

REPUBLIQUE ALGERERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Présenté à la faculté des Sciences de la Nature et de la vie

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

BETTACHE Wafaâ

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : Valorisation des substances naturelles végétales

Thème

Soutenu publiquement le 26/06/2016

DEVANT LE JURY :

Président : BENAKRICHE ,B

Université de Mostaganem

Examinatrice : Ait Saâda ,Dj

Université de Mostaganem

Encadreur : BEKADA ,A

Université de Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire de Microbiologie et biochimie N°1 d'Université (ITA)

Remerciements

Nous remercions dieu tout puissant et miséricordieux qui nous a donné la volonté, la patience et le M^{er} Bekhada Mohammed Ahmed Ali je suis satisfaite de vos qualités Exceptionnelles de bonne enseignante dont votre simplicité et votre amour du travail ont fait de vous une enseignante admirable dont l'exemple à suivre.

Je tiens à remercier intensément M^{er} Ait Saâda d'avoir accepté de présider le jury de la soutenance, qu'il trouve ici toutes mes expressions respectueuses.

Je tiens à remercier très sincèrement M^{er} BENAKRICHE ,B non seulement pour avoir accepté de faire partie des membres du jury de mon travail, mais aussi pour son soutien moral et professionnel pendant la thèse et toutes les années d'études.

Je tiens à remercier toute les techniciens des laboratoires de biochimie et de microbiologie et toutes les personnes avec qui j'ai partagé des bons moments. Je leur serai toujours reconnaissante pour leur aide et leurs conseils et je pense spécialement à Saadia (pour sa gentillesse) , M^{er} Ait Saâda (pour ses conseils et ses encouragements).

et mes remerciement également à toutes les personnes qui ont contribuées de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Dédicace

Ce qui sont les plus chers au monde, mes parents :
A mon père, pour m'avoir soutenu moralement et matériellement
jusqu'à ce jour.

Père, ce travail est le tien.

A ma mère, voici l'aboutissement de tes nombreuses nuits de
prières de ta sagesse et ta générosité pour votre petite fille.

Chère mère, ce travail est le fruit de tes efforts.

Je n'oublie jamais la générosité illimitée de mes sœurs :

Ahlem, Nadia et Fayza.

A mes frère Rochdi, yacine et nesr el din.

Et les petits : wacim, wissale, chaymaa, Amina , rihab , walid
, aymane , sami et tadj el din .

Et tous la familles : Bettache et Berahou

Et à mes tantes fatma , fouzia et tawas , khadidja et bakhta et
mes tantes et fille libre fouzia et manal.

Mes études dans de bonnes conditions, tous simplement je
voudrais leurs dire je les aime de tout mon cœur.

A mes neveux et nièces :

Je vous souhaite beaucoup de chance. J'espère que vous allez
suivre les pas de votre tante, que Dieu vous protège.

A tous mes amies.

A tous les étudiants de la valorisation des substances naturelles
végétales.

A tous mes enseignants de primaire jusqu'à l'université.

Wafaâ

Liste des tableaux

Tableau N° 01 : Nom scientifique de chaque pays	02
Tableau N°2 : Activités biologiques des composés polyphénoliques.....	22
Tableau N°3 : Classification botanique de souche <i>E. coli</i>	27
Tableau N°4 :Classification botanique de bactérie <i>P. aeruginosa</i>	29
Tableau N°5 :La densité optique de différentes concentrations de galle.....	31
Tableau N°6 :La densité optique de différentes concentrations de l'extrait	31
Tableau N°7 : Résultat des taux d'inhibition(mm) obtenus par <i>Escherichia coli</i> et <i>P. aeruginosa</i> de l'extrait de plante de sénégales récoltées (moyennes \pm écarts -type).....	33

Liste de figure

FigureN° 01 : Origine et répartition géographique

Figure N°02 : Structure et composition de plante séné

Figure N°03:les photos de déférence de plante séné (acacia angustifolié)

Fig. 04 : Les différentes classes des composés phénoliques

Fig. 05 : Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamiques

Fig. 06 : Structure chimique de quelques coumarines .

Fig. 07 : Squelette de base des flavonoïdes .

Fig. 08 : Biosynthèse des flavonoides .

Fig. 09 : Structures chimiques de quelques flavonols.

Fig. 10 : Structure de quelques anthocyanidine.

Fig. 11 : Structure chimique des tanins condensés

FigureN°14 : les feuilles de séné (original de marché Oran ,2016).

Diagramme N° 15 : méthode d'extraction par extracteur soxhlet.

FigureN°16 : Extracteur sexhlet et rotavapor d'extrait polyphénol brut.

DiagrammeN°17 : Récapitulation des étapes de dosage des polyphénols totaux.

Figure N° 18 : technique de diffusion en puits

FigureN°12 : la bactérie *E .coli*

FigureN°13 : les bactéries *P .aeruginosa*

FigN°14 : résultat de densité optique de différentes d'extrait séné étudiée sur polyphénolique

FigN°16 : effet des polyphénols totaux du séné sur *P . aeruginosa*

LISTE DES ABREVIATIONS

mg/g : milligramme par gramme.

%: pourcentage.

M: la masse molaire.

d: la densité.

g/l : gramme par litre

g/mol: gramme par mole

°C: degré Celsius

g: gramme

ml: millilitre

min : minute

mm : millimètre

nm : nanomètre

µl: microlitre

UV: Ultra Violet

µm: micromètre

m: mètre

I%: pourcentage d'inhibition

T : contenu total des polyphénols (mg équivalent acide gallique/g d'extrait du gra

c : concentration en équivalent acide gallique (mg/ml).

v : volume de l'extrait (ml).

m : masse de l'extrait du grain (g)

fig : figure

DMSO : Diméthyle sulfoxyde

Na₂ CO₃ : Carbonate de sodium

OMS : Organisation mondiale de la santé

Résumé

Dans cette étude, on a évalué l'activité antibactérienne des extraits polyphénoliques d'une plante médicinale, le séné (cassia angustifolié) à l'encontre de deux souches bactériennes responsables de plusieurs infections à savoir *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.

Les résultats obtenus ont relevé que les extraits polyphénoliques de la plante étudiée, à savoir le cassia angustifolié (Séné), ont montré une certaine activité antibactérienne vis-à-vis de deux bactéries testées. Néanmoins, il apparaît que *E. coli* est la plus sensible parmi les deux souches bactériennes étudiées, avec des diamètres d'inhibition plus élevés.

Mots clés : Activité antibactérienne, Composés phénoliques,

Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli

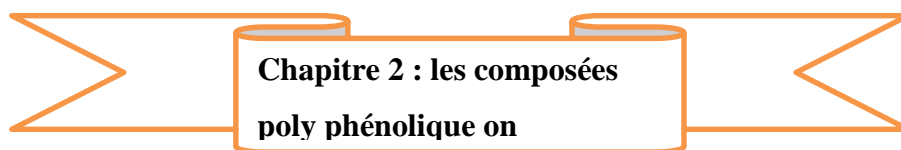
Sommaire

_Introduction générale.....	01
-----------------------------	----

Partie bibliographique



1-Sènè (cassiaangustifolié).....	02
2-Description	02
3-Un peu d’histoire.....	02
4- Origine et répartition géographique	02
5- Classification APGIII (2009).....	04
6-Constituants	04
7-Sources et structure	04
8-Propriétés	06
9-Botanique	08
10- Médicaments et bienfaits pour la santé	09
11-Usages	10



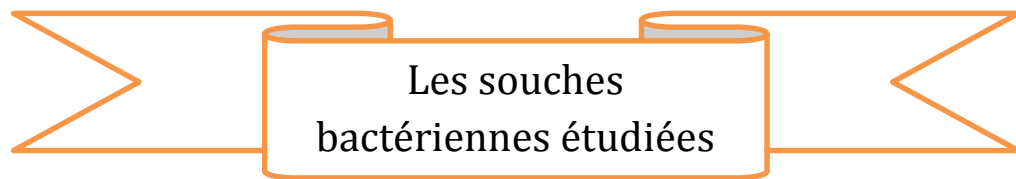
1-Généralités de polyphénoles	14
1-2-Classification des composés phénoliques	

Erre

ur ! Signet non défini.4

1-2-1- Les acides phénols et les coumarines	15
---	----

1-2-2- Les flavonoïdes	16
1-2-3- Les tanins.....	20
1-3-Intérêts des composés phénoliques.....	21
1-1-3-1-Rôle nutritionnel thérapeutique	21
1-3-2- Rôle physiologique	24
1-3-3-Rôle technologique	25



_Introduction	31
1- La famille des Enterobacteriaceae	31
1-1-Escherichia coli	31
1-1-1-Classification botanique de souche <i>E. coli</i>	31
1-1-2-Habitat	31
1-1-3-Les caractéristiques morphologiques et culturelles	32
1-1-4-Caractéristiques biochimiques	32
1-1-5-Pouvoir pathogène.....	32
1-2-La famille des <i>Pseudomonadaceae</i>	33
1-2-1- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
1-2-1-1-Généralités	33
1-2-1-2-Classification botanique	33
1-2-1-3-Habitat	33
1-2-1-4-caractéristiques morphologiques et culturaux.....	33
1-2-1-5-Caractéristiques biochimiques.....	34
1-2-1-6-Pouvoir pathogène	34



Parti expèrimentale

_Introduction.....	37
1-1-But de l'étude ... ;.....	37
1-2 -Lieu de travail	37
1-3-la matière végétale utilisée	37
1-4-l'extaction par soxhlet	38
1-4-1-Mode opératoire.....	38
1-5- Dosage des polyphénols totaux.....	40
1-5-1- Principe	40
1-5-2- Protocole	40
1-6-Prèpation des prè-cultures	42
1-6-1-Repiquage des souches bactériennes.....	42
1-6-2- Préparation de l'inoculum.....	42
1-6-3-Technique des Puits	42
1-6- 4-Technique de diffusion en puits.....	43



Partie :Résultat et discussion

1-Résultat de rendement en extrait séné :.....	45
2-Resultat de donsite optique chaque de différente concentration.....	45
3-Resultats des tests antibactériens	46
3-1-L'effets de extrait des polyphinols totaux du séné sur <i>Escherichia coli</i>	46
3-2-L'effets de extrait des polyphinols totaux du séné sur <i>P. aeruginosa</i>	46
_Discussion générale.....	50
_Conclusion.....	53
_ Annexes	

_Références bibliographiques

Introduction

A travers les siècles, les traditions humaines ont eu connaissance de l'utilisation des plantes médicinales. Si certaines pratiques médicinales paraissent étranges et relèvent de la magie, d'autres au contraire semblent plus fondées et plus efficaces, pourtant toutes ont pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé humaine.

Aujourd'hui l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que 80 % des cinq milliards d'individus qui peuplent la planète se soignent avec des remèdes naturels. Ce que l'on sait moins, c'est qu'un médicament sur trois tire son origine du monde végétal (Nowitz, 2002).

C'est ainsi que de plus en plus de personnes recourent à la phytothérapie pour se soigner, à cause du moindre coût, mais aussi pour éviter les effets secondaires des médicaments (Chiry, 1982).

Les plantes médicinales sont douées de cette efficacité à cause de leurs métabolites secondaires ou principes actifs tels que les composés phénoliques, les alcaloïdes et les huiles essentielles.

Notre pays est assez riche en ce type de plantes qui sont utilisées en médecine traditionnelle, de plus encore en l'art culinaire. Les composants phénoliques ont un effet inhibiteur sur les enzymes et ils sont connus par leur pouvoir antioxydant (Mali, 2006), ce qui prouve leur utilisation thérapeutique.

C'est dans cette optique que nous nous sommes proposé d'étudier l'effet antimicrobien d'une plante médicinale, à savoir le séné (*cassia angustifolié*) connu sous le nom arabe senne maki.

Pour mener à bien cette étude, nous l'avons divisée en trois parties résumées comme suit:

- Extraction des composés phénoliques par l'appareil soxhlet
- Dosage des composés phénoliques
- Effet antibactérien des composés phénoliques extraits

Enfin notre travail est complété par une conclusion.

