteindre 9 à 12 m, un arbuste touffu au tronc court, robuste et sa ramure souple lui confère une silhouette arrondie, l'écorce des branches est brun-rouge et avec l'âge, les jeunes pousses rougeâtres et poilues ont un aspect velouté. Cet arbuste rameux, est capable de vivre 200 ans dans des bois et rochers du Midi de la France, d'Europe Méridionale, d'Asie Occidentale et du Nord de l'Afrique (figure 02) (Boullard, 2001).

L'arbousier a un enracinement profond de type pivotant (il croît lentement mais peut devenir pluri centenaire (Figure 02). Il pousse en plein soleil, et il supporte le calcaire (Morris, 2007 ; Celikel et al., 2008 ; Tonelli et Gallouin, 2013).



Figure 02 : Aspect de l'arbre d'*Arbutus unedo* L. (Tonelli et Gallouin, 2013).

I.3.2. Feuilles

Son beau feuillage dense est persistant, en disposition alterne, se renouvelle progressivement après 1 ou 2 ans, sans stipules, elles sont coriaces, épaisses, simples, elliptiques, entières ou dentelées de 4 à 8 cm de longueur sur 2 à 4 cm de largeur. Elles sont luisantes et d'un beau vert sombre dessus et vert pâle un peu argenté en dessous (figure 03) (Maleš et al., 2006 ; Tonelli et Gallouin, 2013).

I.3.3. Fleurs, fruits et grains

Les fleurs sont en forme de cloche, de longueur 8 à 9 millimètres, d'une couleur blanche, et souvent rose pâle, elles sont une source significative de nectar et pollen pour les abeilles (Maleš et al., 2006 ; Gomes et al., 2011).

Après la fécondation, l'ovaire se transforme en un fruit charnu, une baie sphérique, légèrement aplatie aux pôles et qui mesure 2 à 3 cm de diamètre à maturité, il possède de petits nombreux pépins et sa peau (épicarpe) elle est toujours hérissée de courts tubercules pyramidaux et renferme de nombreuses graines (Boullard, 1997;2001 ; Iserin, 2001).

Les fruits prennent environ 12 mois pour mûrir; donc, l'arbre porte les fruits et fleurs mûrs en même temps (**figure 03**). Le processus de floraison et de fructification s'étend d'octobre à février (**Takrouni et al., 2012**).



Figure 03: Feuilles, fleurs et fruits d'*Arbutus unedo* L. (**Vitale, 2012 ; Tonelli et Gallouin, 2013**)

A l'intérieur du fruit, les cinq loges contiennent de nombreuses petites graines jaunâtres (les pépins) riches en lipides (**Tonelli et Gallouin, 2013**).

I .4. Place dans la systématique

Arbutus L. est un genre appartenant à la sous-famille *Vaccinioideae* (ou *Arbutoideae*, en fonction de l'auteur), et de la famille *des éricacées* qui se retrouve sous les climats méditerranéens (**Meberley, 1987; Stevens et al., 2004 ; Lhuilier, 2007**).

Le nom Ericacée dérive du latin scientifique *Erica*, du latin impérial *Erica*. Cette famille appartient aux dicotylédones et comporte 124 genres et environ 4100 espèces (**Maberley, 1987 Dib, 2008**).

Arbutus unedo était l'une des nombreuses espèces décrites par Carl Linnaeus dans le premier volume de son point de repère 1753 travaux *Species Plantarum*, en lui donnant le

nom qu'il porte encore aujourd'hui. La position taxonomique de l'*Arbutus unedo* L. est représentée dans le (tableau 01).

Tableau 01 : Classification taxonomique d'*Arbutus unedo* L. (mendes, 2010).

Rang taxonomique	Signification
Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Spermatophyta</i>
Sous embranchement	<i>Angiospermae</i>
Classe	<i>Dicotyledones</i>
Sous classe	<i>Dilleniidae</i>
Ordre	<i>Ericale</i>
Famille	<i>Ericaceae</i>
Sous famille	<i>Arbutoideae</i>
Genre	<i>Arbutus</i>
Espèce	<i>Arbutus unedo</i> L.

I. 5. Utilisation alimentaire et thérapeutique

La consommation des plantes sauvages comestibles cultivés localement a joué un rôle important pour la plupart des cultures humaines, en particulier dans la région méditerranéenne, apportant une contribution importante à la santé des communautés locales (Heinrich et al., 2006).

Arbutus unedo sert comme une plante d'abeille pour la production de miel, et les fruits sont la nourriture pour les oiseaux, ils sont également utilisés pour faire des confitures, des boissons et des liqueurs (Correia et oliveira, 2002 ; Spano et al., 2006).

D'autres applications alimentaires telles que les conserves, les confitures, les gelées et les marmelades peuvent également être obtenues à partir de ce fruit. Il est également possible

d'incorporer les baies en yaourts et les utilisent comme confiseries et pour la garniture des tartes et de pâtisserie et dans l'industrie des produits céréaliers (**Seidemann, 1995; Pawlowska et al, 2006**).

Les *arbouses* sont rarement consommés comme des fruits frais, mais ils peuvent avoir une certaine importance dans les économies agricoles locales, dont ils sont utilisés pour la production de très appréciées boissons alcoolisées telles que les vins en raison de sa forte teneur en sucre fermentescible (**Correia et Oliveira , 2002**).

En raison de sa richesse en pectine, l'arboise est aussi incorporé dans les produits céréaliers et les produits à base de viande, celui sec est utilisé pour faire du thé, et des saveurs dans l'industrie (**Tardio et al. , 2002 ; Demirsoy et al. , 2007 ; Ganhao et al. , 2010**).

L'arboise a un rôle hypotensif dont il baisse la tension artérielle, il est indiqué dans les troubles de la circulation sanguine, il peut réduire ainsi l'athérosclérose et utilisé comme un remède naturel pour le diabète (**Bremness, 1999 ; El houari, 2007**).

D'autre part, la racine d'arbousier serait un désinfectant des voies urinaires grâce à l'arbutoside qu'elle renferme, cet arbutoside, ou arbutine, est un 3-glucoside de l'hydroxyquinone. En effet, le principe actif majeur de l'arbousier est qu'il contient 2.7% d'arbutine qui est un puissant antiseptique de l'appareil urinaire (**Chevalier, 2001**)

Les feuilles persistantes sont tenues pour antiseptiques, antispasmodiques et astringentes (par leur teneur en tanin), elles sont ainsi recommandées en cas de diarrhée ou d'engorgement du foie et possèdent des propriétés digestives et stomachiques (**Boullard, 2001 ; Iserin, 2001**).

Chapitre II

Activité antimicrobienne

II.1. Les métabolites actifs des plantes

Toutes les substances antimicrobiennes dérivent du métabolisme secondaire qui est lui-même dérivé du métabolisme primaire et fournit des métabolites à faibles quantités, mais dont l'application dans différents domaines, en particulier à intérêt pharmaceutique et cosmétique, voir nutritionnel, sont de la plus grande importance (**Harbone, 1998**).

Les composés phénoliques, les alcaloïdes ainsi que les huiles essentielles font partie du groupe des métabolites secondaires (**Haddouchi et Benmansour, 2008**).

Les polyphénols sont des groupes de molécules de structures variées dont l'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzoïque auquel est directement lié un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (**Richter, 1993 ; Bruneton, 1999**). Les phénols furent les premiers agents antiseptiques et désinfectants largement utilisés (**Lansing et al., 2003**).

Les polyphénols jouent un rôle fondamental car ils sont des éléments importants de qualités sensorielles (couleur et caractère organoleptique) et nutritionnelles des végétaux que consomme l'homme dont leur intervention dans la santé est maintenant reconnue dans des domaines variés comme anti-cancérogène, antioxydants, , anti-œstrogène et anti inflammatoire, ils interviennent aussi dans la lutte contre le vieillissement des cellules (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

Plusieurs milliers de polyphénols ont été identifiés chez les plantes dont plusieurs centaines dans les plantes comestibles. Il est généralement admis que les humains ingèrent environ 1 gramme de polyphénols par jour (**Akawah et al., 2004**).

Les flavonoïdes présentent la plus grande classe de polyphénols, ils relèvent du métabolisme secondaire et sont très répandus dans le règne végétal d'où 2% de l'ensemble du carbone photo-synthétisé par les plantes est transformé en ces composés. En outre, ils agissent comme des antioxydants puissants encore plus que la vitamine C. (**Alothmane et al., 2009**).

II.2. Activité antimicrobienne des extraits de plantes

Les tests antibactérien et antifongique ont pour but de rechercher l'activité biologique de chaque extrait de plante vis-à-vis des différents microorganismes ; bactéries et moisissures (Osato, 2009 ; Liao et al., 2010).

II.2.1. Activité antibactérienne

La sensibilité d'une bactérie à un antibactérien varie selon la nature de ce dernier. Face à un antibactérien donné, la sensibilité d'une bactérie peut être très différente selon la souche d'appartenance. L'activité antibiotique correspond à l'activité d'une molécule composée présent au sien d'un végétal qui à très faible concentration, inhibe le développement d'une bactérie ou la tue (Nicolas et Daniel ,1998).

La consommation à grande échelle des «médicaments » a entraîné la sélection de souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouveaux substituts, surtout les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration dans les recherches médicales (Ali-Shtayeh et al., 1998).

De nombreuses études *in vitro* menées sur les composés phénoliques les ont confirmés comme agents antimicrobiens contre un grand nombre de microorganismes pathogènes, avec des spectres d'activités variables (Scalbert, 1999). En effet certains quinones présentent un effet bactériostatique sur les bactéries à Gram positif mais pas vis à vis des bactéries à Gram négatif (Riffel et al, 2002). Les acides-phénols ont des propriétés antiseptiques urinaires, antifongiques et antibactériennes (Bruneton, 1999).

II .2.2. Activité antifongique

Les levures et moisissures peuvent être trouvées dans la flore normale d'un produit alimentaire. Ils peuvent produire des métabolites toxiques, et causer des odeurs et des saveurs de la nourriture. Leur présence est un indicateur de contamination de l'environnement (Branger et al., 2007).

L'activité antifongique dépend de plusieurs facteurs tels que le type du solvant utilisé pour l'extraction. Néanmoins, il est toujours possible que l'ajout de DMSO à un extrait végétal diminue son activité intrinsèque (Balansard, 2007).

Des études ont montré que les coumarines exercent plusieurs activités antimicrobiennes à savoir l'inhibition de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* et de la germination des spores d'*Aspergillus niger*, d'autre part, ils sont plus efficaces contre les Gram positifs ((Benidicte et Hooper, 1998 ; Benkiki, 2006).

Actuellement, aucune étude n'a été consacrée à l'effet antimicrobien d' l'extrait de fruit d'*Arbutus unedo* L. Toutes les études ont mis en évidence les effets antimicrobiens des racines et des feuilles seulement. Cependant, des études d'effets antimicrobiens ont été rapportés sur ses huiles essentielles (Miguel et al., 2014).

II. 3. Mécanisme d'action des substances antimicrobiennes d'origine végétale

Il est probable que l'activité antimicrobienne n'est pas attribuable à un mécanisme unique, mais à différentes cibles d'action au niveau cellulaire (Carson et al, 2002).

L'inhibition de croissance bactérienne dépend de deux facteurs ; la bactérie utilisée, et la nature du produit testé. Selon Mori et al. (1987), nous pouvons conclure que l'activité antimicrobienne des extraits dépend non seulement des composés phénoliques mais, aussi de la présence de différents métabolites secondaires.

Les flavonoïdes avec leur différentes classes dont les plus importantes sont les flavones, flavonols, flavonones, flavonones 3-oles, flavanes-3,4 dioles, et les anthocyanidines ont un grand potentiel antibactérien, en effet, en se complexant avec des composants de la paroi, ils inhibent la croissance microbienne et perturbent leurs métabolismes énergétiques (Jones et al, 1994 ; Perret et al,1995 ; Marfak, 2003).

D'autre part, les tanins sont largement connus par leurs propriétés inhibitrices des microorganismes et des enzymes grâce à leur pouvoir à former des complexes stables avec les protéines et en les précipitant (Nguz et al, 1996). Ils exercent une activité antibactérienne par interaction avec la membrane cellulaire qui induit un changement morphologique de la bactérie, en inhibant l'activité des protéases, des protéines de transport et des protéines adhésives (Cowan, 1999). Des effets inhibiteurs de la réplication des virus ont été également décrit in vitro (Bruneton, 1999 ; Charpentier et al, 2008).

Partie *Expérimentale*

Matériels et méthodes

III.1. Matériel

III.1. 1. Matériel végétal

Les fruits d'*Arbutus unedo L.* de différents stades de maturation (vert, jaune et rouge) (**figure 04**) ainsi que les feuilles ont été récoltés de la région de «Texenna», wilaya de Jijel, durant la période allant de 20 novembre 2015 au 08 janvier 2016. Les fruits ont été congelés dans des sacs isothermes et les feuilles ont été séchées à l'abri du soleil puis conservés dans un endroit sec.



Figure 04 : Echantillon des fruits d'*Arbutus unedo L.* en trois stades de maturation.

