



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE BLIDA 1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DES BIOTECHNOLOGIES

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention

Du diplôme de master académique en science de la nature et de la vie

Spécialité : phytopharmacie et protection des végétaux

Thème

Corrélation entre le contenu polyphénolique et l'activité antimicrobienne in vivo
des feuilles de *Cupressus semperverns L*

Présenté par :

Yahiaoui Hanifa Amina

Devant le jury composé de :

Mr. MAHDJOUBI	DJ	MCB	U.BLIDA1	Président
Mme BENRIMA	A	PR	U.BLIDA1	Promotrice
Melle AITE ILEF	KH	Doctorant	U.BLIDA 1	Co promotrice
Mme. BRAHIMI	L	MCB	U.BLIDA1	Examinatrice

ANNEE UNIVERSITAIRE 2018/2019

Remerciement

Tout d'abord, je tiens à remercier Dieu de nous avoir donné la santé, la volonté et la patience pour mener à terme notre formation de master et pouvoir réaliser ce travail de recherche.

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements à mon encadreur et ma Co promotrice

Mme Benrima Atika et ma Co promotrice Mme Aïte Ilef Khouloud et M. Debibe qui nous a fourni le sujet de ce mémoire et nous a guidés de ses précieux conseils et suggestions, et la confiance qu'il nous a témoignés tout au long de ce travail.

Je tiens à gratifier les membres de jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail.

J'adresse aussi nos remerciements à Mme Amina chef de laboratoire de zoologie aussi à Mme Souhila chef de laboratoire de phytopharmacie et à Mme Karima chef de laboratoire d'amélioration Mme la doyenne Benrima, nos remerciements à Mr Zouaoui Ahmed chef de département de biotechnologie et à tous les enseignants de la spécialité phytopharmacie et protection des végétaux.

En fin, un grand merci à tous ceux qui, d'une façon ou d'une autre, ont participé à la réalisation de ce travail.

Dédicace

C'est grâce à dieu le tout puissant qui m'a donnée le courage et la volanté pour achever ce modeste travail que je dédie :

À mes chers parents (Youcef et Razika), qui ont toujours rêvé de me voir arriver à ce stade. Pour leur amour, leur confiance, leur compréhension, leur soutien, leur conseil, leur tendresse, leur orientation et leur sacrifice.

*A mon frère (Khalef et Sofiane)
Je leur souhaite le bonheur et la bonne santé.
Qu'ALLAH me les gardes.*

A tous me grande mère que le dieu protéger pour nous, mes cousines et mes oncles et mes tantes qui sont toujours à mes côtés dans les bons Moments.

Et grand hommage à ma tante Najia Allah Yerhameha qui grâce à elle que je suis là pour son encouragement et leur amour et son aide dans au cours de sa vie .

*A toute ma promo de la spécialité
phytopharmacie et protection des végétaux*

*A toute ma famille
Et à tous ceux qui me sont chers*

HANIFA AMINA.

Liste des figures

Liste des figures :

Figure 1: Cyprès vert (*Cupressus sempervirens* L) (Marcello et al., 2004)

Figure 2 : Etapes de formation de la graine du *Cupressus sempervirens* L, (2- 3 : Phase initiale avec exposition des ovules, 4- 5- 6 : Premières phases de la fécondation, 7- 8- 9 : Grossissement des carpelles et formation du jeune cône, 10- 11- 12- 13 : Développement du cône jusqu'à l'ouverture et à la production de la graine) (Marcello et al., 2004)

Figure 3 : Aire de répartition du *Cupressus sempervirens* L dans le monde (**Laarouk, 1998**)

Figure 4 : Structure de base de favonoïdes (**Richter, 1993**).

Figure 5: La morphologie générale de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) (www.fao.org),

Figure 6 : Pourriture molle d'un tubercule de Pomme de terre causée par *Pectobactérium atrosepticum*

Figure 7 : Différentes phases de l'infection de la pomme de terre par *Pectobactérium atrosepticum*. (**Hélias et al., 2000**)

Figure 8: Situation géographique de site de récolte des feuilles de Cyprès verts *Cupressus sempervirens*

Figure 9 : Evaporation sous vide par rotavapor des extraits (**Photo originale 2019**).

Figure 10 : Isolement et purification des souches bactérienne responsable de la pourriture mole de pomme de terre.

Figure 11 : Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion en milieu solide.

Figure 12: Injection de la bactérie *Pectobacterium atrosepticum* dans demi – tubercule de pomme de terre (*Solanum Tuberosum*) .

Figure 13: Les étapes suivies pour l'inoculation des tubercules de pomme de terre par la souche .

Figure 14 : le rendement d'extraction des extrais phénoliques préparés

Figure 15 : Courbe d'étalonnage pour d'acide gallique.

Figure 16 : Teneurs en polyphénols totaux des extraits de feuilles de *Cupressus sempervirens* L. (les valeurs sont exprimées en moyenne des 2 essais \pm écart type)

Figure 17 ; Aspect macroscopique des colonies isolées sur milieu EMB (a gauche)
et le milieu Hektoen (a droite) (photo originale)

Figure 18 : Aspect microscopique d'un frottis de souches isolées après coloration de
Gram

Figure 19: Résultats de la microgalérie API 20^E de la souche étudiée

Figure 20: Diamètres des zones d'inhibition de la souche *Pectobactérium atrosepticum* par les extraits et les témoins

Figure 21 : Activité antibactérienne sur milieu solide (Photo originale)

Figure 22 : Poids moyen de pourriture molle de pomme de terre après le

Figure 23 : Activité antibactérienne des extraits préparés sur les tubercules de pomme
de terre.

traitement.

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différence des caractères botaniques des trois espèces de cyprès méditerranéens endémiques de l'Algérie (**Ferrandes, 1979**).

Tableau 2 : Composition de cyprès vert (**El sanfi,2013**).

Tableau 3 : Activités biologiques des composés phénoliques (**Debibe, 2014**)

Tableau4 : description de différentes colonies isolées

Tableau5 : Matériel de laboratoire.

Liste des abréviations

Titre : Corrélation entre le contenu polyphénolique et l'activité antimicrobienne in vivo des feuilles de *Cupressus sempervirens* L .

Résumé

Le Cyprès vert est une plante très connue dans le bassin méditerranéen et il est utilisé depuis longtemps dans la médecine traditionnelle dans cette région à cause de sa richesse en composé polyphénolique . L'objectif de ce travail consiste à étudier la relation entre le contenu polyphénoliques des trois extraits préparés à base des feuilles de *Cupressus sempervirens* L sur la l'activité antibactérienne *in vivo et in vitro* de la bactérie *Pectobactérium atrosepticum* .L'extraction a été effectuée à la température ambiante en utilisant quatre solvants: (éthanol, acétone et l'eau distillée) en suivant la méthode d'une extraction solide-liquide, (par la méthode de Folin-Ciocalteu) a été effectué pour quantifier globalement les composés phénoliques présents dans nos extraits, et l'activité antibactérienne *in vitro* a été évalué par la méthode de diffusion sur disques (antibiogramme) , et *in vivo* en utilisant les demi tubercule de la pomme de terre Le dosage de polyphénols totaux montre que l'extrait aqueux est l'extrait le plus riche en polyphénols avec une moyenne de 27,68 mg EAG/g d'extrait; Et les tests *in vivo* montre que la réduction du poids de la pourriture a été nettement plus importante en présence de l'extrait aqueux comparativement à l'extrait méthnolique et l'extrait d'acéton..

Mots clés : Cyprès vert ; Pomme de terre, Extrait polyphénolique; *Pectobactérium atrosepticum*.

Abstract

Green cypress is a well-known plant in the Mediterranean basin and has long been used in traditional medicine in this region because of its rich polyphenolic compound.

The objective of this work is to study the relationship between the polyphenolic content of the three prepared extracts based on the leaves of *Cupressus sempervirens* L on the antibacterial activity in vivo and in vitro of the bacterium *Pectobacterium atrosepticum*. Extraction was performed at room temperature using four solvents: (ethanol, acetone and distilled water) using a solid-liquid extraction method (using the Folin-Ciocalteu method) has been performed to quantify overall phenolic compounds present in our extracts, and antibacterial activity in vitro has been evaluated using the disc diffusion (antibiogram) method, and in vivo using potato tuber halves. The determination of total polyphenols shows that the aqueous extract is the richest in polyphenols with an average of 27.68 mg EAG/g of extract; And the in vivo tests show that the weight reduction of the decay was significantly greater in the presence of the aqueous extract compared to the metholic extract and the acetone extract.

Keywords: Green cypress; Potato, Polyphenolic extract; *Pectobacterium atrosepticum*.

ملخص

الخضرة السبيرس نبات معروف جيدا في حوض البحر الأبيض المتوسط وقد تم استخدامه منذ فترة طويلة في الطب التقليدي في هذه المنطقة بسبب مجمه الغني متعدد الفينول.

الهدف من هذا عمل أن يدرس العلاقة بين ال [بولفنولولي] محتوى من الثلاثة مقتطفات يجهز من الأوراق من [كبرسوس] [سمرفيرس] [ل] على النشاط المضادة جرثومية في [فيفو] وفي [إين فيترو] من ال [بكتينكرن] جرثوم جذبا

تم الاستخراج بدرجة حرارة الغرفة باستخدام أربعة مذيبات: (الإيثانول والأسيتون والماء المقطر) باستخدام طريقة . تم إجراؤها لتحديد كمية المركبات الفينولية (gnault) باستخدام الطريقة المتورقة - الر) استخراج السوائل الصلبة الإجمالية الموجودة في المستخلصات الخاصة بنا، وتم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا في المختبر بواسطة القرص وطريقة الانتشار في فيفو باستخدام حبار النفثو (Biogram)

ويبين تحديد إجمالي عديد الفينول أن المقتطف المائي هو الأغنى في عديد الفينول بمتوسط 27.68 ملغ شرق المتوسط أن تخفيض الوزن من الانحلال كان أكبر بكثير في وجود المقتطف المائي in vivo من المستخلصات؛ وتظهر اختبارات... مقارنة بالمقتطف الميثانولي واستخراج أكتيون

Keywords: Green Cypress; البطاطا؛ استخراج متعدد الفينول; Pectinicorne Attractioniste.

Sommaire

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales occupent une place importante dans notre vie, ainsi elles trouvent des utilisations dans plusieurs domaines : en agroalimentaire, industries chimiques, pharmacologie et en médecine (**Manceur, 2015**).

Parmi ces plantes médicinales, on a choisi dans notre étude, la plante la plus répandue dans la région méditerranéenne et la plus riche en métabolites secondaires ; le Cyprès vert (*Cupressus sempervirens*). Plusieurs études ont montré leurs activités biologiques contre certaines espèces phytopathogène (**Ghedira, 2005 ; Mazari, 2008 ; El snafi, 2013 ; Bouyahiaoui, 2013**).

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) est l'une des plantes les plus importantes de la famille des Solanacées sa consommation est très élevée en Algérie. La culture de la pomme de terre peut subir des dommages liés à l'attaque de ravageurs , mais elle peut également être la cible de nombreuses maladies parasitaires dues à des agents pathogènes aussi variés que des champignons, des bactéries et des virus (**Lagha, 2006**).

Parmi les phytopathogènes, les plus connus et qui causent des dégâts au niveau de la production de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* l) c'est la maladie de la pourriture molle causée par le genre *Pectobacterium* (anciennement appelé *Erwinia*) cette maladie possède une importance planétaire, qui occasionne des pertes économiques considérables en culture et en entrepôt (**Slamani et Itouchene, 2016**)

Il n'existe actuellement aucun moyen de lutte efficace contre cette maladie, causée par les bactéries pectinolytiques du genre *Pectobacterium*, essentiellement. L'arsenal de pathogénécité de cette bactérie est constitué d'une variété d'enzymes extracellulaires (protéases, pectates lyases, pectates hydrolases, etc.) qui sont responsables de la dégradation des principaux constituants de la paroi végétale et de la macération des tissus.

En absence de traitement phytosanitaire efficace contre la pourriture molle, les polyphénols des plantes peuvent présenter une alternative non négligeable à exploiter. Ce travail s'inscrit dans la perspective de valorisation de Cyprès vert (*Cupressus sempervirens*) dans la lutte contre la pourriture molle par l'évaluation de l'effet

antibactérien des extraits de feuilles de cette plante *vis-a-vis* de la souche *Pectobacterium atrosepticum*.