1-le séné (C. angustifolia) :

Le séné est un petit arbuste appartenant à la famille Caesalpiniaceae. Incidemment, le séné appartient à deux genres de Cassia- *C. senna* aussi connu comme Alexandrina séné, et *C. angustifolia* qui est aussi appelé le Tinnevelly séné. Alors que la première série de senna se trouve le long du fleuve du Nil en Egypte et le Soudan, le second type est largement cultivé dans les régions méridionales et orientales de L'Inde. Il est cultivé traditionnellement sur 10.000 ha dans les terres semi-arides districts côtiers de Tirunelveli, Ramnathapuram et Madurai dans le Tamil Nadu. Bien que, la culture réussie a été démontrée dans de nombreuses régions de l'Ouest L'Inde. Il peut se développer sur des dunes de sable après la saison des pluies et peut être maintenu en tant que culture pérenne pour 2-3 années. *C. senna* est importé d'Egypte et vendu sur le marché comme Alexandrian senna. Fondamentalement, le séné originaire d'Afrique du Nord et se développe dans l'abondance partout dans la région ; normalement jusqu'à une hauteur de trois pieds. Il a des tiges vert clair. En outre, l'herbe porte des gousses ou des caisses de fruits en forme oblongues. Celles-ci sont utilisées à des fins thérapeutiques (Yannick Romieux, 1986).

2- Description:

Le séné est un arbrisseau de 1 mètre environ à tige dressée, cylindrique, rameuse, blanchâtre. Les feuilles, alternes, stipulées, ailées, sont divisées en folioles opposées, lancéolées, entières, petites, vertes glauques. Les fleurs, jaunes, sont groupées en épis auxiliaires. Le fruit, appelé follicule, est une gousse plate munie de graines, qui devient sombre en séchant (Kittisupamongkol et al, 2008).

3-Un peu d'histoire:

Le Coran rapporte les propos du prophète Mohammed au VIIe siècle : "Je vous recommande le séné et le miel : ce sont deux remèdes contre toutes les maladies hormis la mort." Le séné n'est pas mentionné dans les ouvrages préislamiques de la médecine grecque ou indienne, ce sont les Arabes qui ont introduit l'usage du "séné de La Mecque" en Europe. (Passmore et al, 1993).

4-Origine et répartition géographique :

Senna alexandrina est présent à l'état naturel du Mali jusqu'en Somalie et au Kenya. En Asie, il est également indigène depuis la péninsule Arabique jusqu'en Inde et au Sri Lanka. Au Mozambique, il a probablement été introduit il y a longtemps et il a

aussi été introduit il y a longtemps et il a aussi été introduit dans plusieurs pays d'Asie centrale et de la Méditerranée, aux Caraïbes et au Mexique. Sa culture commerciale est pratiquée en Inde, au Soudan, en Egypte, au Pakistan, en Chine et en Corée.

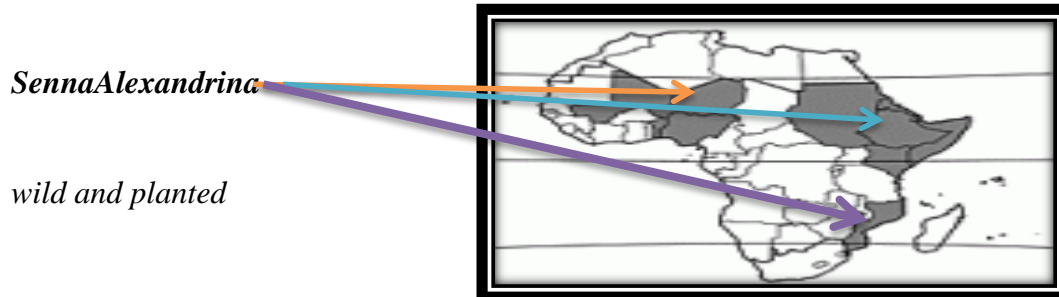


Figure N° 01 : Origine et répartition géographique

Tableau N° 01 : nom scientifique de chaque pays :

Noms français	Sènè, Sènède Tinnevelly
Nom scientifique	Cacia angustifolia
Nom anglais	Alexandrian Senna Senna
Nom allemand	Sennesblätter oder Sennesfruchte
Nom italien	Senna
Nom portugais	Sene
Famille	Caesalpiniées

5- Classification APGIII (2009)

Régne	plantae
Classe	Fabidées
Ordre	fabales
Famille	Fabaceae
Sous-famille	Caesalpinioideae
Genre	senna

Nom binominal

Senna Alexandrina (cassia angustifolié) (Mill.,1768)

6-Constituants :

- Dérivés d'anthracène
- Dérives naphtaléniques
- Flavonoïdes

7-Sources et structure :

7-1-Sources :

Il a été traditionnellement utilisé comme laxatif, et a en outre été prétendu être un expectorant, un pansement, un anti dysentérique, et un agent carminatif; et pour le traitement de la gonorrhée, les maladies de la peau, la dyspepsie, la fièvre et les hémorroïdes. Aucune de ces dernières revendications sont scientifiquement encore validées (**Kittisupamongkol W,2008**)

Les ingrédients actifs peuvent également être obtenus à partir des fruits de *angustifolia* Cassia ou *acutifolia* (considérés comme synonymes (**Passmore** , 1993) ;dont les fruits sont parfois appelés Fructus Sennae (**Kittisupamongkol W,2008**)

7-2- Structure et composition :

Comme un supplément à base de plantes séné contient une variété de molécules

et substances bioactives telles que Les stéréo-isomères Sennoside A et B (deux principaux, bien que C-E). Ils ont trouvé à 01/12 à 01/24% (**Bala S, 2001**), (Aloe-émuline et Emodin Chrysophanol, physcion et Racemochryson, dihydroanthracénone et anthraquinone dérivés Flavonoïdes, elle y compris kaempférol précurseurs de naphthalène [Beta-sitostérol et du stigmastérol (Mena, Rejón GJ, 2002). Les sennosides sont considérés comme les ingrédients actifs. Ce sont des glucosides d'une molécule d'anthrène théine, qui se lient alors à l'autre par paires. Pour que le médicament soit biologiquement actif, le glycoside doit d'abord être rompu (par le métabolisme des bactéries intestinales), puis la molécule dirheinanthrone (également connue sous le nom Sennidin) se sépare de manière passive. Sennosides peuvent passivement se dégrader en glycosides de anthrènes théine, appelé 8-glucosyle anthrènes de théine, mais habituellement réformer passivement avant d'être métabolisé par les bactéries et le déplacement vers la droite dans le diagramme ci-dessous

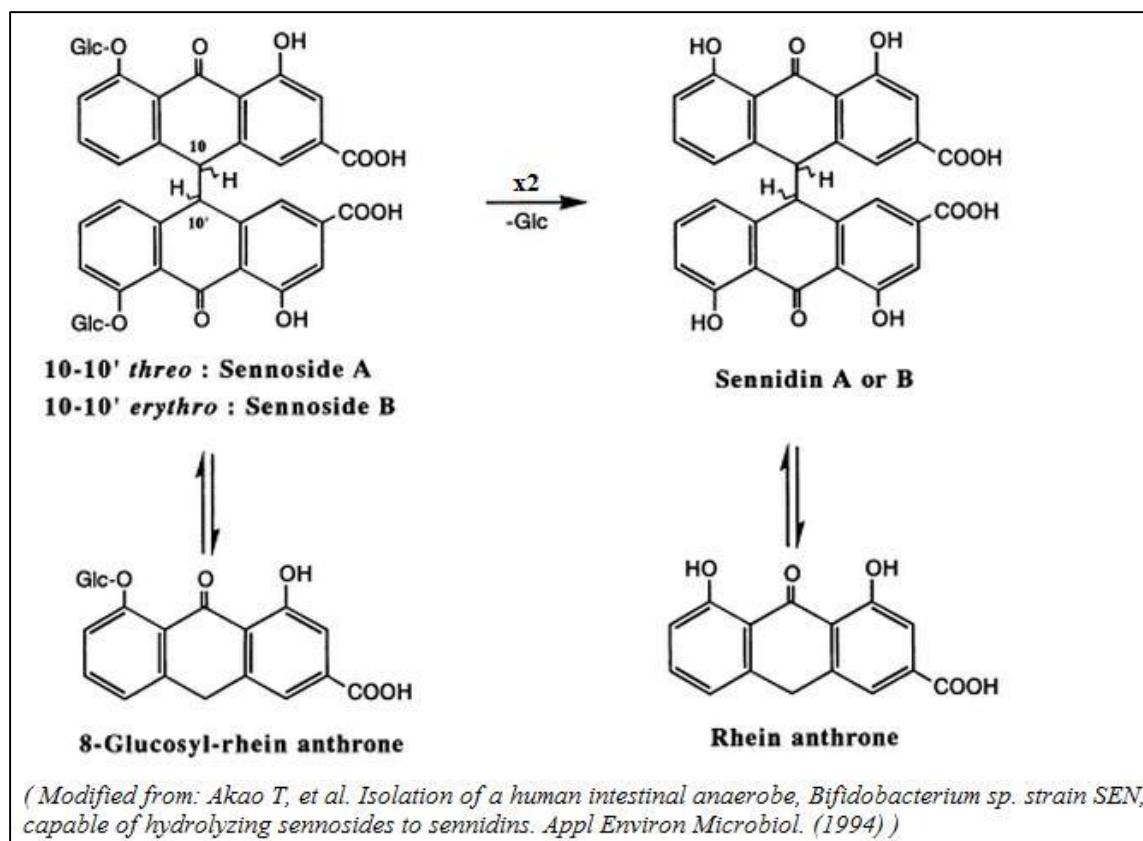


Figure N°02 : Structure et composition de plante séné .

8-Propriétés :

Les composés actifs des feuilles et de la paroi des gousses, pratiquement identiques, sont constitués, sur la base du poids sec, de 2–5% de dérivés d’anthraquinone et d’hétérosides dianthrones apparentés. Le produit séché contient principalement des sennosides A et B, ainsi que de petites quantités de composés apparentés. Les sennosides sont peu résorbés dans l’intestin grêle, mais une fois dans le côlon, ils sont hydrolysés par la flore bactérienne et les anthraquinones formées sont réduites pour produire les anthrones actives, responsables de l’activité laxative, car elles stimulent les mouvements péristaltiques. Les feuilles de qualité pharmaceutique doivent contenir 5,5–8,0% de sennoside B, les gousses quant à elles devant en renfermer au moins 2,2% (“séné Tinnevely”) à 3,4% (“séné alexandrin”) (Ali, 1973)

Les publications médicales scientifiques abondent, surtout sur l’usage de *Senna alexandrina* comme laxatif et sur ses risques probables pour la santé. Bien qu’aucun effet carcinogène dû à un usage prolongé n’ait été découvert lors d’essais sur des rats, il ne doit être utilisé que pour une constipation passagère, car toute utilisation prolongée peut donner lieu à une colite ulcéreuse chronique. L’utilisation de cette substance pharmaceutique est contre-indiquée dans les cas d’obstruction intestinale et d’inflammation intestinale aiguë. Une utilisation chez les enfants de moins de 12 ans et les femmes enceintes ou allaitantes doit être déconseillée. Le recours aux préparations amaigrissantes est dangereux. L’extrait à l’éthanol des feuilles de *Senna alexandrina* montre une activité inhibitrice contre *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, mais pas contre les bactéries gram-négatives.

Comme purgatif, *Senna alexandrina* est souvent remplacé par d’autres espèces de *Senna*, de *Cassia* et d’*Aloe*. Il était jadis courant et rentable de couper les produits du commerce avec d’autres plantes, mais de nos jours, les pays d’importation ont des règles et des contrôles stricts. Selon les sources, on a trouvé dans ces produits jusqu’à 90% de *Senna auriculata* (L.) Roxb. (“avaram”), et *Senna italica* Mill. (“séné du Sénégal”) était aussi couramment utilisé. Dans de nombreux pays africains, les préparations commerciales sont importées.

9-botanique :

Comme une culture annuelle, il reste dans le domaine de 110-130 jours. La plante composée de feuilles, de 5-8 paires ; dépliantes traquées ovales lancéolées (2.5cm × 1.5cm) et peut produire au ras successif de pousses et axillaires sous-floraison de position terminale 60-70 jours après le semis. Les fleurs sont grandes et brillantes jaune de couleur, les gousses de taille moyenne se produisant (3.5cm-6.5cm x 1.5cm) après 90 jours. Ils peuvent contenir 5-8 graines plates. C'est principalement des cultures autogames qui pourraient s'élever à (20%) par le biais coléoptères(Singh, K, 1992).