III.1.2. Les souches indicatrices

Pour la détermination de l'activité antimicrobienne des extraits des fruits d'*Arbutus unedo L.*, nous avons utilisé huit souches bactériennes qui sont :

- Listeria monocytogenes* ATCC 25922;
- Klebsiella oxytoca* ATCC 25922;
- Escherichia coli* ATCC 25922;
- Bacillus subtilis* ATCC 21332;
- Staphylococcus aureus* ATCC25923;
- Salmonella* sp: souche sauvage ;
- Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853;

-*Acinetobacter baumannii* ATCC19606.

✓ Quatre souches fongiques à savoir :

-*Fusarium*;

- *Penicillium*;

- *Aspergillus niger* ;

- *Aspergillus flavus*.

III.1.3. Les milieux de culture

Au cours de cette étude, nous avons utilisé ce qui suit:

✓ **Les géloses** : gélose Mueller-Hinton, gélose sabouraud, gélose nutritive (**annexe 02**).

✓ **Les bouillons** : bouillon nutritif , bouillon MH (**annexe 03**).

III.1.4. Les produits chimiques et réactifs : Les produits chimiques et réactifs utilisés au cours de cette étude sont les suivants:

Méthanol, DMSO, Folin Ciocalteu, carbonate de sodium, nitrite de sodium (NaNO₂), trichlorure d'aluminium (AlCl₃), hydroxyde de sodium (NaOH), acide gallique, quercétine (**annexe 01**).

III.1.5. Appareillage : L'appareillage utilisé est le suivant :

✓ Autoclave (Shiavx Electronic) ;

✓ Bain Marie (Gerhardt Bonn, Memmert) ;

✓ Centrifugeuse électrique ;

✓ Etuve ;

✓ Spectrophotomètre UV- visible (Perkin Elmer).

III.2 .Méthodes

III.2.1. Préparation de la poudre des échantillons

Au laboratoire, le matériel végétal (fruits et feuilles) a été séché dans une étuve réglée à 40°C pendant 72 heures puis broyé dans un broyeur mécanique (**figure 05**). Après tamisage, la poudre a été conservée dans des flacons fermés en verre jusqu'à l'utilisation.



Figure 05 : Poudre de feuilles et de fruits d'*Arbutus unedo L.* en trois stades de maturation.

A :feuilles ; B :fruit vert ; C:fruit rouge ; D: fruit jaune.

III.2.2. Préparation des extraits bruts secs

Les extraits méthanoliques ont été préparés selon la technique décrite par (**Isbilir et al., 2012**) avec quelques modifications ; une prise d'essai de 40g de poudre de chacun des fruits et des feuilles a été mise à macérer dans 200 ml de méthanol absolu sous agitation à température ambiante pendant une nuit. L'extrait a ensuite été filtré sur un papier filtre N°4 et le résidu a été ré- extrait deux fois puis évaporé à sec sous pression réduite à 40°C au Rota-vapeur. Le résidu sec pesé est conservé à 4°C (**figure 06**).

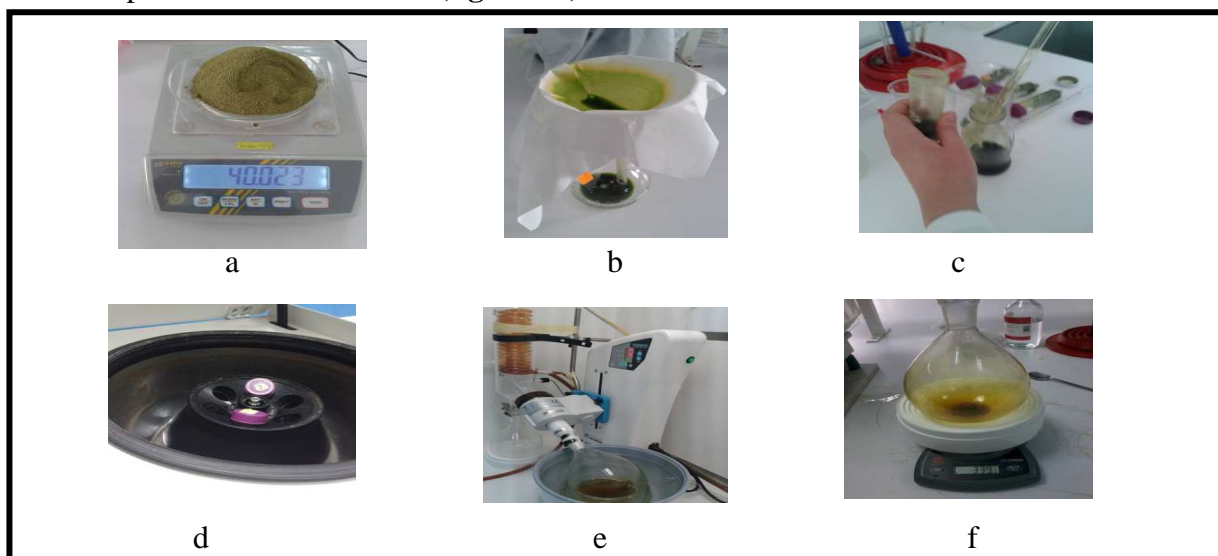


Figure 06 : Etapes de la préparation des extraits bruts pour chacun des feuilles et des fruits.

III.2.3. Le rendement en extrait sec

Nous pouvons déterminer le rendement en extrait sec par le rapport entre le poids de l'extrait sec déjà calculé (en gramme), avec le poids du matériel végétal utilisé pour l'extraction en gramme. Les rendements sont calculés par rapport à 100g de matière végétale sèche.

✓ Calcul du rendement

Le pourcentage en extrait bruts sec méthanolique a été calculé par la formule suivante: $R(\%) = M / M_0 \times 100$

Où :

R (%) : Rendement exprimé en % ;

M: Masse en grammes de l'extrait sec résultant ;

M₀ : Masse en grammes du matériel végétal à traiter.

III.2.4. Dosage des polyphénols totaux

Les composés phénoliques sont dosés par le réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode décrite par (Singleton et al., 1999) à l'aide d'un spectrophotomètre UV- visible de type (Perkin Elmer). La quantité des phénols a été calculée par référence à une courbe d'étalonnage d'acide gallique.

Un volume de 200 µl pour chaque extrait des feuilles et fruits à concentration de 2mg/ml est introduit dans des tubes à essais, le mélange (1 ml de Folin Ciocalteu dilué 10 fois et 0.8 ml de carbonate de sodium à 7.5 %) est additionné. Le mélange est agité et laissé à l'obscurité à une température ambiante pendant 30 min. Un témoin est préparé dans les mêmes conditions. L'absorbance est mesurée à 765 nm. Une courbe d'étalonnage à différentes concentrations d'acide gallique a été préparée (**annexe 04**).

Les teneurs en phénols totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/ g MS).

III.2.5. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été effectué selon la méthode décrite par (**Kumazawa et al., 2004**) avec quelques modifications. La quantité des flavonoïdes (mg EQ/g) a été estimée en se référant à une courbe d'étalonnage de la quercétine (**annexe 04**).

Une quantité de 500 µl de l'extrait méthanolique (5mg/ml) est ajoutée à 1500 µl de l'eau distillée. Au temps zéro, 150 µl de nitrite de sodium (NaNO₂) à 5 % est ajouté au mélange. Après 5 min, 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à 10 % (m/v) est rajouté. Après une incubation de 6 min à la température ambiante, 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1 M) est additionné. Immédiatement, le mélange est complètement agité. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est mesurée à 510 nm contre le blanc.

III.2.6. Etude du pouvoir antimicrobien

Deux méthodes différentes sont employées pour l'évaluation de l'effet antimicrobien des différents extraits bruts: la méthode de diffusion à partir d'un disque de papier (**Essawi et Srour, 2000**) qui permet la mise en évidence de l'activité antimicrobienne des différents extraits et la méthode de micro-dilutions (**Billerbeck et al., 2002**) qui a pour objectif la détermination des CMI (concentrations minimales inhibitrices) à partir d'une gamme de concentrations de produit dans le milieu de culture.

III.2.6.1. Préparation des inoculums et des extraits

a. Revivification des souches et standardisation d'inoculum bactérien

L'activité antibactérienne doit être réalisée sur des souches bactériennes jeunes en phase exponentielle de croissance. Les souches bactériennes ont été revivifiées dans un bouillon nutritif à 37°C pendant 24 heures. Puis chaque souche a été repiquée en stries sur la surface des boîtes de pétries pré-coulés en gélose nutritive pour obtenir des colonies bien isolées. Après incubation de 24 heures à 37 °C, une colonie bien isolée a été prélevée avec une anse de platine stérile, cette colonie a été prise et mise en suspension dans un tube stérile qui contient 10 ml d'eau physiologique stérile, des dilutions décimales ont été effectuées à partir de la suspension mère afin de standardiser l'inoculum qui doit être ajusté à une densité optique entre 0,08- 0,1 à 625 nm (0,5McFarland) soit environ 10⁸ UFC/ml.

b. Préparation d'inoculum mucorale

Les souches fongiques sont ensemencées sur le milieu sabouraud coulé en boîtes de Pétri et incubées à 25 °C pendant 5 jours. Après, ces boîtes sont lavées par 10 ml d'eau distillée stérile afin de récupérer les spores fongiques, la suspension est standardisée par la suite à la concentration de 10^5 spores/ml par dilution et en utilisant la cellule de Malassez.

c. Préparation des extraits

Les extraits bruts méthanoliques ont été solubilisés dans du DMSO pour obtenir des concentrations de 200 mg/ml.

III .2.6.2. Test de l'activité antimicrobienne (méthode de diffusion à partir d'un disque solide)

La méthode de diffusion à partir d'un disque solide a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des extraits vis-à-vis des germes cibles.

La gélose Mueller-Hinton est coulée dans des boîtes de Pétri et écouvillonnée par les inoculums bactériens ou fongiques, puis des disques de papier Wattman n°1 de 6mm de diamètre, stérilisés auparavant à l'étuve (120 °C pendant 15 min) imbibés de 20 µl des extraits méthanoliques, ces disques sont placés à la surface des géloses. Des témoins imbibés par le DMSO ont été aussi utilisés (**figure 07**). L'expérience est répétée trois (03) fois pour chaque extrait et pour chaque espèce bactérienne et fongique.

La lecture des résultats a été faite après une incubation de 24h à 37 °C pour les souches bactériennes et 5 jours d'incubation à 25°C pour les souches fongiques, l'activité antimicrobienne est détectée par la présence d'une zone d'inhibition autour du disque imprégné d'extrait et en fonction du diamètre de ces zones, la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante.



Figure 07 : Méthode de diffusion à partir d'un disque solide.

III.2.6.3. Méthode des micro-dilutions en milieu liquide

Les CMI ont été déterminées par la méthode de micro-dilution en milieu liquide, dans des plaques de 96 puits (**Santos et Hamdan, 2005**). Cette méthode permet la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à partir d'une gamme de concentrations d'extrait dans le milieu de culture. D'après la méthode de **Benjlali et al.,1986**, rapportée par **Billerbeck et al., 2002**, une solution-mère de chaque extrait (d'une concentration finale de 0.2 g/ml) est obtenue en DMSO, puis une série de dilutions est réalisée extemporanément en DMSO à partir de la solution-mère ; la gamme de concentrations finales ainsi obtenue correspond à $1/2 - 1/4 - 1/8 - 1/16 - 1/32 - 1/64 - 1/132$ et $1/146$. 100 μ l de chaque dilution sont alors incorporés à 95 μ l de bouillon Mueller Hinton puisensemencé par 5 μ l de l'inoculum bactérien ou fongique (**figure 08**). Tous les essais sont répétés trois fois.

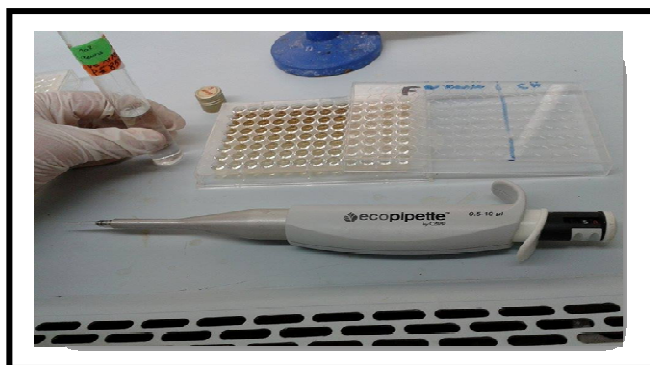


Figure 08 : Méthode de la micro-dilution en milieu liquide.

Après incubation à 37°C pendant 24heure, la croissance est comparée à celle du témoin. La CMI est définie comme la plus petite concentration d'extrait pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin sans extrait.

III.2.7. Concentration minimale bactéricide (CMB) et concentration minimale fongicide (CMF)

Les subcultures réalisées suite à l'obtention des CMI, ont permis d'observer les concentrations minimales bactéricides (CMB) et celles fongicide (CMF).

