

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ 08 MAI 1945 GUELMA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA
TERRE ET DE L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité : Qualité des produits et sécurité alimentaire

Thème

L'activité antibactérienne des polyphénols d'une variété de dattes Algériennes

Présenté par : BENZAIDA Chahira

BOUCHAREB Qassim Mohammed Et.Taher

MAHMOUDI Asma

Devant le jury composé de :

Présidente : M^{me}. SOUIKI L (MC.A)

Examineur : Mr. MEZROUA L (MA.B)

Encadreur : Mr. SIMOHAMMED A (MA.B)

JUIN 2013

Remerciements

On dit souvent que le trajet est aussi important que la destination. Les deux années de maîtrise m'ont permis de bien comprendre la signification de cette phrase toute simple.

Ce parcours, en effet, ne s'est pas réalisé sans défis et sans soulever de nombreuses questions pour lesquelles les réponses nécessitent de longues heures de travail.

*Nous tenons à la fin de ce travail à remercier **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné la foi et de nous avoir permis d'en arriver là.*

Nos remerciements vont également à nos parents de tous les sacrifices qu'ils ont consentis pour nous permettre de suivre nos études dans les meilleures conditions possibles et n'avoir jamais cessé de nous encourager tout au long de nos années d'étude.

*Nous remercions particulièrement notre encadreur **Mr SIMOHAMMED Abdesselam (M.A)** à l'université 08 mai 1945 Guelma, dont la disponibilité, le savoir-faire et le soutien ne nous ont jamais fait défaut, nous tenons à le remercier pour ses conseils fructueux, ses remarques pertinentes, et pour son sens de l'encadrement.*

*Nos remerciements vont également à sa famille (**SIMOHAMMED**), particulièrement sa femme **Fayet**, pour son aide précieuse et ses interventions bénéfiques à chaque fois qu'on lui a fait recours.*

*Nous remercions également **M^{me} SOUIKI Lynda (M.C.A)** à l'université 08 mai 1945 Guelma ; pour avoir accepté d'évaluer ce travail et de présider le jury.*

*Nos remerciements vont également à **Mr BENTORKI Aymen** et **Mr BENADA Mhamed** pour la fourniture des souches microbiennes de référence.*

Nous remercions le jury qui nous a fait l'honneur de participer.

*Nous tenons à remercier **nos collègues** et **nos ami(e)s** de la biologie et plus particulièrement les étudiants de QPSA pour les bons moments qu'on a passé ensemble.*

Enfin, que tous ceux qui nous ont accordé un soutien, une aide technique ou un conseil, trouvent ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à ma mère, en reconnaissance pour son soutien moral et pour toutes les charges assurées durant toutes ces longues années d'études.

J'ai une pensée particulière pour MAMA AKRI qui m'a aidé avec leur prière.

Je dédie également ce mémoire à ma petite sœur Hajer et à mon frère Mohamed pour les bons moments qu'on a passé ensemble.

Je dédie mon travail à mes chers oncles et ses dames, à mes cousins (Joudi, Amar, Doudou, Louli) et mes cousines (Anfel, Boutaina, Mayssa Houda).

Je dédie également ce mémoire, à mon cher époux othmène pour la confiance et l'espoir qu'il a mis en moi.

Je dédie également ce travail, à ma belle mère et mes belles sœurs.

Je le dédie également à tous ceux qui me sont proches et à mes amis (Soriya, Foufou, Samire, Karima, Meriem, Nada, Soumia, Hadda, Hamida, Fatouma, Ismahane, Rima, Hiba, Amira et Wissem...)

Chahra

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mes parents, mes guides affectueux et attentifs, en reconnaissance pour leur soutien moral et pour toutes les charges assurées durant toutes ces longues années d'études.

Je dédie également ce mémoire à ma sœur pour la confiance et l'espoir qu'elle a mis en moi.

Je le dédie également à mon petit frère, à tous ceux qui me sont proches et à mes amis (Amine, Hasen, Hakim, Imed, Nadir, Yazid, et Youcef...)

Je le dédie particulièrement à ma cousine Mona Liza qui fêtera ses 3 mois le jour de ma soutenance.

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes parents, mes guides affectueux et attentifs, en reconnaissance pour leur soutien moral et pour toutes les charges assurées durant toutes ces longues années d'études.

Je dédie également ce mémoire à mes frères CHOUAIB, DJALEL, KHALED, et KARIM et ses enfants LOAY et ZOULIKHA, et ma petite sœur YOUSRA. Ainsi que tout la famille MAHMOUDI et ATTAFI, et ma copine AMIRA et sa famille.

Un grand dédicace pleine de respect et remerciement à Madame L.SOUIKI qui ma soutenue et ma donner la volonté pour enrichir mes connaissances.

Je le dédie particulièrement au plus mince et le plus cher homme TOUFIK, et mes collègues.

ASMA

Sommaire

Liste de figures.

Liste des tableaux.

Introduction..... 1

CHAPITRE I: Synthèse bibliographique

| | |
|--|----|
| 1. L'origine du palmier dattier | 2 |
| 2. La description botanique de datte | 3 |
| 3. Position taxonomique..... | 4 |
| 4. Production mondiale et local des dattes | 4 |
| 4.1. Production mondiale des dattes | 4 |
| 4.2. Production local des dattes | 4 |
| 5. La composition chimique et la valeur nutritionnelle des dattes..... | 4 |
| 5.1. L'eau | 4 |
| 5.2. Les sucres..... | 5 |
| 5.3. Les protéines | 5 |
| 5.4. Les lipides | 5 |
| 5.5 Les éléments minéraux | 5 |
| 5.6 Les vitamines | 5 |
| 6. Les composés phénoliques et leurs intérêts. | 6 |
| 6.1. Les composés phénoliques | 6 |
| 6.2. Intérêt des composés phénoliques..... | 8 |
| 7. Description des souches bactériennes | 10 |
| 7.1 <i>Escherichia coli</i> | 10 |
| 7.2 <i>Staphylococcus aureus</i> | 10 |
| 7.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 11 |

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

| | |
|--|----|
| 1. Extraction des polyphénols | 13 |
| 1.1. Dosage des polyphénols totaux..... | 16 |
| 1.2. Identification des polyphénols | 17 |
| 2. Test de l'activité antimicrobienne..... | 18 |
| 2.1. Préparation de l'inoculum microbien | 19 |

| | |
|---|----|
| 2.2. Ensemencement du milieu de culture | 19 |
| 2.3. Stérilisation de l'extrait brut | 20 |
| 2.4. Préparation des dilutions..... | 20 |
| 2.5. Préparation des disques..... | 20 |
| 2.6. Ensemencement du milieu de culture | 20 |
| 2.7. Méthode de mesure de l'activité antimicrobienne..... | 20 |

CHAPITRE III : Résultats et discussion

| | |
|--|----|
| 1. Résultats de l'extraction des polyphénols..... | 23 |
| 1.1. Résultat du dosage des polyphénols | 23 |
| 1.2. Résultat de l'identification des polyphénols | 25 |
| 2. Résultats du test de l'activité antimicrobienne | 29 |
| Conclusion | 35 |
| Références bibliographiques | |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 01: centre d'origine de la culture de dattier | 2 |
| Figure 02: coupe longitudinale d'une datte | 3 |
| Figure 03: la variété Mech-Degla entière et en coupe longitudinale | 13 |
| Figure 04: localisation de la zone de production des dattes de la wilaya de Biskra... .. | 14 |
| Figure 05: préparation de la plaque de chromatographie..... | 17 |
| Figure 06: les espèces bactériennes testées..... | 21 |
| Figure 07: le test de l'activité antimicrobienne de l'extrait | 22 |
| Figure 08: le rendement d'extraction | 23 |
| Figure 09: courbe étalon de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois mesures)..... | 24 |
| Figure 10: mise en évidence de la présence des polyphénols dans l'extrait de datte..... | 27 |
| Figure 11: flavonoïdes révélés par AlCl ₃ sous UV/365 nm | 28 |
| Figure 12: les zones d'inhibitions obtenues à partir de l'extrait brut sur l'espèce <i>Staphylococcus aureus</i> en comparaison avec le témoin (-)..... | 30 |
| Figure 13: les zones d'inhibition à partir des dilutions $1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32$ sur l'espèce <i>Staphylococcus aureus</i> en comparaison avec le témoin (-) | 31 |
| Figure 14: légère inhibition pour l'espèce <i>Escherichia coli</i> en comparaison avec le témoin (-) | 32 |

Figure 15: légère inhibition pour l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* en comparaison avec le témoin (-) 33

Liste des schémas

Schéma 01: protocole d'extraction des polyphénols totaux p15

Schéma 02: protocole de dosage des polyphénols totaux p16

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 01: les activités des composés phénoliques | 9 |
| Tableau 02: phytoconstituants et systèmes de développement correspondants | 18 |
| Tableau 03: l'établissement de la gamme étalon | 23 |
| Tableau 04: résultats de la séparation par CCM des phytoconstituants de l'extrait de datte | 28 |
| Tableau 05: diamètres des zones d'inhibition (en mm) observés pour les différentes espèces microbiennes testées | 29 |

Liste des abréviations

µg: microgramme

AlCl₃ : chlorure d'aluminium

Avant J.C.: avant Jésus-Christ

°C : degré Celsius

CCM: la Chromatographie sur Couche Mince

CHU: centre hospitalier universitaire

CO₃Na₂: solution de bicarbonate

D: diamètre

D.O: Densité optique

EAG: équivalents d'acide gallique

E.B: Extrait brut

FeCl₃: chlorure ferrique

GN: gélose nutritive

h : Heure

mg: milligramme

MH: milieu Mueller Hinton

ml: millilitre

nm: nanomètre

Rf: Rapport frontal

UFC: Unité Formant Colonie

UV: ultra violet

INTRODUCTION

Le palmier dattier ou dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une plante monocotylédone de la famille des Arécacées (Palmiers), largement cultivée pour ses fruits : les dattes.

C'est un arbre fruitier adapté à survivre dans les climats les plus hostiles du désert, les nomades le considèrent comme un « arbre de vie », puisqu'il leur fournit l'alimentation de base : la datte. Chez certaines tribus, il est même vénéré.

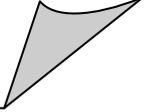
Allah cite cet arbre dans plusieurs versets du Coran et même dans la Bible et a fait de ses fruits une nourriture divine pour l'autre monde. Le Prophète Mohammad (Bénédiction et Paix sur Lui) en mangeait, il invitait même tous les musulmans à en consommer et disait : "Celui qui commence sa journée par manger sept dattes ne sera pas lésé ni par un poison ni par un envoûtement". Il a également dit : « Il y a parmi les arbres un dont les feuilles ne tombent pas c'est le palmier : Il est comme le musulman. C'est un fruit très énergétique et pendant le mois sacré du Ramandhan, il constitue le fruit le plus prisé, il est consommé avec du lait pour rompre le jeûne.

Il ne faut oublier aussi que les dattes possèdent de nombreuses vertus médicinales en vue de leur composition chimique en éléments minéraux et organiques. En effet les dattes sont une excellente source de fibres alimentaires indispensables pour le transit intestinal et l'une des meilleures sources naturelles de potassium de calcium de magnésium et de fer, elles contiennent également beaucoup de vitamines et de glucides et sont très calorifique puisque 100 grammes de dattes consommées fournissent environ 300 kilocalories.

Selon des études de l'Université de Scranton en Pennsylvanie (états unis), les dattes renferment la plus forte concentration de polyphénols comparés aux autres fruits secs ; d'où l'intérêt de notre étude qui va leur être consacré et qui consiste en l'extraction des polyphénols totaux à partir d'une variété de dattes algériennes communément appelée « Mech-degla » à l'aide d'un solvant organique pour ensuite tester leur effet antimicrobien : bactéricide et ou bactériostatique.

Pour cela on réalise plusieurs dilutions à partir de l'extrait brut obtenu et chaque dilution a été testé sur trois espèces de bactéries nuisibles pour l'homme à savoir : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* .Pour déterminer le degré de l'effet bactéricide de ces polyphénols on doit mesurer le diamètre d'inhibition pour chaque dilution.

CHAPITRE I :
Synthèse
bibliographique



1- L'origine du palmier dattier :

Le palmier dattier a été cultivé dans les zones chaudes entre l'Euphrate et le Nil vers 4500 ans avant J.C. De là, sa culture fut introduite en Basse Mésopotamie vers l'an 2500 ans avant J.C. Depuis, elle progressa vers le Nord du pays et gagna la région côtière du plateau Iranien puis la vallée de l'Indus (Munier, 1973).

Depuis l'Egypte (voir figure 1), les techniques culturales du dattier gagnèrent la Libye puis se propagèrent d'abord vers les autres pays du Maghreb comme la Tunisie, l'Algérie et le Sud Marocain et arrivèrent ensuite dans l'Adrar Mauritanien (Matallah, 2004).