9-1-Le climat et le sol :

Ses plantes poussent jusqu'à 1m de hauteur sur des terres en climat subtropical en péninsulaire Inde. Il met en feuilles avec le début du froid. La récolte se développe sur des terres bien drainées, sols latéritiques de 7-8,5 Ph. Les cultures irriguées donnent des rendements élevés. Il faut un temps chaud sec car la stagnation temporaire de l'eau dans les champs peuvent causer la perte de la récolte (Shelton, M.G, 1980)

9-2- Préparation du sol et de semis :

Une fois la terre labourée, l'hersage exposé au soleil pendant 10-15 jours, avant de se diviser en petites zones pour maintenir le drainage. Il est donné 20: 40: 20 kg / ha de N, P et K, mélangé avec 25 kg de Aldrin (5%) ou BHC (5%) pour conjurer les vers et termites. La dose de semis est de 6 kg / ha pour ligne-cultures semées . Les graines sont récoltées stade de maturité, trempées dans l'eau 12hr, traité avec 2,5 g / kg Captan ou thirame et cela pour assurer une bonne germination(Shelton, M.G, 1980).

9 -3-Saison :

Une culture composite appelé, Trinnevelly Senna, est cultivée partout dans le sud de l'Inde. La culture est importante pendant les saisons pluviales de mousson (Juillet dans le nord-ouest de l'Inde et Septembre-Octobre dans le sud de l'Inde), alors ensemencée en Février ;le senné est limité à Tamil Nadu où il est semé au printemps.

9-4- fumiers et engrais :

Les essais sur l'utilisation d'engrais minéraux au plusieurs endroits en Inde

ont révélé que le culture s'élève en utilisant 40 kg N et 25-50kg P₂O₅ / ha appliqué comme pansement et 40 kg basale N / ha appliqué en 2 somnole fendues. Application de 5-10t de FYM / ha en fumure a donné un meilleure rendement (**Bala S, 2001**).

9-5- Irrigation et Interculture :

Dans le Tamil Nadu, le séné est cultivé après la récolte du riz paddy et cultures intercalaires compagnon de sésame, de coton et de légumes. Dans le nord-ouest de l'Inde, le séné-moutarde et senna-coriandre donnent plus rendements.

9-6- Récolte et rendement :

Trois cueillettes de feuilles et les gousses sont habituellement prises après 130 jours de semis. Habituellement, les pousses florifères sont coupées initialement pour augmenter la ramification et cela va permettre à mettre en place plus la croissance végétative. Les feuilles matures et 15-25 jours et les vieilles gousses sont récoltées. En moyenne 1,2-1,5 tonnes / ha de feuilles sèches et 3.5-4q gousses / ha sont obtenues (**Bala S, 2001**).

9-7-technologie post-récolte :

Le feuillage sec et les gousses doivent posséder au moins 2,5 et 3,0% au total sennosides respectivement. Les produits récoltés devraient se propager en soleil. Ils sont en outre séchés dans des jettes bien ventilés pendant 3-5 jours. Il devrait y avoir pas plus de 8,0% d'humidité au stockage. La couleur de feuilles sèches et les gousses devrait rester d'un vert clair au jaune. Le sennosides sont solubles dans l'eau et l'exposition des produits à l'eau de pluie pendant le séchage peut les réduire. Le produit de stockage est susceptible de perdre jusqu'à 30% de son le contenu. Par conséquent, il est recommandé de stocker les produits dans des endroits frais et secs après avoir réduit la masse sous presse hydraulique et enveloppés dans des sacs de jutes bordées de polythène, en particulier pour les longs transports. Les produits sont prêts pour la commercialisation. Si les feuilles et gousses jaunissement. Elles sont vendues en premier dans l'année avec une prime(**Chadha, 2011**).

10- Médicaments et bienfaits pour la santé :

Antipyrétique, cathartique, laxatif, vermifuge, diurétique, Nettoyage du colon de corps toxiques. Senna est un purgatif puissant utilisé dans le traitement de la constipation. Il stimule le péristaltisme intestinal. Il aide à promouvoir les excrétions des toxines qui contribuent à la fatigue et la mauvaise santé générale. Les anthraquinones de cette plante peut inhiber une variété de bactéries (Staphylocoques et Bacillus Coli) et les dermatomyces (Microsporumaudouini).Soulage la constipation en augmentant la quantité d'eau et d'électrolytes (substances dans le sang telles que Présidium et de potassium qui aident à réguler l'équilibre des fluides dans le corps) dans l'intestin (**Chadha, 2011**).

10-1- Pharmacologie de Cassia Senna:

Les feuilles et les gousses du Senna ont montré une activité laxative. Il est utile en constipation habituelle. Pharmacologie enquêtes montrent que sennosides A et B compte pour l'ensemble de l'activité de Senna feuilles et poids.Leaves contiennent glycosides, sennosides A, B, C et D. Deux naphtaline glycosides ont été isolées à partir de feuilles et les gousses. L'action médicinale de Senna peut être attribuée principalement à l'anthraquinone glycosides, en particulier Sennoside A et B. Il apparaît que la partie aglycone est responsable de son action. La répartition des les glycosides d'anthraquinone dans le tractus digestif peut se produire dans une des deux façons. La flore de l'intestin peuvent directement hydrolyser d'une manière similaire à celle de la libre actif aglycone. En variante, en présence de la bile et le fragment sucre, l'aglycone libre peut être absorbé dans la circulation sanguine et sécrétée plus tard dans le côlon.(**Chadha, 2011**). Le résultat final est la stimulation du plexus Auerbach entraînant une augmentation de muscles intestinaux contraction. En outre, sa teneur en mucilage, diminue l'absorption du corps du premier fluide pour une amélioration activité laxative

10-2- Constipation :

Séné par voie orale est efficace pour court traitement à long terme de la constipation. Senna est approuvé par la FDA pour les médicaments en vente libre. Prescrit pour adultes et les enfants âgés de 2 ans et plus.Cependant, chez les enfants âgés de 3-15 ans, l'huile minérale et un médicament appelé lactulose pourrait être plus

efficace. Chez les personnes âgées, Senna ainsi que psyllium est plus efficace que lactulose pour le traitement de la constipation chronique (Singh, K, 1992).

10-3- Bowel préparation avant coloscopie :

Efficace pour le nettoyage du côlon avant la coloscopie; Cependant, le phosphate de sodium ou du polyéthylène glycol sont plus lactulose efficaces.

10-4- Grossesse et allaitement maternel:

Senna est peut-être fort pendant la grossesse et l'allaitement quand il est utilisé à court terme. Il est peut-être dangereux lorsqu'il est utilisé à long terme ou à des doses élevées. À long terme, l'utilisation fréquente, à des doses élevées a donné de graves effets secondaires, y compris la dépendance laxative et des dommages au foie. De petites quantités de Senna dans le lait maternel, ne semble pas être un problème pour les nourrissons. Si la mère utilise Senna des quantités recommandées, cela ne provoque pas des changements dans la fréquence ou la consistance des selles des bébés.

10-5-Interactions avec les médicaments :

9-5-1- digoxine (Lanoxin) :

Senna est un laxatif stimulant pouvant diminuer le taux de potassium s'il est pris en quantités excessives. La surutilisation de Senna peut aussi causer un déséquilibre électrolyte qui pourrait aggraver les maladies cardiaques.

10-5-2- Perdre du poids

Pour perdre du poids on utilise le Senna avec des quantités non exagérées.

11-Usages :

Les feuilles et les gousses de *Senna alexandrina* sont utilisées pour leurs vertus laxatives et purgatives depuis l'antiquité et leur commerce remonte au moins au IX^e siècle après J.-C. En Occident, on trouvait *Senna alexandrina* dans la plupart des pharmacopées sous les noms de "Senna folium" et "Senna fructus". C'est une plante qui a aussi de l'importance en médecine traditionnelle indienne et chinoise. Au Soudan, en Ethiopie, en Somalie et au Kenya, les feuilles comme les gousses servent de purgatif. Au Soudan, on absorbe une décoction de gousses pour se débarrasser des vers intestinaux et soigner les difficultés respiratoires. L'infusion de gousses est préconisée pour les femmes enceintes comme purgatif et pour faire disparaître la

fièvre. L'infusion de feuilles se boit pour venir à bout des flatulences et des convulsions et pour arrêter les saignements de nez (Akoègninou, 2006). En Ethiopie, le bois sert à faire des outils agricoles. Les buissons sont broutés par les chameaux et les chèvres en Somalie. Cependant, au Soudan, *Senna alexandrinat* tend à dominer la végétation dans les zones de pâture intensive, ce qui indique que le bétail ne s'y intéresse pas en priorité. En Ethiopie, l'espèce est recommandée pour la conservation du sol.



FigureN°03 : les défférents plantes du séné

1- Généralités

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires (**Lebham, 2005**). Ils constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux avec plus de 8000 structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante. Ils résultent bio génétiquement de deux voies synthétiques principales : la voie shikimate et acétate (**Lugasi et al., 2003**).

Les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes simples et proanthocyanidines) forment le groupe des composés photochimiques le plus important des plantes (**Beta et al., 2005**).

L'élément structural de base est un noyau benzoïque auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...) (**Bruneton, 1993**).

Les fonctions principales attribuées à ces composés chez les végétaux sont la protection contre les pathogènes et les herbivores ainsi que la limitation des dommages dus aux radiations UV. Dans ce cas, ils agissent par effet d'écran et par effet antioxydant (**Lebham, 2005**).

1-2-Classification des composés phénoliques :

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyle, en plus d'autres constituants (**Salunkhe, 1990**). Les polyphénols naturels vont de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins.

Il existe différentes classes de polyphénols, notamment : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes, les lignanes, les saponines, les phytostérols ou bien phytostanols. Les plus importants sont: les acides phénols, les flavonoïdes et les tanins.

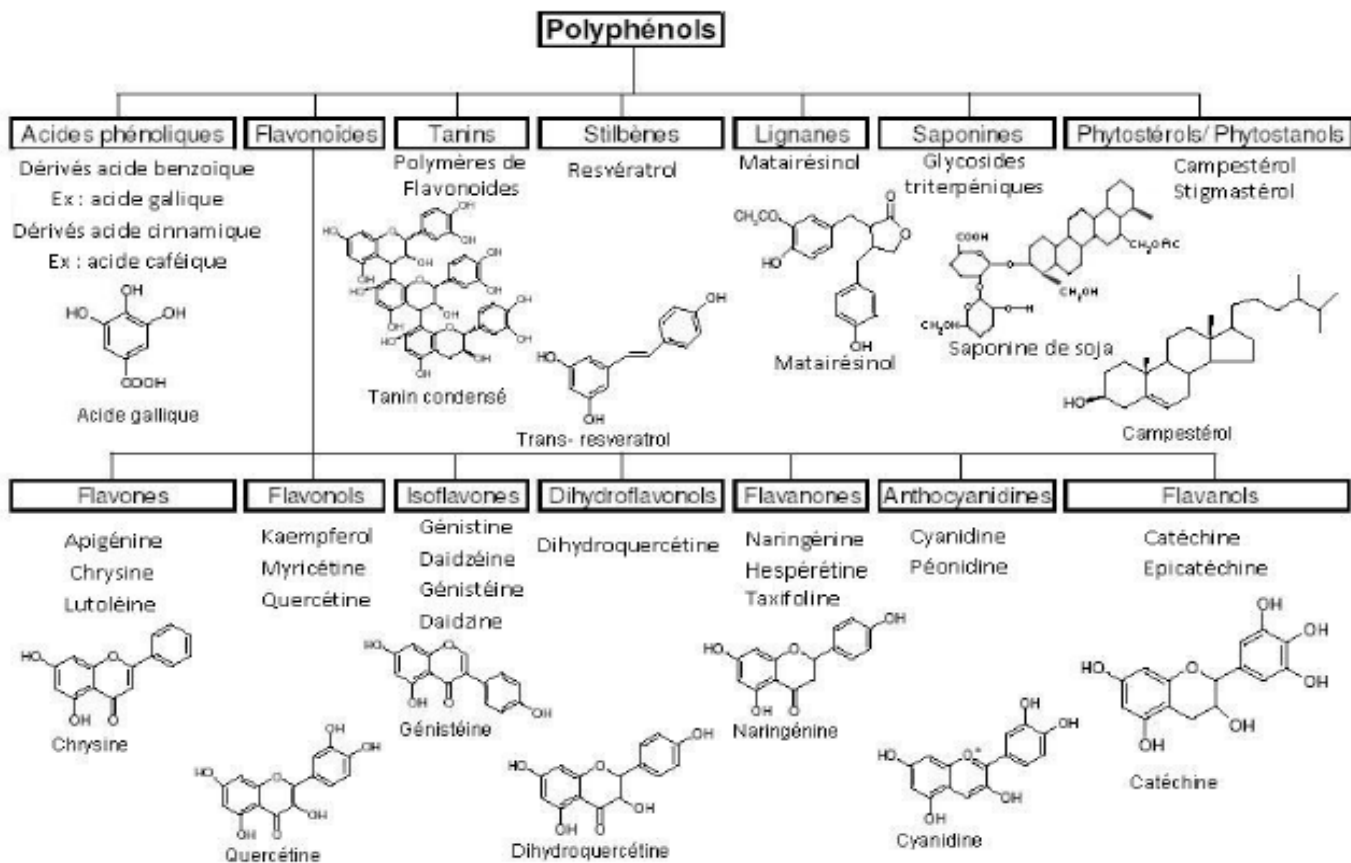


Fig.N° 04 : Les différentes classes des composés phénoliques [5]

1-2-1- Les acides phénols et les coumarines

Les acides phénoliques sont contenus dans un certains nombre de plantes agricoles et médicinales (Psotová et al., 2003). Les acides phénoliques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbone. Ils sont principalement représentés dans la variété de datte Deglet Nour par la présence de l'acide gallique, qui est généralement lié par une liaison ester à l'épicatéchine (Singleton et Timbreuse, 1978).