Ce mémoire est réparti en trois volets ;

Le 1^{er} volet est une étude bibliographique consacrée à une revue non exhaustive sur le Cyprès vert *Cupressus sempervirens* et la pomme de terre (*Solanum tuberosum L.*), leurs compositions et leurs activités biologiques. Nous avons ensuite abordé une partie sur les polyphénols, en particulier leur classification et leurs activités biologiques *in vitro* et *in vivo*.

Le 2^{ème} volet est consacré à la partie expérimentale. Notre méthodologie s'articule autour de deux axes principaux :

1. Le premier axe porte sur l'extraction et le dosage des composés phénoliques des extraits de feuilles de Cyprès vert *Cupressus sempervirens*,
2. Le second axe est focalisé sur l'isolement et l'identification de l'agent causal de la maladie de la pourriture molle dans nos échantillons de pomme de terre.
3. Le troisième axe est concentré sur l'évaluation *in vitro et in vivo* de leur activité antibactérienne.

Enfin, le 3^{ème} volet est dédié à la discussion des résultats obtenus confrontés à ceux donnés par la littérature. Le travail est clôturé par une conclusion générale. Finalement des références bibliographiques sont rassemblées à la fin du document par ordre alphabétique.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

1. Généralités sur le Cyprès

1.1. Historique et origine

Au début du siècle, des peuplements spontanés de Cyprès ont été découverts. Il y a eu le *Cupressus dupreziana* au Tassili et le *Cupressus atlantica*. Ces deux espèces ont été, à un moment confondu avec le *Cupressus sempervirens*, ce n'est qu'après des études botaniques approfondies qu'il y a eu différenciation des trois espèces. **Stewart (1969)** pense qu'à l'origine il y a eu une seule espèce de *Cupressus* qui recouvrait toute la zone méditerranéenne. La différenciation entre le Cyprès vert, le Cyprès du Tassili et le Cyprès de l'Atlas s'est fait au cours du temps et serait due à l'influence du milieu.

Tableau 1 : Différence des caractères botaniques des trois espèces de cyprès méditerranéens endémiques de l'Algérie (**Ferrandes, 1979**).

Partie	<i>Cupressus sempervirens</i>	<i>Cupressus dupreziana</i>	<i>Cupressus atlantica</i>
Ramule	Court, cylindrique non distique	Disposé dans un plan.	Fin et court, nettement quadrangulaire
Ramule de 2 ^{ème} ordre	En plusieurs plans. Cônes de 2 à 3,5 cm. Mucron peu développé	En plan perpendiculaire. Glandes résinifères peu visibles. Cônes de 1 à 2,4 cm. Mucron faible	Quadrangulaire en plan perpendiculaire. Glandes résinifères visibles. Cônes de 1,8 à 2,3 cm. Mucron faible enfoncé.
Pollen	27 à 29 μ m	38,5 μ m	28,4 μ m
Graine	Irrégulière, coque épaisse, aile étroite presque orbiculaire	Presque sphérique régulière, unie, aile large et fine	Brune à aile étroite
			

1.2. Taxonomie

Embranchement	Spermaphytes
Sous Embranchement	Gymnospermes
Classe	Pinopsida
Ordre	Pinales
Famille	Cupressaceae
Genre	Cupressus
Espèce	sempervirens

1.3. Caractéristiques botaniques

1. *Catégorie* : arbre (conifère) à grande longévité, monoïque et thermophile, au tronc rectiligne à l'écorce d'un gris brunâtre fibreuse et striée verticalement, les rameaux écailleux sont bruns (**Becker et al., 1982**).
2. *Port* : élancé, conique, en étroite colonne compact et dense.
3. *Feuillage* : persistant, aromatique, vert foncé. Sur de courtes ramules, petites feuilles glanduleuses (glandes résinifères), squamiformes, imbriquées sur au moins 4 rang à la pointe émoussée.
4. *Fleurs* : à l'extrémité des rameaux, chatons mâles jaune à brun clair chargés en pollen pouvant être allergisant (en février – mars), les femelles globuleux verts réunis en bouquet à l'extrémité des jeunes pousses.
5. *Cônes* : strobiles, globulaires, vertes (3 à 4 cm) et brillantes, légèrement mucronées à 6 – 14 écailles ligneuses polygonales d'un brun clair à brun foncé à maturité (tous les deux ans), contenant de nombreuses graines ailées
6. *Taille* : l'arbre a une taille moyenne de 20 à 30 m. On distingue différentes formes de Cyprès qui par sélection, ont donné des variétés aujourd'hui bien distinctes reproduites par bouturage. On distingue notamment une forme aux branches horizontales et houppier conique : *Cupressus sempervirens* « horizontalis » et une forme colonnaire qui forme un fuseau plus ou moins étroit : *Cupressus sempervirens* « pyramidalis » ou « stricta »

7. *Graines* : les graines sont petites, mesurant de 4 à 7 mm de long. Elles portent deux ailes, de part et d'autre de la graine.
8. *Floraison* : au début du printemps, la production importante de pollen est la cause, tous les ans, de nombreuses allergies. Certaines variétés produisent beaucoup de fruits, ce qui peut nuire à l'esthétique de l'arbre, notamment chez les formes colonnaires, en provoquant une arque des branches. Certaines variétés ont été sélectionnées pour leur capacité à former moins de fruits. La pollinisation est anémogame (pollen transporté par le vent).
9. *Pollen* : les grains de pollen de Cupressacées sont morphologiquement très homogènes. Il est donc impossible de réaliser des déterminations polliniques au niveau du genre ou de l'espèce. Le genre *Cupressus* pollinifie abondamment en février – mars. Le Cyprès a un pollen au pouvoir allergisant, lorsqu'ils sont en trop grande quantité dans l'atmosphère, ils peuvent provoquer l'apparition d'allergies
10. *Enracinement* : son enracinement le fixe solidement au sol. Il assure la stabilité de l'arbre .
11. *Multiplication* : se fait par semis au printemps après avoir pris soin de conserver les graines au froid durant 3 mois (pour respecter la dormance), bouturage en fin d'été .

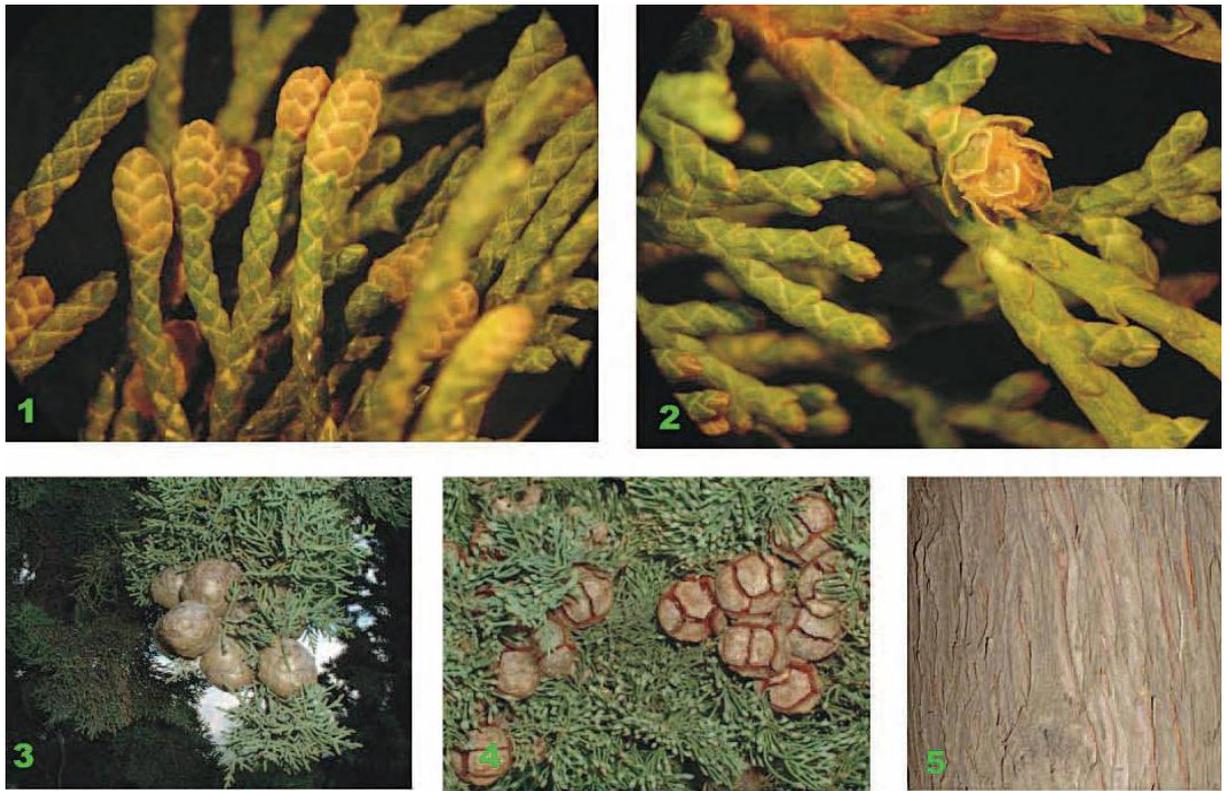


Figure 1: Cyprès vert (*Cupressus sempervirens* L) (Marcello et al., 2004)

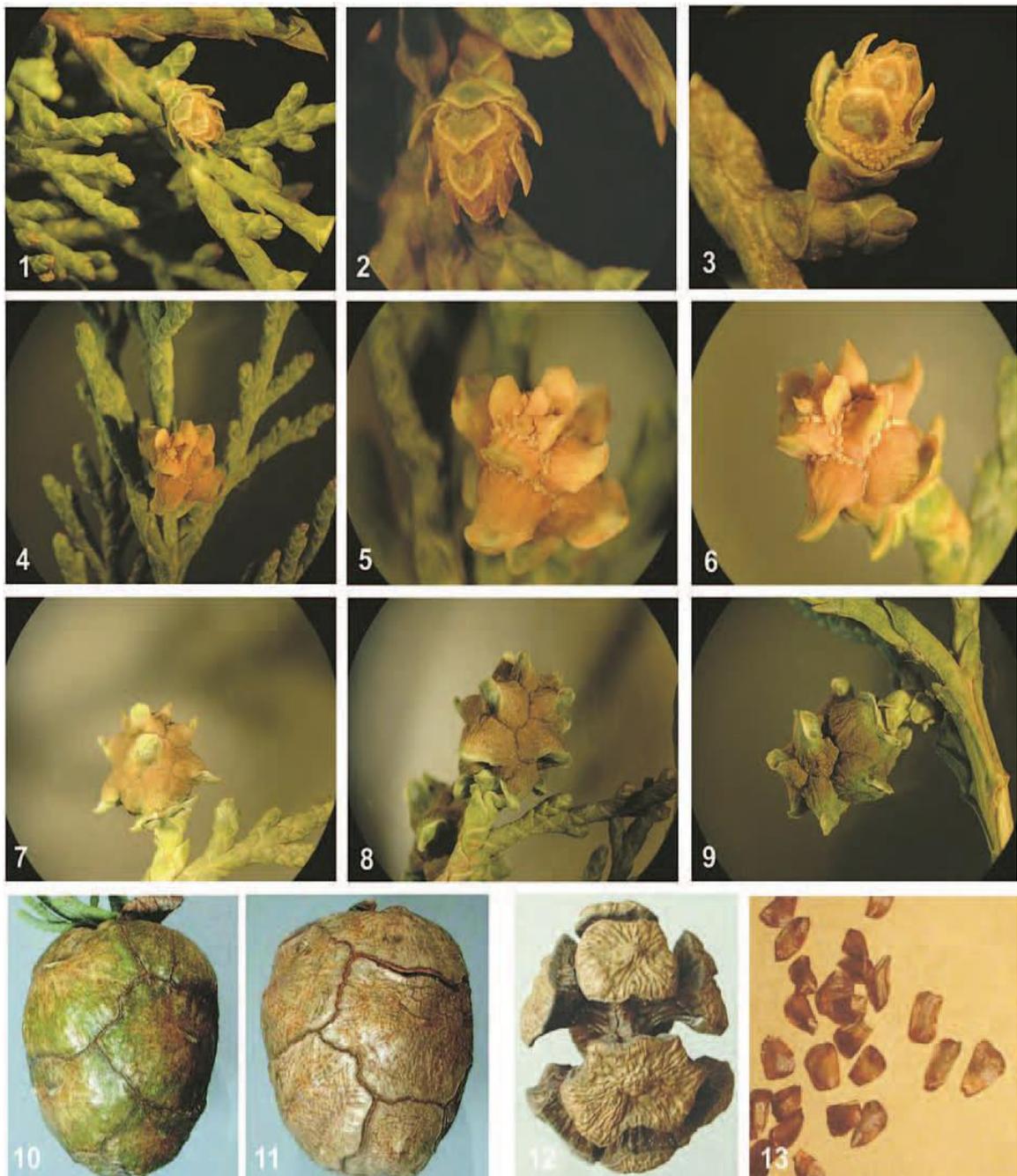


Figure 2 : Etapes de formation de la graine du *Cupressus sempervirens* L, (2- 3 : Phase initiale avec exposition des ovules, 4- 5- 6 : Premières phases de la fécondation, 7- 8- 9 : Grossissement des carpelles et formation du jeune cône, 10- 11- 12- 13 : Développement du cône jusqu'à l'ouverture et à la production de la graine) (Marcello et al., 2004)