Les palmeraies algériennes sont localisées au Nord-Est du Sahara au niveau des oasis où les conditions hydriques et thermiques sont favorables (Ghazi et sahraoui, 2005). Il existe plusieurs variétés telles que : Deglet-Nour, Ltima, Safraia, El-Ghazi, Ghars, Tantboucht, Deglet-Ziane, Mech Deglat, Kenta, Horra, Deglat Baïda (Amellal, 2008).

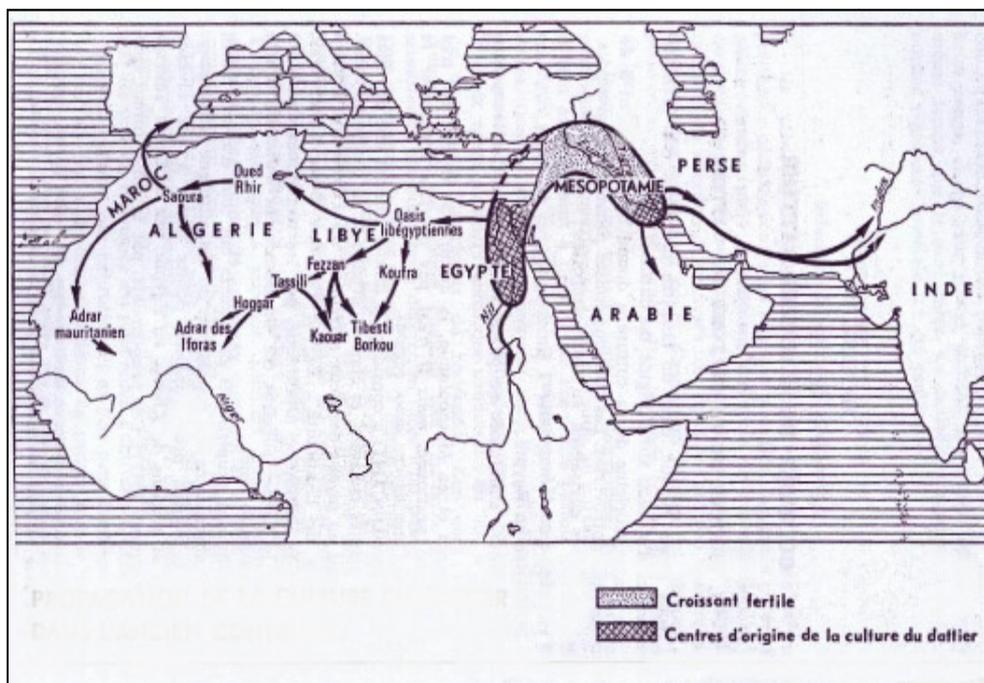


Figure 01: centre d'origine de la culture de dattier (Munier, 1973)

2- La description botanique :

La datte est le fruit du palmier dattier, elle est constituée de deux parties une partie non comestible « noyau » et une autre comestible « pulpe ou chair ».

Selon Espiard (2002), la partie comestible de la datte est constituée de (voir figure 2) :

- Un péricarpe ou enveloppe cellulosique fine dénommée peau.
- Un mésocarpe généralement charnu, de consistance variable selon sa teneur en sucre et de couleur soutenue.
- Un endocarpe de teinte plus claire et de texture fibreuse, parfois réduit à une membrane parcheminée entourant le noyau.

Les dimensions de la datte sont très variables, de 2 à 8cm de longueur et d'un poids de 2 à 8 grammes selon les variétés. Leur couleur va du blanc jaunâtre au noir en passant par les couleurs ambre, rouge, brune plus ou moins foncée (Djerbi, 1994). Les dattes sont généralement de forme allongée, oblongue ou ovoïde, mais on rencontre également des dattes sphériques (Daas Amiour, 2009).

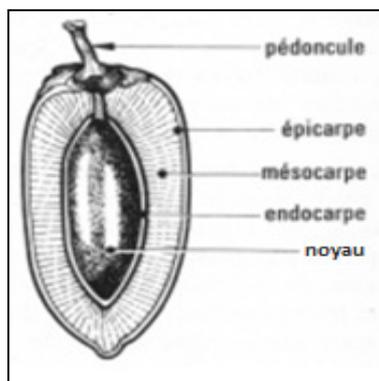


Figure 02: coupe longitudinale d'une datte (Richarde, 1972).

3- Position taxonomique :

Le palmier dattier a été dénommé *Phoenix dactylifera* L. par Linne en 1734. Phoenix dérive de Phoinix, nom du dattier chez les Grecs de l'antiquité, qui le considéraient comme l'arbre des phoeniciens ; dactylifera vient du latin dactylus dérivant du grec dactulos signifiant doigt, en raison de la forme du fruit. Selon (Munier, 1973), le palmier dattier appartient à :

Embranchement Phanérogames.
Sous-embranchement Angiospermes.
Classe Monocotylédones.
Famille Areaceae.

4- Production mondiale et local des dattes :

4-1 Production mondiale des dattes :

En 2006 la production mondiale a été d'environ sept millions de tonnes par an, la datte se place en cinquième position pour les fruits en provenance de régions arides après les agrumes, la mangue, la banane et l'ananas ; et en première place pour les fruits secs avant le raisin, la figue et les pruneaux. Et parmi les 34 pays qui cultivent la datte figurent l'Iraq (21,5 millions de palmiers), l'Arabie saoudite (12 millions), l'Egypte (11 millions), le sultanat d'Oman (8 millions), l'Algérie (7,5 millions), la Lybie (7 millions), le Soudan (4,7 millions), la Tunisie (4,5 millions) et le Maroc (4,4 millions). (Anonyme, 2012)

4-2 Production local des dattes:

Selon Haddoud (2012), membre de l'Association des producteurs de dattes de Tolga, La production des dattes en Algérie est une culture qui occupe une place de premier rang dans l'agriculture saharienne, principalement par son intérêt économique. L'Algérie, de part son effectif de plus de 18 millions de palmiers et de 800 variétés, occupe une place importante parmi les pays producteurs et exportateurs des dattes dans le monde, plus encore, elle occupe le premier rang du point de vue qualité, grâce à la fameuse variété «Deglet Nour». En revanche, la production de dattes en Algérie a connu une hausse avec plus de 8,5 millions de quintaux marqués pour l'année 2012-2013, contre 7,8 millions lors de la campagne 2010-2011, ainsi que 6,5 millions durant la saison 2009-2010.

5- La composition chimique et la valeur nutritionnelle des dattes :

La datte est un fruit à grande valeur alimentaire et très énergétique, elle fournit des calories 4 à 5 fois supérieure à celles fournies par d'autres fruits, Grâce au portion de glucides, de minéraux et de fibres nettement supérieure à un fruit frais traditionnel : son apport calorique peut atteindre 118 kcals pour 100 g contre 50 à 70 kcals pour un autre fruit (Munier, 1973).

5-1 L'eau :

La teneur en eau des dattes évolue en fonction du stade de maturation. L'humidité décroît des stades verts au stades mûrs (Booij *et al.*, 1992).

D'une manière générale, la teneur moyenne en eau des dattes varie de 10 à 40% de poids frais, ceci la classe dans les aliments à humidité intermédiaire (Estanove, 1990).

5-2 Les sucres :

La teneur en sucre varie généralement en fonction de la variété, de la consistance et des stades de maturation. Elle est comprise entre 50 à 80% de la pulpe fraîche pour les sucres totaux avec des proportions qui peuvent atteindre jusqu'à 60% du poids de la pulpe fraîche en saccharose et 17 à 80% pour les sucres réducteurs (Siboukeur, 1997).

Selon Al-Shahib et Marshall (2003) le contenu en sucres totaux de la datte varie entre : 44 et 88% du poids de la pulpe fraîche. Les dattes molles sont caractérisées par une teneur élevée en sucres réducteurs (glucose, fructose) et les dattes sèches par une teneur élevée en saccharose (Noui, 2001).

5-3 Les protéines :

La pulpe de datte ne renferme qu'une faible quantité de protéines variant entre 0.38 à 2.5% selon Noui (2001). D'autres part Al-Shahib et Marshall (2003) notent une quantité plus élevée allant de : 2.3% à 5.6 % du poids de la pulpe fraîche de la datte.

5-4 Les lipides :

La teneur de la pulpe de datte en lipides est très faible soit un pourcentage de 1.25 du poids frais (Benflis, 2006).

5-5 Les éléments minéraux :

La richesse de la pulpe de datte en éléments minéraux la classe parmi les aliments les plus intéressants. (Siboukeur, 1997)

5-6 Les vitamines :

En général, la datte ne constitue pas une source importante de vitamines. La fraction vitaminique de la datte se caractérise par des teneurs appréciables de vitamines du groupe B. Ce sont des précurseurs immédiats des coenzymes indispensables à presque toutes les cellules vivantes et jouent un rôle primordial. (Vilkas, 1993)

6- Les composés phénoliques et leurs intérêts :

6-1 Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques, également dénommés polyphénols sont des molécules spécifiques du règne végétal. Ils forment une immense famille avec plus de 8000 composés (Bahorun, 1997).

Selon Dacosta (2003), on répartit les composés phénoliques en plusieurs classes.

6-1-1 Les acides phénoliques :

Les acides phénoliques sont largement répandus chez les plantes. Ils dérivent principalement de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique. (Dacosta, 2003)

Les acides phénoliques présents dans les plantes ne s'arrête pas là, nous tenons à mentionner en particulier : l'acide méthylgallique, l'acide chlorogénique et l'acide Rosmarinique (Dacosta, 2003).

Les acides phénoliques comportent un radical COOH. Ils se trouvent souvent sous la forme de glycosides ou d'esters.

6-1-2 Les flavonoïdes :

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux.

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phenyl chromone portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides. Le noyau flavone est lui même un dérivé du noyau flavane de base (Milane, 2004).

Structuralement, les flavonoïdes ont un squelette de base commun constitué de 15 atomes de carbone assemblés en trois cycles nommés A, C et B. Selon la structure du cycle intermédiaire (cycle C), les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules :

- Chalcone Flavanone Flavone
- Dihydroflavonol Flavanol Flavonol
- Isoflavone Anthocyanidol

6-1-3 Les tanins :

Les tanins sont des polyphénols qu'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbres, les fruits (raisin, datte, café, cacao...) et les feuilles de thé. Les tanins sont des composés phénoliques solubles dans l'eau et les solvants polaires (Hagerman, 2002).

Les tanins ont la propriété de tanner la peau. C'est à dire de la rendre imputrescible ; cette propriété est liée à leur aptitude à se combiner à des macromolécules (protéines, polysaccharides...) (Ghestem *et al.*, 2001). Ils présentent, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Bate-Smith et Swain, 1962, cité par Bruneton, 1999).

On distingue habituellement, chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Bruneton, 1999).

6-1-4 Les stilbènes :

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, Le resvératrol et le ptérostilbène font partie de la famille des stilbènes et sont des composés synthétisés par la plante suite à un stress. Ces molécules peuvent s'oxyder sous l'action d'enzymes, la stilbène oxydase et les peroxydases (Perret, 2001) contrairement aux flavonoïdes, ces composés sont peu répandus chez les végétaux; le raisin et le vin rouge constituent l'apport alimentaire le plus important de ceux-ci (Krisa *et al.*, 1997).

6-1-5 Les lignanes :

Les lignanes sont des composés dont les deux noyaux phénoliques sont reliés par quatre atomes de carbone, au lieu de trois dans les flavonoïdes. Les lignanes se trouvent souvent dans le bois des Gymnospermes et dans les tissus soumis à lignification chez les Angiospermes (Krief, 2003).

Les graines de lin sont la source la plus importante de lignanes viennent ensuite : les lentilles, les haricots blancs, les graines de céréales et certains légumes. (Dacosta, 2003)

6-1-6 Les Phytostérols et les phytostanols :

Les Phytostérols sont des stérols d'origine végétale dont la constitution est voisine de celle du Cholestérol, le quel a une origine animale. Les principaux phytostérols sont :

- le β -sitostérol, qui possède à son extrémité un radical éthyle en position 24.
- Le campestérol, qui possède à son extrémité un radical méthyle en position 24.
- Le stigmastérol, dont la seule différence avec le β -sitostérol est une double liaison entre les positions 22 et 23.

Parmi les phytostanols, les plus importants sont le sitostanol et le campestanol : ils se distinguent respectivement du sitostérol et du campestérol par la suppression d'une double liaison entre les positions 5 et 6 (Dacosta, 2003).

Les phytostérols sont des composés naturellement présents dans les plantes. Ils ne sont synthétisés ni par l'homme ni par les animaux. Ils sont présents dans le régime alimentaire sous plusieurs formes, mais les deux formes les plus abondantes sont représentées par le β -sitostérol et le campestérol (Lagnika, 2005).