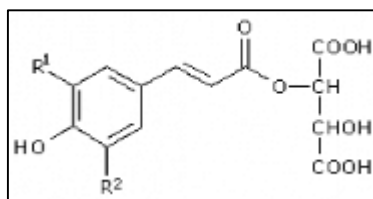
1-2-1-1-Les acides benzoïques :

Les acides benzoïques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbones. Ils sont principalement représentés par les acides p-hydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, cyringiques, salicyliques, o-hydroxybenzoïques et gentisiques. Les acides protocatéchiques et galliques ont probablement une origine et des fonctions différentes dans la plante. Le premier est très largement répandu, le second

est plus rare, on le rencontre dans la nature surtout sous forme de dimère (**Ribereau, 1968**).

1-2-1-2-Les acides cinnamiques

Ces acides possèdent une structure du type C₆-C₃. Les composés les plus fréquents sont l'acide p-coumarique, l'acide caféique, l'acide fertarique et l'acide sinapique (figure 6) (**Ribereau, 1968**).



Esters hydroxycinnamiques	R₁	R₂
Acide t-caféique	OH	H
Acide p-coumarique	H	H
Acide t-fertarique	OCH ₃	H
Acide t-sinapique	OCH ₃	OCH ₃

Fig.N° 05: Structures chimiques de quelques dérivés de l'este hydroxycinnamiques.

On rencontre au moins un de ces quatre acides dans pratiquement tous les végétaux supérieurs. Ces acides existent dans les tissus sous formes de différentes combinaisons (**Ribereau, 1968**).

1-2-1-3- Les coumarines :

On peut considérer que les différentes coumarines dérivent des acides cinnamiques ortho-hydroxylés, de même que la coumarine elle-même dérive de l'acide o-coumarique. Les coumarines les plus fréquentes sont l'umbelliférone ou ombelliférone, l'aesculétine, la scopolétine, dont les substitutions correspondent,

respectivement, aux acides : p-coumarique, caféique et férulique. Signalons également la fraxétine et la daphnétine (voir figure 7) (Dean, 1963).

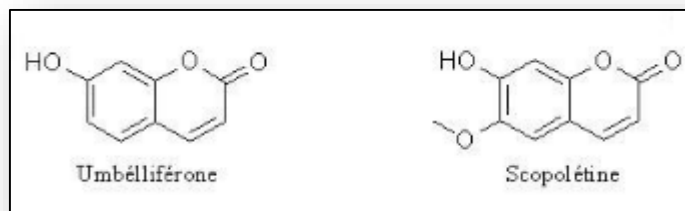


Fig.N° 06 : Structure chimique de quelques coumarines (Dean, 1963).

1-2-2- Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes (du latin *flavus*, jaune) sont des substances généralement colorées ré pondues chez les végétaux ; on les trouve dissoutes dans la vacuole à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes (Guigniard, 1996).

Le terme flavonoïdes rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines, bois. Leur fonction principale semble être la coloration des plantes (au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaïnes), même si leur présence est parfois masquée par leur présence sous forme "leuco", ce qui explique leur intérêt commercial dans l'industrie alimentaire (Gabor et al.,1988).

1-2-2-1-Structure :

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et ils possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux unités aromatiques, de cycle en C₆ (A et B), reliés par une chaîne en C₃ (figure 08) (Bruneton, 1999).

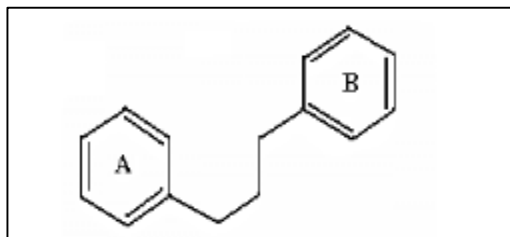


Fig. N°07 : Squelette de base des flavonoïdes (Dean, 1963).

1-2-2-2- Biosynthèse des flavonoïdes ;

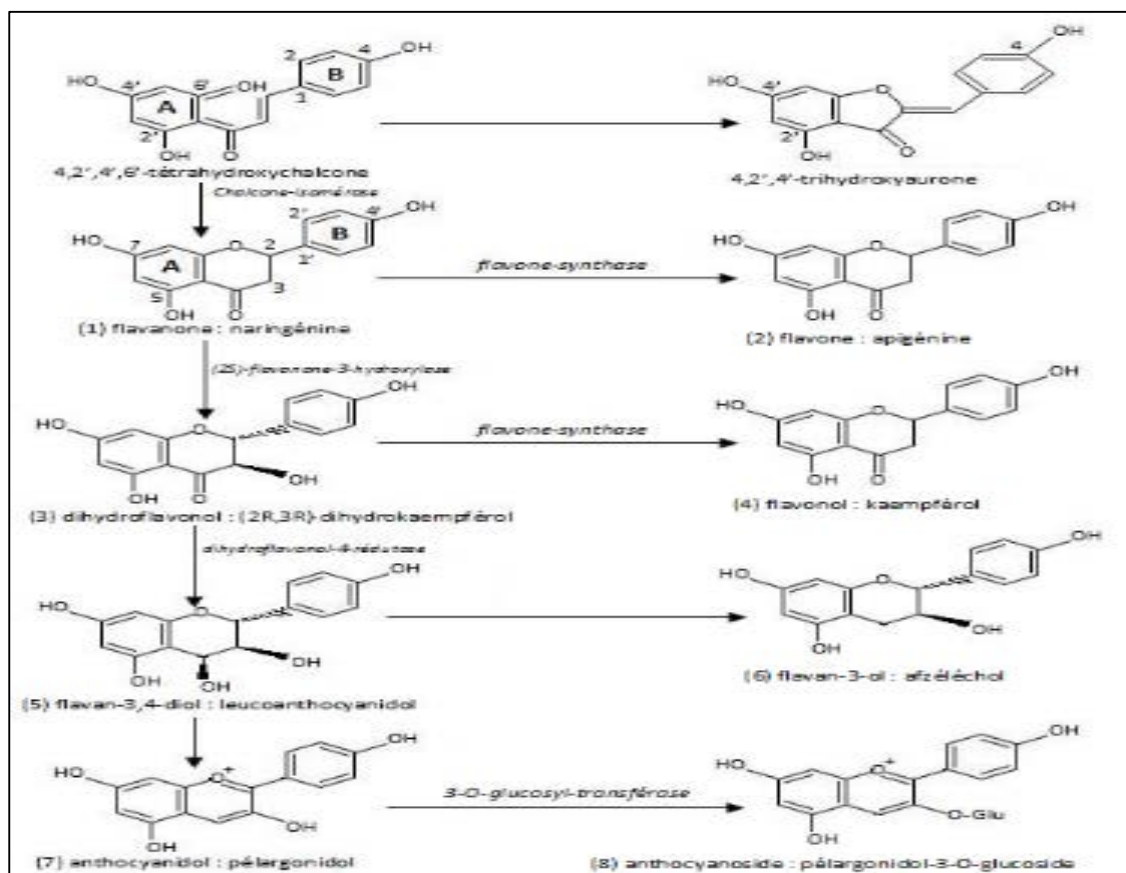


Fig. N°08 : Biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

Elle se fait à partir d'un précurseur commun, la 4, 2', 4', 6'-tétrahydroxychalcone (figure 09). Cette chalcone métabolisée sous l'action d'enzyme, la chalcone isomérase, en naringénine (1). Sur cette dernière agit la flavone synthase pour donner: apigénine (2) ou le dihydroflavonol (3). Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase, se métabolise en kaempférol (4) ou en leucoanthocyanidol. Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3,4-ols (6) et anthocyanidols (7), ce

dernier sous l'action de la 3-O-glycosyltransférase, se transforme en anthocyanoside (8) (Marfek, 2003).

1-2-2-3-Propriétés des flavonoïdes :

Comme on a cité les flavonoïdes sont présents en toutes les parties des végétaux supérieurs. Certains, sont plus spécifiques de certains tissus, comme par exemple les anthocyanes sont plutôt localisés dans les parties externes des fruits, fleurs et feuilles. Les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs. Se sont des pigments naturels au même titre que les chlorophylles (couleur verte) et les caroténoïdes (nuance jaunes et orangées).

De nos jours, les propriétés les flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-allergiques et anti-cancéreuses (Middleton et Kardasnam, 1993). La famille des flavonoides peut se diviser en six classes qui diffèrent par leurs structures chimiques: flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (Medic et al., 2004).

Parmi les nombreux pigments dérivants de cette structure, il convient de citer notamment:

1-2-2-3-1-Les flavonols :

Les flavonols (hydroxy-3 flavone) sont largement répandus et incolores, ils sont caractérisés par la présence carbonylme en position 4 et d'un groupement hydroxyle en position 3. Les flavonols qui possèdent en plus des hydroxydes en 6 ou 8 colorent certaines fleurs au jaune primevère (Guignard, 1996 ; Alais et Linden, 1997).

Parmi les flavonols les plus répandus, on trouve le kaempférol (OH en 4', 5, 7), le quercétol (OH en 3', 4', 5, 7) ces deux flavonols sont incolores; le myricétol est l'isorhamétol (figure 10).

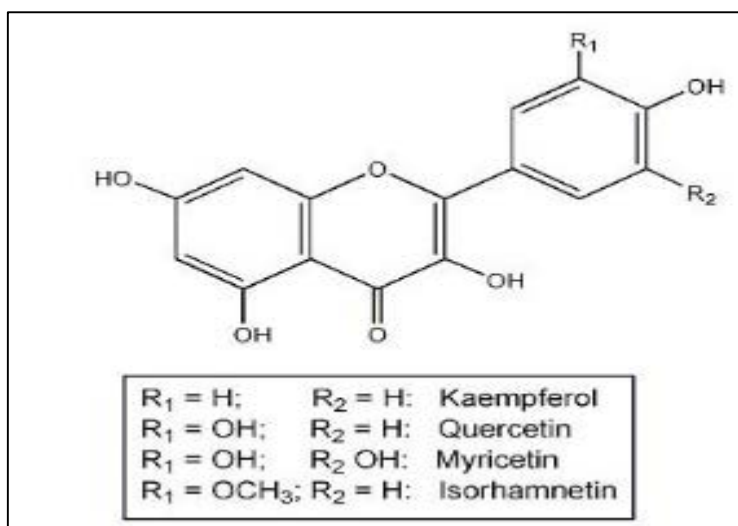


Fig.N°09: Structures chimiques de quelques flavonols (GNU, 2007).

1-2-2-3-2- Les flavanones :

Ces composés ne comportent pas des groupements OH en position 3, et présentent de fortes similitudes de structures avec les flavonols. Dans cette catégorie, il faut ranger les flavonoïdes responsables de la saveur amère de certaines pamplemousses, citrons, orange: la naringine (naringénol lié à du glucose et du rhamnose), l'hespéridine. (Alais et Linden, 1997).

1-2-2-3-3-Les anthocyanes :

1-2-2-3-3-1-Présentation :

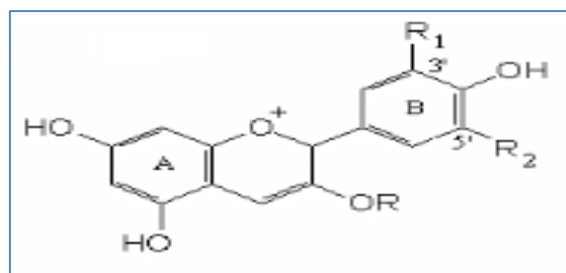
Les anthocyanes (du grec *anthos*, fleur et *Kuanos*, bleu violet) terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés (Guignard, 1996). Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange (Harborne, 1967; Brouillard, 1986).

Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'oeil nu. A l'origine de la couleur des fleurs, des fruits et des baies rouges ou bleues, elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplies d'eau (Mclure, 1979; Harborne et Grayer, 1988; Merlin et al., 1985).

Si la coloration des fleurs et des fruits est leur rôle le plus connu, on trouve également les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines. En automne, les couleurs caractéristiques des feuilles des arbres sont dues aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle.

1-2-2-3-3-2-Structures

Leur structure de base est caractérisée par un noyau "flavon" généralement glucosylé en position C₃ (**Ribereau, 1968**). Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment (figure 11). Si la forme est monoglucoside: R= glucose



Anthocyanidines	R₁	R₂
R=H		
Malvidine	OCH ₃	OCH ₃
Péonidine	OCH ₃	H
Delphinidine	OH	OH
Pétunidine	OCH ₃	OH
Cyanidine	OH	H

Fig. N°10 : Structure de quelques anthocyanidine (Ribereau, 1968).

1-2-2-3-3-3- Propriétés des anthocyanes :**a) Le spectre d'absorption :**

Comme tous les flavonoïdes, les anthocyanidines présentent une absorption caractéristique dans le domaine UV (**Markham, 1982**). La forme cationique de l'anthocyanidine est caractérisée par deux bandes d'absorption, dont une bande intense dans le domaine du visible, caractéristique pour chacune d'entre elles (**Harbone, 1967**). Ce maximum d'absorption subit un effet bathochrome quand la polarité des solvants diminue (solvatochromie négative), par contre on observe un effet hypsochrome quand les positions 3' et 5' sont méthoxylées ou glycosylées. Les sucres augmentent la solubilité et la stabilité des anthocyanes.

b) Modification de la structure en fonction de l'acidité :

Le pH est un facteur important dans le changement de couleur des anthocyanes. La variation de structure de l'anthocyanes en fonction du pH est une particularité de ces molécules. Les observations visuelles d'une solution aqueuse d'anthocyanes montrent la forte coloration rouge d'une solution à pH très acide, la coloration décroît quand le pH augmente vers la neutralité. Une solution neutre d'anthocyanes fraîchement préparée est bleue mais se décolore rapidement. Ces changements de couleurs sont dus à des équilibres chimiques entre différentes formes que peut prendre l'anthocyanes (**Brouillard et Delaporte, 1977; Brouillard, 1982**).

c) Décoloration par le Bisulfite de Sodium :

La décoloration des anthocyanes par l'acide sulfureux et les bisulfites alcalins est une réaction connue depuis longtemps. Cette réaction se fait mieux à pH 3 qu'à pH 1. D'autre part la réaction est réversible mais uniquement dans le cas des anthocyanines. La difficulté de la réaction en milieu acide s'explique par le passage du bisulfite sous forme d'acide sulfureux moins dissocié, avec diminution de la concentration en ions HSO_3^- (**Ribéreau, 1968**).

1-2-3- Les tanins :

Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation (**Hemingway, 1992**).

Les tanins sont divisés en deux groupes :

- ✓ Les tanins condensés, formés de proanthocyanidines (sous forme d'oligomères)
- ✓ Les tanins hydrolysables, esters des acides phénols et de glucose.

1-2-3-1-Les tanins condensés (flavan-3-ols) :

Les tanins condensés, appelés aussi polyphénols ou proanthocyanidine, sont largement répandus dans l'alimentation humaine (fruits, légume, thé, dattes, ...). Certains auteurs ont trouvé pour la variété Deglet- Nour que le taux est 16,66 ug/ml d'acide tannique, au stade Tmar, cette teneur reste faible par rapport à celle notée par Yahiaoui, 1999 (70 ug/ml d'acide tannique).

Il a été rapporté par Haslam (1998) que les tanins jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits (**Haslam, 1998**). Ces tanins sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison inter monomérique (**Porter et al. 1986**). Ils ne s'hydrolysent pas sous l'action des acides minéraux dilués mais forment à l'ébullition des composés insolubles appelés phlobaphènes ou rouge de tanins (**Guignard, 1996**).

1-2-3-1-1- Structure :

La structure complexe des tanins condensés est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leur centre asymétrique et leur degré d'oxydation (**Hemingway, 1992**). Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétrique C₂ et C₃ et par le niveau

d'hydroxylation du noyau B (figure 12). On distingue ainsi les catéchines (dihydroxylées) des gallocatéchines (trihydroxylées).

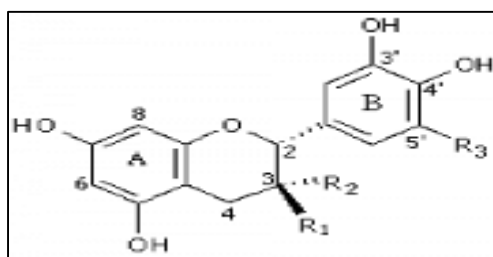


Fig. N°11 : Structure chimique des tanins condensés (Guignard, 1996).

1-2-3-2- 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, 1968**). Ce groupe de tanins est caractéristique des Dicotylédones ; on le rencontre notamment chez les rosidaees dans tous les organes : racines, tiges, feuilles ou fruits avant la maturité. Ces tanins en raison de leurs nombreux groupements OH se dissolvent plus ou moins (en fonction de leur poids moléculaire) dans l'eau, en formant des solutions colloïdales (**Guignard, 1996**).

1-2-3-2-1- Structure :

Les tanins hydrolysables sont constitués d'un noyau central -le glucose- et de chaînes latérales (en position 1, 2, 3, 4 ou 6 sur le glucose) comprenant 1 à n monomère(s) d'acide phénol. Des liaisons carbone à carbone entre noyaux (liaisons biphenyle réalisées par couplage oxydatif), conduisent à des molécules ramassées plus rigides de solubilité diminuée dites les tanins éllagiques. (**Guignard, 1996**).

1-3- Intérêts des composés phénoliques :

1-3-1- Rôle nutritionnel et thérapeutique :

Les polyphénols sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature et de ce fait, sont des éléments qui font partie de l'alimentation animale.

A titre d'exemple, l'homme consomme jusqu'à 10 g de ces composés par jour. Ces substances sont dotées de certaines activités résumées dans le tableau 16.

Tableau N°2: Activités biologiques des composés polyphénoliques (Frankel et al., 1995).

Polyphénols	Activités	Auteurs
Acides phénols (cinnamique et benzoïque)	Antibactériens	(Didry et al., 1982)
	Antifongiques	(Ravn et al., 1984)
	Antioxydants	(Hayase et Kato, 1984)
Coumarines	Vasoprotectrices et antioedémateuses	(Mabry et Ulubelen, 1980)
Flavonoides	Antitumorales	(Stavric et Matula, 1992)
	Anticarcinogènes	(Das et al., 1994)
	Anti-inflammatoires	(Bidet et al., 1987)
	Hypotenseurs et diurétiques	(Bruneton, 1993)
	Antioxydants	(Aruoma et al., 1995)
Anthocyanes	Protection des veines et capillaires	(Bruneton, 1993)
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène	(Masquelier et al., 1979)
	Antioxydants	(Bahorun et al., 1997)
	Antitumorales	(DE Oliveira et al.,

	Antifongiques Anti-inflammatoires	1972) (Brownlee et al., 1992) (Kreofsky et al., 1992)
Tanins galliques et catéchiqes	Antioxydants	(Okuda et al., 1983) (Okamura et al., 1993)

Les polyphénols jouent un grand rôle dans la quantité nutritive et hygiénique des aliments, certain d'entre eux ont des propriétés vitaminiques utilisées par l'industrie pharmaceutique. Ils interviennent également dans la digestibilité des aliments, dans l'utilisation physiologique des protéines (avec les quelles les tanins se combinent), ...etc. Les décès dus au infarctus du myocarde ou par athérosclérose coronarienne sont à associés au taux élevé des cholestérols du type LDL (Low density Lipoprotéines) circulant dans le sang. Des études ont démontré qu'une consommation importante d'antioxydants phénoliques (vitamine E, queucétine...) pouvaient être corrélée avec une baisse significative des décès par athérosclérose, en diminuant l'oxydation des LDL (**Frankel et al., 1995**).

Les polyphénols agiraient aussi en inhibant l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose qui peut conduire à l'occlusion des artères. Ils sont actifs contre de nombreux cancers (colon, estomac, foie, sein, prostate, poumons, peau, vessie,...etc) à tout les stades de cancérogénèse. Au stade d'initiation, ils agissent comme agent bloquant en empêchant l'activation de pro carcinogène. Au stade de promotion et de progression, ils agissent comme agent supprimeur de tumeurs. Les mécanismes impliqués peuvent la encore être très variés: prévention du stress oxydant, inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique et des réactions inflammatoires associées, inhibition de la protéine kinase C et de la prolifération cellulaire, induction de l'apoptose et l'inhibition de l'angiogénèse.

Les polyphénols pourraient aussi exercer des effets protecteurs contre les maladies hormonodépendantes telle que l'ostéoporose en modulant la réponse aux oestrogènes endogènes (**Scalbert et Williamson, 2000**). Enfin, les composés phénoliques et en particulier, l'acide salicylique (acide hydroxybenzoïque) ont également des propriétés antiseptiques (**Ribereau, 1964**).

Cependant les preuves de leurs effets chez l'homme restent encore insuffisantes.

1-3-2- Rôle physiologique :

L'intégration du métabolisme phénolique dans le programme général du développement d'un organe végétal pose en elle-même la question d'un rôle éventuel de ces substances.

Des travaux plus anciens ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques: croissance cellulaires, différenciation, organogénèse, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation (**Alibert et al., 1977**).

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques de feuilles, ils sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements UV (**Hadi, 2004**).

Les pigments responsables de la coloration des fleurs représentent des signaux visuels qui attirent des animaux pollinisateurs. La plus part de ces pigments sont des anthocyanes, des aurones et des chalcones. D'autres polyphénols incolores tels que des flavonols et flavanones interagissent avec des anthocyanes pour altérer, par co-pigmentation, la couleur des fleurs et des fruits (**Brouillard et al., 1997**).

La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (**Rees et Harborne, 1985**). Des chercheurs s'intéressent de plus en plus à l'identification des principes actifs dans les extraits avec l'étude complémentaire intensive de leur mécanisme d'action (**Sun et al., 2002**). (**Ziouti et al., 1998**), ont étudié l'implication

des composés phénoliques du palmier dattier dans la réaction de défense de cette plante contre le bayoud, maladie infectieuse due à un champignon tellurique *Fusarium oxysporum f.sp* et il ont étudié aussi les résultats relatifs à l'effet de l'inoculation par l'agent pathogène sur la composition phénolique et sur les enzymes d'oxydation des phénols. Ces composés pourraient contribuer dans la défense du palmier puisque l'insolubilisation des phénols dans les parois cellulaires participe au renforcement et à la rigidification de celles-ci qui deviennent alors moins dégradables par les parasites (**Tan et al., 1992**).

Le monde animal est lui aussi très concerné par les composés phénoliques et en particulier les flavonoïdes. On trouve par exemple de: la chrysin, la quercétine, la galangine dans la propolis des abeilles. Ces insectes la fabriquent à partir des sécrétions des bourgeons de nombreux arbres comme le bouleau, l'aulne, l'épicéa, le sapin, le saule, l'orme et la modifient par leurs enzymes salivaires. Les abeilles mettent instinctivement en œuvre les propriétés antifongiques et antibactériennes des polyphénols pour aseptiser leur ruche et en colmatant les fentes. Les propriétés cicatrisantes et anti-infectieuses de la propolis étaient, entre autre, utilisées par les civilisations égyptienne, romaine, grecque et inca (**Ghazi et Shraoui, 2005**).

1-3-3-Rôle technologique :

Généralement les polyphénols sont partiellement responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux. L'astringence et l'amertume des nourritures et des boissons dépendent de la teneur en polyphénols (**Lugasi et al., 2003**).

L'astringence est la capacité des tanins à former des complexes stables avec les protéines et les sucres qui leur confère leurs propriétés gustatives et leur astringence, car ils précipitent les protéines salivaires entraînant avec elles leur "cortège" de molécules d'eau qui lubrifiaient alors la muqueuse buccale et qui crée une sensation d'assèchement dans la bouche (**Bravo, 1998 ; Vergé et al. 1999**).

L'astringence est liée à la polymérisation des tanins puisque la diminution de l'astringence dans les fruits lors de leur maturation est due à une augmentation de la polymérisation des tanins (**Peronny, 2005**).