Résultats et discussion

IV.1. Résultats préparation des extraits de feuilles et de fruits d'*Arbutus unedo* L. en trois stades de maturation

La préparation des extraits à partir de feuilles et de fruits d'*Arbutus unedo* L. a été effectuée selon la méthode (d'Isbilir *et al.*, 2012), les échantillons séchés et broyés ont été soumis à une extraction générale avec le méthanol. Cette extraction a permis d'obtenir quatre extraits bruts : l'extrait de feuilles, l'extrait de fruit vert, l'extrait de fruit jaune et celui de fruit rouge. Chaque extrait a été caractérisé par sa couleur spécifique (**figure 09**).

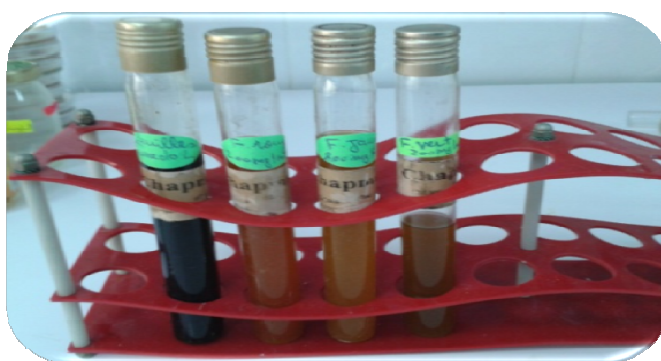


Figure 09 : Les extraits méthanoïques bruts de feuilles et de fruits d'*Arbutus unedo* L.

IV.2. Rendement des extraits

La **figure 10** illustre les résultats obtenus pour le rendement d'extraction méthanolique des composés phénoliques des fruits d'arbousier aux trois stades de maturation ainsi que ceux des feuilles. Nous constatons, comme le montre très clairement la (**figure 10**), que les feuilles d'arbousier ont donné les meilleurs rendements d'extraction (15%), cependant les fruits ont donné le même rendement pour les trois stades de maturation (12.5%).

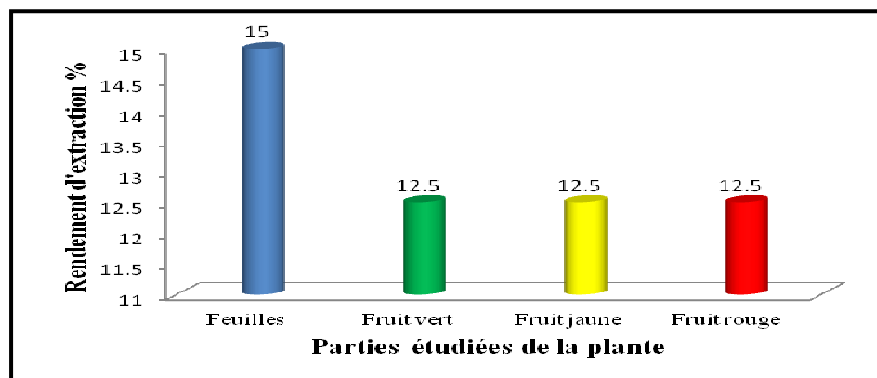


Figure 10: Rendement d'extraction des composés phénoliques de feuilles et de fruits d'*Arbutus unedo* L. aux trois stades de maturation.

D'après **Oliveira (2010)**, le rendement d'extraction des substances bioactives des fruits non mûres était de $24.8 \pm 3.8 \%$, pour les fruits au stade intermédiaire, il était de $43.5 \pm 5.5 \%$ et $45.0 \pm 2.2 \%$ avec les fruits mûres.

D'une manière générale, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie. En effet, le rendement n'est pas relatif ; il dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée.

IV. 3. Dosage des composés phénoliques

IV.3.1. Dosage des polyphénols totaux

Les teneurs en phénols totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme du poids de la matière sèche (mg EAG/ g MS). Leur dosage nous donne une estimation globale de la teneur en différentes classes des composés phénoliques contenus dans l'extrait de fruit analysé (**Pawlowska et al., 2006**). La teneur en polyphénols totaux des fruits d'arbousier aux trois stades de maturation sont illustrés par la (**figure 11**).

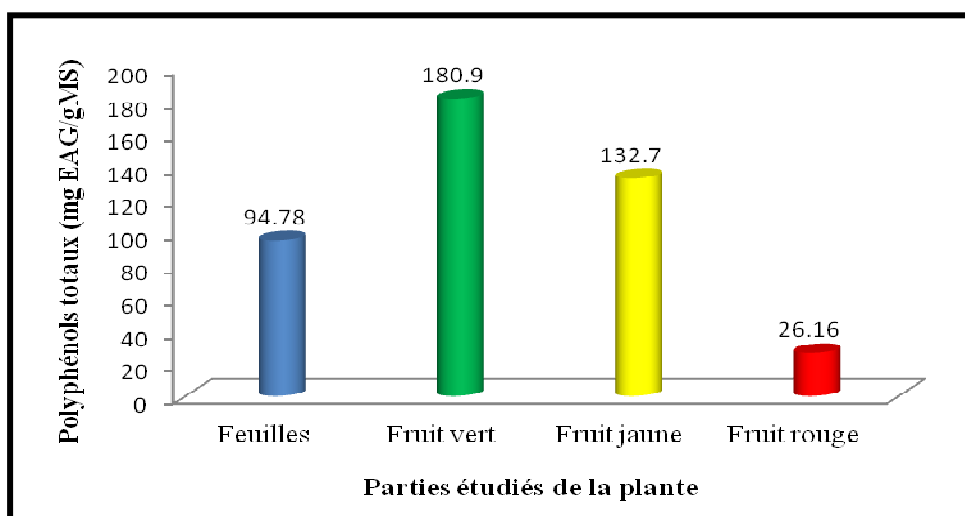


Figure 11 : Teneurs en polyphénols totaux des feuilles et des fruits d'arbousier aux trois stades de maturation.

Selon les résultats illustrés ci-dessus, on constate que les fruits vert d'arbousier sont les plus riches en phénols totaux ($180.9 \text{ mg EAG/g MS}$) par rapport aux fruits jaunes ($123.7 \text{ mg EAG/g MS}$) et ceux rouges ($26.16 \text{ mg EAG/g MS}$) et même aux feuilles ($94.78 \text{ mg EAG/g MS}$).

Oliveira et al. (2011) ont obtenu un contenu maximal en polyphénols de 48.26 g EAG/ kg d'extrait dans le stade intermédiaire de maturation, tandis que les fruits non mûrs et mûrs présentaient des valeurs de 25.4 ± 2.5 et 26.8 ± 2.4 g EAG/ kg MS respectivement.

D'autre part **Alarcão-e-Silva et al.(2001)** ont rapporté une concentration de 15.5 ± 0.6 g EAG/ kg MS des fruits non matures, et 14.6 ± 0.9 g EAG/ kg MS des fruits matures.

Nos résultats concernant les fruits au stade rouge sont supérieurs à ceux trouvés par **Alarcão-E-Silva et al. (2001)**, **Tavares et al.(2010)** et **Orak et al.(2011)** qui sont de l'ordre de $15.5 \pm 0,6$ mgEAG/g, 18 mg EAG/g et 14.29 mg EAG/g MS respectivement. Cependant **Barros et al. (2010)** ont trouvé une de valeur 126.83 mg EAG/g MS.

Les études récentes ont prouvé que les extraits méthanoliques des feuilles de l'arbousier possèdent un fort potentiel antioxydant (**Oliveira et al., 2009**). en effet, les études phytochimiques ont prouvé que les extraits de feuille contiennent plusieurs composés phénoliques, comme les tannins, les flavonoïdes, les glycosides phénoliques et plusieurs autres composés (**Males et al., 2006 ; Fiorentino et al., 2007**).

Des études faites par **Falleh et al. (2008)**, **Podsedek (2007)** et **Lee et al. (2003)** ont montré que la teneur en composés phénoliques d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques ; les conditions climatiques, les pratiques culturelles, le degré de maturité, les conditions de stockage, la méthode d'extraction et la méthode de quantification.

IV.3.2. Dosage des flavonoïdes

Les valeurs moyennes de la teneur en flavonoïdes des fruits d'arbousier aux trois stades de maturation ainsi que celles des feuilles sont récapitulées dans la (**figure 12**).

D'après la **figure 12**, il ressort que la teneur en flavonoïdes du fruit diminue 11.23 mg EQ/g MS en stade vert à 2.8 mg EQ/g MS au stade rouge dont la valeur moyenne est enregistrée pour le fruit au stade jaune (5,9 mg EQ/g MS).

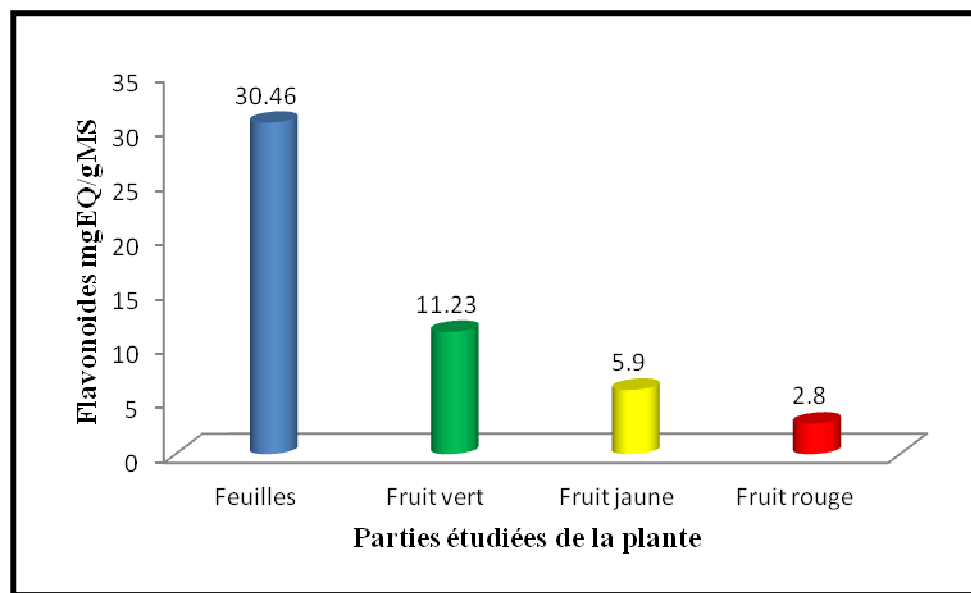


Figure 12 : Teneurs en flavonoïdes des feuilles et des fruits d'arbousier aux trois stades de maturation.

D'une manière générale, la teneur en flavonoïdes de nos fruits est supérieure à celles de quelques autres fruits sauvages étudiés par **Gulen et al.(2012)** à savoir *Lycium europaeum L.*(3.72 mg/100g d'extrait), *Prunus spinosa L.*(1.74 mg/100g d'extrait), *Rosa canina L.*(1.69 mg/100g d'extrait) et *Rubus sanctus L.*(1.88 mg/100g d'extrait).

Les flavonoïdes sont omniprésents chez tous les végétaux et leur activité est exprimée par leur grande affinité biologique avec les polymères, les métaux lourds et surtout pour leur activité antioxydante. Ce sont les plus actifs parmi les antioxydants végétaux alimentaires (**Graille, 2003**). Ils ont en outre une action thérapeutique sur certaines pathologies telle le traitement des inflammations, des infections virales et du cancer (**Moller, 2003 ; Ndhala et al., 2006**).

IV .4. Evaluation du pouvoir antimicrobien des extraits

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

hydrocarbures et les alcools qui démontrent un synergisme (Chaibi et al., 1997 ; Ferrari, 2002).

Une recherche supplémentaire sur la composition chimique de chaque extrait est plus que nécessaire pour comprendre l'évaluation de composés présentant l'activité antimicrobienne (Athamena, 2009).

La méthode des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien et antifongique des composés polyphénoliques vis-à-vis de huit souches bactériennes : *Listeria monocytogenes* ; *Klebsiella oxytoca* ; *Escherichia coli* ; *Bacillus subtilis* ; *Staphylococcus aureus* ; *Salmonella sp*; *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* et quatre souches fongiques : *Fusarium* ; *Penicillium*; *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*.

L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par Mutani et al. (2009). Ils ont classés les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne en 5 classes :

Très fortement inhibitrice ($D \geq 30\text{mm}$) ; fortement inhibitrice ($21 \text{ mm} \leq D \leq 29\text{mm}$) ; modérément inhibitrice ($16\text{mm} \leq D \leq 20\text{mm}$) ; légèrement inhibitrice ($11\text{mm} \leq D \leq 16\text{mm}$) ; non inhibitrice ($D < 10\text{mm}$).

En plus, la sensibilité des souches aux différents agents antimicrobiens a été classifiée par le diamètre de la zone d'inhibition comme suit : extrêmement sensible ($D \geq 20 \text{ mm}$) ; sensible ($15 \text{ mm} \leq D \leq 19\text{mm}$) ; intermédiairement sensible ($9\text{mm} \leq D \leq 14 \text{ mm}$) et non sensible (résistante) ($D < 8\text{mm}$).