6-1-7 Les saponines :

On désigne sous ce nom une vaste famille de glycosides triterpéniques ou stéroïdiens qui se trouvent dans de nombreuses plantes. Ils sont composés de deux parties :

- Une partie hydrophile, formée d'un ou de plusieurs sucres, eux-mêmes de nature variée
- Une partie aglycone et lipophile (dite sapogénine), qui est soit un résidu de triterpène, soit un résidu de stéroïde.

On trouve les saponines dans le soja, l'ail, les haricots blancs, les épinards, les tomates, les pommes de terre, les graines d'avoine, la luzerne (Dacosta, 2003).

6-1-8 Autres Phytoestrogènes :

Cette classe est réservée aux autres phytoestrogènes non intégrés dans les classes déjà cités, rappelons que les phytoestrogènes comprennent les isoflavones, les coumestanes, les stilbènes et les lignanes (Dacosta, 2003).

6-2 Intérêt des composés phénoliques :

6-2-1 Rôle physiologique :

Des travaux plus anciens (Nitsch et Nitsch, 1961; Alibert *et al.*, 1977, cité par Bahorun, 1997) ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation.

Les composés phénoliques participent aux mécanismes d'inhibition tégumentaire : au moment de la germination, l'oxydation des phénols capte une partie de l'oxygène nécessaire à la reprise de l'activité respiratoire de l'embryon ce qui retarde la sortie de la plantule (Guignard, 1996).

6-2-2 Rôle technologique :

Les polyphénols interviennent dans la qualité alimentaire des fruits. Les anthocyanes et certains flavonoïdes participent à la coloration des fruits mûrs. Ils confèrent aux fruits et légumes leurs teintes rouges ou Bleutées (Marfak, 2003).

Les composés phénoliques déterminent également la saveur des fruits : les tanins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs, les flavanones sont responsables de l'amertume des Citrus et peuvent donner naissance, par transformation chimique, à des dihydrochalcones à saveur sucrée (Dubois et *al.*, 1977, cité par Bahorun, 1997).

6-2-3 Rôle biologique, pharmacologique et thérapeutique :

Le tableau ci-dessous résume le rôle biologique, pharmacologique et thérapeutique des composés phénoliques (Bahorun, 1997)

Tableau 01 : les activités des composés phénoliques (Bahorun, 1997)

| POLYPHENOLS | ACTIVITES |
|---|---|
| Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques) | Antibactériennes Antifongiques Antioxydantes |
| Coumarines | Protectrices vasculaires et antioedémateuses |
| Flavonoïdes | Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes |
| Anthocyanes | Protectrices capillaro- veineux |
| Proanthocyanidines | Effets stabilisants sur le collagène Antioxydantes Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires |
| Tannins galliques et catéchiques | Antioxydantes |

7- Description des souches bactériennes :

7-1 *Escherichia coli* :

Escherichia coli (colibacille) est une entérobactérie mobile capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole. (Anonyme, 2003)

- Habitat :

Escherichia coli est une bactérie commensale du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Il représente à lui seul la plus grande partie de la flore bactérienne aérobie de l'intestin (espèce aérobie dominante) à raison de 10⁸ par gramme de fécès (flore totale : 10¹¹ à 10¹² bactéries par gramme). (Anonyme, 2003)

- Pouvoir pathogène :

Les colibacilles, hôtes normaux de l'intestin, ne provoquent normalement pas de maladie. Cependant ils possèdent un potentiel pathogène qu'ils expriment dans certaines circonstances (pathogènes opportunistes) :

- *E.coli* est responsable d'infections urinaires spontanées.
- Certaines souches de colibacilles ont un pouvoir entéropathogène intrinsèque par acquisition de gènes de pathogénicité, comme ils peuvent provoquer des diarrhées aiguës, « cholera-like ». (Anonyme, 2003)

7-2 *Staphylococcus aureus* :

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des coques (cocci) à Gram positif, groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés, catalase positive et oxydase négative.

Parmi les 27 espèces du genre actuellement répertoriées, les principales sont *Staphylococcus aureus*, *S.epidermidis* et *S.saprophyticus*. (Anonyme, 2003)

- Habitat

S.aureus est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (rhino-pharynx, intestin). On le trouve sur la muqueuse nasale d'un tiers environ des sujets normaux. Éliminé dans le milieu extérieur, cette bactérie peut survivre longtemps dans l'environnement. (Anonyme, 2003)

- Pouvoir pathogène

- Germe pyogène par excellence, *S.aureus* est le microbe de la suppuration.
- Certaines souches agissent aussi par libération d'une ou de plusieurs toxines (intoxication alimentaire). (Anonyme, 2003)

La fréquence et la gravité des infections à staphylocoques sont liées à trois principaux facteurs :

- 1- le caractère ubiquitaire du germe,
- 2- l'abaissement des défenses locales et générales des malades soumis à des soins intensifs, des interventions chirurgicales graves, etc.,
- 3- et la fréquente résistance aux antibiotiques du staphylocoque, notamment du staphylocoque hospitalier. (Anonyme, 2003)

7-3 *Pseudomonas aeruginosa* :

Les *Pseudomonas* sont aérobies stricts, oxydase positif, mobiles, produisant souvent des pigments diffusibles et naturellement résistants à de très nombreux antibiotiques, Saprophytes. (Anonyme, 2003)

L'espèce principale, *Pseudomonas aeruginosa* (ou bacille pyocyanique), a les caractères suivants :

- protéolytique,
- production de deux pigments : la pyocyanine (pigment bleu), qui est spécifique de *Pseudomonas aeruginosa*, et la pyoverdine ou fluorescéine qui est présente chez d'autres *Pseudomonas*.
- production d'une exotoxine nécrosante par certaines souches. (Anonyme, 2003)

- Habitat :

On les trouve essentiellement dans l'eau. Ils peuvent contaminer des solutés pour perfusion, des solutions antiseptiques, des préparations médicamenteuses liquides. (Anonyme, 2003)

- Pouvoir pathogène

Pseudomonas aeruginosa exprime son potentiel pathogène lorsqu'il est introduit dans des zones aux défenses immunitaires diminuées. Opportuniste majeur, il est ainsi responsable :

- des suppurations à « pus bleu » des blessures et des brûlures,
- d'infections locales iatrogènes après manœuvre instrumentale : urinaires après cathétérisme, broncho-pulmonaires chez des sujets sous respirateurs, oculaires sur lentille de contact,
- de septicémies chez les brûlés et de surinfections des bronches dans la mucoviscidose, grâce à la production d'élastase. (Anonyme, 2003).

CHAPITRE II :

Matériel et

méthodes

II- Matériel et méthodes :

Notre travail expérimental se subdivise en deux étapes :

1- Extraction des polyphénols à partir des dattes : réalisé au niveau du laboratoire de biochimie de l'université du 08 mai 1945 Guelma;

2- Test de l'activité antimicrobienne des polyphénols de dattes : réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie de l'université du 08 mai 1945 Guelma.

L'ensemble du matériels, produits et consommables utilisés est comme suit :

- Agitateur de milieux de culture ;
- Agitateur magnétique avec plaque chauffante ;
- Anse de platine ;
- Autoclave ;
- Balance de précision ;
- Ballon monocol ;
- Bec Bunsen ;
- Bécher ;
- Boîtes de Pétri ;
- Cuves de spectrophotométrie ;
- Disques en papier filtre (papier buvard) stériles ;
- Eau distillée stérile ;
- Écouvillons stériles ;
- Embouts ;
- Entonnoir ;
- Eppendorf ;
- Eprouvette ;
- Etuve ventilée ;
- Méthanol à 95° ;
- Micropipette ;
- Milieux de culture : gélose nutritive (GN), milieu Mueller Hinton (MH) ;
- Mixeur ;
- Papier filtre ;
- Pipettes Pasteur ;
- Rotavapeur ;
- Spectrophotomètre UV/visible ;
- Tubes à essai.

- Plaque CCM, cuve, éluant, lampe UV (pour la chromatographie)

1. Extraction des polyphénols :

L'objectif de cette extraction est de libérer les polyphénols présents dans les structures vacuolaires par rupture du tissu végétal et par diffusion.

Le matériel végétal utilisé dans notre étude est la variété de datte « Mech-Degla » (voir figure 03) obtenue au niveau de la zone de production des dattes de la wilaya de Biskra (voir figure 04).



Figure 03: la variété Mech-Degla entière et en coupe longitudinale

La variété Mech-Degla appartient à la catégorie de dattes sèches, cette variété est très reconnue par son abondance, sa richesse en sucres et par sa faible valeur marchande.

La datte Mech-Degla est de forme sub-cylindrique, légèrement rétrécie à son extrémité. A maturité, la datte est plutôt beige clair teinté d'un marron peu prononcé. L'épiderme est ridé, peu brillant et cassant. Le mésocarpe est peu charnu de consistance sèche et de texture fibreuse (Belguedj, 1996).

Les dattes sont stockées au réfrigérateur à 4°C jusqu'au moment de leur utilisation de leurs analyses, dans le but de ralentir la respiration, les changements chimiques et physiologiques (Maskan, 2001).

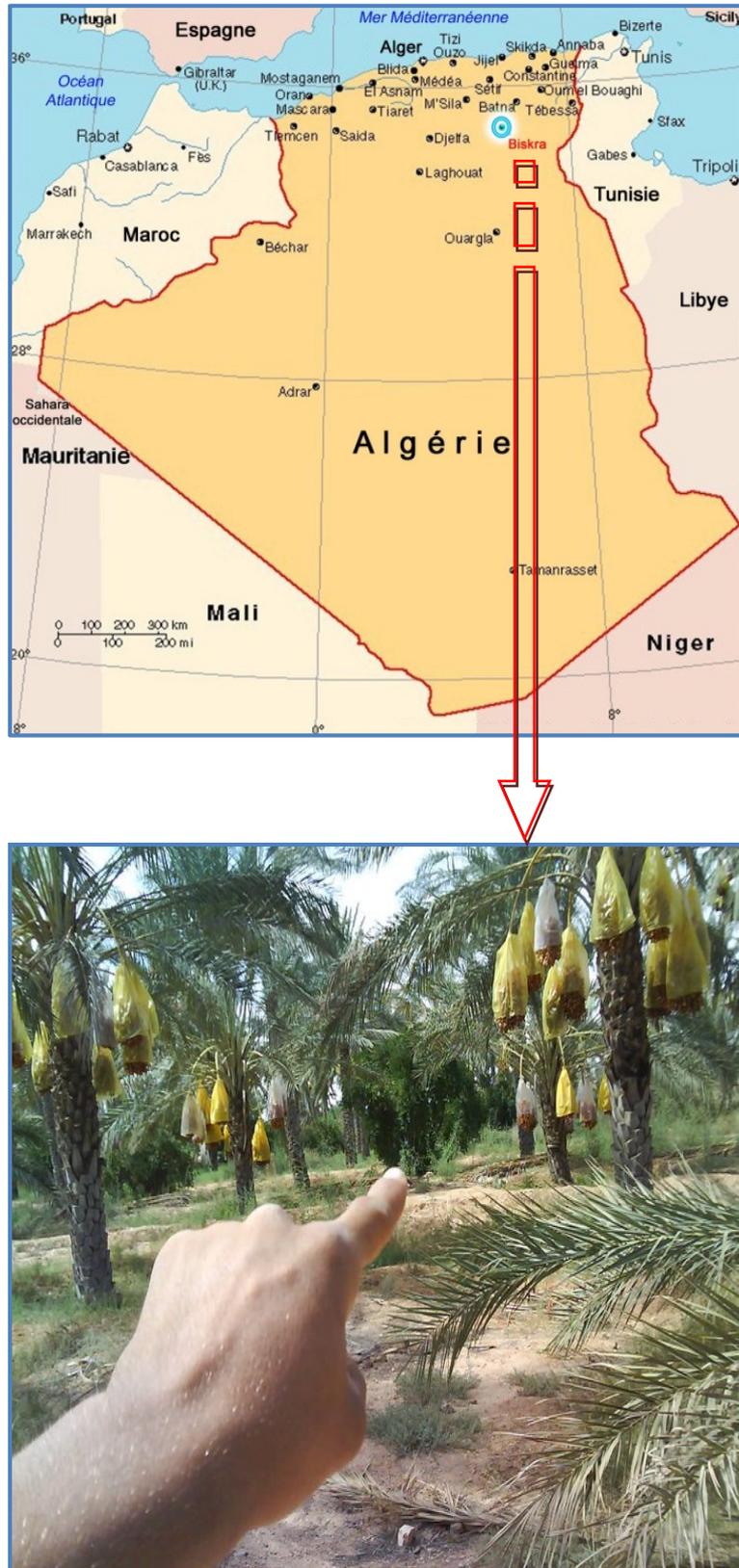


Figure 04: localisation de la zone de production des dattes de la wilaya de Biskra

100 g de dattes sèches sont broyées dans un mortier-pilon, le broyat est récupéré dans un bécher de 500 ml auquel sont ajoutés 240 ml de méthanol à 95° et 60 ml d'eau distillée.