Ainsi dans la technologie de certains produits végétaux, les transformations des composés phénoliques jouent un rôle important: ceci est valable aussi bien pour la fermentation des feuilles de thé et des grains de cacao...etc. (**Ribereau, 1964**).



**Les
bac
tér
ies
étu
dié
es**

Généralités

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les Procaryotes ,car ils ne possèdent pas de membranes nucléaires .Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les Eucaryotes (champignons ,algues , protozoaires) .

Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1µm. On peut les avoir en Leus formes peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions)ou spirales (spirochètes)(**Nauciel et vildè2005**).

1-La famille des Enterobacteriaceae :

Les entérobactéries constituent une famille de bactéries très importantes comportant de nombreux germes subdivisés eux même en espèces .Ce sont des bacilles à Gram négatif dont la plupart sont mobiles, grâce à des flagelles disposés d'une manière apéritrice . Ils sont aéro-anaérobie facultatifs, et se cultivent facilement sur le milieu usuel (**Nauciel et vildè2005**).

La plupart des espèces qui composent cette famille sont des hôtes soit normaux soit pathogènes du tube digestif de l'homme et des animaux (**Fauchère et Avril,2002**).

1-1-Escherichia coli :

Bactérie isolée en1885 par Théodora Van Escherichia dont les selles de nourrissons. Elle communément appelée colibacille c'est une bactérie fécales très commune chez l'être humain et généralement commensal

Certaines souches peuvent être ou devenir pathogènes et vont alors entraines des gastro-entérites des infections urinaires des même des septicémies (**Cherbuy,1991**).

1-1-1-Classification botanique de souche *E. coli* (Chiyry R, 1982).**TableauN°3 :** Classification botanique de souche *E. coli*

Règne	procaryote
domaine	Bacteria
classe	Gammaproteobacteria

ordre	Enterobactériaes
Famille	Enterobactèriaceae
Genre	Escherichia
Espèce	Escherichia coli

1-1-2-Habitat :

E.coli, hôte normal de l'intestin de l'homme et les animaux, souvent retrouvé en petit nombre dans les urines saines. C'est une bactérie largement répandue dans les milieux extérieurs, elle ne semble cependant pas pouvoir y mener une vie saprophyte authentique, sa présence en quantité importante témoigne d'une contamination fécale récente.

1-1-3-Caractéristiques morphologiques et culturales

Le colibacille, ou *E. coli* est un bacille à Gram négatif (**Fauchère et Avril, 2002**), Non sporulée (**Madigan et Martinko, 2005**), de 2 à 3 µm de long sur 0.7 de large. La culture du genre en bouillons est facile, elle donne un trouble dans la masse des ondes noires avec une légère voile, l'odeur fécaloïde est caractéristique sur gélose. Sa culture est réalisée à 37°C (entre 15 et 45°C), les colonies observées sont moyennes, légèrement opaques blanchâtres et brillantes (**Buagnicont, 1995**).

1-1-4-Caractéristiques biochimiques

E. coli possède des caractères biochimiques particuliers permettant de la différencier des espèces voisines, la production d'indole à partir du tryptophane, l'absence d'utilisation du citrate comme source de carbone, l'absence de production d'acétone (réaction de Voges-Proskauer) sont constantes (**Bernard et Reynaud, 2003**).

1-1-5-Pouvoir pathogène

E. coli est la bactérie la plus souvent en cause dans les infections urinaires communautaires qu'elle soit basses (cystite) ou hautes (pyélonéphrite). L'infection des voies urinaires se fait en général par voie ascendante (**Nauciel et Vildè, 2005**).

Elle peut être responsable des infections abdominales comme des cholécystites, péritonite ou salpingites (**Eyquen, 2000**).

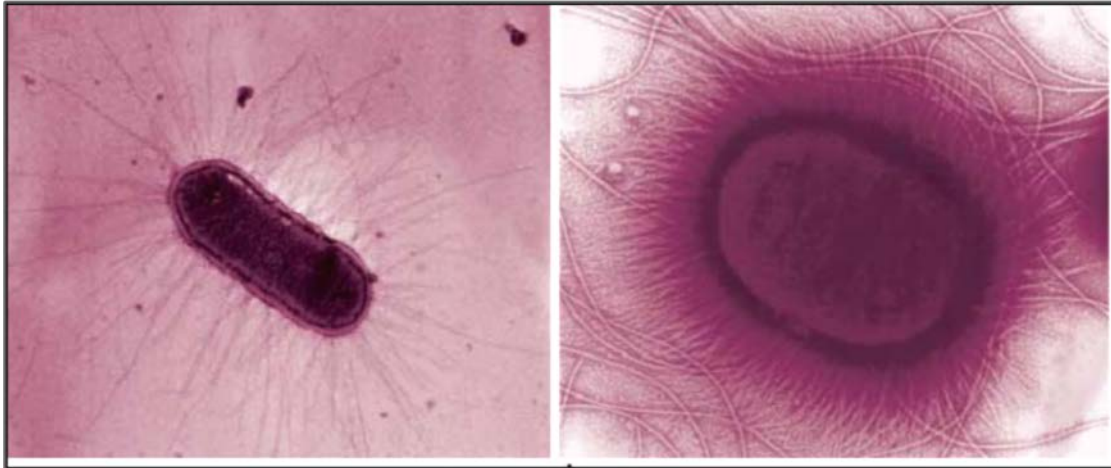


Figure N°12 : La bactérie *E .coli*

1-2-La famille des *Pseudomonadaceae*

Diverses espèces bactériennes provenant de l'eau ou de milieux humides peuvent coloniser et éventuellement infecter l'homme. Leur place est très importante dans les infections nosocomiales (**Nauciel et Vildè, 2005**).

1-2-1-*Pseudomonas aeruginosa*

1-2-1-1-Généralités

Le genre *Pseudomonas* est fait de bacilles mobiles (ciliature polaire), aérobies strictes, se cultivent facilement sur les milieux usuels. *P.aeruginosa* (ou bacille pyocyanique) se caractérise par la pigmentation bleu-vert de colonies (**Nauciel et Vildè, 2005**).

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont caractérisées par leur résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques, elles accumulent parfois les métaux et ce sont des producteurs des pigments (**Bagnicont, 1995**).

1-2-1-2-Classification botanique (Pillet et al ,1986).

Tableau N°4 : Classification botanique de bactérie *P .aeruginosa*

Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonasa</i>

Espèce	<i>P.aeruginosa</i>
--------	---------------------

1-2-1-3-Habitat

Pseudomonas aeruginosa est très répandue dans l'eau et les milieux humides. Elle peut aussi coloniser l'homme (**Nauciel et Vildè, 2005**).

Cette bactérie est répandue dans la nature, vit sans l'eau et le sol, on la trouve aussi dans l'environnement hospitalier, surtout dans les endroits humides. On la trouve aussi dans le tube digestif de l'homme et rarement dans la salive (**Fauchère et Avril, 2002**).

1-2-1-4 Caractéristiques morphologiques et culturaux

Le genre *Pseudomonas* appartient à la famille de *Pseudomonaceae*, il s'agit de bacilles droits ou incurvés, dont la paroi est de type Gram négatif. Ces bactéries sont mobiles par flagellations polaires, ou immobiles. Il s'agit de bactéries dont le métabolisme est respiratoire et jamais fermentaire ; toutefois elles peuvent se développer dans une atmosphère pauvre en oxygène. Leur croissance est possible dans une large gamme de températures (de 4°C à 43°C), avec de nombreuses souches psychrophiles (**Berlin, 1997**).

P.aeruginosa est une bactérie aérobie stricte. Elle croit très facilement sur milieux ordinaires, car elle a très peu d'exigences nutritives. En 24 heures, sur gélose nutritive, les colonies apparaissent souvent dissociées. Dans 95% des cas, les colonies de *P.aeruginosa* sont pigmentées en vert du fait de la production de deux pigments : la pyocyanine et pyoverdine (**Berche et al., 1989**).

1-2-1-5-Caractéristiques biochimiques

Elles possèdent une catalase et une oxydase et sont prototrophes vis-à-vis de nombreuses sources de carbone, elles n'ont pas d'exigences de croissance et sont résistantes à toutes sortes d'agents antimicrobiens (**Ebrilin, 1997**).

P.aeruginosa possède aussi une arginine dihydrolase et environ 20 à 80% des souches appartenant à cette bactérie possèdent une gélatinase et désoxyribonucléase.

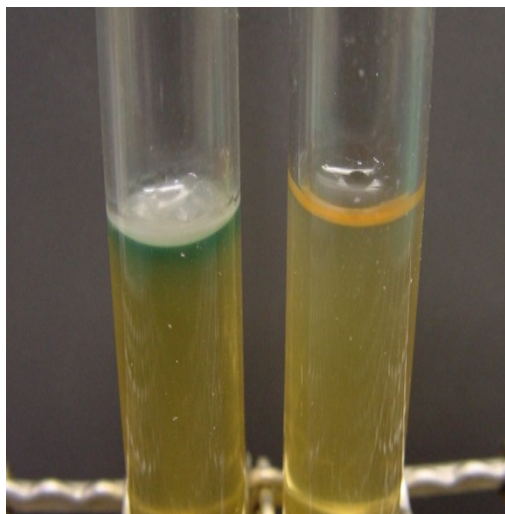
P.aeruginosa est capable de produire la pyocyanine et la pyoverdine , et elle est sensible à la polymyxine (**Berche et al,1989**).

1-2-1-6-Pouvoir pathogène :

la bactérie n'est pas pathogène pour le sujet normal, mais elle peut provoquer des infections parfois sévères chez les sujets dont les défenses sont amoindries .

Elle peut provoquer des infections urinaires, bronchiques (en particulier chez les sujets atteints de mucoviscidos), pulmonaires, oculaires (kératite ou endophtalmie), ostéo-articulaires.

Elle peut aussi infecter des lésions cutanées (brûlures), des plaies traumatiques ou postopératoires, provoquer des otites externes (pouvant évoluer d'une manière invasive chez les sujets âgés et diabétiques), des septicémies ,des endocardites (**Nauciel et Vildè, 2005**).



Pseudomonas aeruginosa

- Gram-negative aerobic bacteria
- Commonly found in the environment
 - At any moist location
- Common cause of nosocomial infections



Dr. TV Rao MD

4

FigureN°13 : La bactérie *P .aeruginosa*

Introduction

Arbrisseau originaire de régions désertiques, le Séné peut atteindre 2 mètres de haut et porte des feuilles composées, les fleurs jaunes irrégulières ont un calice et des étamines stériles. Le fruit est une gousse aplatie contenant de 6 à 8 graines. Pour ces vertus, le séné est utilisé à des fins thérapeutiques. Les parties utilisées sont les gousses et les feuilles en infusion ou en macération.

Le Séné renferme des flavonoïdes, des mucilages, des anthraquinone et des hétérosides dont les principaux composés sont les sénosides A et B.

Ce présent travail va relever l'importance du Séné largement connu, répandu et utilisé dans les pays arabes tels que l'Algérie et en l'Europe.

1-1-But

Notre travail, a pour objectif :

- ✓ l'extraction des composés polyphénols de feuilles de séné par méthode d'extraction soxhlet.
- ✓ Dosage de composés polyphénols.
- ✓ L'étude et évaluation de l'effet antibactérien de l'extrait de séné vis-à-vis des souches bactériennes *E. coli*, *Pseudomonas*.

1-2 -Lieu de travail : Notre travail a été réalisé au niveau des laboratoires de biochimie et de microbiologie de l'université de Mostaganem.

1-3-la matière végétale utilisée

Nous avons utilisé pour cette étude les feuilles de séné connues pour leur effet bénéfique sur la santé et ont été sélectionnées parmi les plantes médicinales utilisées dans la médecine traditionnelle en Algérie

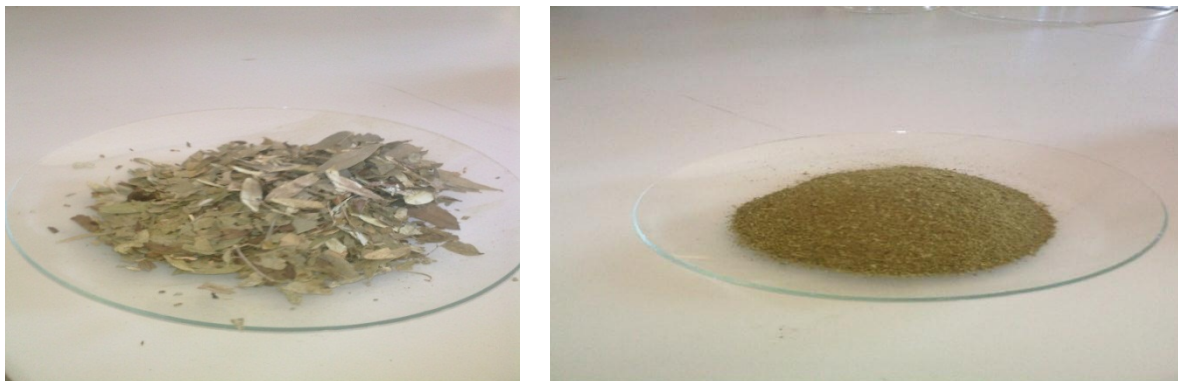


Figure N°14 : Les feuilles de séné (original, 2016).