IV. 4.1. Evaluation du pouvoir antibactérien

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été faite par la méthode des aromatoigrammes. Le pouvoir antimicrobien de nos extraits est obtenu par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (mm).

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme qui permet de déterminer l'activité inhibitrice d'agents antimicrobiens par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque imprégné de différentes solutions à tester.

Les zones d'inhibition sont indemnes de colonies, plus son diamètre est grand, plus la souche est sensible à l'antimicrobien, plus il est petit, plus la souche est résistante.

Le diamètre moyen de la zone d'inhibition (ZI) observé autour des disques imprégnés par les extraits de feuilles et de fruits aux différents stades de maturation après 24 heures d'incubation à 37 C° sont résumés dans le (tableau 02).

Tableau 02 : Valeurs moyennes des diamètres des zones d'inhibition pour l'extrait de feuilles et de fruits vis-à-vis des souches bactériennes testées.

	Les souches bactériennes	Diamètre des zones d'inhibition (mm)			
		Extrait de feuilles	Extrait de fruit vert	Extrait de fruits jaunes	Extrait de fruits rouges
Gram -	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14	19	19	22
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	14	15	14	11
	<i>Escherichia coli</i>	17	18	16	15
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	15	16	14	11
	<i>Salmonella sp</i>	16	15	14	13
Gram +	<i>Listeria monocytogenes</i>	13	14	15	11
	<i>Bacillus subtilis</i>	14	16	17	12
	<i>Staphylococcus aureus</i>	16	17	21	13

Il est clair d'après les résultats obtenus que les quatre extraits méthanoliques exercent une activité inhibitrice plus ou moins prononcée sur les souches testées.

La présence des zones d'inhibition est le résultat d'un antagonisme exercé par les substances bioactives présentes dans les extraits de feuilles et des fruits envers les souches cibles. Les diamètres des zones d'inhibition étaient compris entre 13mm et 17mm pour

l'extrait de feuilles, entre 14 mm et 19 mm pour l'extrait de fruit vert, entre 14 mm et 21 mm pour celui de fruit jaune et entre 11mm et 22mm pour l'extrait de fruit mature (rouge).

D'une manière générale, l'ensemble des extraits étudiés ne présentent pas le même spectre d'action vis-à-vis des souches cibles où nous avons remarqué que l'effet inhibiteur de l'extrait de feuilles a été plus prononcé sur *E.coli* (17mm) (**figure 13**). En revanche, nous avons constaté que *Listeria monocytogenes* était la souche la plus résistante à l'effet inhibiteur de cet extrait (13 mm).

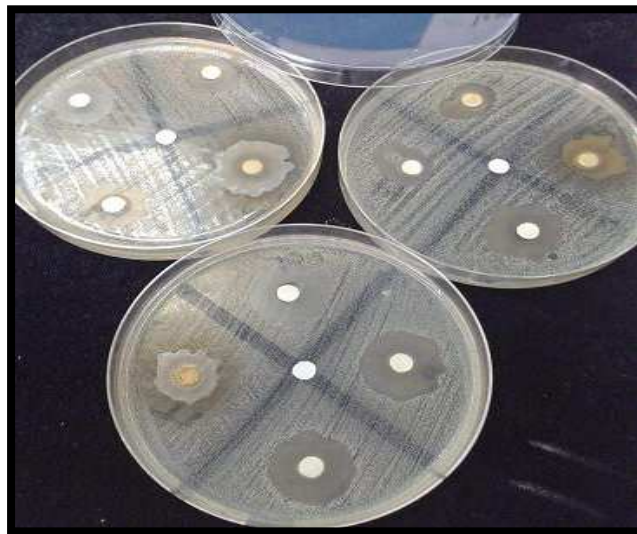


Figure 13 : Activité inhibitrice de différents extraits méthanolique vis - a -vis *E.coli*.

D'après **Mutani et al. (2009)**, l'extrait des feuilles a une activité modérément inhibitrice sur *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, elles sont considérées donc sensibles à cet extrait (**figures 13, 14**). Cependant, il présente une activité légèrement inhibitrice sur *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella oxytoca*, *Listeria monocytogènes* et *Bacillus subtilis*. Ces souches sont considérées intermédiairement sensibles à l'extrait de feuilles d'*Arbutus unedo L* (**figure 14**).

Orak et al. (2011) ont évalué le potentiel antimicrobien de feuilles d'*Arbutus unedo L*. dont aucun effet n'a été observe vis-à-vis *Escherichia coli* et *Salmonella enteritidis*. D'autre part, **Dib et al. (2013)** ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits aqueux et méthanolique des racines de cette plante vis-à-vis deux bactéries Gram négative ; *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, ils n'ont constaté aucun effet de ces extrait vis-à-vis

Pseudomonas aeruginosa, cependant, ils ont trouvé que l'extrait aqueux possède une activité antibactérienne modérée vis-à-vis *Escherichia coli*.

Dans une étude récente, les activités antimicrobiennes des extraits éthanolique de cinq espèces de la famille des *Ericaceae* ; *Arbutus unedo*, *Bruckenthalia spiculifolia*, *Calluna vulgaris*, *Erica arborea* et *Erica carnea* ont été testées contre trois Gram négative à savoir *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Escherichia coli* dont les résultats ne montre aucun effet inhibiteur des feuilles d'*Arbutus unedo* L. (Dragana et al., 2014).

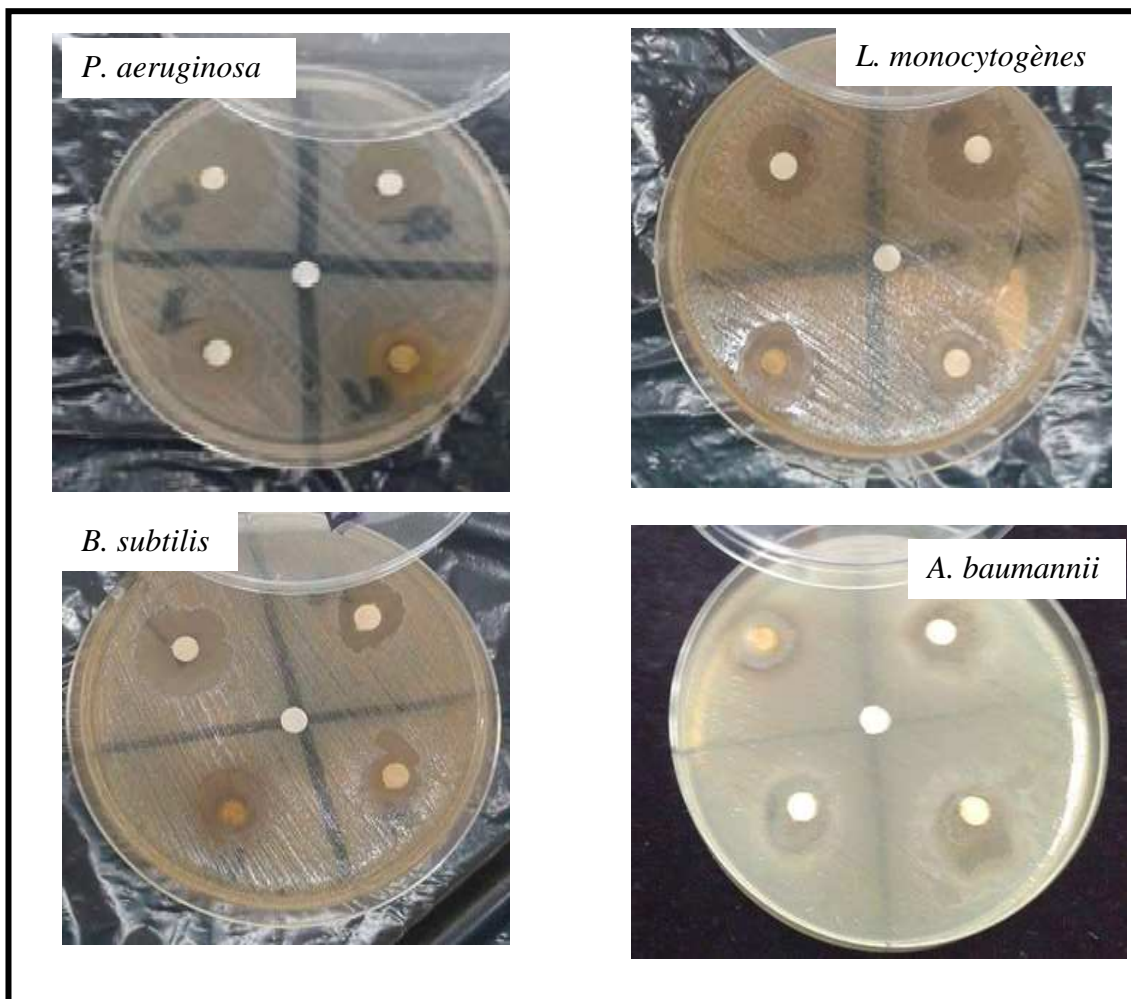


Figure 14 : Activité inhibitrice de différents extraits méthanolique vis- à-vis *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* et *Acinetobacter baumannii*.

Concernant les extraits de fruit, il s'avère que la meilleure activité inhibitrice est enregistrée pour tous les extraits (fruit vert, fruit jaune et fruit rouge) vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* avec des diamètres des zones d'inhibition allant de 19 à 22mm (**figure 14**). Selon **Mutani et al. (2009)**, les extraits des fruits verts et jaunes ont une activité antibactérienne modérément inhibitrice sur cette bactérie, par contre, celui de fruit rouge présente une activité fortement inhibitrice.

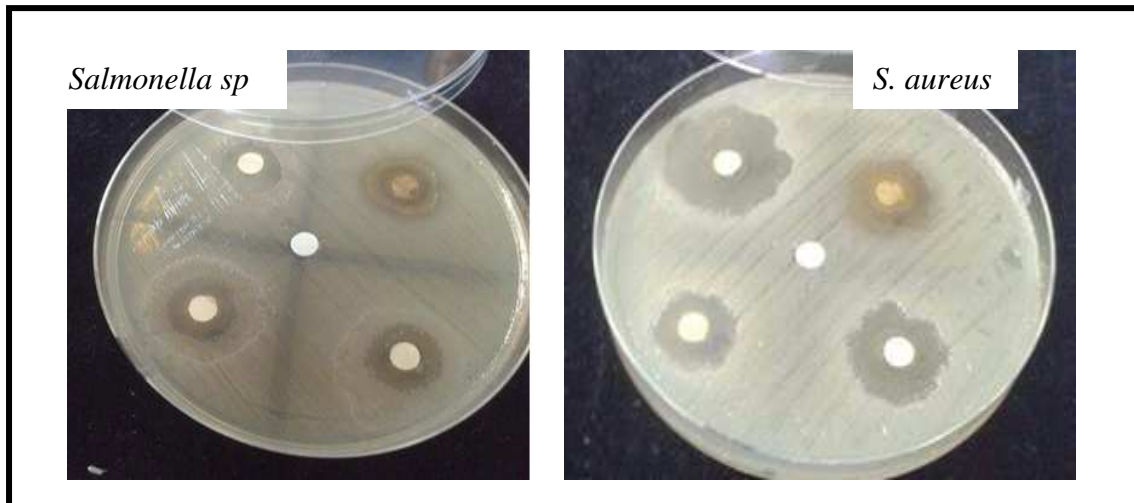


Figure 15 : Activité inhibitrice de différents extraits méthanolique vis avis *Salmonella sp* et *Staphylococcus aureus*.

Concernant l'extrait du fruit vert d'*Arbutus unedo L.*, tous les diamètres des zones d'inhibition sont compris entre 15mm et 19mm ce qui nous permet de considérées que toutes les souches sont sensibles à l'effet de cet extrait à l'exception de *Listeria monocytogenes* (14 mm) qui est intermédiairement sensible. En outre, l'extrait de fruit jaune présente une activité inhibitrice similaire à celle de l'extrait de fruit vert sauf pour *Staphylococcus aureus* où on a enregistré un diamètre de la zone d'inhibition de 21mm ce qui nous permet de dire que cet extrait possède une activité fortement inhibitrice sur cette bactérie (**figure 15**).

Par ailleurs, il apparait que l'activité inhibitrice des extraits de fruit diminue avec la maturation, en effet, l'extrait de fruit mature (rouge) exerce une activité légèrement inhibitrice sur *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter bummanii* et *Klebsiella oxytoca*. Ces souches sont donc intermédiairement sensibles à l'effet de l'extrait de fruit rouge d'*Arbutus unedo L.*

En fin, il est clair, que *Klebsiella oxytoca* apparait la souche la plus sensible à l'effet de tous les extraits étudiés en exceptant celui de fruit jaune (**figure 16**).



Figure 16 : Activité inhibitrice des différents extraits méthanolique vis-à-vis *Klebsiella oxytoca*.

Une étude menée par **Doukani et Tabak (2014)**, portée sur l'effet inhibiteur de fruits et de huiles essentielles d'*Arbutus unedo L.* sur *Salmonella typhi* (ATCC 14028) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), démontre l'absence d'une activité inhibitrice de fruit vis-à-vis ces deux souches bactériennes.