Le mélange est laissé à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 05 heures puis filtré à l'aide d'un papier filtre, ensuite le filtrat est récupéré dans un ballon monocol de 250 ml.

Le solvant (méthanol) est évaporé à l'aide d'un Rotavapeur à 50°C et l'extrait brut obtenu est récupéré pour étudier son activité antimicrobienne.

Le rendement de l'extraction a été calculé avec la formule suivante :

$$\text{Rendement} = (\text{masse obtenue} / \text{masse des dattes sèches}) \times 100$$

Le schéma suivant résume les différentes étapes de l'extraction des polyphénols selon (Mansouri *et al.*, 2005).

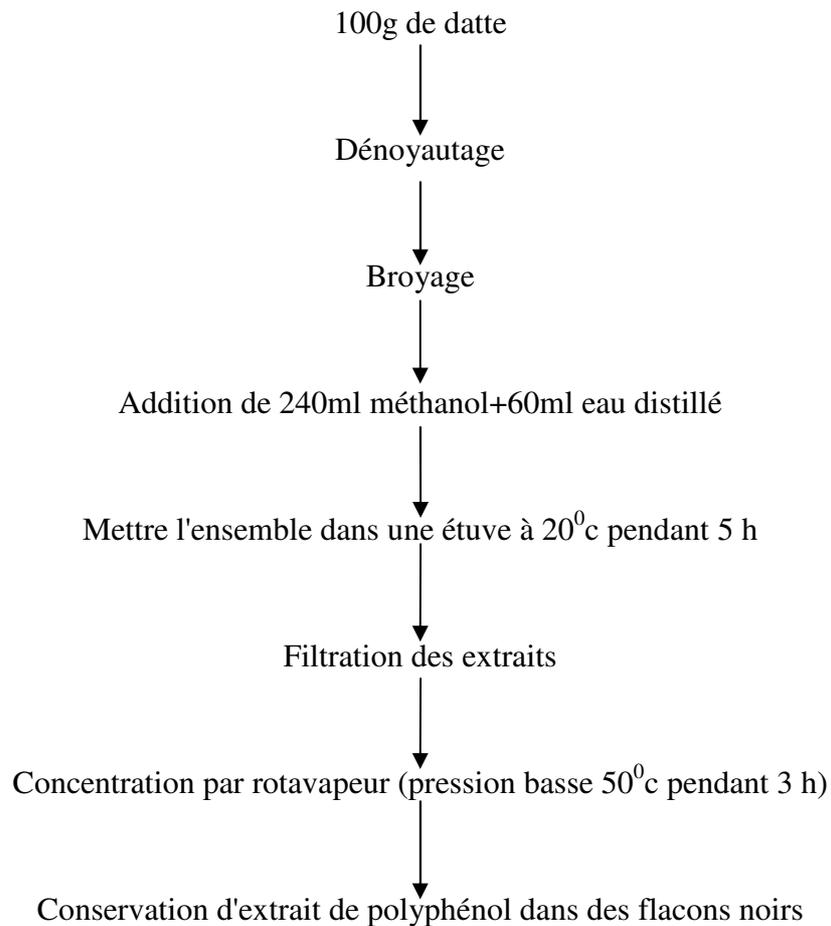


Schéma 01 : protocole d'extraction des polyphénols totaux (Mansouri *et al.*, 2005)

1.1. Dosage des polyphénols totaux :

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement en utilisant l'essai de Folin-Ciocalteu. Cet essai a été décrit en 1965 par Singleton et Rossi, il est basé principalement sur la réduction du réactif acide phosphotungstique phosphomolybdique dans une solution alcaline.

Le dosage des polyphénols a été effectué à l'aide d'un spectrophotomètre à UV visible à double faisceaux qui permet d'obtenir directement la densité optique des différentes concentrations préparées à partir de l'échantillon.

Pour s'assurer que les résultats soient fiables, le dosage des composés phénoliques a été réalisé en trois essais et la moyenne est retenue comme valeur.

La coloration produite, dont l'absorption maximum à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Ghazi et Sahraoui, 2005).

Dans des tubes à essai, on introduit 0,2 ml de la solution préparée à partir de l'extrait, 1 ml du réactif de Folin Ciocalteu (1/10 dans H₂O) ainsi que 0,8 ml d'une solution de bicarbonate (CO₃Na₂) à (7,5% H₂O).

Dans les mêmes conditions un témoin est préparé avec 0,2 ml d'eau distillée à la place de l'extrait, le tout est mis dans un agitateur de milieu et incubé à l'obscurité pendant une durée de 02 heures.

Après incubation, la densité optique est déterminée à 760 nm par rapport au témoin, la concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon c'est-à-dire l'acide gallique (10-400µg/ml) et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg) (Ghazi et Sahraoui, 2005).

Le schéma suivant résume les différentes étapes du dosage des polyphénols :

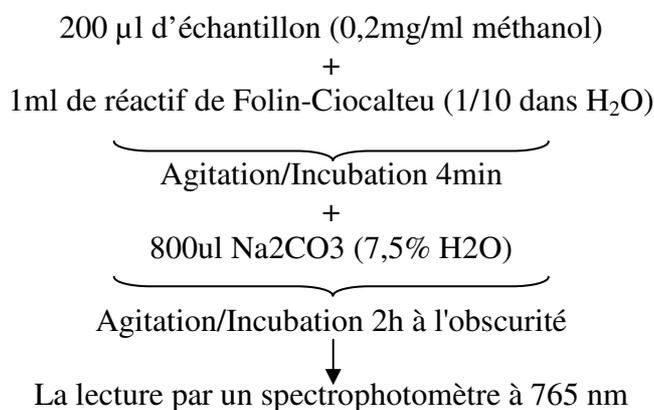


Schéma 02 : protocole de dosage des polyphénols totaux (Wong *et al.*, 2006)

1.2. Identification des polyphénols:

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM), est une technique d'analyse qualitative qui permet l'identification et la séparation d'un grand nombre de substances organiques (Cabanillas; 2011).

Dans notre cas, nous avons utilisé des plaques de gel de silice G60 F254 (phase normale) avec support en aluminium. La phase mobile ou éluant (un mélange binaire ou ternaire de solvant) migre à la surface de la plaque par capillarité (Wagner *et* Blatt, 1996).

La CCM n'est pas suffisante pour identifier un produit mais elle apporte des renseignements orientant vers une hypothèse de structures, par exemple: fluorescence, coloration, Rapport frontal (Rf) (Randerath, 1971).

- Notre extrait est déposé sous forme de tiret à l'aide d'une pipette Pasteur sur une plaque couverte de gel de silice G60F254 (Merck), l'intervalle entre les dépôts est de 1cm, à partir d'une distance de 1,5 cm du bord inférieur de la plaque (voir figure 05). Chaque dépôt est séché à l'aide d'un sèche-cheveux.

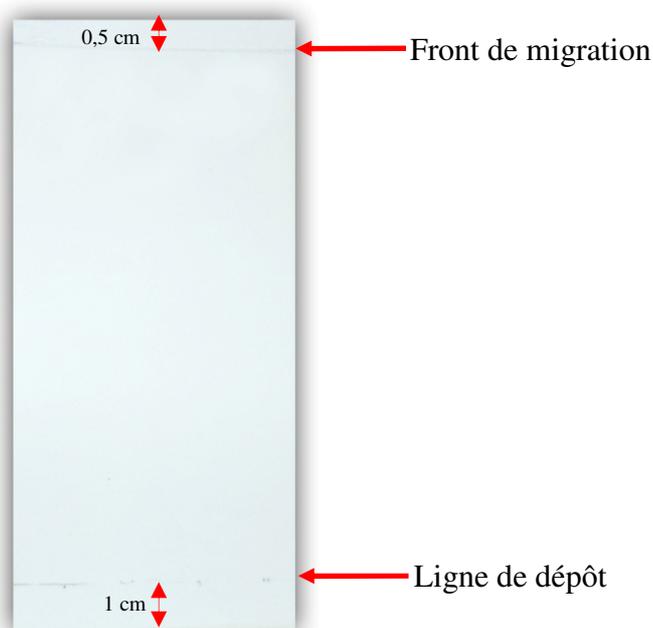


Figure 05: préparation de la plaque de chromatographie

La plaque est ensuite immergée dans un système de migration approprié et la migration est arrêtée quand le front du solvant atteint 0,5 cm du bord supérieur de la plaque. Celle-ci est alors retirée et séchée au sèche-cheveux, examinée sous UV à 254 et 365 nm puis révélée par un révélateur spécifique. Les systèmes d'éluion utilisés sont représentés dans le tableau 02.

Tableau 02 : phytoconstituants et systèmes de développement correspondants
(Wagner *et* Bladt, 1996).

| Phytoconstituants | Système d'élution |
|--------------------------|--|
| Coumarines | AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11: 26) |
| Dérivés anthracéniques | AcOEt-MeOH-H ₂ O (100:13,5:10) |
| Flavonoïdes * | AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26) |
| Quinones | AcOEt-MeOH-H ₂ O (100 :17:13) |
| Téropénoïdes | CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O (70:30:5) |

L'utilisation de réactifs chimiques en solution, vaporisés sur les plaques de CCM, permettent de compléter les observations faites visuellement sous les lampes UV à 254 nm et 365 nm. Pour le cas des flavonoïdes, nous avons utilisé le chlorure d'aluminium (AlCl₃) qui à 254nm : présente une extinction et à 365nm : présente une fluorescence jaune à jaune verdâtre.

2. Test de l'activité antimicrobienne :

L'activité antimicrobienne de notre extrait polyphénoliques est mise en évidence suivant le même principe que l'antibiogramme, en utilisant du papier filtre stérile coupé sous forme de petits disques de 6 mm de diamètre.

Les espèces bactériennes testées ont été isolées et identifiées à partir de prélèvements humains effectués au niveau du laboratoire central CHU d'Oran, il s'agit des espèces suivantes (voir figure 06) :

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

• **Taxonomie des espèces bactériennes :**

- **Classification de l'espèce *Escherichia coli* : selon Castellani *et* Chalmers 1919**

| | |
|---------------|---------------------|
| Règne | Bacteria |
| Embranchement | Proteobacteria |
| Classe | Gammaproteobacteria |
| Ordre | Enterobacteriales |
| Famille | Enterobacteriaceae |
| Genre | Escherichia |

- **Classification de *Pseudomonas aeruginosa* selon Migula, 1894**

| | |
|---------------|---------------------|
| Règne | Bacteria |
| Embranchement | Proteobacteria |
| Classe | Gammaproteobacteria |
| Ordre | Pseudomonadales |
| Famille | Pseudomonadaceae |
| Genre | Pseudomonas |

- **Classification de *Staphylococcus aureus* selon Pasteur, 1880**

| | |
|---------------|-------------------|
| Règne | Bacteria |
| Embranchement | Firmicutes |
| Classe | Bacilli |
| Ordre | Bacillales |
| Famille | Staphylococcaceae |
| Genre | Staphylococcus |

2.1. Préparation de l'inoculum microbien :

3 à 4 colonies bien isolées à partir de cultures pures ont été transférées dans des tubes contenant 2 ml d'eau distillée stérile.

La suspension microbienne obtenue à partir de chaque espèce est ajusté afin d'avoir une turbidité voisine à celle de Mc Farland 0.5 (10^6 UFC/ml) c'est-à-dire une densité optique comprise entre 0.08 et 0.1 lue à une longueur d'onde de 625 nm.

2.2. Ensemencement du milieu de culture :

Le milieu MH (Mueller-Hinton) est le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.

20 ml de la gélose Mueller-Hinton sont coulés dans des boîtes de Pétri, après solidification de cette dernière, un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne préalablement préparée puis frotté sur la totalité de la surface de la gélose en stries serrées.

Une fois l'ensemencement achevé, les boîtes de Pétri ainsi préparées sont séchées dans l'étuve pendant 15 min à 37 °C

2.3. Stérilisation de l'extrait brut :

Sachant que les polyphénols se dénaturent à une température supérieure à 60 °C et que les souches testées sont des espèces mésophiles, l'extrait phénolique a été stérilisé à 45 °C pendant 30 minutes à l'intérieur d'une étuve.

2.4. Préparation des dilutions :

Un volume de 1 ml de l'extrait brut est mis dans un Eppendorf stérile, 0.5 ml ce dernier est prélevé et introduit dans un autre Eppendorf contenant 0.5 ml d'eau distillée stérile, l'opération est répétée autant de fois jusqu'à la dilution voulue.

Les dilutions préparées sont les suivantes : 0, $1/2$, $1/4$, $1/8$, $1/16$, $1/32$.

2.5. Préparation des disques :

Du papier filtre (ou papier buvard) est coupé en disques de 6mm de diamètre, ces derniers sont autoclavés à 121°C pendant 20 minutes.

2.6. Dépôt des disques :

Les disques stériles déjà préparés sont imprégnés par les concentrations croissantes d'extraits puis déposés à l'aide d'une pince fine et stérile à la surface du milieu Mueller-Hinton préalablement ensemencé à raison de quatre à cinq disques par boîte (voir figure 07).