1.4. Aire de répartition

On ne connaît pas exactement l'aire naturelle de Cyprès qui a été depuis très longtemps, planté sur tous le pourtour du bassin méditerranéen. Il est vraisemblablement spontané dans les montagnes du nord de l'Iran et sans doute aussi

en Asie mineure. Pour certains auteurs, il serait originaire de l'île de Chypre et de là, il serait propagé en Grèce, Turquie. En France, le Cyprès a été planté et se trouve dans toutes les régions côtières allant des Alpes aux Pyrénées. En Grèce, le Cyprès pousse du niveau de la mer jusqu'à la limite de la végétation (1750 m au-dessus du niveau de la mer en Crète) et constitue des forêts naturelles en Crète, à Samos, Rhodes, Kos, Simi et Millos. En Espagne, le *Cupressus sempervirens*, a été introduit seulement récemment et les espèces les plus vieilles ont environ 150 ans.

En Italie, nous ne trouvons pas de forêts naturelles de Cyprès. Des Cyprières de petite dimension se trouvent sur les collines de la côte de la mer Tyrrhénienne, de la Ligurie à la Calabre et en Sicile ; celles plus vastes et productives, sont localisées en Italie centrale, surtout en Toscane près de Florence, de Sienne et de Pise. Dans le Nord de l'Italie, le Cyprès se trouve principalement sur les rives des lacs. Au Portugal, le *Cupressus sempervirens* n'est pas très diffusé. Il serait très anciennement naturalisé partout ailleurs.

Quoi qu'il en soit, en Afrique du Nord et tout particulièrement en Algérie, il se comporte actuellement comme une essence autochtone, très bien adaptée à nos climats secs.



Figure 3 : Aire de répartition du *Cupressus sempervirens* L dans le monde (Laarouk, 1998)

2 Composé phénolique de *Cupressus sempervirens*

2. Composés phénoliques

Chaque espèce végétale a la capacité de produire des substances naturelles diversifiées comme les glucides, les protéides, les lipides et les acides nucléiques (métabolites primaires) et des métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les terpènes et stéroïdes, et les composés phénoliques. Ces composés sont différents en fonction des espèces et des relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent tels que parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi pollinisateurs, ses différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification **(Al-sanfi ,2013)** dont la fonction physiologique n'est toujours évidente, mais qui représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents tels que la pharmacologie et l'agroalimentaire **(Hamadouche ,2011)**.

2.1. Définition

Les composés phénoliques (ou polyphénols) sont des métabolites secondaires végétaux **(Darradji, 2013)**. Les polyphénols naturels regroupent un vaste ensemble de substances chimiques contenant au moins un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants. Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés, comme les tanins **(Manceur, 2015)**.

Selon **Harborne (1989)**, les polyphénols peuvent être divisés en au moins 10 classes différentes selon leurs structures chimiques de base et on peut distinguer deux grandes formes des composés phénoliques :

- Forme simple : ce sont les formes phénoliques qui présentent des structures chimiques allant de simple phénol en C6 aux flavonoïdes en C15
- Forme condensés : les tanins qui sont responsables de l'astringence de nombreuses fruits et légumes **(Al manceuri ,2013)**

Les trois classes majeures: , acides phénoliques, flavonoïdes, tanins **(Manceur ,2015)**.

2.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des substances phytochimiques ayant au moins un groupe carboxyle et un groupe hydroxy-phénolique.

On englobe sous la dénomination générale d'acides phénoliques les acides hydroxybenzoïques qui sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure en C6-C1, ils sont très communs aussi bien sous forme libre que combinée à l'état d'ester ou d'hétérosides ; et les acides hydroxycinnamiques qui dérivent de l'acide cinnamique et possèdent une structure en C6-C3 (**Bruneton, 1999 ; Cheynier, 2005**).

2.1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent l'une des classes les plus larges des composés phénoliques. Le squelette des flavonoïdes contient 15 atomes de carbone disposés en deux noyaux aromatiques reliés par un pont à 3 carbones (figure 4). Cette structure résulte des deux voies indépendantes de biosynthèse : la voie de l'acide shikimique et celle de l'acide malonique. Le groupe le plus répandu de flavonoïdes pigmentés est celui des anthocyanines, qui sont responsables de la plupart des couleurs rouge, rose, pourpre, et bleue observées chez les végétaux. En colorant les fleurs; les anthocyanines permettent d'attirer les animaux de pollinisation et donc jouent un rôle important dans la le processus de reproduction des végétaux (**Richter, 1993 ; Balasundrum et al., 2006**).

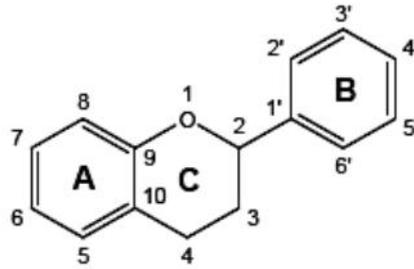


Figure 4 : Structure de base de flavonoïdes (**Richter, 1993**).

2.1.3. Les tanins

Les tanins sont des polyphénols polaires d'origines végétales (**Berthod et al., 1999**), existent presque dans chaque partie de la plante: écorce, bois, feuilles, fruits et racines, (**Cowan, 1999**).

Les tanins se subdivisent en tanins hydrolysables et condensés (**Ribereau-Gayon, 1968**).

- **Les tanins hydrolysables**

Les tanins hydrolysables sont des esters de glucides ou d'acide phénols, ou de dérivés d'acides phénols ; la molécule glucidique est en général du glucose, mais dans certains cas des polysaccharides (**Ribereau-Gayon, 1968**). Ce groupe de tanins est caractéristique des dicotylédones ; on le rencontre notamment chez les rosidées dans tous les organes : racines, tiges, feuilles ou fruits avant la maturité.

- **Les tanins condensés**

Les tanins condensés, appelés aussi polyphénols ou proanthocyanidines, sont largement répandus dans l'alimentation humaine (fruits, légumes, thé, dattes, ...). Ils jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits (**Haslam, 1998**).

D'après (**Al -snafi, 2013**), L'analyse phytochimique sur la plante de Cyprès vert a montré que le cyprès est principalement composé par ces différents Substances:

Tableaux 2 : Composition de cyprès vert (El sanfi,2013).

Substance	Pourcentage
Saponine	1,9 %
Alcaloïde	0,7 %
Tanin	0,31 %
Flavonoïde	0,22 %
Phénol	0 ,067 %

Et en plus les huiles essentielles et plusieurs autres constituants biologiques actifs (**Al snafi , 2013**). Il est constaté que ces analyse phytochimique elles sont différentes selon la variété et l'emplacement de cyprès vert (**Silme et al.,2008**)

2.2. Rôles et propriétés biologiques des composés phénoliques

2.2.1. Rôles physiologiques dans la plante

Comme la majorité des composés secondaires, les polyphénols sont produits par les plantes afin d'accomplir des fonctions précises, les plus notoires étant :

- Défense contre les pathogènes ; principalement les moisissures et les bactéries phytopathogènes.
- Insecticide ; nombreux polyphénols, flavonoïdes, provoquent une perturbation de la motricité naturelle de l'insecte. Celle – ci est altérée dès le premier jour et quatrième jour (**Haffef ,2013**).
- Dissuasion alimentaire. On parle du phénomène d'allélopathie : certaines plantes émettent des substances pour inhiber la croissance des autres plantes.

- Attraction des pollinisateurs : les couleurs, mais aussi les odeurs attirent les insectes. Exemple : certaines orchidées synthétisent des phéromones sexuelles qui sont des substances volatiles émises par les insectes femelles pour attirer les mâles.
- Protections contre les rayonnements UV.
- Molécules qui donnent des arômes et parfums aux plantes. Ce qui sert principalement à repousser les herbivores (**Sasaki et Takahashi 2002**).

2.2.2. Activités biologiques

Des effets protecteurs de polyphénols vis-à-vis de différentes pathologies (cancers, ostéoporose, maladies cardiovasculaires, diabète...) ont été mis en évidence tant d'un point de vue épidémiologique qu'expérimental. Le tableau 3 résume certaines activités biologiques.

Tableau 03 : Activités biologiques des composés phénoliques (**Debibe, 2014**)

Polyphénols	Activités	Auteurs
Acides phénols (cinnamique et benzoïque)	anti-inflammatoires Antibactériens, antifongiques Antioxydants Antitumorales Gastro-protectrice	[Umesalma et al. 2010] [Ravn et al., 1984] [Ferguson., 2001 ; Oszmianski et al., 2007] [Sarni-Manchado et Chenyier, 2006] [Ruggiero et al. 2006].

Coumarines	Vasoprotectrices et antioedémateuses et antibactérienne	[Mabry et Ulubelen, 1980] [Smyth et al., 2009]
	Digestibilité des protéines	[Lazouni et al., 2006]
Flavonoïdes	Antimicrobiens	[Shon et al., 2004]
	Antitumorales	[Garcia-Lafuente et al. 2009]
	Anti-inflammatoires	[Stavric et Matula, 1992]
	Antidiabétique	[Kim et al., 2004]
	Antioxydants	[Tripoli et al., 2007]
	antiplasmodiales	[Kim et al., 2006]
Antiosteoporotiques	[Puel et al., 2004]	
Anthocyanes	Protection des veines et capillaires, antioxydants	[Bruneton, 2009]
		[Mennen et al. 2004]
Tanins	Antioxydants, antimicrobiens, Antitumorales, Anti-inflammatoires	[Okuda et al., 1983]
		[Lazouni et al., 2006]

3. Pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.)

La pomme de terre est une source la plus utilisable dans l'alimentation humaine, et par conséquent et la plus demandée dans le marché alimentaire mondiale et ce demande abusive sur cette matière présentée un dommage pendant la plantation et la récolte de pomme de terre.

3.1 Description morphologique

La pomme de terre est une plante herbacée, tubéreuse à feuilles caduques, à port dressé, qui peut atteindre un mètre de hauteur, plus ou moins étalé avec l'âge. C'est une vivace Grâce à ses tubercules à condition que le climat leur permettent de survivre à la Saison froide mais qui est cultivée comme une plante annuelle (Valérie ,2008) figure (5).