IV.4.2. Evaluation de pouvoir antifongique

La méthode des disques ou méthode de diffusion sur gélose a pour but d'étudier l'activité antifongique des substances naturelles extraites à partir de la plante. Contre des champignons pathogènes obligatoires ; le diamètre du halo d'inhibition est mesuré au bout de cinq jours, ou plus suivant la vitesse de croissance des champignons. Des résultats positifs satisfaisant sont validés pour une zone d'inhibition d'un diamètre supérieur à 15 mm. Les résultats de l'activité antifongique des extraits méthanoliques de feuilles et de fruits d'*Arbutus unedo L.* aux trois stades de maturation sont récapitulés dans le (**tableau 03**).

Tableau 03 : Valeurs moyennes des diamètres des zones d'inhibition pour l'extrait de feuilles et de fruits vis-à-vis les souches fongiques testées.

Les souches fongiques	Diamètre des zones d'inhibition (mm)			
	Extrait de feuilles	Extrait de fruit vert	Extrait de fruits jaunes	Extrait de fruits rouges
<i>Aspergillus flavus</i>	18	17	21	15
<i>Aspergillus niger</i>	18	18	17	20
<i>Penicillium</i>	18	20	25	26
<i>Fusarium</i>	20	21	26	24

D'après les résultats obtenus, il ressort que les quatre extraits méthanolique exercent une activité inhibitrice plus ou moins prononcée sur les souches fongique testées.

Tous les extraits ont réagi positivement avec les souches fongiques testées dont le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une souche à une autre et d'un extrait à un autre, il varie de 18 mm à 20 mm pour l'extrait des feuilles, de 17mm à 21mm pour celui de fruit vert, de 17mm à 26mm pour l'extrait de fruit jaune et de 15mm à 26 mm pour l'extrait de fruit rouge (**figure 17**).

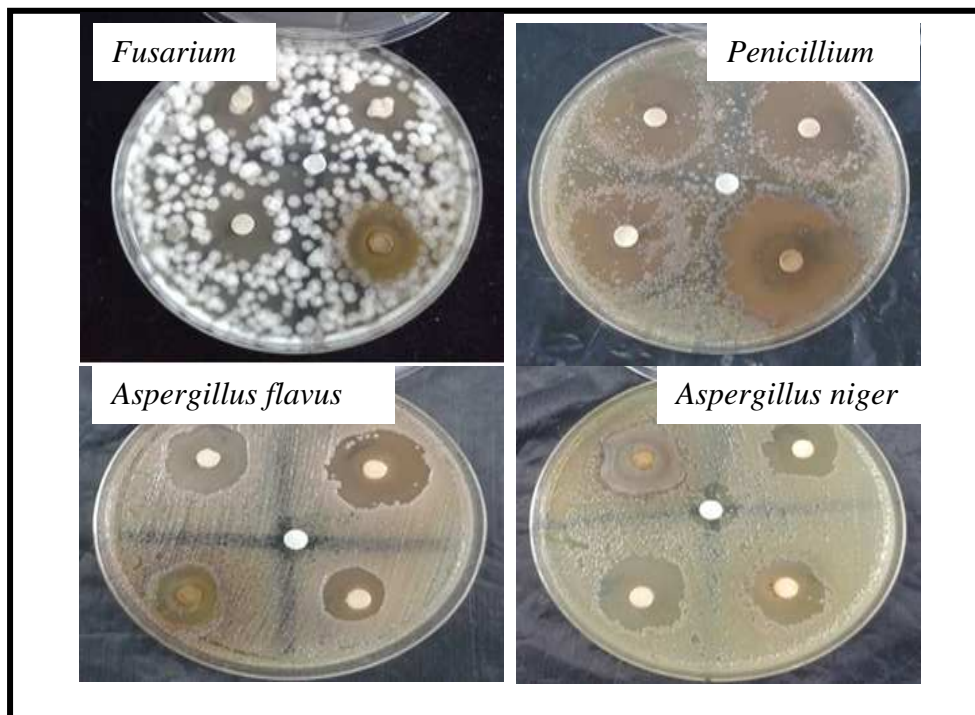


Figure 17 : Activité inhibitrice de différents extraits méthanolique vis-à-vis les différents souches fongique testées.

D'une manière générale, il apparaît que l'activité antifongique des extraits de fruits est plus forte que celle d'extrait des feuilles, de plus, cette activité est plus prononcée pour l'extrait de fruit jaune.

Parmi les moisissures testées, il est clair que *Fusarium* est le plus sensible à l'effet de tous extraits méthanoliques à l'exception de l'extrait de fruit rouge dont sa meilleure activité inhibitrice a apparue contre *Penicillium*.

IV.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et les concentrations minimales bactéricide et fongicide

Les résultats de cette étude qualitative méritent une étude quantitative plus approfondie pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de nos extraits.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée par la plus faible concentration des extraits à laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu.

IV.5.1. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

IV.5.1.1. Concentration minimale inhibitrice des extrait vis-à-vis les souches bactériennes

Nous rapportons dans le (**tableau 04**) les résultats de la détermination de la concentration minimale inhibitrice des extraits des feuilles et de fruits d'*Arbutus unedo L.* aux trois stades de maturation.

Tableau 04 : Résultats de la détermination de la CMI de différents extraits.

Extrait	Gram -						Gram +		
	CMI mg/ml	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
Feuille	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-
	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.25	-	-	-	-	-	-	-	+
	3.12	+	+	-	+	-	+	-	+
	1.51	+	-	+	+	-	+	+	+
	0.75	+	-	-	+	-	+	+	+
Fruit vert	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-
	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-
	3.12	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.51	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.75	+	-	+	-	+	-	-	-
Fruit jaune	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	+	-	-	-	-	-
	12.5	-	-	-	-	+	-	-	-
	6.25	-	-	-	-	-	+	+	+
	3.12	-	-	-	-	-	+	+	-
	1.51	+	-	-	-	-	+	+	+
	0.75	+	-	-	-	-	+	+	-
Fruit rouge	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-
	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.25	-	-	-	-	-	-	-	-
	3.12	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.51	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.75	+	-	+	-	+	-	-	-

En analysant le tableau ci-dessus, il apparaît que la CMI diffère d'un extrait à l'autre et d'une bactérie à l'autre, en effet, pour l'extrait de feuille, les souches *P. aeruginosa*, *salmonella sp* et *L. monocytogenes* n'ont été inhibé qu'à partir la concentration de 3.12 mg/ml , de plus *S.aureus* et *B. subtilis* ont été inhibé par les dilution 3.12 et 6.25 respectivement, cependant, *A. baumannii* , *E.coli* et *K. oxytoca* sont plus résistante à l'effet de cet extrait dont la plus faible concentration testée n'était pas capable de les inhiber.

Les CMI trouvées pour l'extrait de fruit vert et celui de fruit rouge sont similaires, dont ces deux extraits sont apparus plus actifs comparativement à l'extrait de feuille, ils arrivent à inhiber toutes les souches bactériennes testées par une concentration minimale supérieure ou égale à 0.75 mg/ml.

L'extrait de fruit jaune est plus actif vis-à-vis *A. baumannii*, *K. oxytoca*, *Salmonella sp* et *E.coli* dont la CMI est inférieure de 0.75mg/ml. Cependant les bactéries Gram + sont les plus résistantes à l'effet de cet extrait qui n'est pas capable de les inhiber que par une CMI de 12.5 mg/ml.

D'après **Alianni et al. (2001)**, qui ont établi une classification de l'efficacité de l'inhibition des extraits des plantes selon les valeurs de CMI : inhibition modéré varie de 600 µg/ml à 1500 µg/ml, faible inhibition; CMI supérieure à 1600 µg/ml, on peut dire que nos extraits vert et rouge exercent une inhibition modérée sur toutes les souches testées, tandis que l'extrait de feuille présente une faible activité sur l'ensemble de ces souches à l'exception d'*E.coli* .D'autre part , l'extrait de fruit jaune exerce une activité modérée sur *A .baumannii*, *K. oxytoca*, *Salmonella sp* et *E.coli* mais possède une faible activité vis-à-vis *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* et *L. monocytogenes*.

La plus haute sensibilité des bactéries Gram positives comparativement aux bactéries Gram négatives peut être attribuée à la variation de la composition de leurs membranes cellulaires et leurs arrangements. Il est connu que les bactéries Gram positives contiennent une couche externe de peptidoglycane, qui est une barrière inefficace (**Scherrer et Gerhardt, 1971**).

IV.5.1.2. Concentration minimale inhibitrice des extrait vis-à-vis les souches fongiques

Les résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrices des extraits des feuilles et des fruits d'*Arbutus unedo L.* aux trois stades de maturation sont récapitulés dans le (tableau 05).

Tableau 05 : Résultats de la détermination de la CMI de différents extraits.

Extrait	CMI mg/ml	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>
Feuille	100	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	25	-	-	-	+
	12.5	-	-	-	+
	6.25	-	-	-	+
	3.12	-	-	-	+
	1.51	+	-	-	-
	0.75	+	+	+	-
Fruit vert	100	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	25	-	-	-	-
	12.5	-	-	-	-
	6.25	-	-	-	-
	3.12	-	-	-	-
	1.51	-	-	-	-
	0.75	+	-	+	-
Fruit jaune	100	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	25	-	-	-	-
	12.5	-	-	-	-
	6.25	-	-	-	-
	3.12	-	-	-	-
	1.51	-	-	-	-
	0.75	-	-	-	-
Fruit rouge	100	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
	25	-	-	-	-
	12.5	-	-	-	-
	6.25	-	-	-	-
	3.12	-	-	-	-
	1.51	-	-	-	-
	0.75	+	-	+	-

L'analyse du **tableau 05** nous a permis de conclure que l'extrait de fruit jaune est le plus actif vis-à-vis de tous les moisissures testés, en effet, il est capable de les inhiber par une concentration minimale inférieure à 0.75 mg/ml. Cependant, l'extrait des feuilles est le moins actif, dont la CMI de *Fusarium* est de l'ordre de 50mg/ml, de plus, elle est de 3.12mg/ml et 1.51mg/ml pour *A. flavus*, *A. niger* et *Penicillium* respectivement.

Par ailleurs, les extraits des fruits vert et rouge possèdent les même CMI pour tous les souches étudiées, où on constate que la CMI d'*Aspergillus niger* et *Fusarium* est inférieure à 0.75 mg/ml, celle pour *Aspergillus flavus* et *Penicillium* est de 1.51 mg/ml.

En référant à la classification d'**Aligiannis et al. (2001)**, on peut dire que l'extrait de fruit jaune a un effet inhibiteur modéré sur tous les moisissures cibles, tandis que, l'effet d'extrait de feuille est considéré faible pour tous ces microorganismes. En outre, l'extrait vert et celui rouge ont un effet modéré sur *Aspergillus niger* et *Fusarium* mais un faible effet sur *Aspergillus flavus* et *Penicillium*.

IV.5. 2. Concentration minimale bactéricide (CMB) et concentration minimale fongicide (CMF)

Les subcultures réalisées suite à l'obtention des CMI, ont permis d'observer les concentrations minimales bactéricides (CMB) et celles fongicides (CMF).

Le **tableau 06** et la **figure 18** illustrent les résultats de la détermination de la concentration minimale bactéricide des extraits des feuilles et des fruits d'*Arbutus unedo L.* aux trois stades de maturation ainsi que le rapport CMB/CMI.



Figure 18 : La détermination de la CMB des extraits méthanoliques d'*A.unedo L.*

Selon le **tableau 06**, il ressort que les résultats de la détermination de concentrations minimales inhibitrices et celles minimales bactéricides sont identiques, de ce fait, le rapport CMB/CMI égale à 1 pour tous les extraits et toutes les souches bactériennes testées.

Il est rapporté que lorsque le rapport CMB / CMI égale à 1, l'extrait est bactéricide, cependant lorsque ce rapport est supérieur à 1, l'extrait est bactériostatique. En effet, on peut conclure que tous nos extraits ont un pouvoir bactéricide sur toutes les souches bactériennes cibles.