Après une pré-diffusion d'environ 15 minutes à température ambiante, les boîtes sont incubées à 37° C en atmosphère normale pendant 18-24 h.

Pour confirmer l'effet de l'extrait sur les espèces testées, des boîtes témoins sont préparées avec des disques imbibés uniquement avec de l'eau distillée stérile.

2.7. Méthode de mesure de l'activité antimicrobienne :

La sensibilité des espèces microbiennes, vis-à-vis de l'extrait de polyphénols de dattes est appréciée par la présence ou l'absence d'une zone d'inhibition dont le diamètre est calculé dans deux directions perpendiculaires.

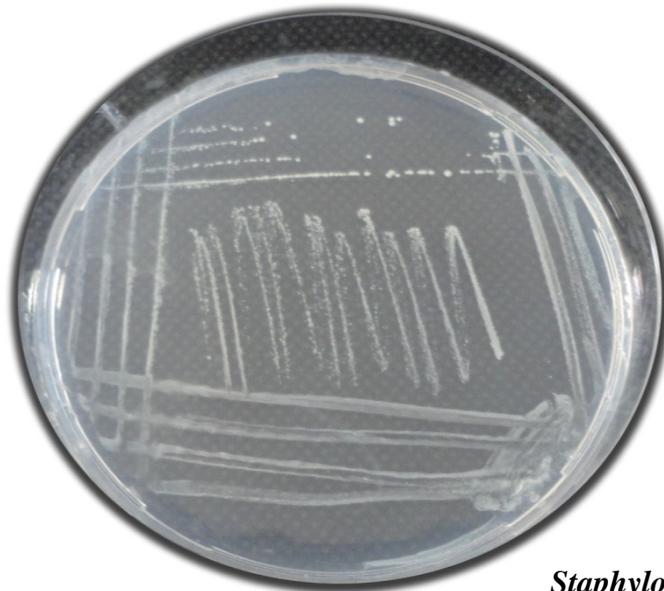
Les expériences sont réalisées en trois répétitions, la souche ayant un diamètre $D < 8$, $9 \geq D \leq 14$, $15 \geq D \leq 19$, $D > 20$ est considérée respectivement comme souche résistante (-), sensible (+), très sensible (++), extrêmement sensible (+++) (Duraffourd *et al.*, 1990 ; Ponce *et al.*, 2003).



Pseudomonas aeruginosa



Escherichia coli

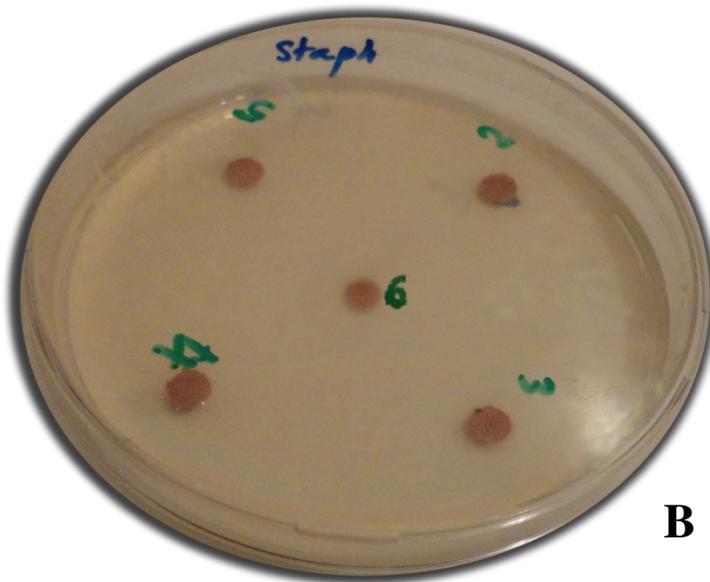


Staphylococcus aureus

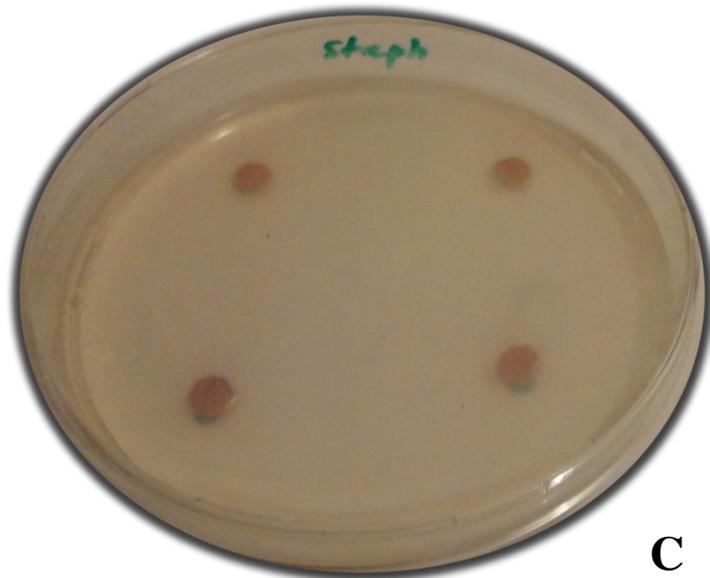
Figure 06: les espèces bactériennes testées



A



B



C

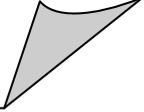
A : Disque imbibé de l'extrait Brut

B : Disque imbibé de dilution

C : Témoin (-)

Figure 07: le test de l'activité antimicrobienne de l'extrait

CHAPITRE III :
Résultats et
discussion



III- Résultats et discussion :

1. Résultats de l'extraction des polyphénols :

Après évaporation totale du méthanol à l'aide du rotavapeur, nous avons obtenu un extrait semi-liquide (voir figure 08) avec un rendement d'extraction de 30.76 % calculé à partir de la formule suivante :

$$\frac{30,76 \text{ g (extrait brute)}}{100 \text{ g (broyat)}} \times 100 = 30.76 \%$$

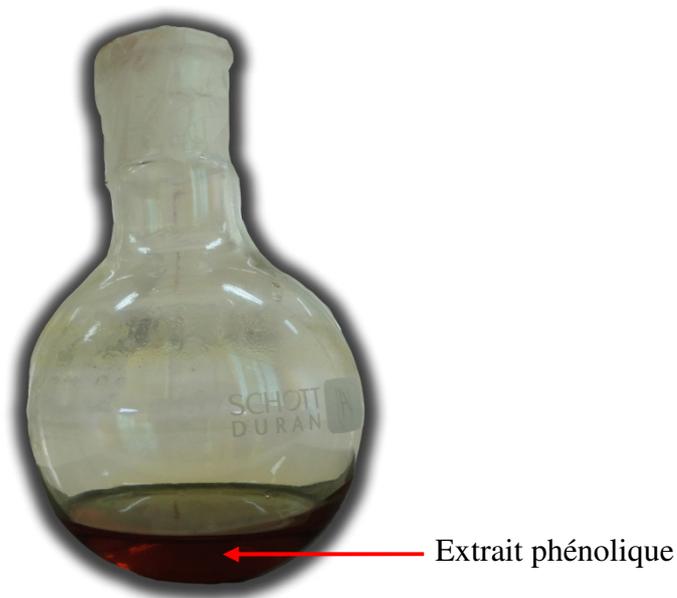


Figure 08: le rendement d'extraction

1.1. Résultats du dosage des polyphénols :

Une courbe d'étalon est réalisée avec une solution d'acide gallique (voir figure 09), le tableau suivant représente la procédure à suivre pour l'établissement de la gamme étalon.

Tableau 03: l'établissement de la gamme étalon

| Tube | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Dilution | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 |
| Concentration (µg/ml) | 300 | 150 | 75 | 37,5 | 18,75 |
| Réactif de Folin Ciocalteu | 1 ml |
| CO ₃ Na ₂ | 0.8 ml |
| Densité optique (D.O) | 0,1979 | 0,1003 | 0,0901 | 0,0747 | 0,0585 |

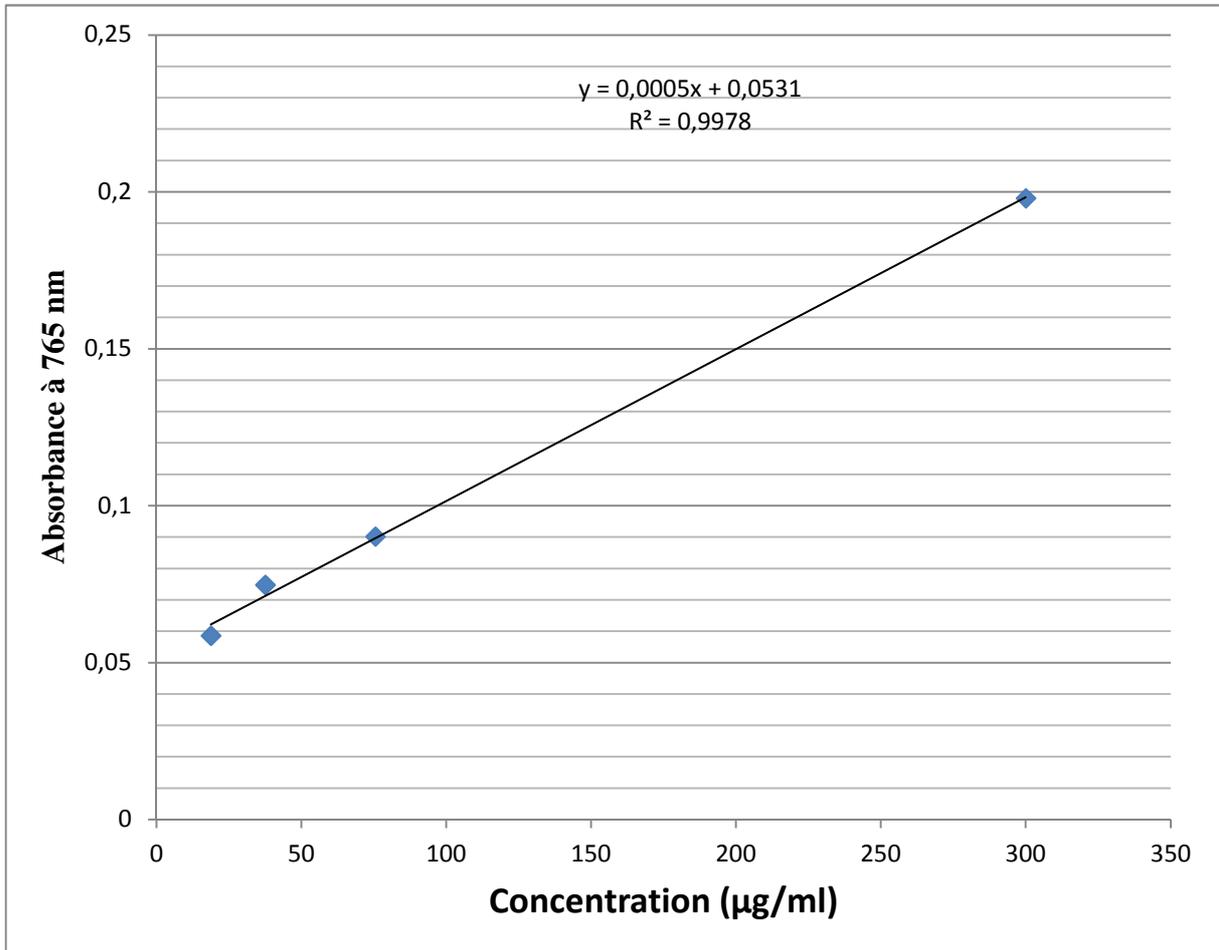


Figure 09: courbe étalon de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois mesures)

La concentration en polyphénols de notre extrait est déduite par extrapolation de sa valeur de densité optique obtenue sur la courbe d'étalon de l'acide gallique, la concentration en polyphénols obtenue est égale à : $158.76 \pm 0,0531 \mu\text{g EAG/ml}$

1.2. Résultats de l'identification des polyphénols :

a) Recherche des polyphénols :

Le réactif de Folin Ciocalteu qui est un acide de couleur jaune, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$) en présence de notre extrait de polyphénols est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène, la même couleur observé. (Ribereau, 1968)

En effet La réaction au chlorure ferrique (FeCl_3) a permis de caractériser les polyphénols, l'apparition d'une coloration bleu-noirâtre plus ou moins foncée indique la présence de polyphénols (voir figure 10). (Koffi et al., 2010)

b) Chromatographie sur couche mince (CCM) :

Les résultats du screening phytochimique par CCM de l'extrait de polyphénols de dattes nous a permis d'avoir des informations sur ses constituants par la fluorescence ; coloration après révélation ; et leur facteur de rétention (R_f).

Révélation des Flavonoïdes :

La caractérisation des flavonoïdes dans notre extrait a montré que ces composés phénoliques sont fortement présents. Ce constat est perçu en observant le chromatogramme (voir figure 11) dont les interprétations sont présentées dans le tableau 04.