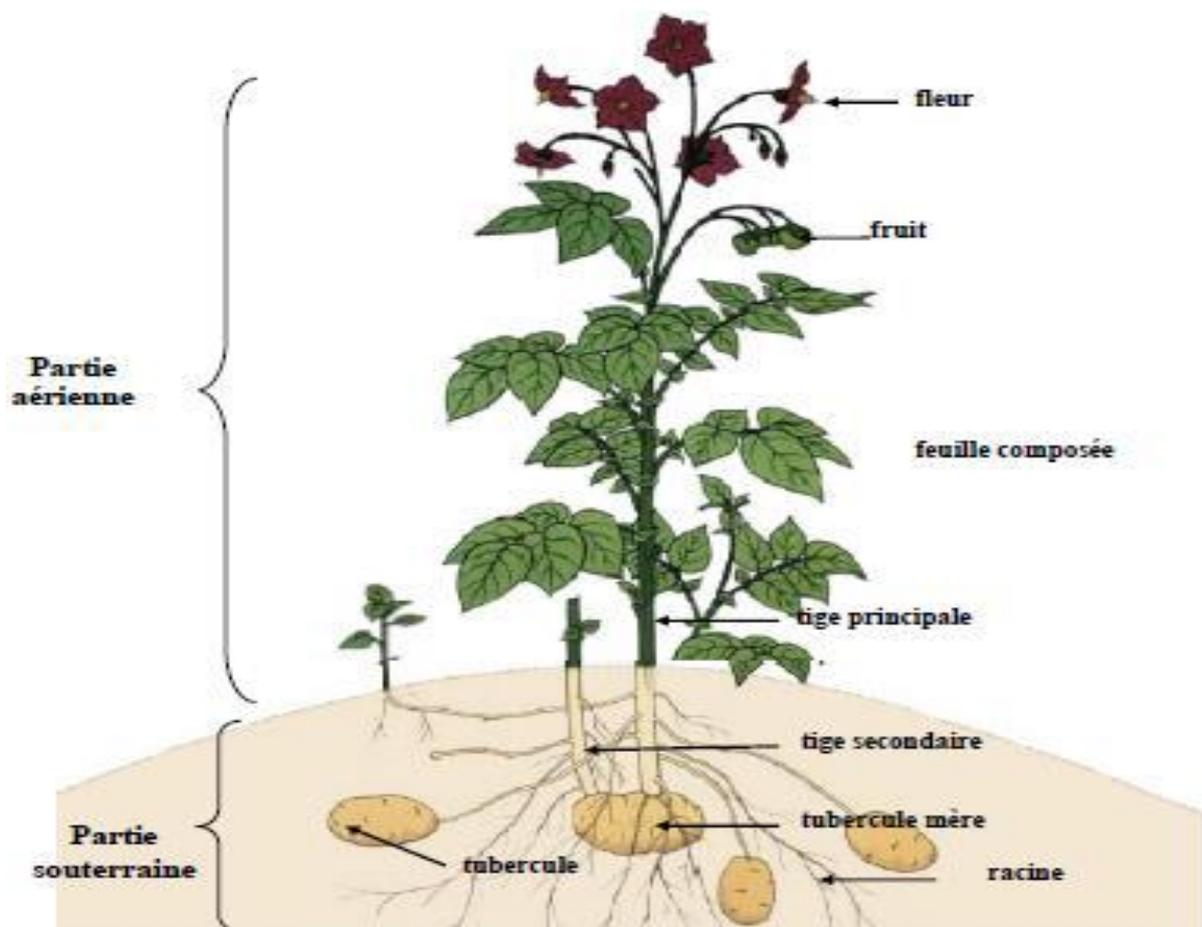


Figure 5: La morphologie générale de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) (www.fao.org),

3.2 Classification

Selon **Linné ,1785** pomme de terre appartient au

Règne :	Plantae.
Sous-règne :	Tracheobionta.
Division :	Magnoliophyta.
Classe :	Magnoliopsida.
Sous-classe :	Asteridae.
Ordre :	<i>Solanales</i> .
Famille :	<i>Solanaceae</i> .
Sous-famille :	<i>Solanoideae</i> .
Genre :	<i>Solanum</i> .

Nom binominal : *Solanum tuberosum* L.

La pomme de terre est soumise à l'attaque de maladies diverses dues à des champignons (*Phytophthora infestans* , *Fusarium sp* , ect), des virus, des bactéries (*Pectobacterium sp* ., *Pseudomonas solanacearum* ,ect .) et des nématodes. Ces pathogènes en infectant les feuillages, les racines et /ou les tubercules, provoquent des manques à la levée, un affaiblissement des plantes, une mort prématurée ou continuer à se développer sur les tubercules pendant la période de conservation telle que la galle argentée, la pourriture molle. En Algérie, 70% des causes de refus sont attribués aux problèmes phytosanitaires dont 29% à des viroses et 32% à des pourritures molles.

3.3 Agent causal

La bactéries pectinolytiques du genre *Pectobatreium* (anciennement appelé *Erwinia*) sont connues pour être responsables des dégâts occasionnés sur pomme de terre. Ce genre est divisé en deux espèces *P. chrysanthemi* et *P. carotovorum ssp.* cette diernier est divisé en cinq sous – espèce parmi les quelles deux (*P*

.carotovorum ssp. Carotovorum (Pcc) et *P.carotovorum ssp . artosepticum (pca)* sont largement inféodées à, la pomme de terre(**Lagha,2013**).

3.4 Description de la maladie

La pourriture molle est l'une des maladies bactériennes de la pomme de terre, responsable des pertes économiques importantes à l'échelle mondiale. La maladie peut se propager en entrepôt à partir de tubercules infectés au champ (**De Boer, 1994**).

En conservation (figure 7), les tubercules présentent tout d'abord de petites taches huileuses de 3 à 5 mm de diamètre au niveau des lenticelles. Les taches translucides grandissent en diamètre et en profondeur dans les conditions qui favorisent le développement de la maladie, telles que l'humidité, l'anaérobiose, etc. Le tissu s'affaisse autour du porc et forme des lésions déprimées, et les tissus sous épidermiques deviennent spongieux et se crevassent. Les parties infectées sont d'abord de couleur crème, elles passent ensuite au brun et laissent suinter une substance visqueuse d'odeur fétide (Figure 6). L'odeur est provoquée par les bactéries envahissantes secondaires qui se développent dans les tissus de décomposition.

Selon les conditions du milieu ambiant, la maladie évolue en pourriture sèche et les tubercules se momifient, ou en pourriture molle à odeur nauséabonde, leur chair noircie au contact de l'air et se liquéfie. Cette dernière est de loin la plus redoutable car elle conduit à la contamination de nombreux tubercules dans le lieu de conservation (**Grison, 1983**).



Figure 6 : Pourriture molle d'un tubercule de Pomme de terre causée par *Pectobacterium* sp.

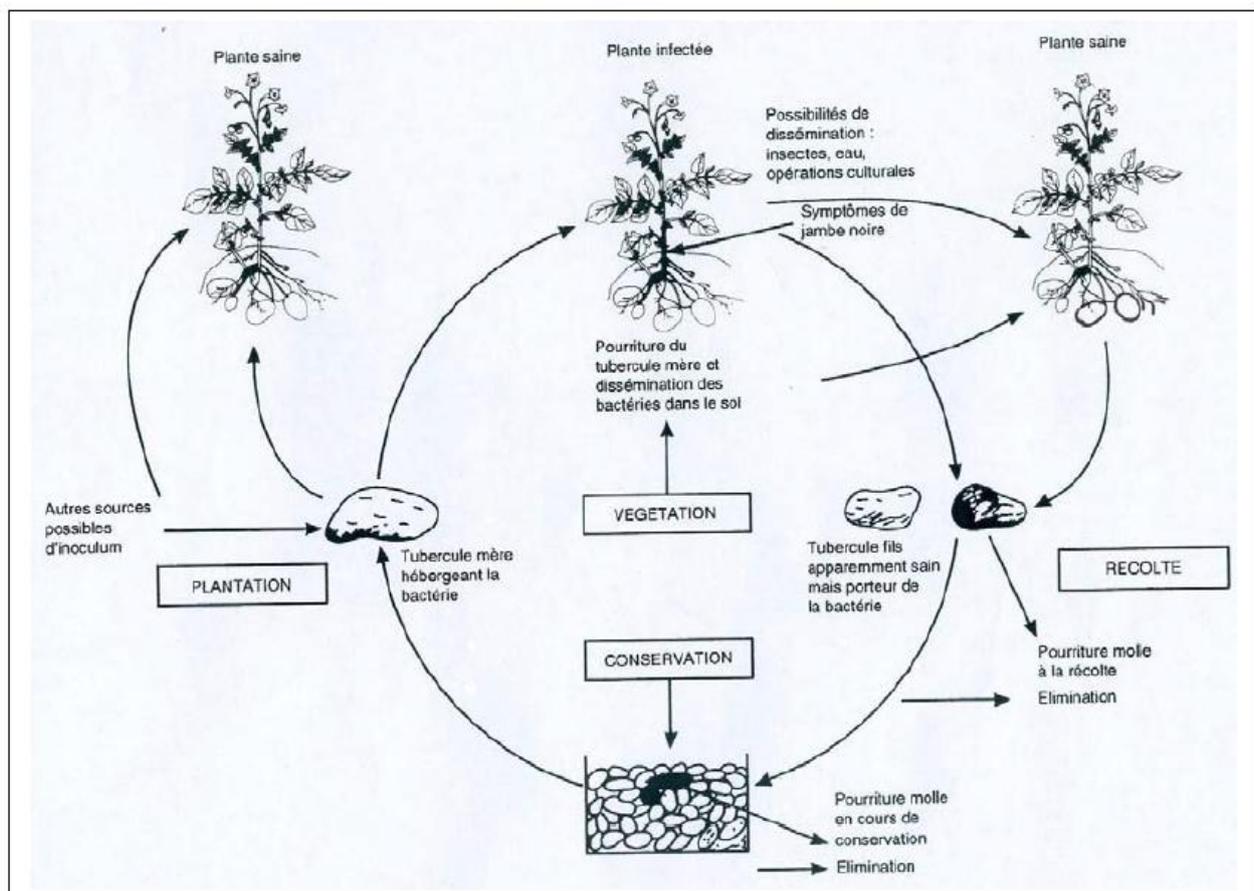


Figure 7 : Différentes phases de l'infection de la pomme de terre par *Pectobacterium* sp (Hélias et al., 2000)

Chapitre 2

Matériels et méthodes

Chapitre II : Matériel et méthode

2.1 But de l'étude

Le but de notre travail est basé sur l'étude de l'effet antibactérien des extraits polyphénoliques de *Cupressus sempervirens* vis-a-vis d'une souche bactérienne isolée de pourriture molle de pomme de terre *Solanum tuberosum* L.

Pour atteindre notre objectif nous avons suivi les étapes suivantes ;

- 1- Isoler, purifier et identifier les souches responsables de pourriture molle de pomme de terre à partir des échantillons infectés.
- 2- Extraction et dosage des polyphénols de trois extraits préparés à partir de feuilles de Cyprès vert *Cupressus sempervirens* L.
- 3- Evaluation de l'activité antibactérienne *in vitro* par la méthode de diffusion en milieu solide. et *in vivo* sur des tubercules de pommes de terre.

2.2. Lieu de l'étude.

Notre étude s'est étalée sur une période de 4 mois, d'avril jusqu' à juillet 2019.

Les différentes expérimentations ont été effectuées dans les structures suivantes :

- Laboratoire de phytopharmacie et protection des végétaux et zootechnique du département biotechnologie (Université de Blida 1) afin de préparer les différents extraits phénolique.
- Laboratoire de microbiologie (Université de Blida 1) ou nous avons réalisé les différents tests microbiologiques.

2.3 Récolte des plantes : Collections des échantillon

Les feuilles de *Cupressus sempervirens* sont récoltées dans la station expérimentale de la faculté de sciences de la nature et de la vie de l'université de Blida1. La récolte est faite d'une manière aleatoire a partir de plusieurs sites en Mars 2019 et la confirmation de l'espèce est réalisée par l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitiere et de Vigne (ITAF). Le positionnement géographiques de site de récolte est montré dans (figure 8) .

Les tubercules de pomme de terre ont été achetés d'un marché local a Blida

La plante a été sélectionnée sur la base de sa richesse en composés phénoliques, peu d'études qui se sont intéressées à ces extraits phénoliques et sa disponibilité dans la wilaya de Blida.