1-4-1 Extraction par soxhlet

Un extracteur soxhlet (ou appareil de soxhlet) est une pièce de verrerie utilisée en chimie analytique et en chimie organique, elle permet de faire l'extraction par solvant continu. Cet appareil porte le nom de son inventeur Franz von Soxhlet.

1-4-1-Mode opératoire

Cette méthode, repose sur les étapes suivantes :

- ✚ 25g de feuilles de séné broyées à l'aide d'un mixeur, le broyat est mis dans la cartouche puis placé dans le tube spécialement conçu; un ballon est relié contenant 500ml de méthanol à 80%. On procède au chauffage du solvant.
- ✚ L'extraction est réalisée pendant 8 cycles.
- ✚ le méthanol de l'extrait est évaporé sous vide à l'aide d'un rotavapor, l'extrait ainsi obtenu est dosé à l'aide d'un spectrophotomètre.

- ✚ Il doit être conservé au frais et à l'obscurité pour que les composés phénoliques ne perdent pas leur activité d'une part et empêcher leur oxydation d'autre part.

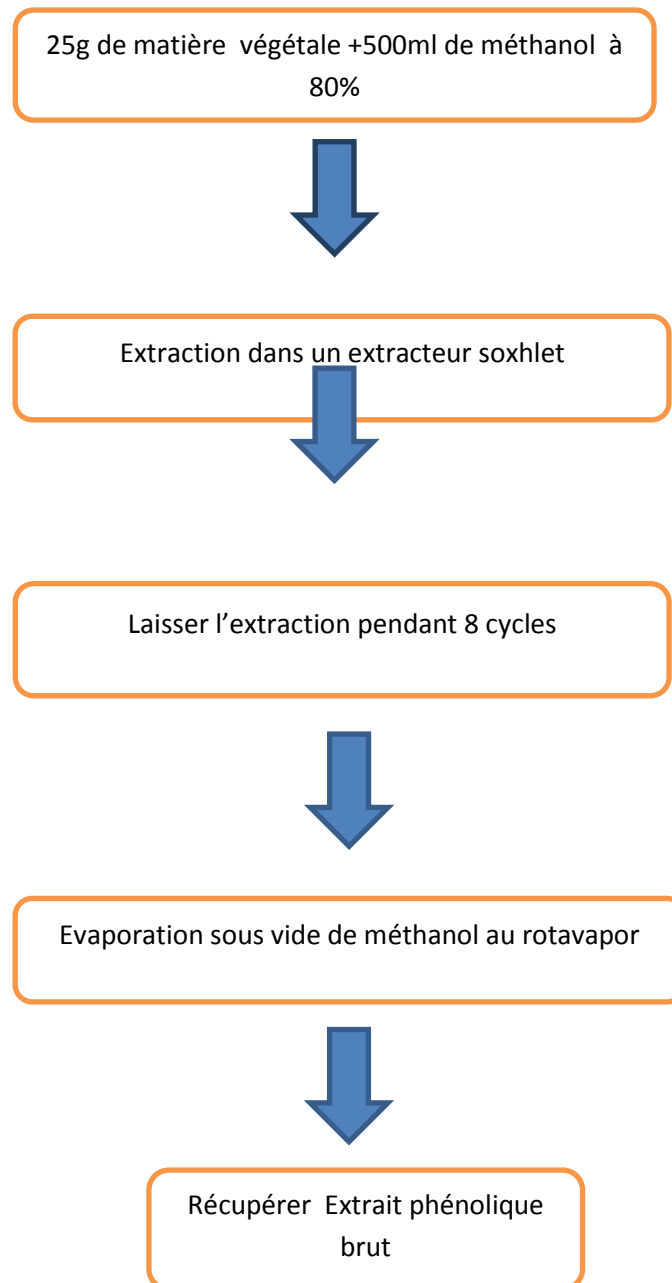


Diagramme N° 15 : Méthode d'extraction par soxhlet.

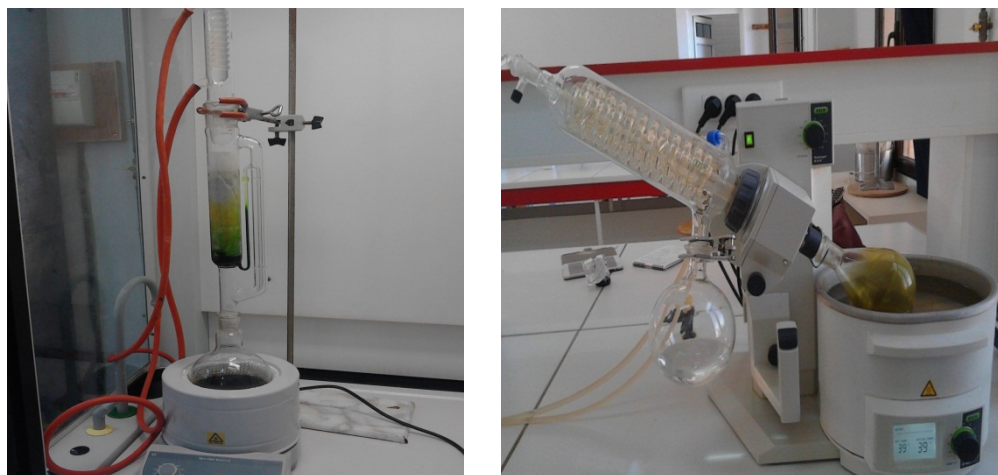


Figure N°16 : Extracteur soxhlet et rotavapor d'extrait de polyphénol brut

1-5- Dosage des polyphénols totaux

La quantification des polyphénols totaux est basée sur la réaction de Folin-Ciocalteu.

Cette méthode est choisie pour les raisons suivantes :

- ✓ c'est une méthode bien standardisée, elle répond aux critères de faisabilité et de reproductibilité;
- ✓ la disponibilité du réactif de Folin;
- ✓ la grande longueur d'onde (760nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent coloré (**Huang et al., 2005**).

1-5-1- Principe

L'ensemble des composés phénoliques est oxydé par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Ribéreau-Gayon, 1968**). L'absorption est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Charpentier et Boizot, 2006**).

1-5-2- Protocole

Un volume de 200 µl de extrait brut méthanoïque de chaque partie de la plante (feuilles) sont introduit dans des tubes à essai, le mélange (1ml du réactif de folin ciocalteu dilué 10 fois et 0,8 ml de carbonate de sodium à 7.5% est additionné). Les tubes sont agités et conservés durant 30minutes à la température ambiante.

L'absorbance est mesurée à 750nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre jenway 6504 UV/VIS.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif. La courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0,03-0,50 mg/ml), et est exprimée en mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait) selon l'équation :

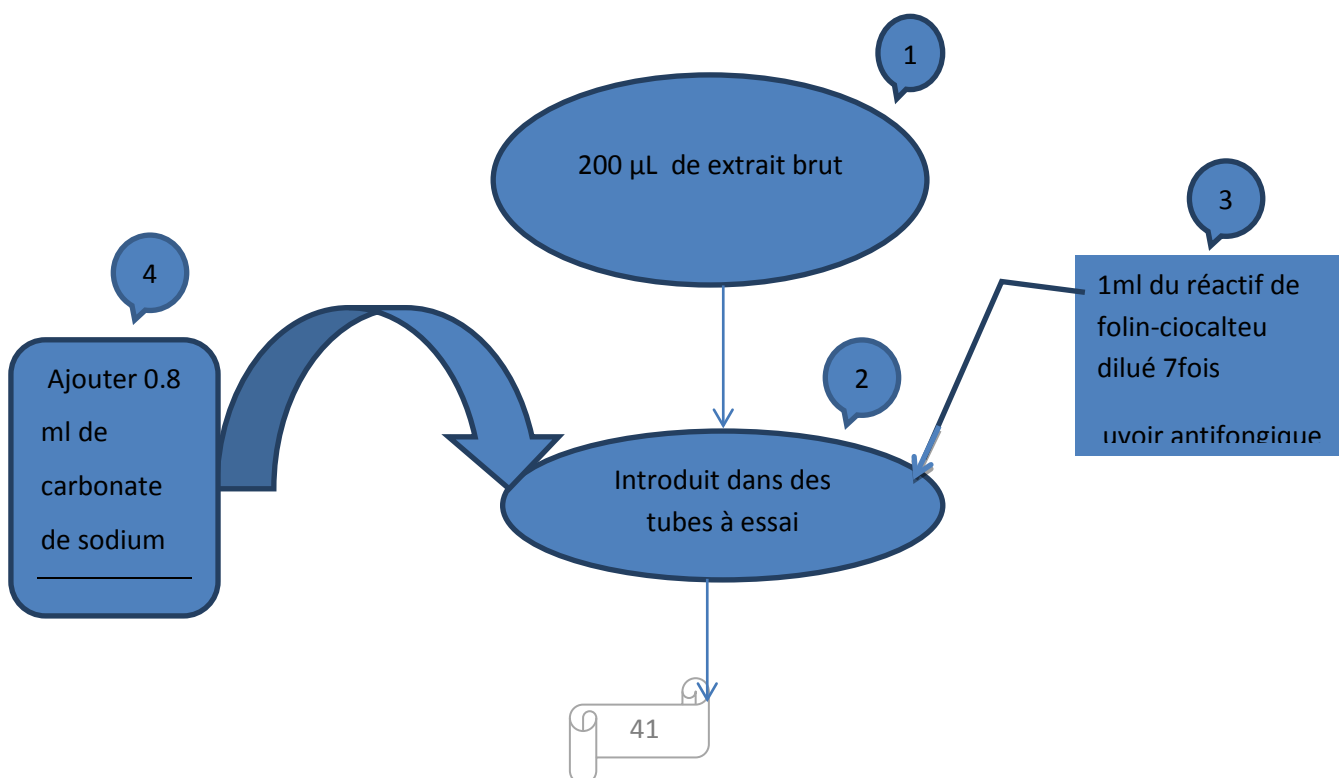
$$T = c \cdot v / m$$

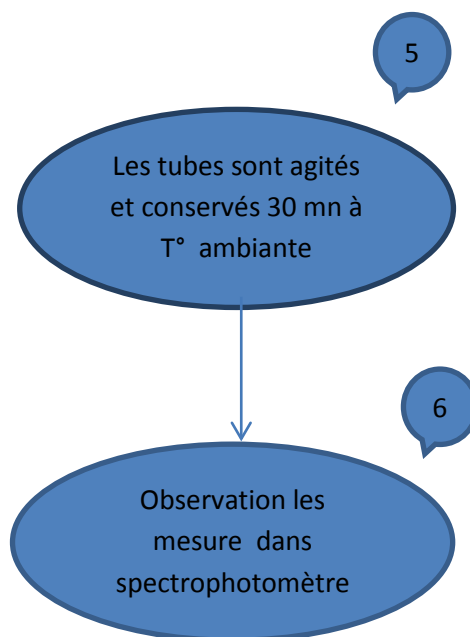
T : contenu total des polyphénols (mg équivalent acide gallique/g d'extrait).

c : concentration en équivalent acide gallique (mg/ml).

v : volume de l'extrait (ml).

m : masse de l'extrait (g) (**Madi, 2010**)





DiagrammeN°17 : Récapitulation des étapes de dosage des polyphénols totaux.

1-6-Préparation des pré-cultures

1-6-1-Repiquage des souches bactériennes

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir des cultures jeunes et des colonies isolées servant à préparer l'inoculum (**Moroh et al., 2008**).

1-6-2- Préparation de l'inoculum

Préparer des suspensions bactériennes de chaque souche (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) : à l'aide d'une anse de platine stérile, on prélève une colonie bien isolée d'une culture pure de chaque souche et on l'écrase sur la paroi de tube qui contient 5ml de bouillon nutritif, puis on incube dans l'étuve à 37°C pendant 3 à 5 heures. La suspension bactérienne est préparée de façon à obtenir un inoculum de 10^6 UFC /ml (UFC= unités formant colonies) (**Moroh et al., 2008**).