Les flavonoïdes sont fluorescents comme d'autres métabolites secondaires sous UV/365nm.

Les anthocyanidines-3-glycosides donnent des taches orange rouge et mauve; les flavones, flavones méthylées, isoflavones, flavanones et chalcones apparaissent sous forme de taches bleues. Les flavanols et les auronnes se caractérisent par l'apparition de taches vertes, les flavones et les chalcones présentent une coloration pourpre et orange.

Pour se rassurer que ces fluorescences appartiennent aux flavonoïdes, un révélateur spécifique a été utilisé. Les flavonoïdes forment avec le révélateur (AlCl_3) des complexes bien colorés dans le visible ou sous UV/365 nm. En effet, le chlorure d'aluminium (AlCl_3) a montré la présence de plusieurs taches de fluorescence.

De plus, le chlorure d'aluminium a révélé aussi la présence des flavonoïdes colorés en jaune. L'intensité de la coloration des produits séparés est proportionnelle à leurs concentrations.

Le chromatogramme de l'extrait testé et révélé par l' AlCl_3 présente des constituants de différentes fluorescences, ce qui explique la présence de différents types des flavonoïdes dans l'extrait tels que les flavones, flavonols et/ou aurones, isoflavones, flavanones et chalcones.

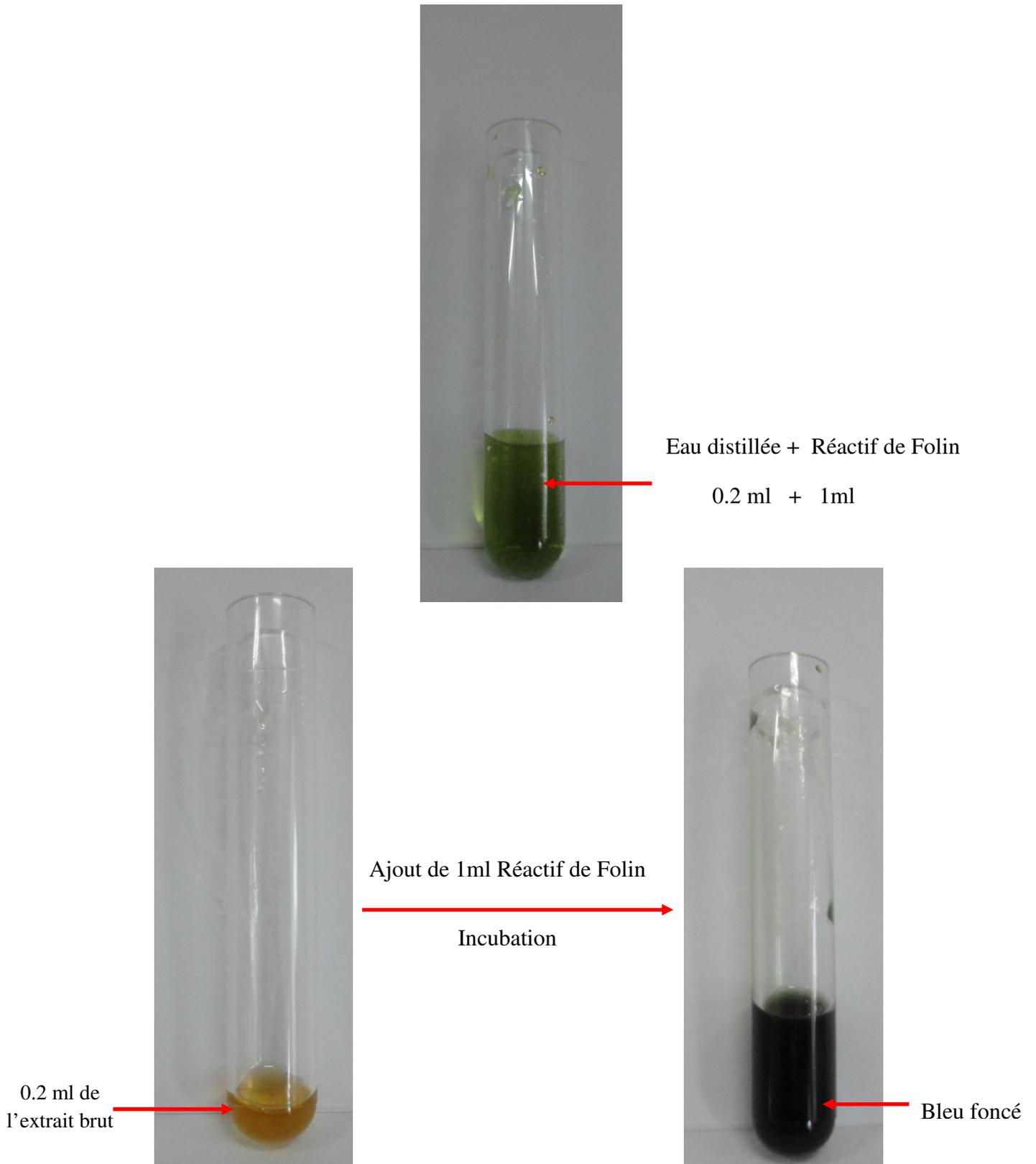


Figure 10: mise en évidence de la présence des polyphénols dans l'extrait de datte



Figure 11: flavonoïdes révélés par AlCl_3 sous UV/365 nm

Tableau 04 : résultats de la séparation par CCM des phytoconstituants de l'extrait de datte

| Phytoconstituants | <i>R_f</i> | Evaluation | |
|---|----------------------|---|---|
| | | Avant révélation | Après révélation |
| Flavonoïdes révélée par AlCl_3 | 0,04 | - A 254nm : présente une extinction - A365nm : présente une fluorescence jaune à jaune verdâtre. | - Au visible : donne une couleur jaune - Sous UV à 365nm : fluorescence jaune vert, orange rouge, bleue, vert, mauve |
| | 0,52 | | |
| | 0,55 | | |
| | 0,68 | | |
| | 0,89 | | |

2. Résultats du test de l'activité antimicrobienne :

L'activité antimicrobienne est traduite par la présence de zones d'inhibition autour des disques imbibés par notre extrait brut et par ses différentes dilutions.

Cette activité consiste en l'inhibition de la croissance microbienne après incubation.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 05 : diamètres des zones d'inhibition (en mm) observés pour les différentes espèces microbiennes testées.

| Espèces \ Dilution | 0* | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 |
|-------------------------------|-------------------------|-------------|-------------|------------|-----------|-----------|
| | <i>Escherichia coli</i> | 03 (-) | 00 (-) | 00 (-) | 00 (-) | 00 (-) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 02 (-) | 00 (-) | 00 (-) | 00 (-) | 00 (-) | 00 (-) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 30 (+++) | 27 (+++) | 20 (+++) | 16 (++) | 8 (+) | 0 (-) |

NB : 0* → correspond à l'extrait brut.

Pour l'espèce *Staphylococcus aureus*, nous avons obtenu des zones d'inhibition franches à partir de l'extrait brut (voir figure 12) et à partir des dilutions 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, la dilution 1/32 n'a donné aucun résultat (voir figure 13).

Les résultats obtenus laissent dire que *Staphylococcus aureus* est sensible à notre extrait de polyphénols.

Pour les espèces *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* nous n'avons obtenu aucune zone d'inhibition franche que soit à partir de l'extrait brut ou à partir des différentes dilutions.

Par ailleurs nous avons remarqué une légère inhibition pour ces deux espèces *Escherichia coli* (voir figure 14) et *Pseudomonas aeruginosa* (voir figure 15) mais nous ne pouvons pas les considérer comme des zones d'inhibition franches ce qui laisse dire que *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* ne sont pas sensibles à notre extrait de polyphénols.

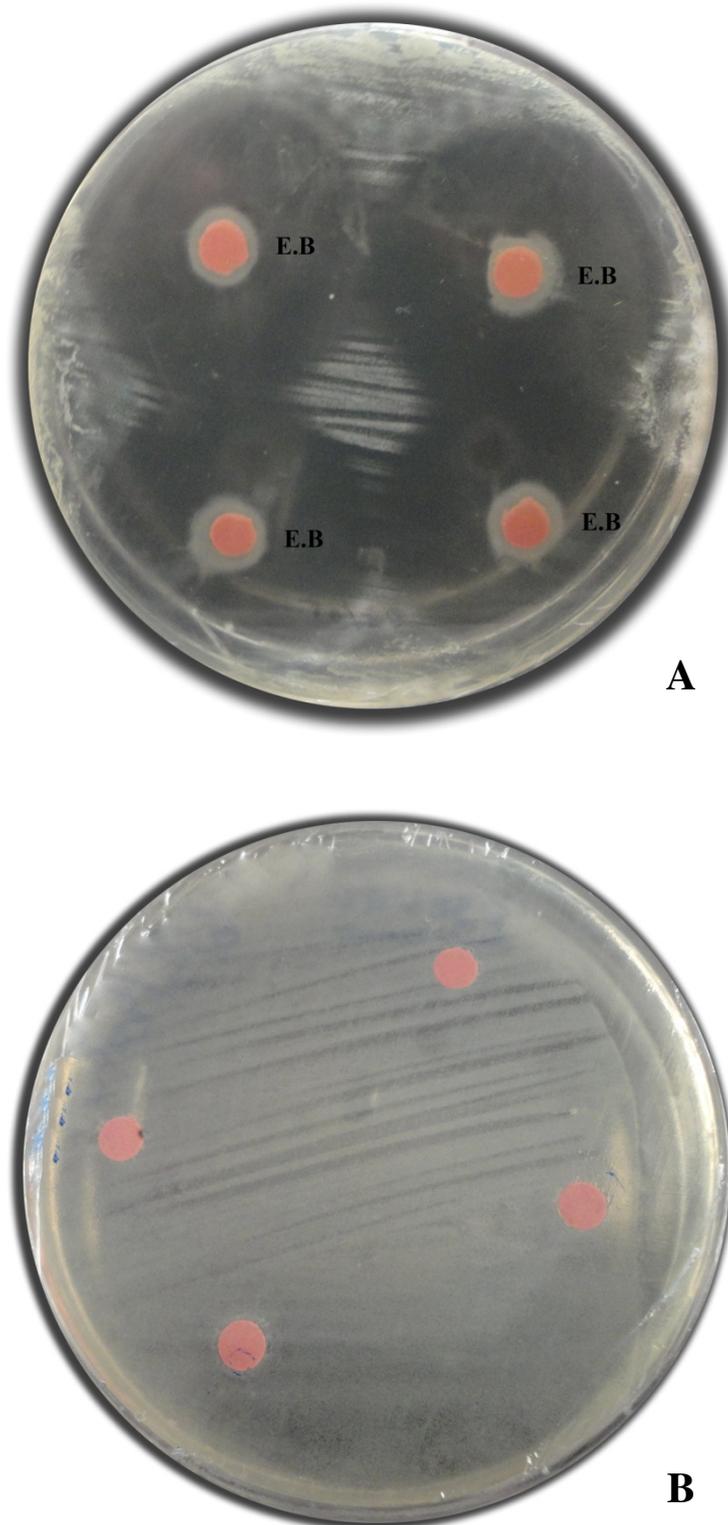


Figure 12: les zones d'inhibitions obtenues à partir de l'extrait brut sur l'espèce *Staphylococcus aureus* en comparaison avec le témoin (-)