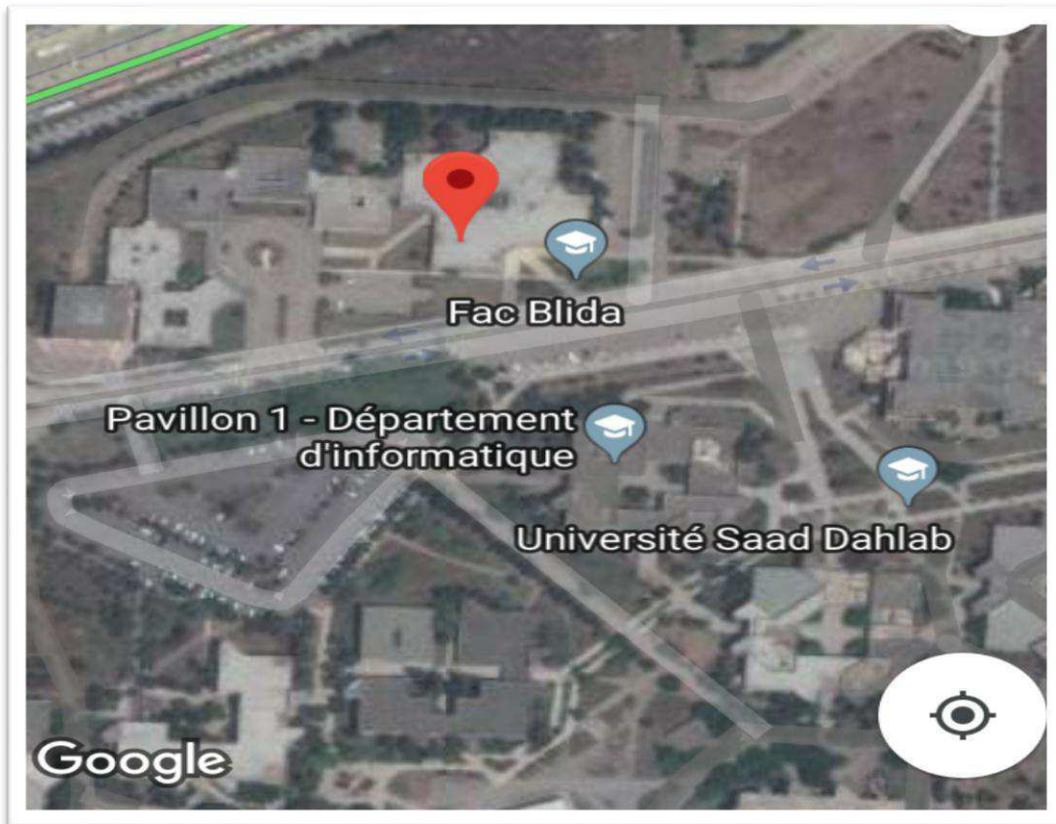


Figure 8: Situation géographique de site de récolte des feuilles de Cyprès verts *Cupressus sempervirens*(Google)

2.4 . Conservation du matériel végétal

2.4.1 Séchage

Les feuilles de forme horizontale d'espèce *Cupressus sempervirens* est débarrassé des débris, est séché à l'air libre, à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant une dizaine de jours (Doymaz et al., 2004).

2.4.2 Broyage et tamisage

Les feuilles séchées sont broyées en poudre assez fine à l'aide d'un broyeur électrique. Cette dernière est tamisée pour obtenir des particules de tailles plus ou

moins homogènes. La poudre ainsi obtenue est conservée dans des boîtes en verre fermées à l'abri de la lumière et de l'humidité en vue d'une utilisation ultérieure (**Wong et kits, 2006**).

2.5 Extraction des polyphénols des feuilles de *Cupressus sempervirens*

2.5.1 Mode opératoire

On a utilisé dans cette étude, une méthode d'extraction solide-liquide. Le protocole d'extraction des polyphénols est celui décrit par **Wong et al (2006)** avec quelques modifications apportées au protocole, elle consiste à une macération de 20g de poudre de matériel végétal sec dans 320 ml d'éthanol 96% et acétone 99,5 % et l'eau distillée pure pendant 24 heures.

Le mélange est soumis à une agitation continue à l'aide d'un agitateur à hélice à une température ambiante et à l'obscurité (le bécher de macération est bien enveloppé avec du papier aluminium). Ensuite ils ont été filtrés (papier whatman N°5) et concentrés par évaporation sous pression réduite à 60°C pour qu'il n'y ait pas de dégradation des polyphénols à l'aide d'un rotavapor (BÜCHI Rotavapor R-200). Enfin, les résidus secs obtenus ont été récupérés dans 5 ml de solvant. Les extraits ainsi préparés en été conservés à 4°C (**EI –Mansouri ,2013**) (figure 9).

En effet, très volatiles dans la nature, les extraits phénoliques peuvent rapidement perdre leurs propriétés. Très vite, elles commencent à vieillir, généralement au bout de 6 mois. Au mieux, elles peuvent conserver leurs propriétés thérapeutiques. Pour cela, elles doivent être impérativement gardées à l'abri de l'air, de la lumière et de la chaleur, et contenues dans des flacons en verre opaques ou teintés (en bleu ou brun) hermétiquement clos, entreposés debout (**EI –Manceouri ,2013**)



Figure 9 : Evaporation sous vide par rotavapor des extraits (**Photo originale 2019**).

- Le rendement d'extraction a été calculé selon la formule suivante :

$$R = \frac{\text{Masse d'extrait obtenue}}{\text{Prise d'essais}} \times 100$$

2.8. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols sont estimés par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite dès 1965 par Singleton et Rossi. Et modifiée ensuite par plusieurs auteurs (**Singleton et al., 1999**).

➤ *Principe*

Les composés phénoliques réagissent avec le réactif de Follin-ciocalteu. Ce dernier est composé d'un mélange jaune d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PM_{12}O_{40}$) qui se réduit lors de l'oxydation des polyphénols, en oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 765nm est proportionnelle aux taux des composés phénoliques

2.8.2 Mode opératoire

Le protocole de dosage des polyphénols totaux utilisé dans notre travail est celui décrit par **Hayouni et al. (2007)** avec quelques modifications.

Les extraits préparés ont été dilués 10 fois pour avoir une absorbance comprise entre 0.8 et 1. Ensuite 1000 μ L de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois dans de l'eau ultra pure) sont ajoutés à 200 μ L d'extrait. On ajoute ensuite 800 μ L de Na_2CO_3 (75g.L-

1). Le blanc de la réaction ne contenant pas de polyphénols est réalisé comme le point 0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de la gamme d'étalon. Les mélanges réactionnels, sont agités et incubés 5 min à 40°C.

La lecture de l'absorbance à 765 nm se fait grâce à un spectrophotomètre à UV (Ultraviolet) visible, notons qu'une droite d'étalonnage est préalablement réalisée avant l'analyse avec de l'acide gallique (0, 12.5, 25, 50, 100 et 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dans les mêmes conditions. Toutes les expériences ont été répétées trois fois et les résultats ont été déterminés par l'équation de régression de la courbe d'étalonnage, et sont exprimés sous forme de moyennes en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g d'extrait).

Calcul de concentration des polyphénols des extraits

La concentration des extraits est calculé par la formule suivante (**Bssaibis et al., 2009**) :

$$[\text{polyphénols}] = \frac{a \cdot f}{b}$$

a : concentration des polyphénols en $\mu\text{g}/\text{ml}$ déterminée à partir de courbe étalon.

f : facteur de dilution (x10)

b : concentration initiale des extraits.

2.8 Préparation d'essai in vivo

Protocole est décrit par (**Lagha ,2007**) avec quelque modification apportée

2.8.1 Isolement des bactéries

A partir d'une pomme de terre infectée nous avons réalisé un prélèvement de pourriture dans un bouillon nutritif. Après une incubation de 24heures à 37c° un isolement par ensemencement en stries a été réalisé sur trois milieux de culture différents (gélose nutritive Mac conkey et gélose Hektoen spécifiques pour l'isolement des bactéries à Gram négatif), puis les boites de Pétri ont été incubées à l'étuve pendant 24 heures à 37c°(figure 10).



Figure 10 : Isolement et purification des souches bactérienne responsable de la pourriture mole de pomme de terre.

2.8.2. Identification des souches isolées

2.8.2.1 Coloration de Gram

❖ Principe

La coloration de Gram est une coloration différentielle : Elle permet de classer les bactéries en deux groupes (Gram+ et Gram-) sur la base de la perméabilité de leur paroi à l'alcool (ou à l'alcool/acétone). Cette perméabilité dépend de la composition de la paroi bactérienne (épaisseur de la paroi liée à sa richesse en peptidoglycane), comme elle permet de visualiser facilement les bactéries et de donner des indications sur leurs formes et leurs tailles.

Cette technique a été mise au point en 1884 par Hans Christian Gram et elle garde toute sa pertinence même dans un laboratoire plus sophistiqué en raison de sa rapidité et de l'orientation diagnostique qu'elle donne.

❖ Technique

- Préparation d'un frottis : prélèvement à l'aide de l'anse à ensemencement ou d'une pipette pasteur une parcelle de la colonie à étudier et la déposer sur une goutte d'eau sur une lame propre et la bien étaler afin d'éviter les agglomérations des bactéries.
- Fixation du frottis : en passant la lame sur la flamme (le côté sur lequel est étalé l'échantillon est dirigé vers le haut) puis laisser refroidir.

❖ Coloration

- 1- La coloration primaire: Couvrir complètement la lame de violet de gentiane pendant 30 secondes à 1 minute puis rincer à l'eau.
- 2- La fixation au Lugol : Couvrir la lame de Lugol pendant 30 secondes puis rincer à l'eau.
- 3- La décoloration à l'alcool: Verser quelques gouttes d'alcool sur le frottis tenu verticalement jusqu'à ce que l'alcool s'écoule non teinté (5 secondes environ). Rincer à l'eau.
- 4- La coloration secondaire : Recolorer par de la Fuschine en versant le colorant en bout de lame et en le faisant glisser le long de la lame. Ne pas verser la Fuschine sur le frottis pour éviter une coloration trop intense. Laisser agir de 1 minute à 30 secondes. Rincer avec l'eau et laisser sécher.

❖ Lecture de résultat

- Observer la lame au microscope (avec une goutte d'huile à immersion, au grossissement 1000x).
- On distingue :
 - Bactéries à Gram positif (paroi épaisse) qui sont colorées en violet foncé/bleu.
 - Bactéries à Gram négatif (paroi mince) qui sont colorées en rouge/rose.

2.8.2.2. Identification biochimique

Des tests biochimiques caractéristiques ont été utilisés pour vérifier l'appartenance des souches isolées au genre *Pectobacterium sp.* Il s'agit de l'activité fermentative sur milieu Hugh et Leifson, la réduction des nitrates et l'utilisation du lactose, du trehalose et de citrate. D'autres tests sur la galerie API 20^E.

Test d'oxydase

Test de détection de l'enzyme phénylène diamine oxydase chez les bactéries Gram négatif qui le produisent.

❖ **But** : Différencier les Entérobactéries des Pseudomonas

❖ **Technique**

A l'aide d'une pince, placer un disque d'oxydase sur une lame porte-objet puis prélever une colonie bien isolée et représentative de la culture fraîche à tester et la frotter doucement sur le disque et observer.

❖ **Résultat**

- Réaction positive : coloration bleu foncé à violet apparaissant dans un délai de 30 secondes.
- Réaction négative : absence de coloration.

❖ **MEVAG : Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides.**

Principe

Les bactéries peuvent utiliser les glucides par deux voies métaboliques différentes ou ne pas utiliser les glucides, on définit ainsi :

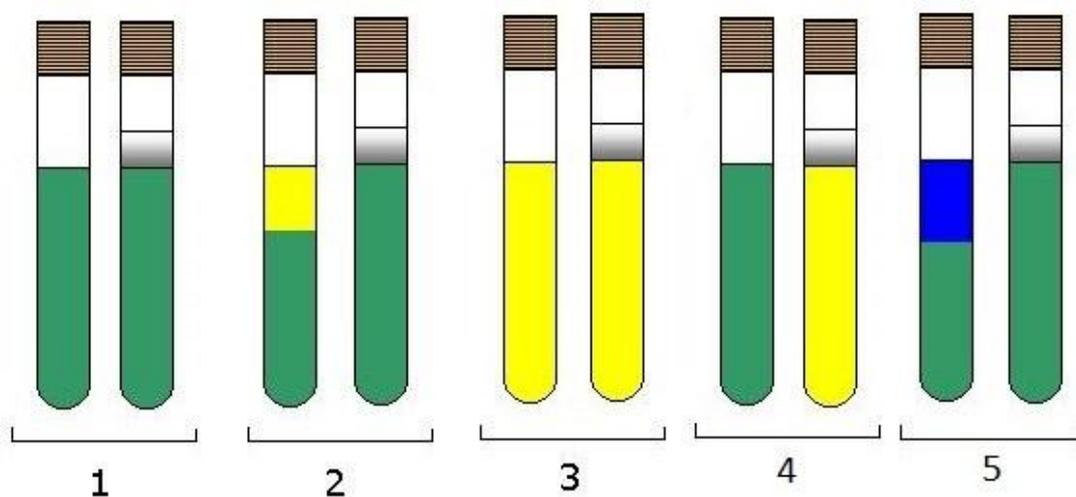
- Une voie fermentative : dans laquelle toutes les réactions peuvent avoir lieu en présence ou en absence d'oxygène (avec formation de catabolites de dégradation en particulier acides, qui s'accumulent dans le milieu et font baisser le pH)
- Une voie oxydative : dans laquelle l'oxygène est obligatoirement utilisé, et peu de catabolites acides sont formés.
- Une voie inerte : dans laquelle il n'y a pas d'utilisation du glucide, quelles que soient les conditions d'incubation : souche inerte vis-à-vis du glucide.