Tableau 06 : Résultats de CMI et CMB des extraits méthanoliques ainsi que les rapports CMB/CMI

Les Souches	Les extraits	CMI mg/ml	CMB mg/ml	CMB/CMI	Interprétation
<i>P. aeruginosa</i>	Feuille	6,25	6,25	1	Bactéricide
	F. Vert	1,51	1,51	1	Bactéricide
	F. Jaune	3,12	3,12	1	Bactéricide
	F. Rouge	1,51	1,51	1	Bactéricide
<i>A. baumannii</i>	Feuille	6,25	6,25	1	Bactéricide
	F. Vert	0,75	0,75	1	Bactéricide
	F. Jaune	0,75	0,75	1	Bactéricide
	F. Rouge	0,75	0,75	1	Bactéricide
<i>K. oxytoca</i>	Feuille	3,12	3,12	1	Bactéricide
	F. Vert	1,51	1,51	1	Bactéricide
	F. Jaune	0,75	0,75	1	Bactéricide
	F. Rouge	1,51	1,51	1	Bactéricide
<i>Salmonella sp</i>	Feuille	6,25	6,25	1	Bactéricide
	F. Vert	0,75	0,75	1	Bactéricide
	F. Jaune	0,75	0,75	1	Bactéricide
	F. Rouge	0,75	0,75	1	Bactéricide

<i>E. coli</i>	Feuille	0,75	0,75	1	Bactéricide
	F. Vert	1,51	1,51	1	Bactéricide
	F. Jaune	0,75	0,75	1	Bactéricide
	F. Rouge	1,51	1,51	1	Bactéricide
<i>L. monocytogenes</i>	Feuille	6,25	6,25	1	Bactéricide
	F. Vert	0,75	0,75	1	Bactéricide
	F. Jaune	12,5	12,5	1	Bactéricide
	F. Rouge	0,75	0,75	1	Bactéricide
<i>B. subtilis</i>	Feuille	3,12	3,12	1	Bactéricide
	F. Vert	0,75	0,75	1	Bactéricide
	F. Jaune	12,5	12,5	1	Bactéricide
	F. Rouge	0,75	0,75	1	Bactéricide
<i>S. aureus</i>	Feuille	12,5	12,5	1	Bactéricide
	F. Vert	0,75	0,75	1	Bactéricide
	F. Jaune	12,5	12,5	1	Bactéricide
	F. Rouge	0,75	0,75	1	Bactéricide

Les résultats de la détermination des concentrations minimales fongicides des extraits des feuilles et des fruits d'*Arbutus unedo* L. aux trois stades de maturation sont récapitulés dans le (tableau 07).

Tableau 07 : Résultats de CMI et CMF des extraits méthanoliques ainsi que les rapports CMF/CMI.

Les Souches	Les extraits	CMI mg/ml	CMF mg/ml	CMF/CMI	Interprétation
<i>A. flavus</i>	Feuille	3.12	3.12	1	Fongicide
	F. Vert	1,51	1,51	1	Fongicide
	F. Jaune	0.75	21.5	28.67	Fongistatique
	F. Rouge	1,51	1,51	1	Fongicide
<i>A. niger</i>	Feuille	1,51	1,51	1	Fongicide
	F. Vert	1,51	1,51	1	Fongicide
	F. Jaune	0,75	0,75	1	Fongicide
	F. Rouge	0,75	0,75	1	Fongicide
<i>Penicillium</i>	Feuille	1,51	1,51	1	Fongicide
	F. Vert	1,51	1,51	1	Fongicide
	F. Jaune	0,75	0,75	1	Fongicide
	F. Rouge	1,51	1,51	1	Fongicide
<i>Fusarium</i>	Feuille	50	50	1	Fongicide
	F. Vert	0,75	3.12	4.16	Fongistatique
	F. Jaune	0,75	0,75	1	Fongicide
	F. Rouge	0,75	0,75	1	Fongicide

$CMF / CMI = 1$ (Fongicide) ; $CMF / CMI > 1$ (Fongistatique).

L'analyse du **tableau 07** montre que le rapport CMF/CMI égale à 1 pour tous les extraits et les souches fongiques cibles à l'exception de celui d'extrait de fruit jaune vis-à-vis de *A. flavus* et celui d'extrait de fruit vert vis-à-vis *Fusarium*, ce qui nous a permis de dire que tous les extraits méthanoliques exercent un effet fongicide vis-à-vis des souches cibles en exceptant ces deux derniers qui ont un effet fongistatique sur *A. flavus* et *Fusarium*.

Conclusion et perspectives

The image features the text "Conclusion et perspectives" in a golden-yellow, italicized, serif font. The text is centered and has a subtle shadow effect beneath it, giving it a three-dimensional appearance. The entire page is enclosed in a decorative border consisting of a solid black line with a dotted pattern.

Conclusion et perspectives

Arbutus unedo L ; est originaire des pays méditerranéens, il reste très négligé, malgré les différentes études et résultats qui ont montré que cette espèce est très intéressante aussi bien du point de vue écologique (résistance à la sécheresse, etc) .

De nombreuses recherches scientifiques ont démontré que les feuilles et les fruits de cette plante sont riches en flavonoïdes et composés phénoliques . En thérapie, ces fruits sont connus pour ses effets astringents, diurétiques, et antiseptiques.

Nous avons entrepris une étude d'activité antimicrobienne des extraits de feuilles et de fruits d'*Arbutus unedo L*. aux différents stades de maturation (rouge, jaune, vert) après un dosage des polyphénols et de flavonoïdes.

L'activité antibactérienne d'extrait méthanolique de concentration de 0.2g/ml a été déterminée sur huit souches bactériennes dont cinq sont à Gram négatif et les trois autres sont à Gram positif, par contre l'activité antifongique a été évaluée vis-à-vis quatre souches fongiques. Ce test est effectué par la méthode de disques imbibés par les extraits et appliqués sur un tapis microbien déjàensemencé sur milieu Muller Hinton ; cette technique nous a permis de tester l'effet inhibiteur des extraits obtenus de feuilles et de fruits. L'étude de l'activité antimicrobienne a été complétée par la détermination des concentrations minimales inhibitrices et des celles minimales bactéricide (CMB) et fongicide (CMF).

En ce qui concerne les métabolites secondaires, nous avons remarqué que les feuilles et les fruits d'*Arbutus unedo L*. sont riches en polyphénols totaux qui atteignent leur maximum pour le fruit vert (180.9 mg EAG/g MS). Le dosage des flavonoïdes a révélé une dominance des flavonoïdes dans l'extrait de feuilles (30.46 mg EQ/ g MS).

Les extraits méthanoliques ont montré une activité antimicrobienne très importante vis-à-vis les souches bactériennes et fongiques cibles, avec des diamètres d'inhibition cernés entre 11et 26mm. on outre, d'après les résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrice, nos extraits vert et rouge exercent une inhibition modérée (<0.75 mg/ml) sur toutes les souches testées, tandis que l'extrait de feuille présente une faible activité (> 1.6 mg/ml) sur l'ensemble de ces souche à l'exception d'*E.coli* .D'autre part , l'extrait de fruit

jaune exerce une activité modérée sur *A. baumannii*, *K. oxytoca*, *Salmonella sp* et *E.coli* mais possède une faible activité vis-à-vis *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* et *L. monocytogenes*.

Par ailleurs, l'extrait de fruit jaune est le plus actif vis-à-vis tous les moisissures testés, en effet, il est capable de les inhiber par une concentration minimale inférieure à 0.75 mg/ml.

Cependant, l'extrait de feuilles est le moins actif, en outre, les extrait de fruit vert et rouge possède les même CMI pour tous les souches fongiques étudiées, où on constate que la CMI d'*Aspergillus niger* et *Fusarium* est inférieure à 0.75 mg/ml, celle pour *Aspergillus flavus* et *Penicillium* est de 1.51 mg/ml.

Les valeurs trouvées des rapports CMB/CMI confirment que tous nos extraits exercent un effet bactéricide sur toutes les souches bactériennes cibles. D'autre part, les valeurs des rapports CMF/CMI montre aussi que tous les extraits ont un effet fongicide sur toutes les souches fongique à l'exception d'extrait de fruit jaune et celui de fruit vert qui ont un effet fongistatique sur *A. flavus* et *Fusarium*.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches , de cet effet ,et comme perspectives on propose de :

- ❖ En ce qui concerne l'activité antimicrobienne il serait intéressant de définir le mécanisme d'action des substances végétales de la plante sur les microorganismes.
- ❖ Déterminer des nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.
- ❖ Orienter les recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires de l'activité antimicrobienne des composés poly-phénoliques en général et des flavonoïdes en particulier.
- ❖ Confirmer par des tests *in vivo* l'intérêt thérapeutique de cette plante.

Referénces bibliographiques

The image features the title 'Referénces bibliographiques' in a stylized, golden, 3D font. The letters are thick and have a slight shadow beneath them, giving them a three-dimensional appearance. The text is slanted to the right. The background is white, and the entire page is framed by a black border with a dotted pattern.

Références Bibliographiques

A

1. **Alarcão-e-Silva M.L.C.M.M., Leitão A.E.B., Azinheira H.G., Leitão M.C.A., 2001.** The Arbutus berry: Studies on its color and chemical characteristics at two mature stages. *Journal of Food Composition and Analysis*. 14, 27–35.
2. **Aliyiannis N., Kalpotzakis E., Mitaku S., and Chinou I. B., 2001.** Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* 40: 4168-4170.
3. **Ali-Shtayeh MS, Yaghmour RM, Faidi YR, Salem K, Al-Nuri MA., 1998.** Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *J Ethnopharmacol.*60(3):265-71.
4. **Akouwauh G.A.,Zhari.I.,Norgyati.I.,Sadikun.Aet Khamsah S.M., 2004.**The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity .*Food chemistry* 87:559-566.
5. **Alothman N.,Bhat R.,et Karim AA., 2009.** Antioxydant capacity and phénolic content of selected tropical fruits from Malaysia,extracted with different solvents.*Food chemistry* .
6. **Ardestani A., Yazdanparast R., 2007.**Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts .*Food Chem.*104 ,21-29.
7. **Athamena S., 2009** .Etude quantitative des flavonoïdes des graines de *Cuminum cyminum* et les feuilles de *Rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique .Thèse de Magistère en Biochimie Appliquée .Université El Hadj Lakhdar .Batna .88.
8. **Audigie C.L., Dupont G., 1982.**Principes des méthodes d'analyses biochimiques, Paris ,566-567.
9. **Awika J M ., Rooney I W., 2004.**Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health .*Photochemistry* .65, 1199-1221.
10. **Ayaz F.A., Kucukislamoglu M., Reunanen M., 2000.**Sugar, non-volatile and phénolic acids composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.var.ellipsoidea) Fruits.*Journal of Food Composition and Analysis* .13.171-177.

B

11. **Baba-Aissa F (2000)** .Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb,substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. EDAS Algérie.
12. **Balansard G., 2007.** Analyse critique des protocoles pharmacologiques utilisés pour la recherche d'extraits et de substances pures d'origine végétale à propriétés Antibactérienne ou antiparasitaire. Revue ethnopharmacologie. 42.
13. **Barros L., Carvalho A., Morais J., Ferreira I., 2010.** Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterization in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*. 120, 247-254.
14. **Bekhechi C.,Attk-Bekkara F., Abdelouhib D.E.,2008.**Composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles de origanum glandulosum d'Algerie-phytherapie .6:153-159.
15. **Benjlali B, Tantaoui-Elaraki A, Ismaïl-Alaoui M et Ayadi A ., 1986.** Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie*. 20,155-167.
16. **Benidicte F,Hooper D.C.,1998.**Effet of mutation in GRIA of topoisomerase IV, from *Staphylococcus aureus* on quinplene .ang .42 (8) :2109-2112.
17. **Billerbeck V.-G., Roques C., Vanière P., Marquier P., 2002.** Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes*.3(10) : 248-251.
18. **Boullard, B ., 1997.** Dictionnaire : Plantes et Champignons, Edition ESTEM, p55.
19. **Boullard, B., 2001.** Plantes Médicinales du Monde; Réalités et Croyances, Edition ESTEM, p50, 80.
20. **Branger, A, Richer, M. M., Roustel, S., 2007.** Microbiochimie et alimentation. Ed. Educagri. Paris. Pp 127-131.
21. **Bravo L., 1998** .Polyphenols : chemistry, dietary sources, métabolisme, and nutritional signifiante ; nutrition reviews ; 56(11) :317-333.
22. **Bremness L., 1998** .Les plantes aromatiques et Médicinales. Bordas Editions.
23. **Bruneton J., 1999.**Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales.3^eEd : Lavoisier ; Paris. P.1120.

C

24. **Celikel G., Demirsoy L., Demirsoy H., 2008.**The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey .*Scientia Horticulturae*. 118, 115-119.
25. **Chaibi A., Ababouch L.H., Belasri K., Boucetta S., Busta F.F., 1997.** Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus*T and *Clostridium botulinum* 62A spores by essential oils. *Food Microbiology*. 14. 161-174.
26. **Chevalier A., 2001.** Larousse Encyclopédie des plantes médicinales : 62-283.
27. **CODEX ALIMENTARIOUS (FAO/OMS) ., 1995 .**Fruits et légumes traités et surgelés .Deuxième édition , volume 5A .Rome ,518 .od and Chemical Toxicology ,10-1016.
28. **Cole, M.D., 1994.** Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays- a critical review.*Biochemical Systematics and Ecology* 22, 837-856.
29. **Cosentino S.,Tuberoso CIG.,Lisano B et al.,1999.**Sarinian Thymus essential oils.*Letters in Applied Microbiology* .29:130-135.
30. **Cowan MM., 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*.12, 564-582.
31. **Cox S.D., Mann C.M.,et al.,2000.**The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)-*Journal of applied Microbiology* .88(1) :170-175.