A : Test

B : Témoin négatif

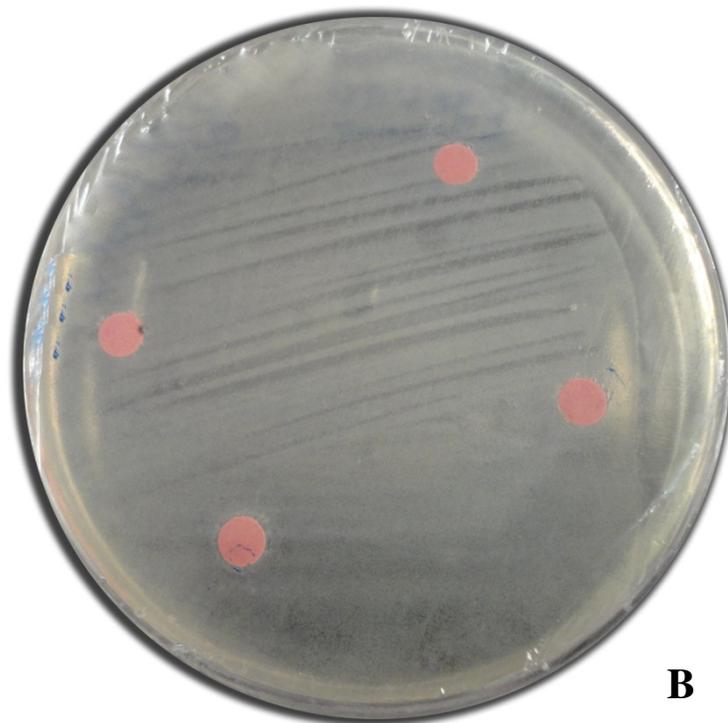
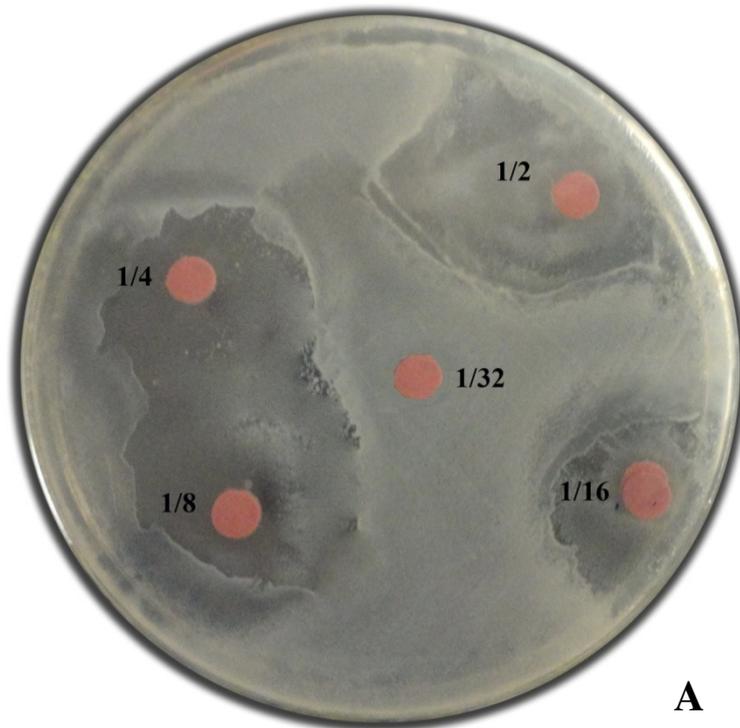


Figure 13: les zones d'inhibition à partir des dilutions $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$ sur l'espèce *Staphylococcus aureus* en comparaison avec le témoin (-)

A : Test

B : Témoin négatif

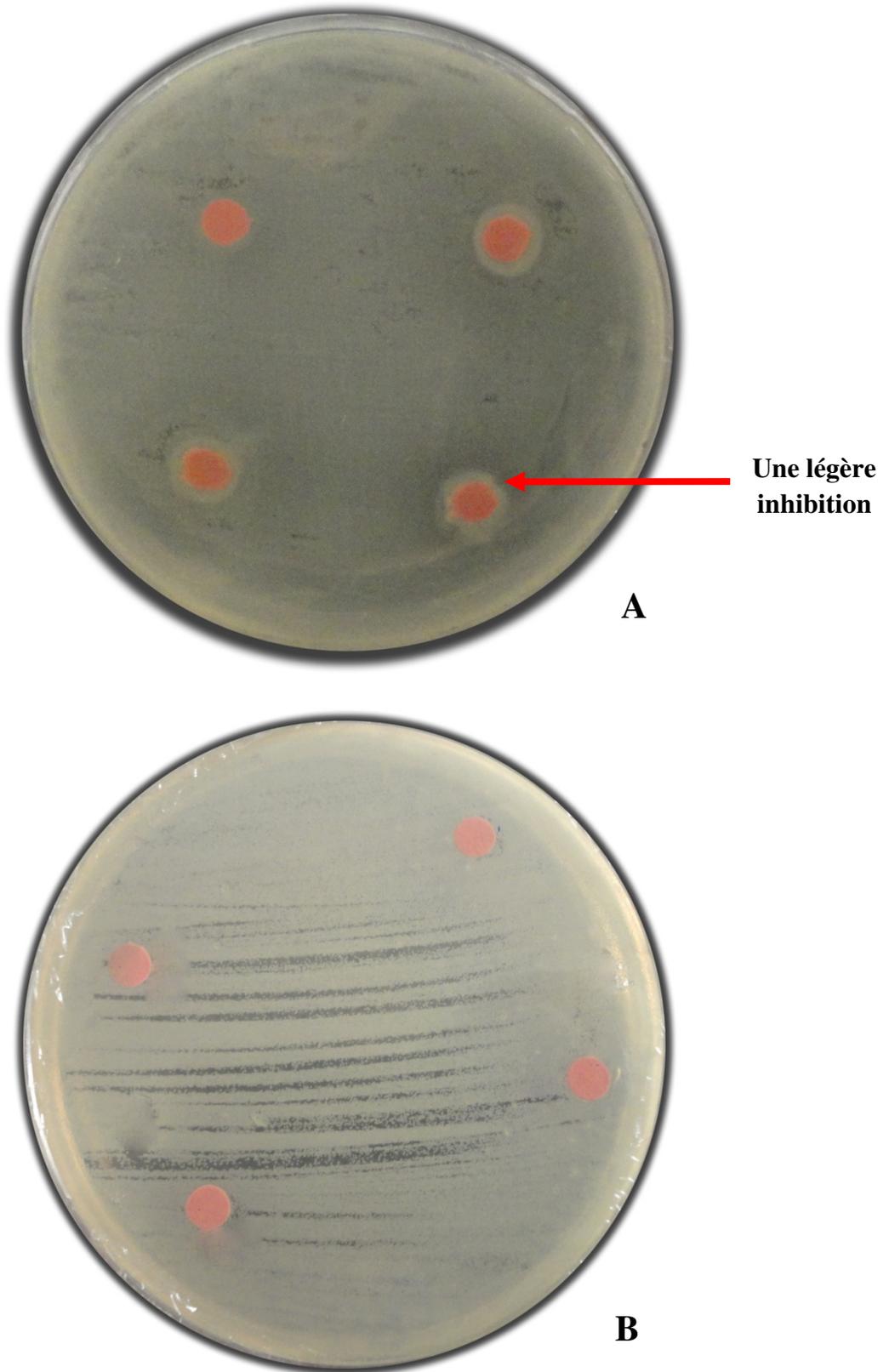


Figure 14: légère inhibition pour l'espèce *Escherichia coli* en comparaison avec le témoin (-)

A : Test

B : Témoin négatif

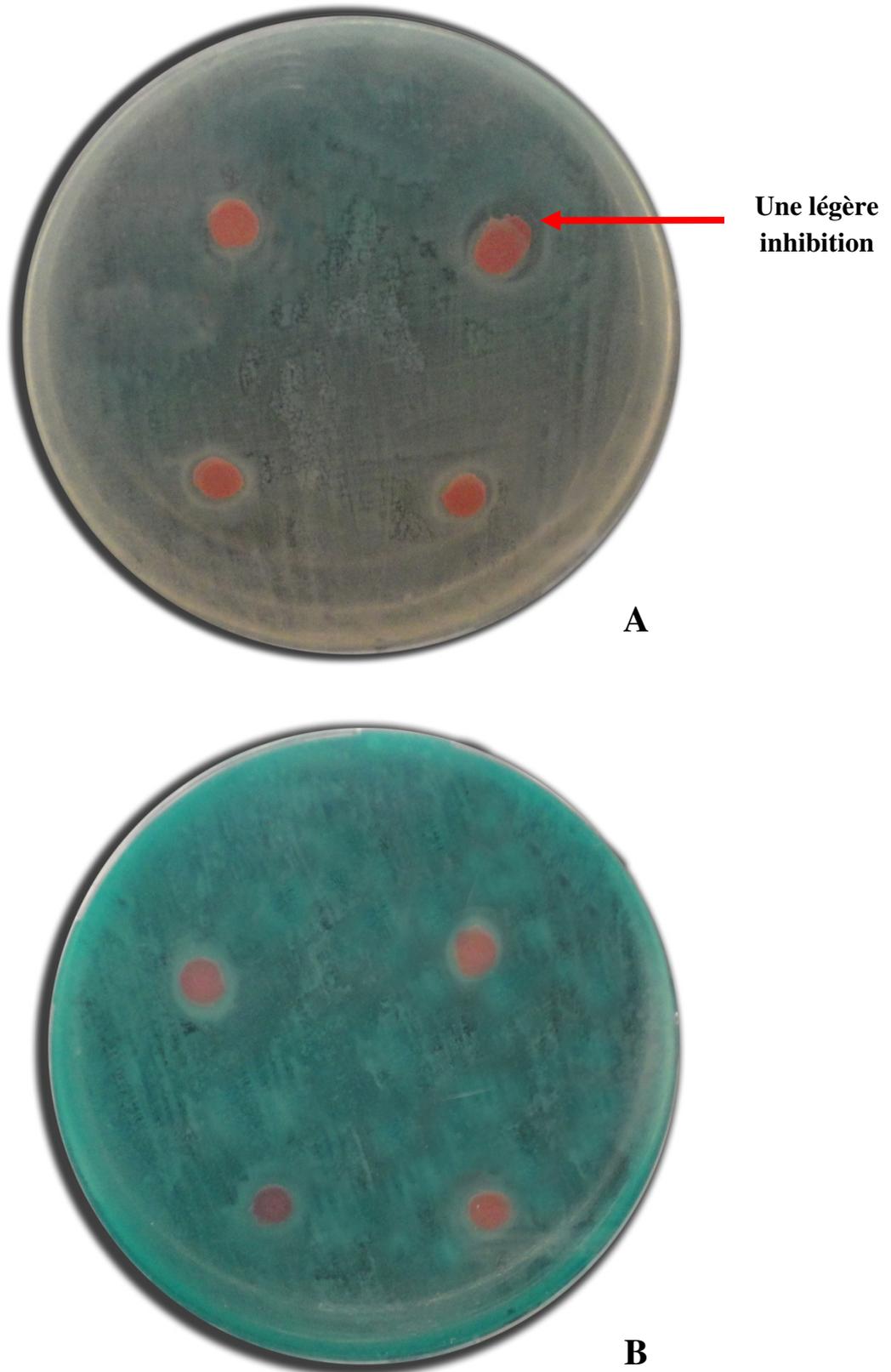


Figure 15: légère inhibition pour l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* en comparaison avec le témoin (-)

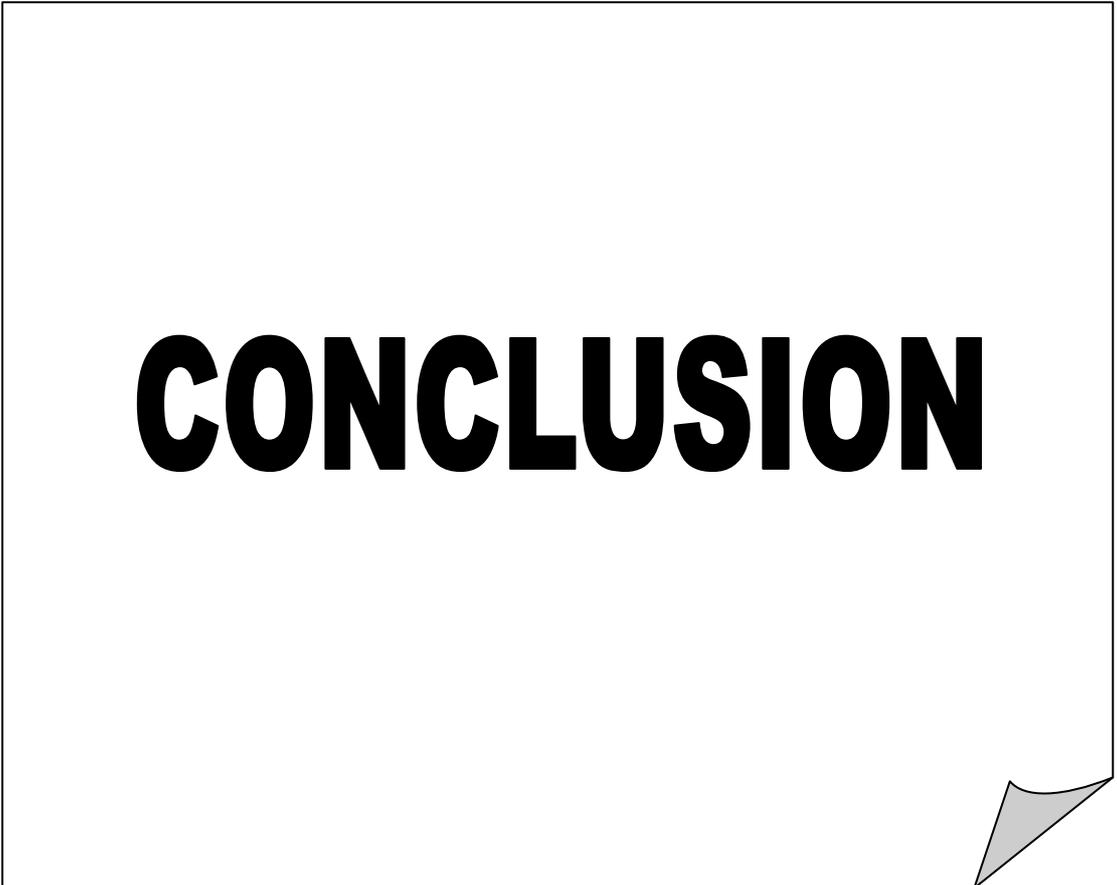
A : Test

B : Témoin négatif

Dans notre cas et d'après les résultats obtenus, l'activité de l'extrait est due aux polyphénols et elle pourrait être liée au degré d'oxydation de ces composés.