Mode opératoire

- Faire fondre en portant à ébullition deux tubes de Hugh et Leifson.
- Refroidir en mettant au bain marie à 45 -50 °C, puis ajouter aseptiquement dans chaque tube 7 gouttes d'une solution de glucose à 30% pour obtenir une concentration finale de 1%.
- Mélanger et refroidir le milieu en plongeant les tubes dans de l'eau froide.

- Ensemencer l'un après l'autre les deux tubes pas piqûre centrale a la pipette pasteur boutonnée et chargée avec une suspension bactérien en rechargeant le pipette.
- Ajouter de la paraffine liquide sur une hauteur de 1 cm dans le premier tube ensemencé.
- Dévisser légèrement les bouchons.
- Placer les deux tubes dans l'étuve a 37°C pendant 24 heures.

Lecture



Tube 1 : peu ou pas de culture (pas d'utilisation du glucose) absence d'acidification : Métabolisme inerte.

Tube 2 : pour le tube avec paraffine il y a peu ou pas de culture et une absence d'acidification. Dans le tube sans paraffine, il y a une acidification modéré, généralement le haut du tube est jaune et le reste est vert : Métabolisme oxydatif.

Tube 3 : les deux tubes sont jaunes, acidification dans les deux tubes : Métabolisme fermentatif du glucose.

Tube 4 : acidification dans le tube avec paraffine seulement : Métabolisme fermentatif seul.

Tube 5 : le haut du tube est bleu, bactéries inertes au glucose : utilisation des peptides comme source d'énergie

Galerie Api 20E

Après la coloration de Gram les souches sont identifiées par les galeries biochimiques API 20E (Analytical Profile Index)

➤ Principe

D'après **Freney et al., (2007)**, la galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substances déshydratés. Au-dessous de chaque tube, un sigle indique la nature du test. Les tubes sont ensemencés avec une suspension bactérienne effectuée en eau distillée stérile. La réaction produite au cours du procédé d'incubation se traduit par les virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactif.

Un fond et couvercle complètent la galerie et permettent de constituer une boîte d'incubation.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide d'un tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide de la base de données API 20E (Bio-Mérieux).

➤ Technique

• Préparation de la galerie

- On place de l'eau distillée dans les alvéoles présentes dans le fond de la boîte afin de créer une atmosphère humide.
- On dépose aseptiquement la galerie dans la boîte d'incubation.

• Préparation de l'inoculum

On prélève à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée une colonie suspecte parfaitement isolée puis la dissocie soigneusement dans le tube contenant préalablement l'eau distillée stérile.

• Inoculation de la galerie

- ❖ Remplir les tubes et cupules des tests CIT, VP et GEL avec la suspension bactérienne et uniquement les tubes des autres tests.

- ❖ Réaliser une anaérobiose dans les tests ADH, LDC, ODC, H₂S, URE en remplissant leur cupule d'huile de vaseline stérile.
- ❖ Refermer la galerie et l'incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.
- ❖ Après incubation, noter sur la fiche de résultat, toutes les réactions spontanées. La révélation des trois TDA, VP et indole est faite par l'ajout des réactifs nécessaires (TDA, VP1, VP2 et KOVACS).

➤ **Lecture**

La lecture des galeries API 20E se fait selon les indications du fournisseur. Après codification des réactions en un profil numérique :

- les tests seront regrouper en groupe de 3 prennent les chiffres (1,2ou 4) pour un test positive et le chiffre 0 pour un test négative.

On obtient un nombre de 7 chiffres (profil numérique). L'identification est alors obtenue en comparant avec le catalogue analytique

2.8.2.3. Etude de l'activité antibactérienne des extraits *in vitro*.

Pour évaluer l'activité antibactérienne, on a utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé (figure 11). Le principe de cette méthode est d'utiliser des disques de 9mm de diamètre. Les disques ont été imprégnés par 50µl de des différentes solutions des extraits Puis déposés à la surface d'un milieu écouvillonné par une suspension bactérienne d'une densité optique de 0.5Mc Farland. A la fin la durée d'incubation 18-24 heures à 37 °C, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés (**Debib et al., 2014**).



Figure 11 : Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion en milieu solide.

2.8.2.4. Etude de l'activité antibactérienne des extraits sur des tubercules de pommes de terre.

Mode opératoire

Les tubercules de pomme de terre sans blessures ni maladies, sont utilisés pour les tests de pathogénicité. La méthode d'inoculation des demi-tubercules, décrits par **Ibrahim et al. (1978)** est utilisée pour tester la sensibilité de cet agent pathogène vis-à-vis des extraits préparés.

Une suspension bactérienne de 18 à 24 heures est préparée avec de l'eau physiologique à 0.9%,

Chaque tubercule est coupé longitudinalement en deux parties égales et un puit de 10 mm de diamètre x 10 mm de profondeur est creusé à l'emporte-pièce au centre de chaque demi tubercule. Les puits formés sont inoculés par 100 μ l d'une suspension bactérienne prélevés à partir des bouillons nutritifs. Les demi-tubercules témoins sont remplis avec de l'eau distillée stérile.

Les demi-tubercules ainsi préparés sont disposés dans des bacs en plastique enveloppé avec papier aluminium et disposé au-dessus un papier absorbant de cuisines humidifiées avec 100 ml d'eau physiologiques et couverts à l'aide d'un film en plastique de façon à créer une atmosphère confinée et humide. Après 6 jours d'incubation à température ambiante (27 à 28°C), on est procédé à des observations pour noter le développement de la maladie signe d'une pathogénicité de la souche. Cette dernière est testée sur demi-tubercules (figure 12).



Figure 12: Injection de la bactérie *Pectobacterium sp* dans demi-tubercule de pomme de terre (*Solanum Tuberosum*).

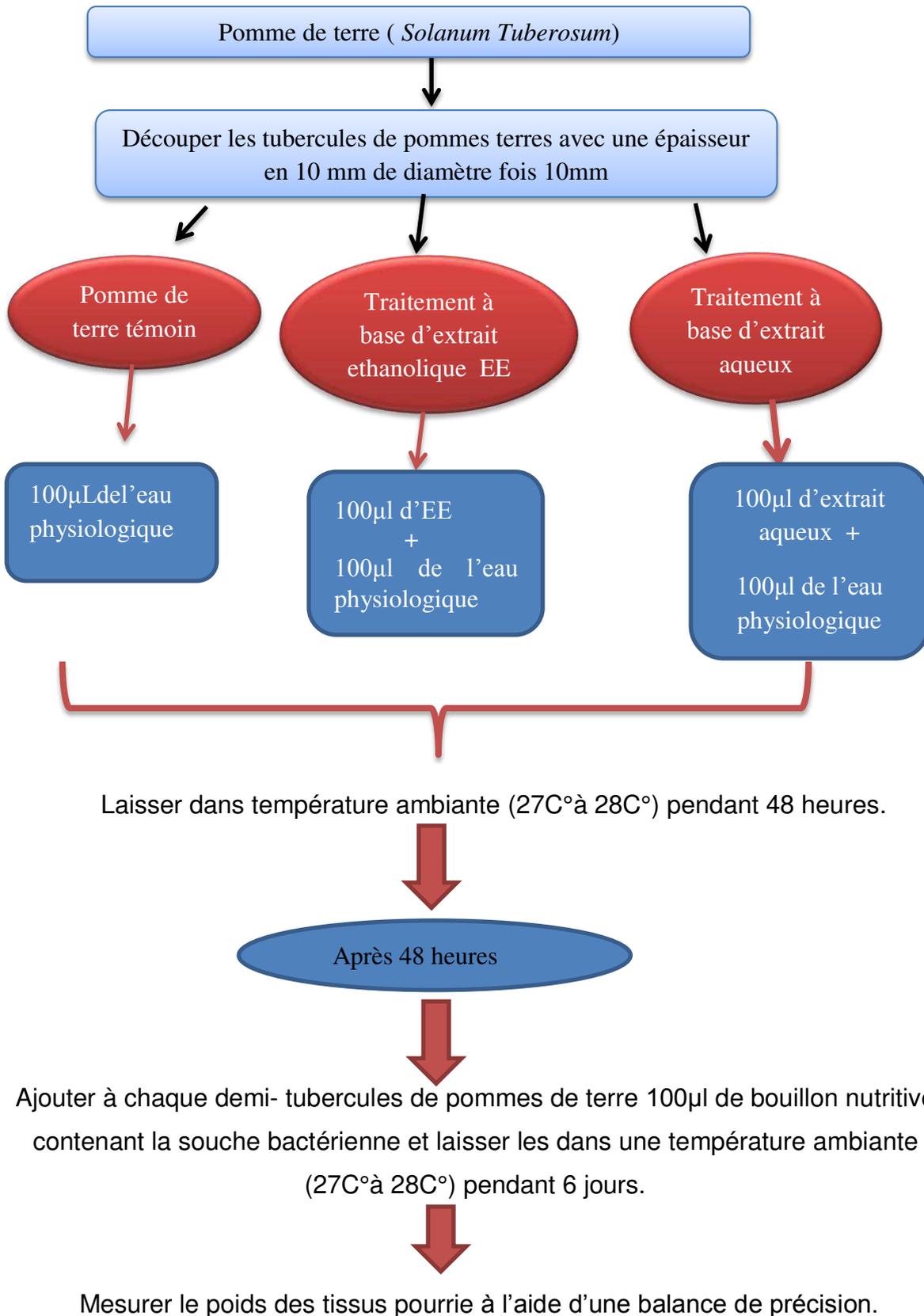


Figure 13: Les étapes suivies pour l'inoculation des tubercules de pomme de terre par la souche .

Chapitre 3

Résultats et discussion

Chapitre 3 : Résultats et discussion

3.1. Rendement en extrait sec

Notre objective est de choisir un solvant très efficace pour notre échantillon, et selon la recherche bibliographique qui suggère que la méthode d'extraction doit permettre l'extraction complète des composés d'intérêt et doit éviter leur modification chimique, nous avons testé trois solvants : l'éthanol, l'acétone et l'eau distillée .

Il ressort de l'analyse des résultats illustrés si dessous, que les meilleurs rendements ont été obtenus par l'extrait aqueux qui représente le rendement le plus élevé, suivi par l'extrait d'acéton. Juste après, il vient l'extrait éthanolique, marqué par son rendement plus ou moins faible.

Ces résultats corrèle avec d'autres travaux antérieurs (**Falleh et al., 2008 ; Debib et al., 2014**) qui suggèrent que le rendement variable des extraits revient à la solubilité différentielle des différents composés phénoliques dans les solvants et que cette solubilité est en fonction de leur degré de polymérisation, l'interaction avec les autres constituants et le type de solvant utilisé.