D

32. **Demirsoy, H., Demirsoy, L., Celikel, G., Koyuncu, T., 2007.** Effects of dried on some properties of strawberry tree fruits. *Asian J. Chemistry* 19, 1777-1782.
33. **Dib, M.A., 2008.** Contribution a l'étude de l'activité antimicrobienne de quelques polyphénols présents dans *Arbutus unedo* L. Thèse de Doctorat, Tlemcen, p140.
34. **Dib, M.A., Allali, H., Bendiabdellah, A., Meliani, N., Tabeti, B., 2013.** Antimicrobial activity and phytochemical screening of *A. unedo* L. *J. Saudi Chem. Soc.* 17, 381–395.
35. **Didry, N., Dubreuil, L., Pinkas, M., 1990.** New procedure for direct bioautographic TLC assay as applied to a tincture of *Ranunculus bulbosus*. *Journal of Ethnopharmacology* 29, 283-290.
36. كشف الرموز في الأعشاب للشيخ ابن حمدوش الجزائري، دار الرشاد - مطبعة دار .A.. Djazairi المتاب الدار البيضاء ، 1963
37. **Dorman H.J.D.,Deans S.G.,2000.**Antimicrobial agents from plants :antibacterial activity of plant volatile oils.-*J.Appl.Microbiol.*88,308-316.

38. Doukani, K., Tabak, S., 2014. Profil physicochimique du fruit «Lendj» (*Arbutus unedo* L.). B. Sciences Agronomiques et biologiques, n°12 : 53- 66. www.iaset.us
editor@iaset.org.

39. Dragana, P., Branislava, L., Dušanka, K., Milica, M., Milica, K., Bojana, M., Nada, K., 2014. Antimicrobial Activity of Selected Plant Species of Genera *Arbutus* L., *Bruckenthalia* Rchb., *Calluna* Salisb. and *Erica* L. (*Ericaceae*). Scientific Journal of the Faculty of Medicine in Niš. 31 (1), 81-85.

E

40. El Haouari, M., Lopez, J.J., Makhfi, H., Rosado, J.A., Salido, G.M., 2007. Antiaggregant effects of *Arbutus unedo* L. extracts in human platelets. J. Ethnopharmacol. 113(2), 325–331.

41. Essawi T. et Srour M., 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. J. Ethnopharm. 70 : 343-349.

F

42. Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdely C., 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. C. R. Biologies. 331: 372-379.

43. Fandohan P., Gbenou J., Gnonlofin B., 2004. Effet of essential oil on the growth of Fumonisin contamination in corn. J. Agric. Food Chem., 52, 6824–6829.

44. Ferrari J., 2002. Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles: *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. Thèse de doctorat. Lausanne. 195.

45. Fiorentino, A., Castaldi, S., D'Abrosca, B., Natale, A., Carfora, A., Messere, A., Monaco, P., 2007. Polyphenol from the hydroalcoholic extract of *Arbutus unedo* living in a monospecific Mediterranean woodland. Biochem. Syst. Ecol. 35, 809–811.

G

46. Ganhão R., Morcuende D., Estévez M., 2010. Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage. *Meat Sci.* **85**, 402–409.

47. Glordani R., Kaloustian J., 2006. Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques. *Phytothérapie* .3 :121-124.

48. Gomes M.F.F.N., 2011. Strategies for the Improvement of *Arbutus unedo* L. (Strawberry tree) : In vitro Propagation, Mycorrhization and Diversity Analysis. Ph.D. Thesis, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, 128-130.

49. Graille J., 2003. Lipides et corps gras alimentaires. Ed. Tec et Doc-Lavoisier, 389.

50. Gulen T., Bayram K., Nazan C., Ahmet G., 2012. Free radical scavenging activity and phenolic content of edible wild fruits from Kazdagi (Ida Mountains), Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research.* **6(36)**, 4992.

H

51. Haddouchi F., Benmansour A., 2008. Les Huiles Essentielles, Utilisation Et Activités biologiques, Application de Deux Plantes Aromatiques. Les technologies de laboratoire .8, 20-27.

52. Hamburger, M.O., Cordell, G.A., 1987. A direct bioautographic tic assay for compounds possessing antibacterial activity. *Journal of Natural Products* **50**, 19-22.

53. Harbone J.B., 1998. Phytochemical methods a guide to modern's techniques of plants analysis, 3rd edition .p.412.

54. Hayouni.E.A., Abedrabba.M., Bouix.Met Hamdi .M., 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food chemistry.* **105** :1126-1134.

55. Heinrich, M., 2006. Understanding local Mediterranean diets: A multidisciplinary pharmacological and ethnobotanical approach. *Pharmacological Research*, **52**, 353, 366.

56. Horbourn.N., Marete.E., Jacquier.J. Cet O'Riordan.D. Effect of drying methods on the constituents of meadow sweet (*Filipendula ulmaria*) and willow (*Salix alba*). *Food chemistry and technology.*

I

57. Isbilir S.S., Orak H.H., Yagar H., Ekinci N., 2012. Determination of antioxidant activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) flowers and fruits at different ripening stages. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, 11(3), 223-237.

58. Iserin, P., 2001. Encyclopédie des plantes Médicinales ; Identification, Préparation, Soins, Edition Larousse, p170.

59. Iucn ., 2005. A guide to medicinal plants in north africa. Ed. IUCN.Malaga(Spain).256.

J

60. Jones S.B., Luchsinger A.E.,1994. *Plant Systematics*, 2nd Ed. McGraw-Hill Book Company, 344.

K

61. Kelen M.et Bektas T., 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of essential oils of three *Salvira* species from Turkish flora .*Bioresources technology*, 99, 4096-4104.

62. KimT.L., 2012. In *Edible Medicinal and Non- Medicinal Plants* ; Springer : Dordrecht. The Ntherlands ; Heidelberg, Germany ; London, UK ; New York, NY, USA, 2,444-451.

L

63. Lahlou M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oilsphytotherapy research. 18: 435-448.

64. Lansing M., Prescott J., Harley P., Klein D A .2003. *Microbiologie* .2ème Edition française : De boeck .1164pages .

65. Lee S.J., Umamo K., Shibamoto T., Lee K.G., 2003. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties-*Food Chemistry*. 91, 131-137.

66. Lhuillier, A., 2007. Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes Malgaches: *Agauria sallicifolia* Hook. F. Ex Olivier, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Mininiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). These de doctorat de l'institut National Polytechnique de Toulouse, pp. 200.

67. Liao C.H., Lai C.C., Hsu M.S., Chu F.Y., Wu M.Y., Huang Y.T. et Hsueh P .R., 2010. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates determined by the

agar dilution, disk diffusion and Etest methods: comparison of results using GC agar and chocolate agar. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **35** (5), 457-60.

M

68. Males,Z.,Plazibat,M.,Vundac,V.B.,Zuntar,I.,2006.Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree- *Arbutus unedo L.(Ericaceae)*,*Acta pharm.56 :245-250.*

69. Marfak A. ; 2003.Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur reactive avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides.Thèse pour obtenir le grade de Docteur de PUniversité de Limoges. Spécialité:biophysique. 187.

70. Marzouk Z.,Nefffati A.,Marzouk B et al 2006.Chemical composition and antibacterial and antimutgenic activity of Tunisian *Rosmarinus officinalis L.*oil from Kasrine.*Journal of food Agriculture Environment.*4:61-65.

71. Mebarki N., 2010.Extraction de l'huile essential de thymus fontanesiidt application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne .Thèse magister. Université de Boumerdes. Pp124.

72. Meberley , D.J.1987. The plant book .A portable dictionnary of the plants.Cambridge University press.Cambridge.

73. Mendes, L.2010. Estudo de efeito protector da folhae fruto da espécie *Arbutus unedo L* na danificacao oxidativa en eritrocitos humanos, Universidade fernando Pessoa, Porto.

74. Miguel. M. G., Faleiro, M.L. , Guerreiro, A. C. , Antunes, M.D 2014.*Arbutus unedo L.*: Chemical and biological properties. *Molecules.* 19, 15799-15823.

75. Moller J., 2003. L'oxydation des aliments et la santé. Ed. Nouvelle Imprimerie Laballery, Paris, 250.

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

77. Mutani ,C.Bii, C.Vagias, D,Abatis , V.Roussis.,2009 . Antimicrobial activity of *O.acantium* extract and lupine triterpenes, *Journal of Ethnopharmacology* , doi: 10.1016/J.JEP.02.007.

N

78. Ndhlala A.R., Kasiyamhuri A., Mupure C., Chitindingue K., benhura M.A., Muchuweti M., 2006. Phenolic composition of flacourtia indica, Opuntia megacantha and Sclerocarya birrea.[article in press].

O

79. Oliveira I., Coelho V., Baltasar R., Pereira J.A.,Baptista P., 2009.Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo L.*) Leaves on free radicals .Food Chem .Toxicol.47, 1507-1511.

80. Oliveira I.,Baptista P.,Malheiro Casal R.S.A.B.,Pereira J.A., 2011.Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo L.*) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity.Food Res .Int .44 ,1401-1407.

81. Oliveira, I., Pereira, J.A., Bento, A., Baptista, P., 2010. Actividade sequestrante de radicais livres do medronho (*Arbutus unedo L.*). Actas Portuguesas Hortic. 16, 173-178.

82. Orak H.H., Aktas T., Yagar H., SelenIsbilir S., Ekinci N., Sahin F.H., (2011). Antioxidant activity, some nutritional and colour properties of vaccum dried strawberry tree (*Arbutus unedo L.*) fruit. Acta Sci PolTechnol Aliment.10, 327-338.

83. Osato M., 2009.Comparison of the E test and the NCCLS –approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant Helicobacter pylori .Int.J.Antimicrob.Agents, 17,39-44.

84. Owen P.et Johens T., 1999.Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout.Journal of Ethnopharmacology.64:149-160.

P

85. Pallauf, K, Rivas-Gonzalo, J. C., del Castillo, M. D., Cano, M. P. & Pascual S., 2008.Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo L*) fruits .journal of Food composition and Analysis, 21(4):273-281.

86. Pawlowska A.M., De Leo M., Baraca A., 2006. Phenolics of *Arbutus unedo L.* (*Ericaceae*) fruits: identification of anthocyanins and gallic acid derivatives .Journal of Agriculture and Food Chemistry. 54 (26). 10234-10238.

87. Prabuseenivasan S.,Jajacumar M.,Ignacimuthus S.,2006.In vitro antibacterial activity of some plant essential oil. Biomed central complémentart and Alternative Medecine.6(39).

88. Podsedek A., 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. LWT. 40, 1-11.

Q

89. Quezel,P.,Santa,S., 1963.Nouvelle flore de l'algérie et des régions Désertiques Méridionales ,TOME II ,Centre National de la recherche scientifique, France, Paris .

R

90. Richter G., 1993.Metabolisme des végétaux (physiologie et biochimie).Ed : presses polytechnique et universitaire Romandes .P321.

91. Riffel A.,Medina L-F.,Stefani V.,Santos R-C,Bizani,Brandelle .,2002.In vitro antibacterial Activity of a new series of 1,4-naphtaquinones.Brazillian journal of medical and biological research .35 (7).811-818.

92. Rios, J.L., Recio, M.C., Villar, A., 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology 23,127-146.

S

93. Sagdiç O. (2003) .Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 36: 467-473

94. Santos D.E., Galego L., Gonçalves T., Quintas C., 2012. Yeast diversity in the Mediterranean strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits' fermentations. *Food Res. Int.*47, 45–50.

95. Sarni-Manchado P et chynier, V ., 2006.Les polyphénols en agroalimentaire. Edition ; science et technologie.

96. Scherrer R, Gerhardt P., 1971. Molecular sieving by the Bacillus megaterium cell wall and protoplast. *J. Bacteriol.* 107: 718-735 .

97. Seidemann J., 1995. Description of exotic fruits – arbutus (*Arbutus-unedo* L). *Dtsch.Lebensm.-Rundsch.* 91 (4), 110-113.

98. Singleton, V. L., Rossi, J. R., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphothungstic acid. *Am. J. Enol. Vitic*, 16, 144–158.

99. Sokmen A.,Gulluce M.,Akpulat HA et al.,2004.The in vitro antibacterial and antioxidant activity of the essential oils and methanol extracts of endemic thymus *spatulifolius* Food control.15:627-634.

100. Spano N .,Casula L.,Panzanelli A.,Pilo M.I.,Piu P ;C.,Scanu R.,Tapparo A.,Sanna G., 2006.ARP-HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey .The case of strawberry tree honey.Talanta .68,1390-1395 .

T

101. Tahraoui A., El-Hilali J., Israili Z.H., Lyoussi B., 2007. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in the south-eastern Morocco (Errachidia province). *J. Ethnopharmacol.* 110, 105–117.

102. Takrouni M .M.,Ali I.B.H.,Messaoued C.,Boussaid M., 2012.Genetic variability of tunisian wild strawberry tree (*Arbutus unedo L.*)Populations interfered from isozyme markers.*Sci.Hort.*146, 92-98.

103. Tardio ,J., Pascual,H.,Morales,R.2002. Alimentos silverstres de Madrid : Guia de plantas ysetas de uso alimentario tradicional en la Comunidad de Madrid.Ediciones la libreria.Madrid.

104. Tavares L., Fortalezas S., Carrilho C., McDougall G.J., Stewart D., R.B, Ferreira R.B., 2010. Antioxidant and antiproliferative properties of strawberry tree tissues. *Journal of Berry Research.* 5, 3-12.