En effet, les polyphénols sont des composés très susceptibles d'auto-oxydation, cette dernière se traduit par une polymérisation des monomères tels les monomères de flavonoïdes pour donner des polymères de poids moléculaires élevés. Il a été démontré que le mécanisme de toxicité vis-à-vis des microorganismes se fait soit par la privation des ions métalliques tels que le fer soit par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires (les adhésines) ou les enzymes. (Scalbert, 1991) et (Cowan, 1999)

Cependant un important facteur qui régit l'activité antimicrobienne des polyphénols est leur poids moléculaire, les monomères sont trop petits pour établir assez de pont hydrogènes tandis que les polymères de haut poids moléculaire sont trop grands pour traverser la paroi bactérienne, le poids moléculaire idéal serait donc celui des oligomères. (Field, 1992)



CONCLUSION

Notre travail avait pour but de confirmer les vertus des dattes à travers le test de l'activité antibactérienne sur des souches pathogènes pour l'homme.

En effet les résultats obtenus, ont révélé la richesse des dattes en polyphénols et en particulier les flavonoïdes.

Le test de l'activité s'est montré concluant sur l'espèce *Staphylococcus aureus* avec une inhibition que ce soit avec l'extrait brut ou les dilutions $1/2$, $1/4$, $1/8$, $1/16$, alors que chez les espèces *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* l'inhibition était moins évidente.

Cependant, le résultat obtenu sur l'espèce *Staphylococcus aureus* laisse dire que notre étude peut être enrichie avec des recherches approfondies sur les interactions entre les microorganismes et les métabolites secondaires des plantes en général et ceux des fruits des dattes en particulier.

Enfin, notre travail et la science ne font que confirmer les propos du prophète : « un foyer où il n'y a pas de dattes ses habitants sont affamés »

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUE

1. **Al-Shahib W., Marshall R. J., 2003.** The fruit of the date palm: it's possible use as the best food for the future? *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 54 : 247-259. [Abstract].
2. **Amellal H., 2008.** Aptitudes technologiques de quelques variétés communes de dattes : Formulation d'un yaourt Naturellement Sucré et Aromatisé. Laboratoire de recherche de technologie alimentaire (LRTA). Université M'Hamed Bougara-Boumerdes. 203 p.
3. **Anonyme., 2003.** Bactériologie DCEM 1- Service de Bactériologie. Faculté de médecine Pierre et Marie CUIRE. Université Paris- VI, 122 p.
4. **Anonyme., 2012.** Les dattes et leurs secrets. *STAR magazine* n° :1437 du 15 au 21 juillet 2012. 48 p.
5. **Bahorun T., 1997.** Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food Agric. Res.* N° special: 83-95.
6. **Benflis S., 2006.** Caractéristiques biochimiques de l'extrait de datte variété sèche « Mech-Degla ». Mémoire d'ingénieur. Département d'agronomie. Batna, 49 p.
7. **Booij I., Piombo G., Risterucci J.M., Coupe M., Thomas D., Ferry M., 1992.** Etude de la composition chimique de dattes à différents stades de maturité pour la caractérisation variétale de divers cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*). *Fruits*, 47 (6) : 667-678.
8. **Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème édition. Médicales Internationales-Tec et Doc. Paris, p 370-401.
9. **Buelguedj, M., 1996.** Caractéristiques des cultivars de dattiers du Sud-Est du Sahara algérien. Vol I. Conception et réalisation : filière « Cultures pérennes » de l'ITDAS, 67 p.
10. **Cabanillas B. J., 2011.** Caractérisation de principes actifs antileishmaniens isolés de Piperaceae et Zingiberaceae médicinales péruviennes. Thèse de doctorat. Ecole doctorale : Sciences de la Matière. Unité de recherche : Laboratoire de

- pharmacochimie des substances naturelles et pharmacophores redox – UMR-152. Université Toulouse III - Paul Sabatier, Toulouse. France, 215 p.
11. **Castellani & Chalmers 1919.** Bergey's manual of determinative Bacteriology, 8th ed. 1974, Ed.: R.E. Buchanan, The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
 12. **Cowan M., 1999.** Clin. Microbiol. Rev. 12: 564-582.
 13. **Daas amiour S., 2009.** Etude quantitative des composés phénoliques des extraits de trois variétés de dattes (Phoenix dactylifera L.) Et évaluation in vitro de leur activité biologique. Mémoire de magister. Département de Biologie, Faculté des Sciences Université El-Hadj Lakhdar – Batna. 160 p.
 14. **Dacosta Y., 2003.** Les phytonutriments bioactifs. Editions Yves Dacosta. Paris, 317 p.
 15. **Djerbi M., 1994.** Précis de Phoeniciculture. FAO Rome. 192 p.
 16. **Duraffourd C., D'Hervicourt L., Lappraz J.C. ; 1990.** Cahiers de phytothérapie clinique. Examen de laboratoire galénique. Elements thérapeutiques synergiques. 2^{ème} édition Masson (Paris), 87 p.
 17. **Espiard E., 2002.** Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Tech et Doc Lavoisier, pp147-155.
 18. **Estanove P., 1990.** Note technique : Valorisation de la datte. In Options méditerranéennes, série A, N°11. Systèmes agricoles oasiens. Ed. Ciheam, pp 301-318.
 19. **Field J.A., Lettinga, G., 1992.** Basic Life Science 59: 673-692.
 20. **Ghazi F., Sahraoui S., 2005.** Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de dattes communes : Tantboucht et Hamraïa. Mémoire d'ingénieur .Institut national d'agronomie. Alger, 81 p.

21. **Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A. M., 2001.** Le préparateur en pharmacie. Ed. Médicales Internationales. Paris, pp 108-119.
22. **Guingard J, 1996.** Biochimie végétale. Lavoisier, Paris, pp 175-192.
23. **Haddoud N., 2012.** Exportation de dattes : Les unités de conditionnement doivent répondre aux normes internationales (Horizons). Rapport de l'Association des producteurs de dattes de Tolga. Forum des chefs d'entreprise le Lundi 7 janvier 2013, Chéraga – Alger. 17 p.
24. **Hagerman A.E., 2002.** Tannin Handbook. 2ème édition. Miami University. Oxford, USA, 116 p.
25. **Krief S., 2003.** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (pan troglodytes schweinfurthii) en Ouganda, activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de doctorat. Brunoy, 237 p.
26. **Krisa S., waffo teguo P., Decendit A. , Deffieux G., Huguet F., Fauconneau B., Mérillon J M., 1997.** Production, purification et activité biologique des picéides(stilbènes) extraits de cultures cellulaires de vitis vinifera L. Bull. Soc. Pharm., 136 : 7-18.
27. **Lagnika L., 2005.** Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur. Strasbourg, 249 p.
28. **Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E., Kefalas P., 2005.** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food chem.*, 89: 411- 426.
29. **Marfak A., 2003.** Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de Limoges, 220 p.
30. **Maskan M., 2001.** Kinetics of colour change of kiwifruits during hot air and microwave drying. *Journal of Food Engineering*, 48, 169-175.

31. **Matallah M., 2004.** Contribution à l'étude de la conservation des dattes de la variété Deglet-Nour : Isotherme d'adsorption et de désorption. Mémoire d'ingénierie en Agronomie. Institut National Agronomique (INA) El Harrach – Alger, 78 p.
32. **Migula W., 1895.** Bacteriaceae (Stäbchenbacterien) In: Die Natürlichen Pflanzenfamilien. Teil I, Abteilung Ia, Ed.: A. Engler, pg. 20-30, W. Engelmann, Leipzig.
33. **Milane H., 2004.** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg, 268 p.
34. **Munier P., 1973.** Le palmier dattier. Ed. Maisonneuve, Paris, 221 p.
35. **Noui Y., 2001.** L'optimisation de la production de la biomasse "Saccharomyces cerevisiae" cultivé sur un extrait de datte. Mémoire d'ingénieur. Département d'agronomie. Batna, 62 p.
36. **Pasteur L., 1880.** (réunies et annotées par Louis Pasteur Vallery-Radot), *Œuvres de Pasteur* (7 tomes), Masson, 1939
37. **Perret C., 2001.** Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cinerea*. Thèse de doctorat. Université de Neuchâtel, 184 p.
38. **Ponce A.G., Fritz R., del Valle C. Roura S.I. ; 2003.** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic.
39. **Randerath K., 1971.** Chromatographie sur couches minces. Gauthier-Villars. Paris, 337-339.
40. **Richarde R., 1972.** Eléments de biologie végétale. Fou Cher, Paris, 164 p.
41. **Scalbert A., 1991.** Phytochemistry. 30 : 3875-3883.
42. **Siboukeur O., 1997.** Qualité nutritionnelle, hygiénique et organoleptique du jus de dattes. Thèse Magister, INA. El-Harrach, Alger, 106 p.

43. **Vilkas M., 1993.** Vitamines. Ed. Hermann, 158 p.
44. **Wagner H., Bladt S., 1996.** Plant drug analysis. A thin-layer chromatography atlas, (2nd ed.). Berlin : Springer, 384 p.
45. **Wong, C.C., Li, H.B., Cheng, K.W., Chen, F., 2006.** A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem.*, 97: 705-711.

RÉSUMÉ

Résumé

La datte est un fruit très apprécié, d'une grande valeur nutritionnelle, sa teneur en composés phénoliques incite à mieux le valoriser. L'objectif de notre étude est de quantifier en premier lieu les composés phénoliques présents dans l'extrait organique d'une variété de datte algérienne nommée (Mech Degla) et d'évaluer en second lieu *in vitro* l'activité antimicrobienne de ce dernier. Les résultats du dosage des composés phénoliques ont révélé une moyenne en polyphénols qui est égale 158,76 µg/ml EAG.

Par la technique de Chromatographie sur Couche Mince (CCM) de l'extrait de polyphénols de dattes nous a permis d'avoir des informations sur ses constituants par la fluorescence ; coloration après révélation ; et leur Rapport frontal (Rf).

Le test antimicrobien a montré une activité sur l'espèce *Staphylococcus aureus* alors qu'aucune activité n'a été observée sur les espèces *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Nous n'avons obtenu aucune zone d'inhibition franche, Les résultats obtenus laissent dire que *Staphylococcus aureus* est sensible à notre extrait de polyphénols.

Mots clés : activité antimicrobienne, composés phénoliques, dattes

Summary

The date is a much appreciated fruit of high nutritional value, its phenolics content prompts to more increase its standing. The aim of our study was to quantify firstly phenolic compound present in organics extracts of algerian date variety, named (Mech Degla) and to evaluate secondly invitro the biological activity (antimicrobial) of these extracts.

The results of the proportioning of the phenolic compounds revealed an average in polyphénols 158,76 $\mu\text{g/ml}$.

By the technique of Thin layer chromatography (CCM) date polyphenol extract enabled us to have information on its components by fluorescence; colouring after revelation; and their frontal Report/ratio (RF).

The antimicrobial test showed an activity on the species *Staphylococcus aureus* whereas no activity was observed on the species *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

We did not obtain any zone of honest inhibition; the results obtained let say that *Staphylococcus aureus* is sensitive to our polyphenol extract.

Key words: antimicrobial activity, phenolic compounds, dates.

ملخص

التمر فاكهة جد مطلوبة وذات قيمة غذائية عالية لاحتوائها على مركبات فينولية مما يدعو إلى زيادة الاهتمام بها كمنتج غذائي، الهدف من الدراسة التي اجريناها كان بالدرجة الاولى التقدير الكمي للمركبات الفينولية الموجودة في المستخلصات العضوية لصنف من التمور الجزائرية المختلفة بصفتها النوعية (مش دقلة) متبوعا بدراسة مخبرية لتأثيرات البيولوجية (مضاد البكتيريا). نتائج تقدير جرعة المركبات الفينولية كشفت عن معدل الفينولات 158,76 ميكروغرام/مل .

بتقنية الكروماتوغرافيا على طبقة رقيقة لمستخلص فينولات التمور تسمح بامتلاكها لمعلومات حول المركبات ، من خلال الإشعاع ، التلوين قبل الإشعاع ، و مردودها .

الفحص المضاد للبكتيريا برهن مفعوله على صنف *Staphylococcus aureus* في حين أنه لا يلاحظ أي مفعول على صنف

Escherichia coli و *Pseudomonas aeruginosa*.

النتائج المحصل عليها تسمح لنا بالقول أن *Staphylococcus aureus* حساسة لمستخلصنا الفينولي .

الكلمات المفتاحية: الفينولات ,مفعول,مضاد البكتيريا, التمر.