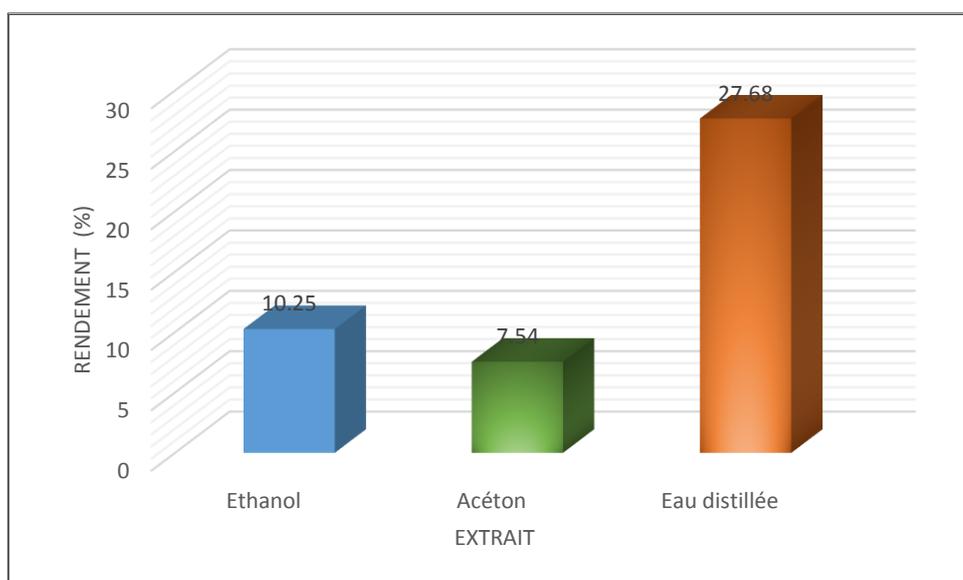


Figure 14 : le rendement d'extraction des extrais phénoliques préparés

3.2. Dosage spectrophotométrique des polyphénols totaux des feuilles du Cyprés vert

Les teneurs en polyphénols totaux des EA, EE et ED des feuilles de *Cupressus sempervirens* L. ont été déterminées par la méthode colorimétrique, en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. La teneur en composés phénoliques totaux de différents extraits des feuilles du Cyprés vert (*Cupressus sempervirens*) est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage (figure 15). Les quantités des polyphénols correspondantes ont été exprimées en milligrammes d'équivalent en acide gallique par un gramme d'extrait et déterminées par l'équation de type : $y = 0.0094x + 0.2317$

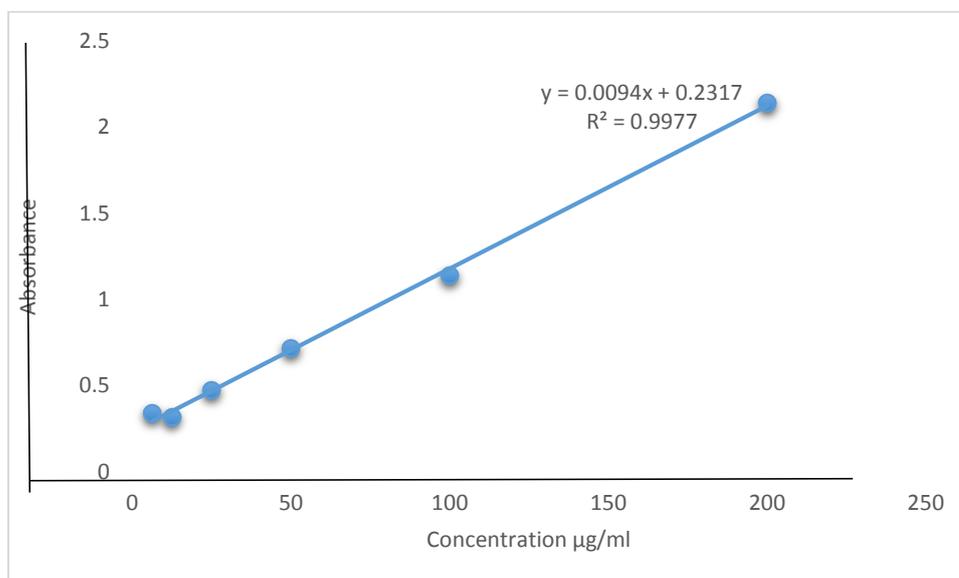


Figure 15 : Courbe d'étalonnage pour l'acide gallique.

A la lumière de cette courbe d'étalonnage, Le contenu phénolique total de trois extraits est représenté dans la figure suivante :

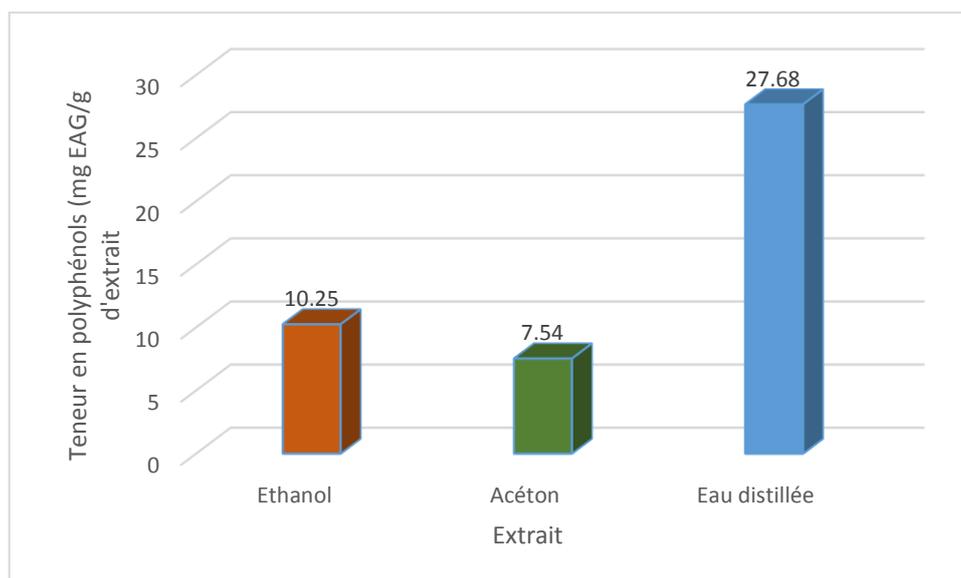


Figure 16 : Teneurs en polyphénols totaux des extraits de feuilles de *Cupressus sempervirens* L. (les valeurs sont exprimées en moyenne des 2 essais \pm écart type)

Selon les résultats illustrés ci-dessus, on distingue que la teneur polyphénolique des feuilles de *Cupressus sempervirens* dépend de la polarité du solvant et du mode d'extraction. Nos résultats montrent que l'extrait aqueux est l'extrait le plus riche en polyphénols avec une moyenne de 27,68 mg EAG/g d'extrait. Par contre les valeurs des polyphénols de l'extrait d'acétone et l'extrait éthanolique sont très proches.

Selon **Falleh et al., 2008** Le contenu polyphénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques. Un de ces facteurs est le système de solvants d'extraction (**Ouedraogo et al., 2015**).

Selon Seidel (2005), l'eau et le méthanol sont deux solvants polaires qui extraient particulièrement les flavonoïdes glycosylés et les tannins. Tandis que les flavonoïdes aglycones sont extraits par les alcools ou les mélanges eau-alcool.

Toutefois, il faut noter que la faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines etc (Vuorela, 2005). Ainsi, le solvant d'extraction élu des substances non phénoliques comme les sucres,

les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique (**Georgé et al., 2005**).

Généralement et selon la littérature scientifique Le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement selon plusieurs facteurs :

- Facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies...etc. (**Ebrahimi et al., 2008**).
- Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante (**Miliauskas et al., 2004**), le type de polyphénol, l'état de santé du fruit, la méthode de récolte et de stockage (**Stratil P et al., 2007**).
- La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux (**Lee et al., 2003**).

Il a été prouvé que les teneurs des phénols totaux sont élevées lorsque le milieu de vie de la plante n'est pas adéquat, dans ce cas la plante favorise la synthèse des métabolites secondaires afin de s'adapter et survivre (**Tim Andrew 2005, Piquemal 2008**).

3.3. Identification des souches isolées

Après l'isolement et la purification de trois souches bactérienne isolées de la pourriture mole de pomme de terre nous avons identifié une seule espèce *Pectobacterium atrosepticum*.

3.3.1. Examen macroscopiques

Tableau4 : description de différentes colonies isolées

Milieux de cultures	Identification phénotypique des colonies				
	couleur	Forme Relief	Opacité consistance	Contour Bords	Taille

EMB	-incolore	-ronde plate	- Translucide Sèche	Irréguliers	~ 2-3mm
Hektoen	Verdâtre	-Ronde, Plate	-Opaque crémeuse	irrégulier	~ 1-2m

L'observation macroscopique des colonies sur les milieux sélectifs EMB et Hektoen nous a permis d'orienter l'identification qui a été confirmée par les tests biochimiques de la galerie API 20^E.



Figure 17 ; Aspect macroscopique des colonies isolées sur milieu EMB (a gauche) et le milieu Hektoen (a droite) (photo originale)

• 3.3.2. L'observation de l'état frais et coloration de Gram

L'observation microscopique a montré que ces bactéries Coccobacille, Gram-, mobiles.

D'après la coloration de Gram, ces derniers apparaissent avec une couleur rose ; ce qui signifie qu'ils font partie des Gram négatifs

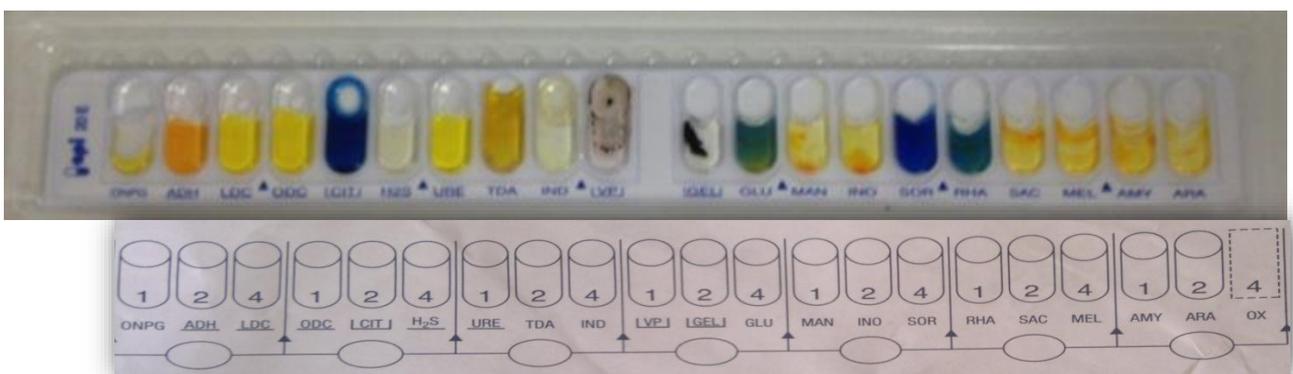


Figure 18 : Aspect microscopique d'un frottis de souches isolées après coloration de Gram

L'étude de type respiratoire sur le milieu MEVAG et la recherche de l'oxydase ont montré que notre souche est oxydase négative et elle est aerobie anaerobie facultatif.

Identification biochimique par la galerie API 20^E

Après l'orientation de l'identification nous avons confirmé l'identification par un ensemencement sur la galerie API 20^E . Les résultats sont illustré dans la figure 19 .



Lecture de la galerie	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Erwinia spp selon API	13	3	1	0	5	0	0	0	0	88	17	97	77	3	26	1	91	19	42	41

Figure 19: Résultats de la microgalérie API 20^E de la souche étudiée

La comparaison des résultats expérimentaux avec les pourcentages de réaction positives mentionnés dans le tableau d'identification proposé par biomérieux nous a permis d'identifier la souche isolée comme *Pectobactérium atrosepticum* appartient à l'ancien genre *Erwinia*. Les Résultats des caractères biochimiques ont montré que notre souche elle est

ONPG +, ADH -, LDC -, ODC -, CIT+, H₂S -, URE -, TDA -, IND-, VP +, GEL +, GLU+ ; MAN+, INO-, RHA -, SAC +, MEL+, AMY +, ARA +

3.4. Activité antibactérienne

3.4.1 Sensibilité des extraits phénolique de cyprès vert *vis-à-vis*

Pectobactérium atrosepticum. sur milieu solide

L'activité antimicrobienne des trois extraits (Ethanolique, d'acéton et extrait aqueux) des feuilles de *Cupressus sempervirens* L .s'est manifestée par l'apparition des zones d'inhibition autour des disques imprégnés d'extrait étudié.

Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'un extrait un autre. Il apparait clairement de la figure 00 que l'extrait d'acéton a le meilleur effet antibactérien avec une zone d'inhibition de 15.30 mm suivi par l'extrait ethanologique alors que l'extrait aqueux possède l'effet antibactérien le plus faible.