105. Tonelli N.,Gallouin F., 2013. Des fruits et des graines comestibles du monde entire .87-91.

106. Torres J.A., Valle F., Pinto C., Garcia-Fuentes A., Salazar C., Cano E., 2002. *Arbutusunedo L.* communities in southern Iberian Peninsula Mountains. *Plant Ecol.* 160, 207–223.

V

107. Vitale D., 2012. La macchia a corbezzolo (*Arbutus unedo L., Ericaceae*): aspetti botanici,prodotti e potenzialità economiche in Sardegna Tesi di dottorato di ricerca in: *Monitoraggioe Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo.* Università degli Studi diSassari.73.

Z

108. Ziyyat A., Boussairi E., 1997. Cardiovascular effects of *Arbutus unedo L.* in spontaneouslyhypertensive rats. *Phytotherapy Research,* **12**, 110–113.

Annexes

Les Annexes

Annexe 01. Préparation des solutions

➤ **Solution de Mc Farland (Standards de turbidité)**

Le standard Mc Farland 0,5 : est notamment utilisé lors de la préparation de l'inoculum bactérien pour les tests de sensibilité aux agents antimicrobiens. L'une des premières applications des standards de turbidité fut estimer la densité des populations bactérienne lors de la préparation des vaccins. En 1997.

Il sert à la préparation de l'inoculum en dilution en gélose standardisée, à la macro et Micro dilution en bouillon, à la procédure par dilution sur disque et aux tests de sensibilité des microorganismes anaérobie.

Les standards de turbidité se préparent en mélangeant des produits chimiques qui précipitent pour former une solution de turbidité reproductible.

Il est préparé par ajout d'acide sulfurique à une solution aqueuse de chlorure de baryum, Ce qui entraîne la formation d'un précipite de sulfate de baryum en suspension. Le standard Mc Farland correspond approximativement à une suspension homogène d'Escherichia coli de $1,5 \times 10^8$ cellule par ml^3 .

Réactifs

Formule approximative par 100ml d'eau purifiée.

- Acide sulfurique (H_2SO_4), 0,8M.....99,5ml.
- Chlorure de baryum ($BaCl_2$) 0,048M0,5ml.
- La densité optique de la solution (DO) varie de 0,08 -0,1 à 625nm.

➤ **Solution d'eau physiologie**

Utilisation

Eau physiologie stérile en tube pour utilisation en microbiologie.

Description du produit

Eau physiologique stérile utilisable pour de nombreuses taches au laboratoire de Microbiologie. Dilutions échantillons cliniques, standardisation de turbidité pour son utilisation dans l'ensemencement et /ou l'identification bactérienne, pour études de sensibilité aux antibiotiques. Peut être utilisé pour la dissolution de pastilles d'identification, pour essais biochimiques, pour réaliser des dilutions de séries de concentrations d'antibiotiques. L'utilisation de tubes permet d'utiliser de petits volumes sans risque de contamination.

Composition

- Na Cl9g.
- Eau distillée1000ml. (Stérilisation à 120°C pendant 20mn).

Annexe 02. Composition des milieux de culture utilisés pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne

➤ **Gélose nutritive**

La Gélose Nutritive est un milieu largement utilisé pour la culture des microorganismes peu exigeants. Elle est recommandée dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

- Peptone.....5,00 Ph final à 25°C : 6,8 +/-0,2.
- Extrait de viande de boeuf.....3,00.
- Agar.....15,00.

➤ **Gélose Mueller Hinton**

La gélose Mueller-Hinton est le milieu de référence pour les tests de sensibilité des germes aux antibiotiques. Sa formulation est conforme aux recommandations du de l'O.M.S. Elle peut également être additionnée de sang pour réaliser l'antibiogramme des germes fragiles, tels que *Haemophilus influenzae*, *Neisseria*, *Enterococcus sp* et *Streptococcus Pneumoniae*.

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

- Infusion de boeuf..... 30,00.
- Peptone de caséine..... 17,50 Le milieu en flacons ou boîtes se conserve.
- Amidon..... 1,50 entre 2 et 8°C.
- Agar..... 17,00.
- ph 7,4.

Annexe 03. Composition des bouillons nutritifs utilisés pour la culture des microorganismes-tests

➤ **Bouillon nutritive**

Le bouillon nutritif constitue un milieu d'utilisation générale pour un grand nombre de microorganismes ne présentant pas d'exigences particulières. Sa formulation répond aux directives du J.O du 8Aout 1972 pour la recherche d'un pouvoir inhibiteur intrinsèque des produits cosmétiques.

Sa formule est la suivante :

- Macération de viande 1g.
- (eau distillée +extrait de viande).
- Peptone trypsique 15g.
- NaCL ou KCL 5g.
- Ph final 7,2-7,4.
- Stériliser à 115°C pendant 20min.

➤ Bouillon MH

Le Mueller Hinton Broth (bouillon de Mueller Hinton) est un milieu polyvalent servant à la culture d'un grand nombre de microorganismes exigeants et non exigeants.

Application

Le Mueller Hinton Broth (bouillon de Mueller Hinton) est un milieu polyvalent servant à la culture d'un grand nombre de microorganismes exigeants et non exigeants. Dans cette formulation, les concentrations en ions calcium et magnésium n'ont pas été ajustées pour adapter le milieu aux méthodes quantitatives de test de sensibilité aux agents antimicrobiens.

Annexe 04. Courbes d'étalonnages

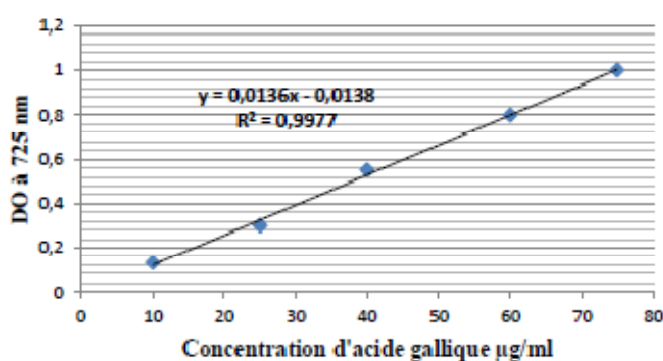


Figure 1 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

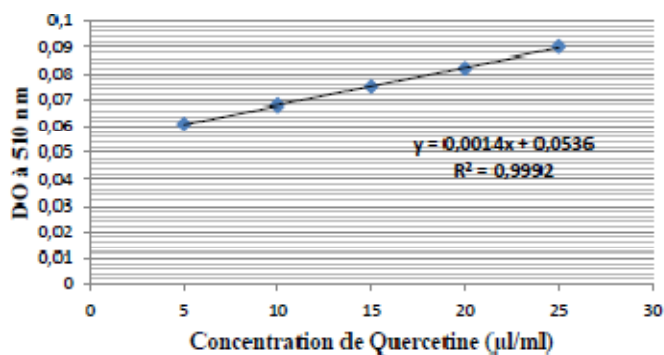


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Résumés

Etude de l'activité antimicrobienne des feuilles et des fruits d'*Arbutus unedo* L. en trois stades de maturation

Résumé

Arbutus unedo L. est une plante originaire de la région méditerranéenne, appartenant à la famille des *Ericaceae*, cette espèce connue en Algérie sous le nom de « Lendj» ou bien « Ticisnou ».

Les extraits méthanoliques de feuilles et de fruits d'*Arbutus unedo* L. en trois stades de maturation ont été obtenus par macération. Les rendements étaient de 15 % pour les feuilles et 12.5 % pour tous les fruits. La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 94.78 mg EAG/g MS pour l'extrait de feuille, 180.9 mgEAG/g MS, 132.7 mgEAG/g MS et 26.16 mgEAG/g MS pour les extraits de fruit vert, jaune et rouge respectivement. Les flavonoïdes ont été évalués par la méthode utilisant le chlorure d'aluminium (AlCl₃), sa teneur est estimée à 30.46 mg EQ/ g MS (extrait de feuille), 11.23 mg EQ/g MS (extrait de fruit vert), 5.9 mg EQ/g MS (extrait de fruit jaune) et 2.8 mg EQ/g MS (extrait de fruit rouge).

L'activité antimicrobienne a été déterminé sur huit souches bactériennes; *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 21332), *Listeria monocytogenes* (ATCC 25922) , *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella sp*, *Klebsiella oxytoca* (ATCC 25922) , *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606) , et quatre souches fongiques : *Aspergillus niger* , *Flavus* , *Penicillium* et *Fusarium* selon la méthode de diffusion sur disque et pour l'affirmation, les concentrations minimales d'inhibition (CMI), les concentration minimales bactéricide et fongicide ont été déterminées. Les résultats obtenus confirment que tous les extraits méthanoliques étudiés possèdent une activité antimicrobienne plus ou moins prononcée sur toutes les souches étudiées.

Mots clés : *Arbutus unedo* L. , extraits méthanoliques , polyphénols , flavonoïdes activité antimicrobienne.

Study of the antimicrobial activity of leaves and fruits *Arbutus unedo* L. in three stages of maturation

Abstract

Arbutus unedo L., is an evergreen small tree in the Ericaceae family, widely distributed in the Mediterranean region, in Algeria, this species known under the name of "Lendj" or "Ticisnou".

The methanolic extract of leaves and fruits of *Arbutus unedo* L. at three ripening stages were obtained by maceration. The yields were 15 % for leaves and 12.5 % for all fruits. The total content of polyphenols was given by using Folin-Ciocalteu reagent, it is 94.78 Mg GAE/g DM for leaves extract, 180.9 mg GAE/g DM, 132.7 mg GAE/g DM and 26.16 mg GAE/g DM for the green, yellow and red fruit extracts respectively. Flavonoids were evaluated by the method using aluminium chloride (AlCl₃), its content is estimated at 30.46 mg QE/g DM (leaves extract), 11.23 mg QE/g DM (green fruit extract), 5.9 mg QE/g DM (yellow fruit extract) and 2.8 mg QE/g DM (red fruit extract).

Antimicrobial activity was evaluated against eight bacterial strains ;*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 21332), *Listeria monocytogenes* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonellas sp*, *Klebsiella oxytoca* (ATCC 25922), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), and four fungi strains :*Aspergillus Niger*, *Flavus*, *Penicillium* and *Fusarium* according to the method of disc diffusion and for the affirmation, the minimum inhibitory concentration (MIC), the minimum bactericidal and fungicidal concentrations were evaluated. The obtained results confirm that all the studied methanolic extracts have an antimicrobial activity more or less marked on all the studied stocks.

Key words: *Arbutus unedo* L., methanolic extracts, polyphenols, flavonoids, antimicrobial activity.

دراسة نشاط مضادات الميكروبات من أوراق الشجر و الفواكه القطب *unedo L* . من ثلاث مراحل النضج

الملخص

Arbutus unedo L. النبات الأصلي لمنطقة البحر الأبيض المتوسط، يعود لعائلة خلنجية *Ericaceae* ، يعرف في الجزائر تحت اسم "Lendj" أو "Ticisnou" وقد تم الحصول على مستخلصات الميثانول من أوراق وفاكهة هذه النبتة في ثلاث مراحل من النضج. فكان المرودود 15٪ بالنسبة للأوراق و 12.5٪ بالنسبة لجميع الفواكه. تم تحديد المحتوى الكلي البوليفينول باستعمال طريقة Folin-Ciocalteu، حيث كانت النتائج كما يلي: 94.78 mgEAG/gMS بالنسبة لمستخلص الأوراق ، 180.9 mgEAG/gMS ، 132.7 mgEAG/gMS و 26.16 mgEAG/gMS فيما يخص مستخلصات الفاكهة الخضراء، الصفراء والحمراء على التوالي. وقد تم تقييم الفلافونيدات باستخدام طريقة كلوريد الألومنيوم (AlCl₃)، وقد كان تركيزها 30.46 mg EQ/ g MS (مستخلص الأوراق)، 11.23 MS (مستخلص الفاكهة الخضراء)، 5.9 mg EQ/ g MS (مستخلص الفاكهة الصفراء) و 2.8 mg EQ/ g MS (الفاكهة الحمراء).

تم تحديد النشاط المضاد للميكروبات لثمانية أنواع من البكتريا (*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 21332), *Listeria monocytogenes* (ATCC 25922) , *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Salmonella sp*, *Klebsiella oxytoca* (ATCC 19606)، وأربع أنواع فطرية: *Fusarium*، *Aspergillus niger*، *Flavus*، *Penicillium* باستخدام طريقة الانتشار حول الأقراص، ومن أجل التأكيد تم تحديد أقل تركيز مثبط (MIC) وكذلك أقل تركيز مميت للجراثيم والفطريات المستهدفة. وقد اكدت النتائج المتحصل عليها أن جميع مستخلصات الميثانول لها نشاط مضاد للميكروبات لكل السلالات المستهدفة.

الكلمات المفتاحية: *Arbutus unedo L* ، مستخلصات الميثانول، مادة البوليفينول، الفلافونويد، نشاطية مضادة للميكروبات.