1-6-3-Technique des Puits

Elle consiste à creuser des puits dans la gélose à l'aide d'un emporte-pièce. Dans ces puits, l'extrait à tester est déposé, ceci permet une diffusion profonde dans le milieu de culture (Menghindi *et al.*, 1987).

L'effet antibactérien des différents extraits dilués à 50 % a été étudié pour chaque souche bactérienne. À partir d'une culture de 18 à 20 h (10^5 - 10^6 UFC/ml).

L'ensemencement de l'inoculum de 1 ml est réalisé en surface du milieu Mueller Hinton préalablement coulé dans des boîtes de Pétri. Après 15 mn, des puits ont été creusés à l'aide de pipettes Pasteur. Le fond des puits est obturé par une goutte de gélose Mueller Hinton pour limiter la diffusion des extraits sous la gélose. Ensuite, quelques gouttes de chaque extrait dilué sont distribuées dans chaque puit. Après diffusion (20 mn), les cultures sont incubées dans des étuves à la température de 37 °C pendant 24 h. Les auréoles d'inhibition sont mesurées par un pied à coulisse. Le diamètre du puits (5 mm) est inclus dans la mesure. Les résultats sont représentés sous forme de tableaux.

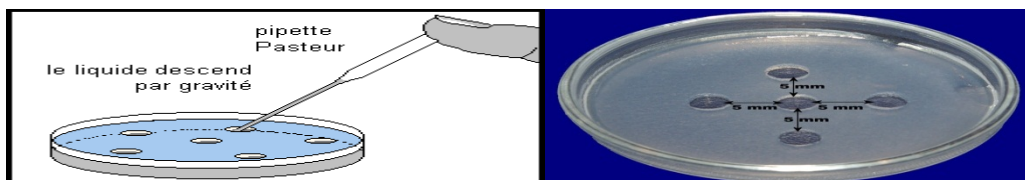


Figure N°18 : Technique de diffusion en puits

Résultats et discussion

1-Résultat de rendement en extrait séné

Calcul du rendement en extrait :

Dt (%)=11.9%.

2-Résultat de densité optique des différentes concentrations d'a gallique

Tableau N°5 : La densité optique des différentes concentrations de dosage acide gallique.

Concentration de l'acide gallique mg/l	100%	80%	60%	40%	20%
Densité optique(760nm)	0.080	0.065	0.018	0.017	0.006

Le tableau N°6, représente les densités optiques obtenues suit au dosage des différentes doses de l'extrait polyphénolique obtenu.

Tableau N°6 : La densité optique des différentes concentrations de l'extrait

Concentration de l'extrait mg/l	100%	80%	60%	40%	20%
Densité optique (760nm)	0.173	0.092	0.089	0.087	0.068

Le tableau N°6 et fig. N°14, La quantité de polyphénols totaux calculés l'aide de l'équation de la droite d'étalonnage permet d'aboutir à 34 mg/l de MS. Ce résultat met en évidence que l'extrait de feuille de séné est riche en polyphénols totaux.

Ces résultats enjoignent ceux trouvés par (**Pandino et al., 2011**). La courbe d'étalonnage obtenue, en prenant l'acide gallique à différentes concentrations comme standard, représentée dans la figure 12, montre la linéarité de la réponse du détecteur en fonction des différentes concentrations. Le choix de ce modèle de représentation est fondé sur la méthodologie de plusieurs auteurs, notamment **Mujica et al., (2009)**.

Résultats et discussion

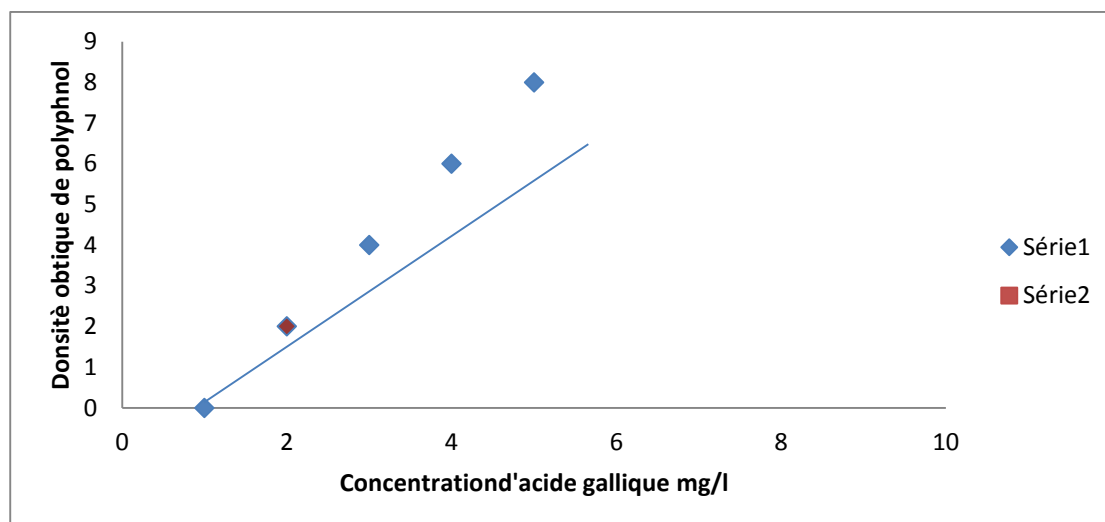


Fig N°14 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

En se basant sur les valeurs d'absorbance, les extraits polyphénoliques réagissant avec le réactif de Folin-Ciocalteu, et comparées à la solution standard d'acide gallique, les résultats de l'analyse quantitative des composés phénoliques totaux sont donnés dans le tableau N°5.

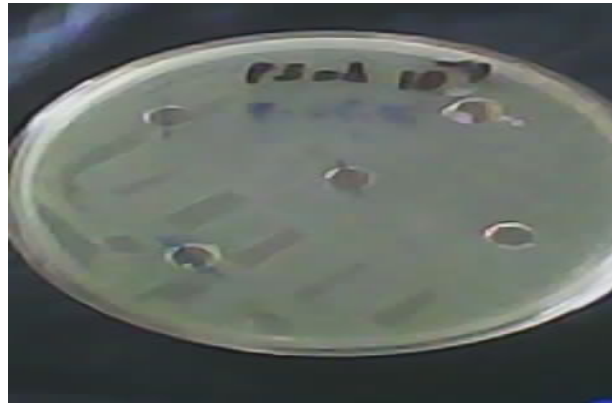
3-Resultats des tests antibactériens

3-1-l'effets de extrait des polyphénols totaux du séné sur *E. coli* et *P.aeruginosa*

Les résultats obtenus et représentés dans le tableau N°7 montrent que l'extrait de feuilles de séné récupéré par la méthode de soxhlet, a un effet inhibiteur sur la souche d'*Escherichia coli* même pour les plus faibles concentrations testées. Cependant plus la concentration augmente plus l'inhibition est importante. Par ailleurs, concernant *P.aeruginosa* et quelques soient les concentrations testées, les inhibitions semblent légèrement moindres par rapport à celles obtenues avec *E.coli*.



FigN°15 : Effet des polyphénols totaux du séné sur *Escherichia coli*



FigN°16 : Effet des polyphénols totaux du séné sur *P.aeruginosa*

Résultats et discussion

Tableau N°7 : Résultat des taux d'inhibition (mm) obtenus par *Escherichia coli* et *P. aeruginosa* de l'extrait polyphénolique (analyse de la variance mono factorielle suivie d'une comparaison des moyennes deux à deux selon le test de Newman-Keuls)

Bactéries [C]	100%	80%	60%	40%	20%	Effet de concentration
<i>E.coli</i>	13 ± 5.35	14.6 ± 5.938	11.6 ± 6.337	13.2 ± 6.648	9.6 ± 6.6	(p/0.01)
<i>P. aeruginosa</i>	10.6 ± 3.286	8.6 ± 3.435	12 ± 5.75	12 ± 2.236	6 ± 2.646	(p/0.01)

Discussion générale

La multiplication des infections humaines, nous a amené à rechercher dans les ressources naturelles que sont les plantes médicinales, des substances à moindre coût et surtout sans effets secondaires, et ayant des propriétés antibactériennes assez intéressantes.

Dans cette étude nous avons évalué l'activité antibactérienne d'extrait de feuilles de plante médicinale, le séné (*Acacia angustifolié*) sur deux souches bactériennes, à savoir *E. coli* et *P.aeruginosa*, responsables des plusieurs infections chez l'homme et les animaux

Après analyse de nos résultats, il ressort que les deux bactéries sont sensibles à l'action des composés phénoliques extraits des feuilles du séné.

D'autre part, on remarque que *E. coli* est la plus sensible parmi les deux souches bactériennes étudiées, avec des diamètres d'inhibition plus élevés.

La sensibilité de ces bactéries s'explique par le fait que ces souches sont des bactéries à gram négatif caractérisées par une paroi fine qui a permis aux extraits de plantes de pénétrer dans le cytoplasme et agir sur elle (**Fauchère et Avrile ,2002**).

Selon **Macheix (2005)**, le métabolisme phénolique est très sensible aux facteurs de l'environnement, qu'ils soient de nature physique, chimique ou biologique, De plus, ces composés participent de façon active aux interactions de la plante avec son environnement, soit en jouant le rôle de signaux de reconnaissance vis-à-vis de certains micro-organismes, soit en lui permettant de résister à diverses agressions, d'origines biologiques ou non.

Lugasi et al., (2003) ont également rapporté que la présence des flavonoïdes est en grande partie influencée par des facteurs génétiques et des conditions environnementaux, d'autres facteurs tels que la germination, le degré de maturité, la variété, le traitement, et le stockage ont également une influence sur la teneur des composés phénoliques des plantes.

Parmi ces composés, les polyphénols qui contribuent aussi à lutter contre les bactéries en dégradant les parois des cellules (**Anonyme, 2009**) ; ils sont de plus connus pour plusieurs propriétés biologique : anti-inflammatoires, antivirales et antibactériennes (**Hadi, 2004**).

Discussion générale

Finalement, pour mieux distinguer le principe actif responsable de cet effet, il est nécessaire d'utiliser d'autres méthodes plus précises d'identification et de dosage des composés phénoliques.

Conclusion

Au terme de ce modeste travail, nous pouvons conclure que les extraits polyphénoliques de la plante étudiée, à savoir le cassia angustifolié (Séné), ont montré une certaine activité antibactérienne vis-à-vis de deux bactéries : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Le but de notre travail était de confirmer d'une manière rationnelle cette utilisation empirique de la plante ayant une réputation certaine dans la médecine populaire.

Une des vertus connues de cette plante est son utilisation dans les infections cutanées (mycoses) et le traitement de la constipation. Il faut noter que ce travail reste à compléter par une étude biochimique (dosage des principes actifs), afin de déterminer avec plus de précision les principes actifs qui composent la plante étudiée.

En perspective, il serait intéressant de poursuivre ce travail, afin de déterminer :

- ✓ Concentration minimale inhibitrice des extraits de cette plante sur les souches bactériennes étudiées.
- ✓ L'effet des extraits sur d'autres souches bactériennes pathogènes pour l'homme.
- ✓ D'autres méthodes d'extraction des principes actifs
- ✓ Faire des extractions sur d'autres plantes médicinales, qui sont très utilisées par nos populations, et tester leur activité antibactérienne.

Annexes

Annexe 1 :Milieux de culture :

Muller-Hinton :Hydrolysate de caséine	17.5g
Extrait de viande	40g
Amidon..... ;.....	1.5g
Agar	17.5g
Eau distillée..... ;	1000ml pH : 7.2

Bouillon nutritif :Peptone	5g
Na cl	5g
Extrait de levure.....	3g
Extrait de viande.....	1g
Eau distillée.....	1000ml pH :7.2

Annexe2 :Matériel de laboratoire utilisé :

- **Verrerie** : Béchers, tubes à essais ,pipettes pasteur, fioles , Ellen Mayer , flacons, verres de montres ,.....etc.
- **Autres matériels** : papier filtre stérile, écouvillons , anse à platine ,bec benzène ,boite pétré ,
- **Milieu utilisé** : Gélose **Muller**-Hinton, Bouillon nutritif , méthanol à 80%, Folin-Ciocalteu,carbonate de sodium à 7.5% , acide gallique.

Appareils utilisé :Balance , mixeur, rota vapeur agitateur magnétique ,étuve(37°C) ,Extracteur sexhlet, spectrophotomètre, Autoclave,bain marie .