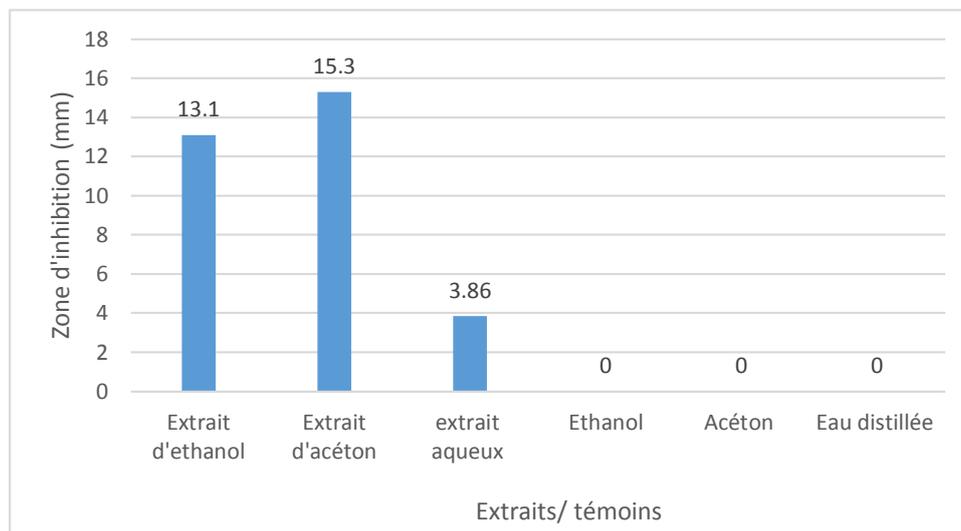


Figure 20: Diamètres des zones d'inhibition de la souche *Pectobacterium atrosepticum* par les extraits et les témoins

L'activité antibactérienne des extraits de plantes est due aux différents agents chimiques présents dans ces extraits, y compris les flavonoïdes et les triterpénoïdes ainsi que d'autres composés de nature phénolique ou groupes hydroxyle libres, qui sont classifiés comme composés antibiotiques très actifs (Rojas et al. 1992 ; Marjorie, 1999).

La variation de la composition chimique explique donc les variations observées dans l'activité antimicrobienne des extraits d'une même plante ou de plantes différentes. L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composés à l'origine de cet extrait (Essawi et Srour, 2000). Pour cela, la comparaison cas par cas de l'activité antimicrobienne de plusieurs extraits, en se basant sur le dosage d'un seul constituant actif (polyphénols dans notre cas), nous semble inutile.

Nos extraits ont été tous trouvés contenir une quantité de polyphénols plus ou moins importante, donc on peut dire que l'activité antibactérienne de ces extraits est due, au moins partiellement, à la présence de ce type de composés chimiques actifs dans leur composition, surtout pour les extraits polaires.

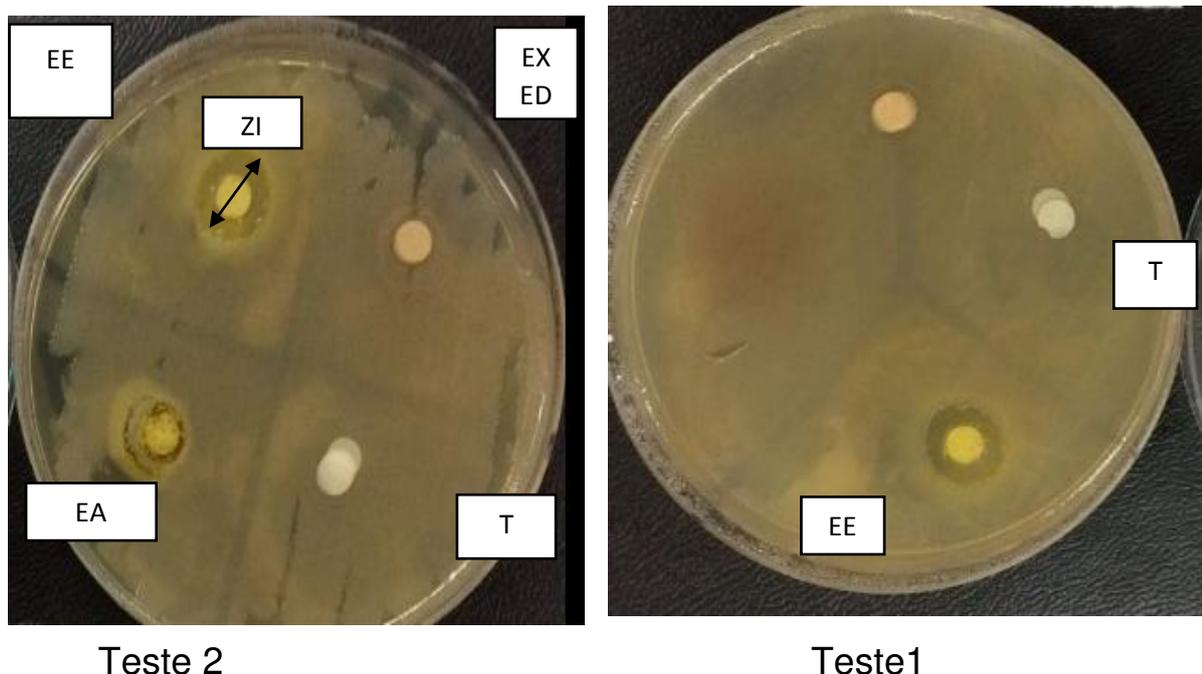


Figure 21 : Activité antibactérienne sur milieu solide (Photo originale)

3.4.2. Effet des extraits sur la pathogénicité de la souche *Pectobactérium atrosepticum*

L'observation visuelle des symptômes après inoculation des témoins, a montré une sensibilité de tous les tubercules vis-à-vis de la souche *Pectobactérium atrosepticum*. Les symptômes obtenus, présentés dans la figure 00 se caractérisent par l'apparition d'une zone nécrosée d'aspect liquide et de couleur blanche- crème, entourée d'un halo noir marquant une frontière avec les tissus sains.

Pour la majorité des demi-tubercules, la quantité de tissus pourris varie de 1 a 1.6 g après 6 jours d'incubation a la température ambiante (27 a 28°C).

En revanche, les résultats de l'inoculation des demi-tubercules après traitement des ces derniers par les différents extraits montrent une réductions du poids des tissus pourris. Cette réductions est nettement plus importante en présence de l'extrait aqueux comparativement a l'extrait méthnolique et l'extrait d'acéton. La virulence de la souche étudiée dépend de la production et la sécrétion d'une large gamme d'enzymes

extracellulaires (pectinases, proteases et cellulases) responsables de la dégradation des constituants de la paroi végétale et de la macération des tissus.

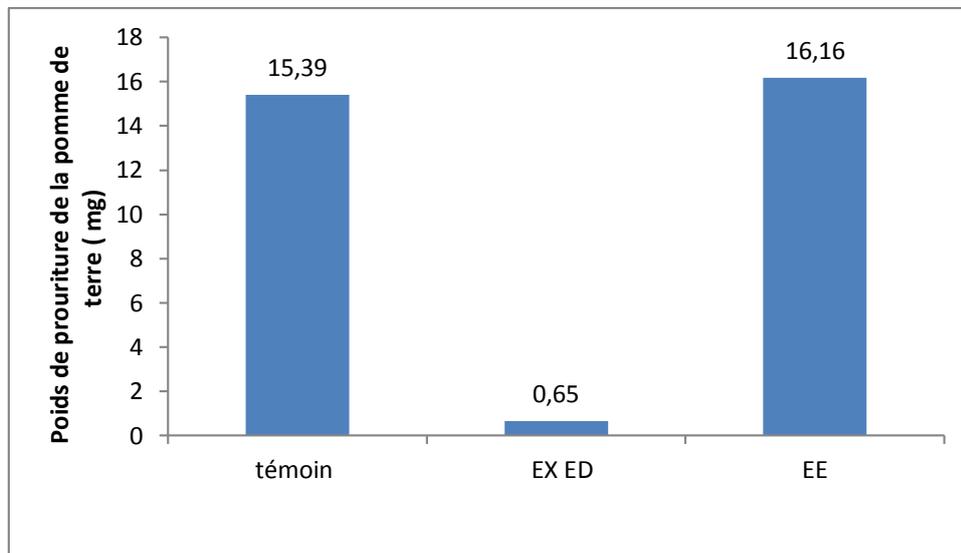


Figure 22 : Poids moyen de pourriture molle de pomme de terre après le traitement.



Figure 23 : Activité antibactérienne des extraits préparés sur les tubercules de pomme de terre.

Nous avons mis en évidence la présence de composés phénoliques dans nos extraits. Ces derniers sont connus comme moyen de défense des plantes contre les agressions externes (Remesy et al., 1996) et pour leurs activités antimicrobiennes (Ghedira, 2005). La baisse du taux de tissus pourris sur les tubercules due à l'action des extraits utilisés s'expliquerait par l'effet de ces derniers sur la croissance bactériennes. Trois mécanismes biochimiques d'action seraient mis en jeu par les composés phénoliques pour freiner le développement de la pourriture molle : action directe sur les membranes cellulaires de la bactérie, action indirecte par le blocage des activités enzymatiques bactériennes et interaction avec les tubercules de pomme de terre à l'origine d'une induction des réactions de défense de cette dernière.

Les composés phénoliques peuvent inhiber la souche *Pectobacterium atrosepticum* indirectement par leur action sur les enzymes pectinolytiques qui jouent un rôle important dans la pathogénicité des *Pectobacterium*. En plus de ces enzymes pectinolytiques, les composés phénoliques peuvent avoir également un effet sur les protéases produites lors de l'infection du

tubercule. Ces protéases sont connues pour être impliquées dans la suppression des mécanismes de résistance de l'hôte en dégradant les protéines de défense de ce dernier, induisant ainsi indirectement la macération et la perte de cohésion des tissus (Marits et al., 1999).

Conclusion

Annexe

1. La définition de Solvant organique

1.1 Acétone

Le solvant organique est un produit chimique, volatil ou gazeux, qui a la propriété de solubiliser les graisses ainsi que de nombreuses substances lipophiles. Inhalé, il agit sur le système nerveux central en induisant des manifestations ébrieuses. Celles-ci sont parfois recherchées par des adolescents.

Acétone

corps organique, de formule CH_3COCH_3 , premier terme de la série des cétones; nommé propanone, suivant la nomenclature rigoureuse :

On appelle acétone un liquide limpide, incolore, inflammable, volatil, d'une odeur étherée, et qui se produit dans la distillation sèche des acétates

1.2 Ethanol

L'éthanol, ou alcool éthylique, est un alcool, possédant la structure semi-développée suivante : $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$

L'éthanol est habituellement désigné par l'abréviation **EtOH**.

C'est un liquide incolore, miscible à l'eau en toutes proportions.

On l'appelle fréquemment simplement «alcool», car l'éthanol est l'alcool qui se retrouve dans l'ensemble des boissons alcoolisées. Dans la pharmacopée européenne, éthanol sert à désigner l'éthanol absolu, c'est-à-dire pur à 100 %, tandis que alcool Ph. Eur. sert à désigner l'éthanol contenant une certaine quantité d'eau. Ses synonymes sont esprit de vin, alcool de grain. L'alcoolisme est la consommation excessive de boissons contenant de l'éthanol

2. L'antibiogramme

2.1 L'antibiogramme standard en milieu gélosé : méthode des disques

2-1-1 Principe général

Pour réaliser l'antibiogramme par la méthode des disques, la culture bactérienne estensemencée à la surface d'une gélose spécialement étudiée, la gélose de Mueller-Hinton, éventuellement additionnée de sang. Des disques pré-imprégnés d'une dose connue d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose. L'antibiotique diffuse à

partir du disque en créant un gradient de concentration. La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet une estimation de la concentration minimale inhibitrice. Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne en seront déduits.

2-1-2 Technique

En pratique, on réalise à partir de l'isolement (souche pure) un ensemencement en tapis sur le milieu. On dispose ensuite les disques d'antibiotiques et on place à l'incubateur. Au bout de 24 h, on lit les différents diamètres d'inhibition et on peut conclure en comparant ceux-ci aux abaques de lecture

3. Matériel de laboratoire :

Dispositifs	Appareil
Les tubes à essai	Mélangeur
Les Pipettes pasteurs	Agitateur magnétique
Les boites à pétries en plastique	Routard vapeur
Bicher	Centrifugeuse
Enerleirmiler	Spectrophotomètre
Bacs	Etuve
Micropipette	Balance
	Tamis
	Broyeur électronique
	Réfrigérateur

Tableau 1.2 : Matériel de laboratoire .

**Référence
bibliographique**

Annexe